



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO  
IONIZANTE EM PELE HUMANA PARA ALOENXERTO**

**SELMA CECÍLIA BOURROUL**

**Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do Grau  
de Mestre em Ciências na Área de  
Tecnologia Nuclear - Aplicações.**

**Orientadora:  
Dra. Monica Beatriz Mathor**

**São Paulo  
2004**

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

CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO  
IONIZANTE EM PELE HUMANA PARA ALOENXERTO

SELMA CECÍLIA BOURROUL



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

Orientadora:

Dra. Monica Beatriz Mathor

SÃO PAULO  
2004

*À minha mãe, por ter me mostrado os primeiros caminhos.*

*Ao Armando, por ter tornado minha escolha possível.*

*Ao Giuliano, por sua alegria.*

## Agradecimentos

À Dra. Monica Beatriz Mathor, pela orientação sempre presente, por sua amizade e principalmente compreensão.

Ao CNPq, pela bolsa de Mestrado.

Ao IPEN, pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. José Roberto Rogero, Presidente da Comissão de Pós Graduação, pelo apoio à nossa participação em Congressos, que se traduziu na divulgação e enriquecimento deste trabalho.

À Divisão de Ensino, em especial ao Fernando Moreira, à Ilze Puglia, à Vera Lucia Garcia e à Ana Maria Benassi, pelo apoio e atenção.

Ao CTR, pelo acolhimento e por propiciar condições para o desenvolvimento do nosso trabalho.

À Dra. Marisa Roma Herson, por seu interesse, sugestões e inestimável colaboração pessoal que possibilitaram a realização deste trabalho.

Ao Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo fornecimento dos tecidos necessários à pesquisa.

Ao Dr. Eddy Segura Pino, por ter tornado possível a caracterização biomecânica da pele, mas principalmente, por suas importantes sugestões neste estudo.

Ao Dr. Sergio Ferreira de Oliveira, por seu interesse neste trabalho, por ter realizado o estudo e análise ultra-estrutural dos tecidos irradiados.

Ao amigo Msc. Alex Kors Vidsiunas, pela preparação e inclusão das amostras para observação no microscópio eletrônico de transmissão.

Ao Gaspar Ferreira de Lima, por seu profissionalismo nos cortes e contrastação do material para microscopia eletrônica.

À Dra. Kayo Okasaki, à Msc. Míriam Suzuki e à Dra. Márcia Silva, pelas instruções nas observações e registros fotográficos da microscopia óptica.

Ao Dr. Jarbas Arruda Bauer, excelente professor, por apresentar a histologia como um estudo dinâmico e integrado.

Ao Dr. Wilson Aparecido Parejo Calvo, pela colaboração e informações sobre irradiação no acelerador de elétrons.

Aos Eng<sup>o</sup>. Elizabeth Somessari e Carlos Gaia da Silveira, pela irradiação das amostras, sugestões e explicações. Ao Hélio Antonio Paes, pela fabricação do dispositivo de proteção do termopar para as medidas de temperatura no acelerador de elétrons.

À Msc. Célia Marina Napolitano e ao Ethel Martins Pedroso pela dosimetria.

Ao Manuel Nunes Mori, pela padronização do corte das amostras e pela realização dos primeiros ensaios biomecânicos.

Ao Djalma Batista Dias, pela realização dos ensaios biomecânicos e por suas explicações sobre a técnica de funcionamento da máquina Instron, que possibilitaram minha independência na realização dos ensaios de tração .

Ao Daniel Cavalli, pela ajuda na padronização das amostras para o estudo biomecânico.

À amiga Elisa Santos, pela colaboração nas primeiras lâminas histológicas.

À Wilma Conceição Montilha pela realização da análise estatística.

Ao Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela preparação das lâminas histológicas. À Silvana Altran do Laboratório de Cirurgia Plástica e Microcirurgia da FM-USP, por sua colaboração na entrega das amostras para histologia.

À amiga Dra. Suzi Frey Sabato, companheira de congresso, por sua amizade e incentivo.

À amiga Dra. Sueli Borrely, pelo incentivo e conselhos.

Aos amigos de equipe Maria Fátima Klingbell, Andrea Cecilia Dorion Rodas, Cynara Viterbo, Karina Lima e Luis Otávio Carvalho Kosmiskas, pelo apoio.

Aos amigos de CTR, Msc. Icimone Oliveira, Maria Fernanda Romanelli, Maria Cristina Moraes, Daniela Nardi e David Tsai, por sua amizade e ajuda.

Aos amigos do ICB Ana Lucia Mota, Augusto Montezano e Angela Bruni, por suas sugestões e amizade.

Às amigas Márcia Celina Valdez dos Santos e Nancy Umisedo , que mesmo à distância sempre deram seu apoio e carinho.

Agradeço especialmente ao Prof. Flavio Delmanto, Diretor do Núcleo de Saúde do Centro Universitário UniFMU, pois foram sua compreensão e generosidade que possibilitaram a minha dedicação integral a este trabalho.

# CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA RADIAÇÃO IONIZANTE EM PELE HUMANA PARA ALOENXERTO

Selma Cecília Bourroul

## RESUMO

A pele desempenha papel fundamental na viabilidade do organismo. Nos casos de lesões extensas, os aloenxertos apresentam-se como uma alternativa para cobrir temporariamente essas áreas. Após triagem do doador, a pele processada em glicerol concentrado (acima de 85%), pode ser armazenada nos Bancos de Tecidos. O glicerol nessa concentração possui efeito bacteriostático porém há necessidade de quarentena. A esterilização da pele por radiação ionizante é o método mais indicado pois reduz o prazo para transplante do enxerto em pacientes e sua confiabilidade é considerada excelente. Os objetivos deste trabalho foram estabelecer procedimentos de utilização de duas fontes distintas de radiação ionizante para esterilização de pele humana destinada ao aloenxerto, e avaliar a pele após exposição à irradiação gama e feixe de elétrons. Foi realizada a caracterização do tecido quanto a resposta aos ensaios de tração por meio da comparação dos valores do módulo de elasticidade entre amostras-controle e irradiadas. Amostras de pele foram submetidas a doses de 25 kGy e 50 kGy no irradiador de  $^{60}\text{Co}$  e no acelerador de elétrons. Foram realizados também estudos de morfologia e ultra-estrutura. As amostras irradiadas com gama a 25kGy, não apresentaram diferença significativa quanto aos valores do módulo de elasticidade em relação ao controle. As amostras submetidas à irradiação gama a 50 kGy e ao feixe de elétrons a 25 kGy e 50 kGy apresentaram diferença significativa quanto aos valores do módulo de elasticidade em relação ao controle. A análise das ultramicrografias revelaram modificações na estrutura e modificação no padrão de estriação das fibrilas de colágeno da derme das amostras irradiadas.

# CHARACTERIZATION OF IONIZING RADIATION EFFECTS ON HUMAN SKIN ALLOGRAFTS

Selma Cecília Bourroul

## *ABSTRACT*

The skin has a fundamental role in the viability of the human body. In the cases of extensive wounds, allograft skin provides an alternative to cover temporarily the damaged areas. After donor screening and preservation in glycerol (above 85%), the skin can be stored in the Skin Banks. The glycerol at this concentration has a bacteriostatic effect after certain time of preservation. On the other hand, skin sterilization by ionizing radiation may reduce the quarantine period for transplantation in patients and its safety is considered excellent. The objectives of this work were to establish procedures using two sources of ionizing radiation for sterilization of human skin allograft, and to evaluate the skin after gamma and electron beam irradiation. The analysis of stress-strain intended to verify possible effects of the radiation on the structure of preserved grafts. Skin samples were submitted to doses of 25 kGy and 50 kGy in an irradiator of  $^{60}\text{Co}$  and in an electron beam accelerator. Morphology and ultra-structure studies were also accomplished. The samples irradiated with a dose of 25kGy seemed to maintain the biomechanic characteristics. The gamma irradiated samples with a dose of 50 kGy and submitted to an electron beam at doses of 25 kGy and 50 kGy presented significant differences in the values of the elasticity modulus, in relation to the control. The analysis of the ultramicrographies revealed modifications in the structure and alterations in the pattern of collagen fibrils periodicity of the irradiated samples.

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>20</b>
<b>3 CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>	<b>21</b>
<b>3.1 A PELE HUMANA</b>	<b>21</b>
<b>3.1.1 Funções</b>	<b>21</b>
<b>3.1.2 Morfologia</b>	<b>22</b>
<b>3.1.2.1 Epiderme</b>	<b>22</b>
<b>3.1.2.2 Membrana Basal</b>	<b>23</b>
<b>3.1.2.3 Derme</b>	<b>23</b>
<i>3.1.2.3.1 Fibras Colágenas</i>	<i>24</i>
<i>3.1.2.3.1 Fibras Elásticas</i>	<i>28</i>
<b>3.1.3 Caracterização Biomecânica da Pele Humana</b>	<b>29</b>
<b>3.2 ALOENXERTO</b>	<b>30</b>
<b>3.3 ESTERILIZAÇÃO</b>	<b>32</b>
<b>3.3.1 Esterilização por Radiação Ionizante</b>	<b>32</b>
<b>3.4 RADIAÇÃO IONIZANTE</b>	<b>33</b>
<b>3.4.1 Radiação Gama</b>	<b>33</b>
<b>3.4.2 Feixe de Elétrons</b>	<b>34</b>
<b>3.4.3 Efeito Direto e Efeito Indireto da Radiação Ionizante</b>	<b>35</b>
<b>3.5 FONTES DE RADIAÇÃO IONIZANTE</b>	<b>35</b>
<b>3.5.1 Irradiador de Cobalto 60 (<sup>60</sup>Co)</b>	<b>35</b>
<b>3.5.2 Acelerador de Elétrons</b>	<b>36</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>39</b>
<b>4.1 MATERIAIS</b>	<b>39</b>
<b>4.1.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS</b>	<b>39</b>
<b>4.1.2 IRRADIADORES</b>	<b>40</b>
<b>4.1.2.1 Irradiador de Cobalto-60</b>	<b>40</b>
<b>4.1.2.2 Acelerador de Elétrons</b>	<b>40</b>
<b>4.1.3 ENSAIOS BIOMECÂNICOS DE TRACÇÃO</b>	<b>40</b>
<b>4.1.3.1 Corte do corpo de prova</b>	<b>40</b>
<b>4.1.3.2 Ensaio de resistência à tração</b>	<b>41</b>
<b>4.1.4 ESTUDOS MORFOLÓGICOS</b>	<b>41</b>
<b>4.1.4.1 Microscópio óptico</b>	<b>41</b>
<b>4.1.4.2 Microscópio eletrônico de transmissão</b>	<b>41</b>
<b>4.2 MÉTODOS</b>	<b>42</b>
<b>4.2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS</b>	<b>42</b>
<b>4.2.1.1 Manipulação do material biológico e instrumentos</b>	<b>43</b>
<b>4.2.1.2 Descarte do material biológico</b>	<b>43</b>

<b>4.2.2 ENSAIOS BIOMECÂNICOS DE RESISTÊNCIA À TRAÇÃO</b>	<b>43</b>
<b>4.3 HISTOLOGIA</b>	<b>45</b>
<b>4.4 ULTRA-ESTRUTURA</b>	<b>46</b>
<b>4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>47</b>
<b>4.5.1 Análise estatística descritiva</b>	<b>47</b>
<b>4.5.2 Teste de significância</b>	<b>47</b>
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>50</b>
<b>5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS</b>	<b>50</b>
<b>5.2 TESTES BIOMECÂNICOS DE RESISTÊNCIA À TRAÇÃO</b>	<b>51</b>
<b>5.2.1. Amostras submetidas à irradiação gama e ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy</b>	<b>52</b>
<b>5.2.1.1 Análise estatística</b>	<b>55</b>
<i>5.2.1.1.1 Análise estatística descritiva</i>	<i>55</i>
<i>5.2.1.1.2 Teste de significância</i>	<i>56</i>
<b>5.2.2 Amostras submetidas ao feixe de elétrons com modificação do sistema de transporte e da temperatura com dose de 25 kGy</b>	<b>58</b>
<b>5.2.2.1 Registro de temperaturas no acelerador de elétrons</b>	<b>60</b>
<i>5.2.2.1.1 Sistema de transporte de esteira</i>	<i>60</i>
<i>5.2.2.1.2 Sistema de transporte de bandeja</i>	<i>61</i>
<b>5.2.2.2 Análise estatística</b>	<b>64</b>
<i>5.2.2.2.1 Análise estatística descritiva</i>	<i>64</i>
<b>5.2.3 Amostras submetidas à irradiação gama e feixe de elétrons com dose de 50kGy</b>	<b>65</b>
<b>5.2.3.1 Análise estatística</b>	<b>67</b>
<i>5.2.3.1.1 Análise estatística descritiva</i>	<i>67</i>
<i>5.2.3.1.2 Teste de significância</i>	<i>68</i>
<b>5.2.4 Amostras submetidas a irradiação gama e feixe de elétrons irradiadas com doses crescentes de 10 kGy a 50 kGy</b>	<b>70</b>
<b>5.3 ESTUDO HISTOLÓGICO</b>	<b>72</b>
<b>5.3.1 Hematoxilina-eosina</b>	<b>72</b>
<b>5.3.2 Mallory</b>	<b>72</b>
<b>5.3.3 Picro-sirius</b>	<b>72</b>
<b>5.3.4 Resorcina</b>	<b>72</b>
<b>5.4 ESTUDO ULTRA-ESTRUTURAL</b>	<b>73</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>84</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICE A – Valores do módulo de elasticidade (MPa) das amostras do grupo controle e dos grupos irradiados a 25 kGy</b>	<b>100</b>
<b>APÊNDICE B – Valores do módulo de elasticidade (em MPa) das amostras do grupo controle e dos grupos irradiados a 50 kGy</b>	<b>101</b>
<b>APÊNDICE C – Teste de Mann-Whitney para pequenas amostras (n&lt;12)</b>	<b>102</b>
<b>ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética do IPEN</b>	<b>103</b>
<b>ANEXO B – Ofício do Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO C – Sterilization of skin allograft by ionizing radiation – artigo publicado na revista <i>Cellular and Molecular Biology</i> 48(7), 803-807</b>	<b>105</b>

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 3.1 – Representação da molécula de colágeno formada por 3 cadeias alfa. O aminoácido glicina está indicado em cor mais forte na região interna da molécula (modificado de Alberts, 1997). 25
- FIGURA 3.2 - Estrutura da fibra de colágeno: as fibras de colágeno são formadas por unidades menores, as fibrilas, constituídas por macromoléculas denominadas tropocolágeno que estão paralelamente organizadas. O tropocolágeno é formado por três cadeias peptídicas de estrutura alfa- ligadas por pontes de hidrogênio (modificado de Gartner & Hyatt, 2001). 26
- FIGURA 3.3 – Pontes de hidrogênio na molécula de colágeno: (A) entre átomos que formam a alfa-hélice (intra-molecular); (B) entre as três moléculas alfa que formam o tropocolágeno (intermolecular). (modificadas de Lehninger, 1976). 27
- FIGURA 3.4 –Máquina Universal de Ensaio Instron.(A) Aspecto geral , controles e sistema computacional. (B) Garras segurando corpo de prova.. 30
- FIGURA 3.5 – Irradiador de cobalto-60 Gammacell-220. (1) câmara secundária com recipiente para amostras; (2) câmara primária (3) Painel de controle. 36
- FIGURA 3.6 – Acelerador de elétrons Dynamitron JOB-188. (1) sistema de varredura; (2) bomba de vácuo; (3) bandeja com suporte para amostras; (4) esteira transportadora. 38
- FIGURA 4.1 – Exemplo de amostras de tiras de pele de espessura parcial acondicionadas em embalagem selada térmicamente, com identificação de que o material foi irradiado (seta). 39
- FIGURA 4.2 – (A) Faca de aço, em formato de halteres, para corte de corpo de prova, montada em suporte de madeira; (B) dimensões do corpo de prova; (G) extensômetro; (C) corpo de prova de pele. 41
- FIGURA 4.3 – Gráfico obtido com o software Merlin 2.21, mostrando o prolongamento da porção linear (/) e a indicação dos valores de tensão ( $\sigma_1$  e  $\sigma_2$ ) e de alongamento ( $\epsilon_1$  e  $\epsilon_2$ ) para cálculo do módulo de elasticidade de acordo com a equação  $E = \Delta\sigma/\Delta\epsilon$  (3). 45
- FIGURA 5.1 – Gráfico obtido com o software Merlin 2.21 para a amostra nº 3 do grupo controle do doador VIIIb. (/) A reta em azul foi construída manualmente para evidenciar a parte linear da curva. 51
- FIGURA 5.2 – Relação entre "stress" x "strain" em 5% das amostras testadas. A seta indica a resistência à tração da camada corneificada da epiderme após a ruptura da derme. 52
- FIGURA 5.3– Valores de Módulo de Elasticidade (em MPa) para amostras irradiadas com gama e submetidas ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy. 53
- FIGURA 5.4 – Gráfico comparativo dos valores de Módulo de Elasticidade (em MPa) das amostras dos grupos controle dos seis doadores. 54
- FIGURA 5.5– Gráfico de porcentagem dos grupos experimentais submetidos à irradiação gama e ao feixe de elétrons, com dose de 25kGy, em relação ao controle. 55

- FIGURA 5.6 – Módulo de Elasticidade dos grupos irradiados com gama e com elétrons, em porcentagem em relação ao grupo controle de cada doador. (-) A reta em vermelho representa o valor limite entre os dois efeitos. 56
- FIGURA 5.7 – Gráfico comparativo dos valores de Módulo de Elasticidade (em MPa) para amostras ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy transportadas por esteira e bandeja à temperatura ambiente (*ta*) e sob resfriamento (*resf*). 59
- FIGURA 5.8 – Gráfico de porcentagem dos grupos experimentais submetidos ao feixe de elétrons, com dose de 25kGy, transportados em esteira e bandeja à temperatura ambiente (*ta*) e sob resfriamento (*resf*), em relação ao controle. 60
- FIGURA 5.9 - Variação da temperatura durante a irradiação a 10 kGy pelo sistema de esteira e de bandeja no acelerador de elétrons, com e sem resfriamento (em porcentagem). A reta (—) indica a temperatura ambiente utilizada como referência. 63
- FIGURA 5.10 - Variação das temperaturas durante a irradiação a 25 kGy pelo sistema de bandeja no acelerador de elétrons, com e sem resfriamento (porcentagem). A reta (—) indica a temperatura ambiente utilizada como referência. 64
- FIGURA 5.11 – Módulo de Elasticidade dos grupos submetidos ao feixe de elétrons, em porcentagem em relação ao grupo controle de cada doador. (—) A reta representa o valor limite máximo para as amostras transportadas por esteira à temperatura ambiente. 64
- FIGURA 5.12 - Valores de Módulo de Elasticidade (em MPa) para amostras controle e irradiadas com gama e submetidas ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy. 66
- FIGURA 5.13 – Valores do módulo de elasticidade (em MPa) das amostras dos grupos controle para amostras irradiadas com dose de 50kGy. 66
- FIGURA 5.14 – Gráfico de porcentagem dos grupos experimentais submetidos à irradiação gama e ao feixe de elétrons, com dose de 50kGy, em relação ao controle. 67
- FIGURA 5.15 – Módulo de Elasticidade dos grupos irradiados a 50kGy com gama e com elétrons, em porcentagem em relação ao grupo controle de cada doador. (—) A reta em vermelho representa o valor limite entre os dois efeitos. 68
- FIGURA 5.16 - Efeito da irradiação crescente sobre os valores das médias do módulo de elasticidade das amostras submetidas à radiação gama e ao feixe de elétrons. 71
- FIGURA 5.17 - Efeito da irradiação crescente sobre os valores das médias do módulo de elasticidade das amostras submetidas à radiação gama e ao feixe de elétrons, em porcentagem. 71
- FIGURA 5.18 - Fotomicrografias de pele para aloenxerto coradas com hematoxilina-eosina, observadas ao microscópio de luz. (A) Amostra controle; (B) Amostra submetida à radiação gama com dose de 25 kGy; (C) Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy; (D) Amostra submetida à radiação gama com dose de 50 kGy; (E) Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy. Aumento: 400x. 74
- FIGURA 5.19 - Fotomicrografias de pele para aloenxerto coradas com Mallory, observadas ao microscópio de luz. (A) Amostra controle; (B) Amostra submetida à radiação gama com dose de 25 kGy; (C) Amostra submetida ao

feixe de elétrons com dose de 25 kGy; **(D)** Amostra submetida à radiação gama com dose de 50 kGy; **(E)** Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy. Aumento: 400x.

75

FIGURA 5.20 - Fotomicrografias de pele para aloenxerto coradas com picro-sirius, observadas ao microscópio de luz polarizada. **(A)** Amostra controle; **(B)** Amostra submetida à radiação gama com dose de 25 kGy; **(C)** Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy; **(D)** Amostra submetida à radiação gama com dose de 50 kGy; **(E)** Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy. As setas (→) indicam feixes de fibras de colágeno I. Aumento: 400x.

76

FIGURA 5.21 - Fotomicrografias de pele para aloenxerto coradas com resorcina, observadas ao microscópio de luz. **(A)** Amostra controle; **(B)** Amostra submetida à radiação gama com dose de 25 kGy; **(C)** Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy; **(D)** Amostra submetida à radiação gama com dose de 50 kGy; **(E)** Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy. As setas (→) indicam fibras de elastina. Aumento: 400x.

77

FIGURA 5.22 - Ultramicrografias de pele para aloenxerto observadas ao microscópio eletrônico de transmissão. **(A)** Amostra controle; **(B)** Amostra submetida à radiação gama com dose de 25 kGy; **(C)** Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy; **(D)** Amostra submetida à radiação gama com dose de 50 kGy; **(E)** Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy. As setas (→) indicam fibrilas de colágeno I em corte longitudinal. Aumento: 10000x.

78

FIGURA 5.23 - Ultramicrografias de pele para aloenxerto observadas ao microscópio eletrônico de transmissão. Amostra controle (ampliada). Aumento: 10000x.

79

FIGURA 5. 24 - Ultramicrografias de pele para aloenxerto observadas ao microscópio eletrônico de transmissão: Amostra submetida à radiação gama com dose de 25 kGy (ampliada). Aumento: 10000x.

80

FIGURA 5.25 - Ultramicrografias de pele para aloenxerto observadas ao microscópio eletrônico de transmissão: Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy (ampliada). Aumento: 10000x..

81

FIGURA 5.26 - Ultramicrografias de pele para aloenxerto observadas ao microscópio eletrônico de transmissão: Amostra submetida à radiação gama com dose de 50 kGy (ampliada). Aumento: 10000x.

82

FIGURA 5. 27 - Ultramicrografias de pele para aloenxerto observadas ao microscópio eletrônico de transmissão: Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy (ampliada). Aumento: 10000x..

83

## LISTA DE TABELAS

TABELA 5.1 – Caracterização das amostras de pele para pesquisa.	50
TABELA 5.2 – Média dos valores de espessura das amostras de pele (em mm) para os lotes irradiados a 25 kGy e 50 kGy.	51
TABELA 5.3 - Valores da média do módulo de elasticidade (em MPa) do grupo controle, do grupo irradiado com gama e do grupo submetido ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy.	53
TABELA 5.4 - Valores da média do módulo de elasticidade (em porcentagem) do grupo controle, do grupo irradiado com gama e do grupo submetido ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy.	54
TABELA 5.5 – Medidas centrais e de dispersão do módulo de elasticidade das amostras dos seis doadores para os grupos irradiados com gama e com elétrons (em proporção) a 25kGy.	56
TABELA 5.6 – Teste de significância de "Student" para média do módulo de elasticidade (E, em MPa) dos grupos irradiados com gama e com elétrons com dose de 25 kGy, comparados à média do grupo controle. Nível de significância=1%.	57
TABELA 5.7 – Teste de significância de "Student" para médias do módulo de elasticidade (E, em MPa) de todos os doadores nos grupos irradiados com gama e com elétrons com dose de 25 kGy, comparados à média do grupo controle p. Nível de significância=1% ( $\alpha \leq 0,01$ ).	58
TABELA 5.8 - Valores da média do módulo de elasticidade (em MPa) do grupo controle e dos grupos submetidos ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy utilizando o sistema de transporte de esteira e o de bandeja, irradiados à temperatura ambiente e com resfriamento.	58
TABELA 5.9 - Valores da média do módulo de elasticidade (em porcentagem) do grupo controle e dos grupos submetidos ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy utilizando o sistema de transporte de esteira e o de bandeja, irradiados à temperatura ambiente e com resfriamento.	59
TABELA 5.10 – Temperaturas registradas das amostras e do ambiente no sistema de transporte de esteira no acelerador de elétrons. Dados apresentados em graus Celsius (°C) e em porcentagem (%).	61
TABELA 5.11 – Temperaturas do ambiente e das amostras irradiadas a 10 kGy sem resfriamento no sistema de transporte de bandeja no acelerador de elétrons. Dados apresentados em graus Celsius (°C) e em porcentagem (%).	61
TABELA 5.12 – Temperaturas do ambiente e das amostras irradiadas a 10 kGy com resfriamento no sistema de transporte de bandeja no acelerador de elétrons. Dados apresentados em graus Celsius (°C) e em porcentagem (%).	62
TABELA 5.13 – Temperaturas do ambiente e das amostras irradiadas a 25 kGy sem resfriamento no sistema de transporte de bandeja no acelerador de elétrons. Dados apresentados em graus Celsius (°C) e em porcentagem (%).	62

TABELA 5.14 – Temperaturas do ambiente e das amostras irradiadas a 25 kGy com resfriamento no sistema de transporte de bandeja no acelerador de elétrons. Dados apresentados em graus Celsius (°C) e em porcentagem (%).	62
TABELA 5.15 – Temperaturas do ambiente e das amostras irradiadas a 25 kGy com resfriamento no sistema de transporte de bandeja no acelerador de elétrons. Dados apresentados em graus Celsius (°C) e em porcentagem (%).	63
TABELA 5.16 – Medidas centrais e de dispersão do módulo de elasticidade das amostras dos oito doadores para os grupos submetidos ao feixe de elétrons (em proporção) em sistema de transporte de esteira e de bandeja, à temperatura ambiente e com resfriamento.	65
TABELA 5.17 - Valores da média do módulo de elasticidade (em MPa) do grupo controle, do grupo irradiado com gama e do grupo submetido ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy.	65
TABELA 5.18 - Valores da média do módulo de elasticidade (em porcentagem) do grupo controle, do grupo irradiado com gama e do grupo submetido ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy.	67
TABELA 5.19 – Medidas centrais e de dispersão do módulo de elasticidade (em proporção) das amostras dos três doadores para os grupos irradiados com gama e com elétrons a 50kGy.	68
TABELA 5.20 – Teste de significância de "Student" t para média do módulo de elasticidade (E, em MPa) dos grupos irradiados com gama e com elétrons com dose de 50 kGy, comparados à média do grupo controle não irradiado. Nível de significância=5% ( $p \leq 0,05$ ).	69
TABELA 5.21 – Teste de significância de "Student" para médias do módulo de elasticidade (E, em MPa) de todos os doadores nos grupos irradiados com gama e com elétrons com dose de 25 kGy, comparados à média do grupo controle p. Nível de significância=5% ( $\alpha \leq 0,05$ ).	69
TABELA 5.22 - Médias dos valores do módulo de elasticidade para um doador de amostras irradiadas com radiação gama em doses crescentes.	70
TABELA 5.23 - Médias dos valores do módulo de elasticidade para três doadores de amostras submetidas ao feixe de elétrons em doses crescentes.	70
TABELA 5.24 - Médias dos valores do módulo de elasticidade para um doador de amostras irradiadas com radiação gama em doses crescentes (em porcentagem).	70
TABELA 5.25 - Médias dos valores do módulo de elasticidade para três doadores de amostras submetidas ao feixe de elétrons em doses crescentes (em porcentagem).	70

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas.

AIEA - Agência Internacional de Energia Atômica.

ANSI – American National Standard.

ASTM – American Standard Test Method.

BT-ICHC – Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas.

CNEN/SP – Comissão Nacional de Energia Nuclear / São Paulo.

CTR – Centro de Tecnologia das Radiações.

DNA – Deoxyribonucleic Acid (= ácido desoxirribonucleico)..

FM – Faculdade de Medicina.

IAEA – International Atomic Energy Agency.

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas.

IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

LBM – Laboratório de Biologia Molecular.

NBR – Norma Brasileira.

REG – Retículo Endoplasmático Granular

USP – Universidade de São Paulo.

UV – ultra-violeta (radiação).

## LISTA DE SÍMBOLOS

A – área.

cal – caloria (unidade de medida de energia: 1 cal = 4,18 J).

$^{60}\text{Co}$  – cobalto-60 (isótopo radioativo do  $^{59}\text{Co}$ ).

$^{\circ}\text{C}$  – Graus Celsius (unidade de medida de temperatura).

E – módulo de elasticidade.

$\varepsilon$  – alongamento.

$\Delta\varepsilon$  – variação do alongamento.

$\bar{d}$  – diferença das médias.

F – força.

Gy – gray (unidade de medida de dose absorvida: 1 Gy = 1 J/kg)

g – graus de liberdade.

$H_0$  – hipótese de nulidade.

$H_1$  – hipótese alternativa.

Hz – hertz (unidade de medida de frequência) .

J – joule (unidade de medida de energia).

kCi – quilocurie (unidade de medida de atividade: 1 Ci =  $3,7 \times 10^{10}$  desintegrações/seg).

keV – quiloelétronvolt (unidade de medida de energia: 1 eV = 23.060 kcal/mol).

kGy – kilogray ( $10^3$  Gy).

kGy/h – kilogray por hora (unidade de medida de taxa de dose absorvida).

kGy/s – kilogray por segundo (unidade de medida de taxa de dose absorvida).

kN – quilonewton (unidade de medida de força:  $10^3$  N).

kV – quilovolt (unidade de medida de energia:  $10^3$  V).

L – comprimento.

M – molar (concentração: n° de moles do soluto dissolvidos em 1 L de solução).

mA – mili ampère (unidade de medida de corrente elétrica).

MeV – milhão de elétronvolt ( $10^6$  eV).

MPa – megapascal (unidade de medida do módulo de elasticidade: 1 MPa =  $1 \text{ N/mm}^2$ ) .

mm – milímetro (unidade de medida de comprimento).

$\text{mm}^2$  – milímetro quadrado (unidade de medida de área).

$\mu\text{m}$  – micrômetro (unidade de medida de comprimento: 1  $\mu\text{m}$  =  $10^{-3}$  mm).

N – newton (unidade de medida de força).

n – número de amostras.

nm – nanômetro (unidade de medida de comprimento:  $1 \text{ nm} = 10^{-3} \mu\text{m}$ ).

s – desvio padrão.

$s^2$  – variância

$\sigma$  – tensão.

$\Delta\sigma$  – variação da tensão.

t – variável do teste de significância de Student.

$\bar{x}$  – média das amostras.

## 1 INTRODUÇÃO

A pele, considerada o maior órgão do corpo humano, representa 16 % do peso corporal (Junqueira & Carneiro, 1995) e se constitui em eficiente barreira contra uma variedade de agentes físicos, químicos e biológicos, além de participar de processos homeostáticos e fisiológicos de regulação (Hlaeac, 1995).

Em função de sua importância, extensas lesões na pele comprometem a recuperação do indivíduo. É o caso, por exemplo, de queimaduras graves, extensas e profundas, que destroem epiderme, derme e tecidos subcutâneos impossibilitando a regeneração espontânea da pele e muitas vezes levando o paciente a óbito. A redução da mortalidade está relacionada, portanto, à eficácia da proteção precoce da região queimada de modo a diminuir substancialmente a desidratação, possibilitar o controle de infecções (Herndon, 1997) e permitir a regeneração adequada da pele, evitando a ocorrência de retração dos tecidos adjacentes e formação de cicatrizes deformantes (Borojevic & Serricella, 1999).

Para a maioria dos ferimentos causados por queimaduras, a melhor opção de cobertura é o enxerto autólogo (tecido do próprio indivíduo) pois pode ser permanente, uma vez que não existe risco de rejeição imunológica. No entanto, se a disponibilidade de área doadora para autoenxerto é limitada, outros tipos de substitutos, sintéticos ou biológicos, podem ser utilizados (Sheridan & Tompkins, 1999).

Pesquisas com biomateriais têm desenvolvido e colocado no mercado substitutos dérmicos ou compostos dermo-epidérmicos sintéticos, poliméricos ou de origem biológica, destinados ao tratamento de queimados (Balasubramani et al. 2001; Rennekampff & Schaller, 2002).

Entretanto, apesar dos avanços no campo da bioengenharia de tecidos, os aloenxertos de pele ainda se mantêm como "padrão ouro" na cobertura temporária de queimaduras extensas e profundas (Mackie, 2001) e têm sido preferencialmente utilizados nesses procedimentos, em detrimento dos curativos sintéticos ou de biomaterias (Richters et al., 1996). Este fato está relacionado à comprovada diminuição da mortalidade e do sofrimento dos pacientes, às propriedades do aloenxerto em favorecer a re-epitelização da área injuriada, e à simplicidade do processo de conservação e manutenção da pele em

Bancos de Tecidos (Bolgiani & Benain, 1993; Mackie, 1997; Freedlander et al., 1998; Kearney, 1998; Bravo et al., 2000; Robb et al., 2001).

As principais críticas à utilização dos enxertos alógenos, se referem ao estoque limitado de tecidos (Herndon, 1997) e ao risco de contaminação microbiológica (Eastlund, 1995; Kealey, 1997; Pirnay et al., 1997). No entanto, Herndon (1997) considera que a disponibilidade de pele para enxerto pode ser otimizada com a divulgação e sensibilização pública, dirigida ao aumento da captação de tecidos. Quanto à segurança, o autor faz referência à necessidade de normas específicas de controle de qualidade nos Bancos de Tecidos.

Nesse sentido, a Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA), com sede em Viena, tem contribuído para a criação de bancos de tecidos, na promoção de encontros, fornecimento de suporte tecnológico, elaboração e publicação de normas e padrões aplicáveis à esterilização por radiação ionizante (Pedraza, 2003).

Os bancos de tecidos devem garantir a integridade e esterilidade dos tecidos armazenados. Uma vez que os métodos de processamento para conservação de tecidos (congelamento, liofilização e imersão em glicerol concentrado) podem não ser esterilizantes, faz-se necessário adicionar ao processo, métodos de esterilização (IAEA, 2002a), que, além de confiáveis, não alterem significativamente a morfologia destes tecidos e mantenham suas características, o mais próximo possível das do tecido fresco.

Assim como determinados produtos poliméricos, tecidos biológicos não podem ser esterilizados pelo calor, pois em temperaturas acima de 56 °C ocorre desnaturação de suas proteínas. A esterilização por óxido de etileno (EtO) requer monitoração, aeração e quarentena, para remoção dos resíduos do gás (IAEA, 2002a). Dziejic-Goclawska & Stachowicz (1997) são da opinião de que o EtO não deveria ser utilizado para esterilização de aloenxertos, principalmente devido aos efeitos tóxicos de seus resíduos e dos produtos, potencialmente cancerígenos, resultantes da reação do gás com componentes orgânicos.

A radiação ionizante, por sua vez, apresenta uma série de vantagens: não produz resíduos radioativos, não origina substâncias tóxicas nem oferece riscos de contaminação (por isso não há necessidade de quarentena); a estrutura dos tecidos e uma embalagem adequada não interferem no resultado da esterilização; a esterilização pode ser feita na temperatura de armazenamento e embalagem final; e sua confiabilidade é considerada excelente (Phillips, 1997).

Existem, entretanto, importantes diferenças no mecanismo de absorção de energia pelos tecidos biológicos, dependendo da fonte que é utilizada: raios gama dos irradiadores

de  $^{60}\text{Co}$  ou feixes de elétrons gerados em aceleradores (Dziedzic-Goclawska & Stachowicz, 1997). Essas diferenças e os efeitos do tipo de radiação ionizante, devem ser estudados e conhecidos para a escolha da fonte de irradiação.

Os efeitos da radiação também variam de acordo com o tecido irradiado e como este foi processado e armazenado.

Em tecidos biológicos "ex vivo", destinados a enxerto, foram constatadas diferentes alterações na estrutura das moléculas de colágeno, em amostras de ossos e tendões, dependendo do tipo de conservação do tecido (congelado ou liofilizado) comparados ao tecido fresco (Dziedzic-Goclawska, 2000).

Especificamente em relação à pele, vários estudos foram realizados sobre o efeito da radiação ionizante no tecido "in vivo". Trott et al., (1999) (*apud* Schmuth et al., 2001), constataram, em modelo animal, mudanças degenerativas da epiderme, morte das células epiteliais, hipoplasia, inibição da proliferação celular e ocorrência de apoptose na epiderme. Schmuth et al. (2001), relataram a ocorrência de alteração funcional na permeabilidade do estrato córneo da epiderme humana nas dermatites por radiação, em pacientes de radioterapia por fótons e por elétrons. Outras pesquisas "in vivo" realizaram estudos morfométricos em fibrilas de colágeno tipo I da derme irradiada de camundongos por baixas doses de irradiação gama. Entre eles, Leontiou et al. (1993) descreveram o aumento de diâmetro das fibrilas de colágeno, e Tzaphlidou et al. (2002), verificaram a modificação da arquitetura da fibrila de colágeno na derme irradiada com raios gama.

A degradação do colágeno modifica suas propriedades biomecânicas (Olde Damink et al., 1995) e conseqüentemente interfere nas características biomecânicas da pele, uma vez que essa proteína fibrosa, inelástica e flexível da derme é responsável pela integridade e resistência às tensões multi-direcionais a que o tecido pode ser submetido (Ottani, 2001).

O trabalho que a AIEA tem desenvolvido, resultou no criação de programas nacionais de bancos de tecidos que utilizam a radiação ionizante para a esterilização de tecidos em pelo menos trinta países, dentre os quais, o Brasil (Pedraza, 2003).

O Instituto Central do Hospital das Clínicas (ICHC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP) em convênio com o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), e financiado pela AIEA, implantou em 2000, o primeiro Banco de Tecidos no Brasil, a utilizar radioesterilização em tecidos conservados em glicerol concentrado (mínimo 85%), para transplantes alógenos, proporcionando a

viabilização de estudos e avaliação dos tecidos submetidos a esse processo (Bourroul et al., 2002).

Durante o biênio 2001-2002, especialistas de diferentes áreas do Programa de Radiação e Bancos de Tecidos, prepararam os seguintes documentos, concluídos em agosto de 2002, que regulamentam o funcionamento dos bancos de tecidos e a utilização da radiação ionizante como método esterilizante:

1. Padrões internacionais em bancos de tecidos;
2. Código de práticas para esterilização por radiação de tecidos para aloenxerto;
3. Estratégias de conscientização pública para bancos de tecidos.

Para 2003-2004, um dos maiores objetivos do programa será o de promover a utilização desses documentos pelos países participantes (IAEA, 2004).

## **2 OBJETIVOS**

Em função do que foi exposto, os principais objetivos deste trabalho foram:

- Avaliar os efeitos da radiação na pele conservada em glicerol concentrado por meio da caracterização do tecido quanto à morfologia e resposta aos ensaios de resistência à tração.
- Estabelecer procedimentos de utilização de duas fontes distintas de radiação ionizante para esterilização de pele humana destinada ao aloenxerto: irradiador de  $^{60}\text{Co}$  e acelerador de elétrons.

## 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 3.1 A PELE HUMANA

#### 3.1.1 Funções

A pele, cuja espessura varia de 0,5 mm a 6,0 mm, reveste externamente o corpo humano, garante a proteção do indivíduo e sua interação com o meio circundante. É formada por duas camadas, epiderme e derme.

A pele íntegra é uma efetiva barreira contra invasão de microorganismos, ação de toxinas, traumas mecânicos, temperaturas extremas e baixas doses de radiação ionizante (Schmuth et al., 2001). A proteção do organismo contra os efeitos prejudiciais dos raios solares, especialmente dos ultra-violeta, se deve à pigmentação da pele fornecida por grânulos de melanina que, produzidos pelos melanócitos, são transferidos aos queratinócitos (Junqueira & Carneiro, 1995).

Exposta ao meio ambiente, a pele é capaz de responder às modificações externas e internas. É responsável pela manutenção dos processos homeostáticos, participa da termorregulação corporal, dos equilíbrios hídrico e osmótico, e dos processos fisiológicos de regulação, como na síntese de vitamina D<sup>1</sup>, colesterol e melanina (Hlaeac, 1995; Schmuth et al., 2001). Possui um complexo sistema antioxidante, que inclui componentes enzimáticos e não enzimáticos, constituindo-se na primeira defesa contra radicais livres (Pugliese, 1998). A sensibilidade sensorial e percepção do meio externo está relacionada às inúmeras terminações nervosas, neurorreceptores, localizados na derme. A resposta imunológica da pele aos alérgenos, ocorre graças aos linfócitos presentes na derme e às células apresentadoras de antígenos da epiderme (Junqueira, 1995).

A pele possui anexos - pelos, unhas, glândulas sudoríparas e sebáceas - com funções protetoras especializadas (Kerr, 2000).

Danos ou perda de grandes áreas de pele, tais como queimaduras extensas, podem causar severas alterações sistêmicas, tais como, hipotermia, perda de fluídos, infecções, ou ainda, cicatrizes e alterações na imagem corporal, ou até mesmo acarretar a morte do indivíduo. (Hlaeac, 1995; Koller, 2001).

---

<sup>1</sup>A vitamina D atua no metabolismo do cálcio, promovendo sua absorção pelo epitélio intestinal e reduzindo a secreção de Ca<sup>+2</sup> pelos rins).

### 3.1.2 Morfologia

Anatomicamente, a pele é formada por duas camadas, epiderme e derme, com características e origem embrionária distintas, mas que possuem uma grande adesão e interatividade. Abaixo da derme, a hipoderme é formada por tecido adiposo e não faz parte da pele; constituindo-se em tecido subcutâneo de suporte e união com os órgãos subjacentes (Junqueira & Carneiro, 1995; Herson, 1999; Kerr, 2000,).

A caracterização das camadas da pele já foi amplamente estudada e aparece na maioria dos artigos que abordam o assunto e nos livros-texto de histologia e dermatologia. As descrições sintéticas da epiderme, membrana basal e derme, abaixo descritas, foram baseadas em Junqueira & Carneiro (1995); Holbrook & Wolff (1999); Kerr (2000) e Koiler (2001).

#### 3.1.2.1 Epiderme

A epiderme, que constitui a interface com o meio externo, é formada por tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado de origem ectodérmica com pouquíssima matriz extracelular. Geralmente muito delgada na maior parte do corpo (não ultrapassando 0,12 mm), torna-se mais espessa nas áreas de constante pressão e atrito, tais como solas dos pés e palmas das mãos. É considerada o componente mais ativo da pele pois, à medida que a camada córnea, mais superficial, sofre descamação, é constantemente substituída por novas células originadas das camadas mais profundas.

A epiderme é composta por cinco camadas. As características de cada uma refletem as propriedades mitóticas e sintéticas dos queratinócitos e seu estágio de diferenciação:

1. Camada córnea: Formada por escamas córneas, que perderam núcleo e organelas, mas que permanecem aderidas umas às outras e são preenchidas por queratina. Essa camada é impermeável, resistente às pressões mecânicas e ao cisalhamento, às mudanças de pH e de temperatura e à digestão enzimática. À medida em que se desprendem, as escamas são continuamente repostas por queratinócitos da camada lúcida.
2. Camada lúcida: Ausente nas regiões onde a pele é mais fina, possui intensa atividade enzimática.
3. Camada granulosa: Os queratinócitos acumulam queratohialina, proteína que está provavelmente relacionada à rigidez da célula que está morrendo. Essa camada é também responsável pela síntese de involucrina que exocitada acumula-se sobre as células promovendo a impermeabilização do epitélio, garantindo o equilíbrio hídrico e homeostático do organismo.

4. Camada espinhosa: As células possuem tonofibrilas (feixes de filamentos de citoqueratina) que juntamente com os desmossomos mantém a coesão entre as células e conferem resistência ao atrito.

5. Camada basal ou germinativa: A camada basal possui células indiferenciadas que apresentam intensa atividade mitótica originando continuamente os queratinócitos. À medida que as células amadurecem, são empurradas para as camadas mais superficiais, diferenciam-se e assumem novas funções.

### **3.1.2.2 Membrana Basal**

A membrana basal é estrutura identificada no microscópio óptico, composta pela lâmina basal (observada somente no microscópio eletrônico) e parte da matriz extracelular da derme adjacente. A lâmina basal presente no contato entre epiderme e derme, é produzida por ambas as camadas. As proteínas transmembrânicas das células epiteliais mantém interação com as fibrilas de colágeno produzidas pelos fibroblastos, o que garante a adesão e continuidade física entre as duas camadas (Alberts et al., 1997).

A interface entre derme e epiderme é papilar, o que aumenta a superfície de contato entre elas e permite que a pele estique sem romper .

### **3.1.2.3 Derme**

A derme, camada mais profunda da pele, é constituída por tecido conjuntivo de origem mesodérmica, onde há maior quantidade de matriz extracelular do que células. A matriz extracelular é formada por grande quantidade de substância amorfa, representada pelos proteoglicanos, e um integrado sistema de fibras de colágeno e elastina produzidas pelas células do conjuntivo, os fibroblastos. Essa camada garante a integridade física da pele e também participa de sua regeneração.

Na derme encontram-se os vasos sanguíneos e linfáticos que irrigam e nutrem a epiderme, assim como os neuroreceptores que percebem estímulos táteis, variações de temperatura e sensações dolorosas. Presentes nessa camada estão também estruturas da epiderme como os folículos pilosos e as glândulas sebáceas e sudoríparas (Holbrook & Wolf, 1999).

A derme distingue-se em duas regiões: derme papilar (porção superior da derme, adjacente à epiderme) e derme reticular (região mais profunda).

A derme papilar é irregular na região de interdigitação com a epiderme. É constituída por tecido conjuntivo frouxo, fibras reticulares, fibras do sistema elásticos

(oxitalânicas) e muitas alças capilares. Continuamente à região papilar, a camada reticular da derme é formada por tecido conjuntivo denso não modelado com fibras colágenas firmemente agrupadas em feixes e fibras elásticas espessas (Gartner & Hyatt, 2001).

#### 3.1.2.3.1 Fibras Colágenas

O colágeno constitui a família de proteínas mais abundante nos vertebrados superiores (Lehninger, 1976) compreendendo cerca de 25% das proteínas totais do organismo (Gartner & Hyatt, 2001). Dos 15 tipos de moléculas de colágeno conhecidos, os freqüentemente encontrados nos tecidos conjuntivos são os tipos I, II, III, V e XI, sendo todos de estrutura fibrilar (Alberts, 1997). O principal componente fibroso da derme é o colágeno tipo I, proteína insolúvel (Stryer, 1996), que corresponde a cerca de 75% da pele, em peso seco. As fibras de colágeno, formadas por colágeno I, estão presentes na derme reticular e são responsáveis pela resistência do tecido às forças de tensão. As fibras reticulares, mais finas, são formadas por colágeno tipo III e encontram-se na região papilar da derme (Holbrook & Wolff, 1999).

Para reconhecer o tipo de estrutura que se observa no microscópio óptico e no microscópio eletrônico de transmissão, é necessário entender a síntese das fibras de colágeno.

A molécula de colágeno é formada por uma tripla hélice a partir de 3 cadeias alfa que se enrolam umas nas outras formando um tipo de corda supertorcida. Uma cadeia alfa-hélice é a estrutura secundária de um polipeptídeo formado por várias subunidades semelhantes, no qual um aminoácido se liga com o quarto aminoácido da cadeia, dando uma volta em si mesmo. Cada cadeia de alfa-colágeno possui cerca de 1000 aminoácidos e contém 3 aminoácidos por volta onde o 3º é sempre glicina (Gly) na seqüência: X-Y-Gly, onde X e Y podem ser quaisquer aminoácidos mas geralmente X é prolina e Y é hidroxiprolina. O fato da Gly ser o menor aminoácido da natureza (pois seu radical é apenas constituído pelo hidrogênio), é que mantém as 3 cadeias alfa próximas, pois ele ocupa o interior da molécula (FIG.3.1).

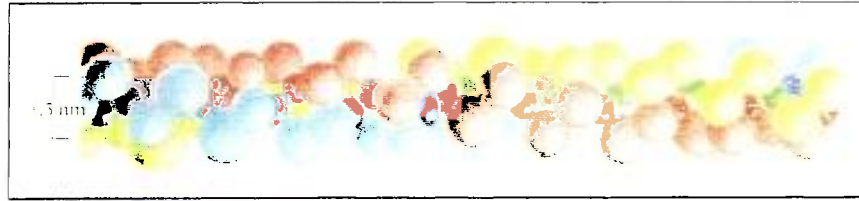


FIGURA 3.1 – Representação da molécula de colágeno formada por 3 cadeias alfa. O aminoácido glicina está indicado em cor mais forte na região interna da molécula (modificado de Alberts, 1997).

A síntese de colágeno se inicia no retículo endoplasmático granular (REG) onde são formadas as 3 cadeias-alfa (cada uma possui um peptídeo de sinal na porção terminal da molécula). Algumas prolínas e lisinas da cadeia  $\alpha$  são hidroxiladas (inserção do ânion OH nesses aminoácidos) auxiliadas pelo co-fator vitamina C no Complexo de Golgi. Na falta de vitamina C, a tripla hélice fica frágil e os tecidos conjuntivos não se mantêm íntegros. Cada cadeia alfa combina-se com duas outras formando uma molécula helicoidal de tripla fita ligada por pontes de hidrogênio (H) e denominada de *pró-colágeno*. O *pró-colágeno* é lançado para fora do REG em vesícula secretora que leva a molécula para o meio extracelular. No meio externo recebe o nome de *tropocolágeno*. Após serem secretados pelos fibroblastos, as moléculas de colágeno agrupam-se em polímeros ordenados, denominados *fibrilas de colágeno*, graças à remoção da seqüência final da molécula de colágeno (peptídeo de sinal ou *pró-peptídeo*), pela enzima colagenase sintetizada pelos próprios fibroblastos. O peptídeo de sinal tem a função de guiar a formação intracelular da fita tripla e impedir a formação de fibrilas dentro da célula. As fibrilas de colágeno normalmente se agregam em *fibras de colágeno*. As fibras de colágeno se agregam em *feixes de colágeno* (Alberts, 1997). As fibras e feixes de colágeno podem ser observados no microscópio óptico. As fibrilas de colágeno podem ser individualizadas somente no microscópio eletrônico. A FIG.3.2, sintetiza o que foi descrito.

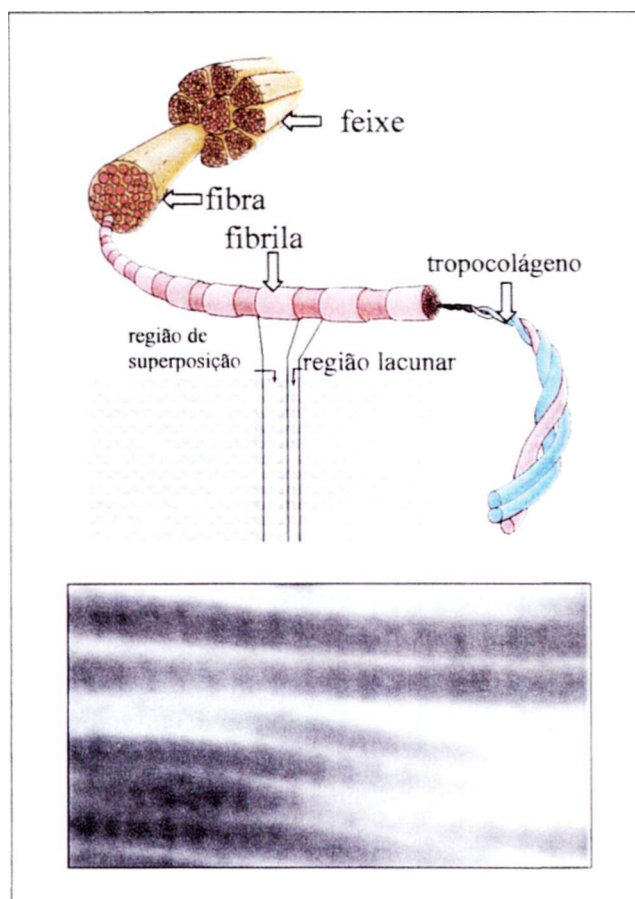


FIGURA 3.2 - Estrutura da fibra de colágeno: as fibras de colágeno são formadas por unidades menores, as fibrilas, constituídas por macromoléculas denominadas tropocolágeno que estão paralelamente organizadas. O tropocolágeno é formado por três cadeias peptídicas de estrutura alfa- ligadas por pontes de hidrogênio (modificado de Gartner & Hyatt, 2001).

A estrutura da molécula protéica de colágeno é mantida, em grande parte, graças às pontes de hidrogênio que mantêm a estrutura da alfa-hélice e está presente entre moléculas alfa-hélice, formando a molécula tripla-hélice (FIG.3.3). Esse tipo de ligação ocorre devido ao aspecto altamente eletronegativo do átomo de oxigênio, que em ligação covalente com o hidrogênio, tende a atrair o seu único elétron. O hidrogênio assume carga positiva parcial local, enquanto que o oxigênio fica com carga negativa parcial local na zona das órbitas não compartilhadas. Na região em que porções de moléculas se aproximam muito ocorre atração eletrostática entre a carga negativa parcial do átomo de oxigênio de uma porção da molécula e a carga positiva parcial do átomo de hidrogênio ligado covalentemente a outro átomo eletronegativo. Essa união eletrostática é denominada ponte de hidrogênio (Lehninger, 1976).

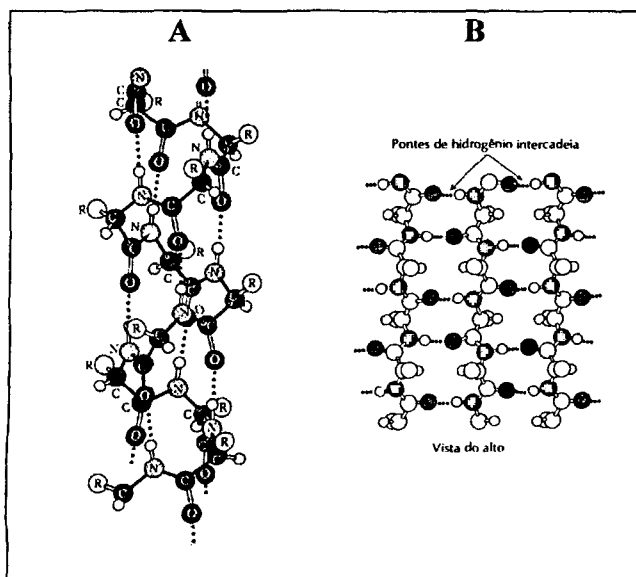


FIGURA 3.3 – Pontes de hidrogênio na molécula de colágeno: **(A)** entre átomos que formam a alfa-hélice (intra-molecular); **(B)** entre as três moléculas alfa que formam o tropocolágeno (intermolecular). (modificadas de Lehninger, 1976).

As pontes de hidrogênio nas moléculas protéicas são relativamente fracas se comparadas às ligações covalentes. A título de comparação, a ponte de hidrogênio entre O e H tem uma energia de ligação<sup>2</sup> de 4,5 kcal/mol enquanto a ligação covalente entre O e H possui uma energia de ligação de 110 kcal/mol. Num sistema aquoso, como nos tecidos biológicos, as moléculas de água competem para formar pontes de hidrogênio com as moléculas de proteína. Por outro lado, a formação da primeira ponte de hidrogênio entre moléculas de peptídeos, por questões geométricas, favorece muito a formação da segunda ligação, esta segunda ligação aumenta a probabilidade de se formar uma terceira, e assim por diante, resultando numa ligação muito forte entre duas ou mais cadeias peptídicas. Essa facilitação de formação de pontes de hidrogênio é chamada de cooperatividade, característica das moléculas protéicas que podem conter até milhares de ligações cooperativas de pontes de hidrogênio (Lehninger, 1976).

Além das ligações por ponte de hidrogênio, já citadas, o reforço intra e intermolecular é também dado por ligações covalentes cruzadas entre as lisinas que compõe as moléculas de colágeno. Se a ligação cruzada é inibida, a força tensora das fibrilas reduz e o tecido torna-se frágil (Alberts, 1997; Stryer, 1992).

É possível identificar o colágeno com colorações específicas, em lâminas histológicas. A coloração com tricromo de Mallory, por exemplo, é comumente utilizada

para diferenciação entre fibras de colágeno e fibras musculares, entretanto, não apresenta resultados satisfatórios para distinção entre os tipos de colágeno (Montes, 1996).

Montes (1996) afirma que o método picrosirius é um processamento histoquímico específico para detecção de colágeno em cortes histológico. As moléculas de colágeno possuem uma orientação paralela, uma em relação às outras, que lhe conferem uma birrefringência natural. O corante "sirius red" alinha-se paralelamente ao longo eixo de cada uma das moléculas, realçando sua birrefringência; a incidência de luz polarizada cria uma imagem brilhante e colorida das fibras de colágeno que se destacam de outras estruturas não orientadas. Pela diferença de intensidade e cor, é possível distinguir os tipos de colágeno do tecido observado. Assim, o colágeno tipo I forma fibras espessas (*fibras colágenas*) que apresentam intensa birrefringência de coloração amarela ou vermelha. O colágeno tipo III forma fibras finas (*fibras reticulares*) frouxamente dispostas e por isso apresentam birrefringência esverdeada

Estudos de microscopia eletrônica mostram o colágeno tipo I como grossas fibras formadas por uma série de fibrilas densamente empacotadas. Observadas no microscópio eletrônico de transmissão, as fibrilas de colágeno apresentam estriações transversais características a cada 67 nm, o que reflete a alternância regular das moléculas de colágeno (tropocolágeno) paralelamente ordenadas na fibrila (FIG. 3.2). O corante penetra na região lacunar, preenchendo o espaço entre as moléculas e formando bandas coradas fortemente (Alberts, 1997). Stryer (1996) atenta para o fato de que as fileiras de tropocolágeno não estão em fase, indicando que as fileiras adjacentes estão deslocadas de aproximadamente 67 nm. Em recente estudo Tzaphlidou (2004) descreve a não uniformidade das bandas mas a ocorrência de 12 bandas de diferentes espessuras, denominadas "período D".

#### 3.1.2.3.1 Fibras Elásticas

Uma rede de fibras elásticas na derme fornece a elasticidade à pele, de tal modo que após uma distensão temporária, o tecido volta à conformação original. O principal componente das fibras elásticas é a elastina, proteína hidrofóbica rica em prolina e lisina (assim como o colágeno). Alberts (1997) descreve a formação das fibras elásticas e seus três tipos: oxitalânicas, elaunínicas e elásticas. Existe uma aumento de complexidade da fibras oxitalânica para a elástica. A fibra oxitalânica é constituída apenas por microfibrilas agrupados; a elaunínica apresenta substância amorfa (elastina) entre as microfibrilas e as fibras elásticas apresentam um cerne de elastina circundado por microfibrilas (Alberts,

---

<sup>2</sup> Energia de ligação é a energia necessária para romper uma ligação entre os átomos.

1997; Gartner & Hyatt, 2001). Existe uma continuidade entre as fibras elásticas, elauónicas e oxitalânica, da região mais profunda da derme até a região papilar.

Montes (1996), descreve os principais métodos de coloração para fibras elásticas, que são precedidos por digestão com elastase. Entre esses métodos, a coloração por resorcina-fucsina de Weigert é a mais sensível e ainda cora fibras elauónicas. As fibras oxitalânicas são coradas quando previamente é feita uma oxidação com ozônio aquoso 10%.

Ao nível ultraestrutural, as fibras elásticas compreendem um cerne com abundante, homogêneo e amorfo material rodeado de microfibrilas.

### 3.1.3 Caracterização Biomecânica da Pele Humana

As características biomecânicas da pele são determinadas principalmente pela direção e resistência apresentadas pela rede de colágeno da derme mais profunda e pelas fibras oxitalânicas localizadas na derme papilar. Biomecanicamente, a pele não se comporta como um material homogêneo. Segundo Gibson (1967), a análise de uma lâmina histológica de pele que foi fixada em estado relaxado, mostra fibras colágenas dispostas aparentemente ao acaso. No entanto se a pele é mantida distendida durante a fixação, as fibras apresentam-se orientadas no sentido do alongamento; quanto maior a força a que a pele é submetida, maior a quantidade de fibras colágenas alinhadas. Submetidas à baixa tensão, as fibras de colágeno deslizam com relativa facilidade umas sobre as outras e a pele distende. À medida em que as fibras tornam-se alinhadas, a resistência contra o estiramento aumenta e é necessário aplicar uma força maior, que acaba provocando a deformação do tecido e, finalmente, seu rompimento.

Recentemente, Noorlander (2002) desenvolveu um método para determinar mudanças mensuráveis na orientação das fibras colágenas na derme resultantes de tensões mecânicas. Baseando-se em método descrito por Junqueira (1979) *apud* Noorlander (2002) de coloração com picrossírius e observação com microscópio de epipolarização, o autor converte imagens digitais em imagens binárias que são analisadas quantitativamente.

A epiderme também contribui para a caracterização biomecânica da pele. Chistolini (1999) sugere que a força biomecânica da epiderme é devida às junções adesivas intercelulares e à reação à tensão oferecida pelo citoesqueleto. Entre os queratinócitos estabelecem-se junções adesivas (desmossomos) que mantém as células muito unidas mesmo quando morrem, as escamas córneas permanecem aderidas à superfície do epitélio por causa das junções adesivas.

Os estudos biomecânicos podem ser realizados em equipamentos específicos. A Máquina Universal de Ensaios Instron, modelo 5567, do CTR/IPEN possui câmara para ensaios a temperaturas de  $-70^{\circ}\text{C}$  a  $250^{\circ}\text{C}$ , módulos de carga de 1 kN e de 10 kN e conjunto de garras adequadas para materiais rígidos, semi-rígidos e não rígidos. Possui também sistema pneumático de ajuste de garras para fixação das amostras. Na Máquina Universal de Ensaios Instron, podem ser realizados ensaios de tração, compressão e flexão. (FIG.3.4).

O sistema de comando e aquisição de dados é composto por microcomputador PC e programa Merlin 2.21, e impressora matricial.



FIGURA 3.4 –Máquina Universal de Ensaios Instron.(A) Aspecto geral , controles e sistema computacional. (B) Garras segurando corpo de prova..

### 3.2 ALOENXERTO

A possibilidade de armazenamento de pele humana para posterior aproveitamento como enxerto não é recente. Desde o início do século XX, vários são os registros de estudos do desenvolvimento de diferentes métodos de conservação.

PHILLIPS (1997) afirma serem o congelamento, a liofilização e a imersão em glicerol concentrado, os principais métodos de conservação utilizados em Bancos de Tecidos. A refrigeração é método freqüentemente empregado para conservação de autoenxertos, não sendo apropriado para armazenagem de enxertos por longo tempo pois a viabilidade da pele no refrigerador é de apenas 14 dias.

No processo de congelamento são empregadas substâncias crioprotetoras como o glicerol em baixas concentrações (de 5% a 30%) que promovem uma diminuição do ponto de congelamento da solução. Os crioprotetores ajudam a diminuir a formação de cristais de gelo, que são muito prejudiciais à viabilidade das células cutâneas. A pele congelada deve

ser armazenada em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  e para sua utilização deve-se proceder a um rápido descongelamento e inativação do crioprotetor (Phillips, 1997).

A liofilização é um método de conservação bastante utilizado pois inativa as enzimas que provocam autólise das células logo após sua morte, sem porém, desnaturar as proteínas, garantindo as propriedades estruturais importantes do enxerto. Nesse processo combina-se congelamento e secagem a vácuo, durante o qual a água é removida da célula no estado congelado. (Gava, 1979). Tecidos biológicos liofilizados devem ter um conteúdo de umidade residual menor do que 5%, podem ser mantidos à temperatura ambiente, reidratam-se facilmente e mantêm sua estrutura inicial. (Phillips, 1997). Ainda que inative algumas formas vegetativas de microorganismos, como alguns tipos de fungos e bactérias, que necessitam de níveis de umidade ao redor de 30% para desenvolver suas atividades metabólicas (Gava, 1979), a liofilização não esteriliza os tecidos (IAEA, 2002<sup>a</sup>).

O glicerol em altas concentrações (acima de 85%) pode ser utilizado como conservante de tecidos biológicos a longo prazo (Pigossi et al., 1971). Ao desidratar a pele, o glicerol preserva sua estrutura, pois substitui a água extraída das células e distribui a água remanescente pelo tecido (Marshall, 1995; Richters, 1996). Além disso, não afeta as fibras de colágeno e elastina presentes na derme (Richters, 1996). Aliado à simplicidade técnica da conservação, o glicerol apresenta ainda ação bacteriostática comprovada (Baare, 1994; Marshall, 1995). Os autores recomendam, porém, a utilização dos enxertos somente após, no mínimo, quatro semanas, para garantir a efetividade do processo. A utilização de um método de esterilização aliada à conservação em glicerol contribui, entre outras vantagens, para diminuir o tempo de quarentena dos enxertos.

Os tecidos adequadamente conservados são armazenados em Bancos de Tecidos.

Em São Paulo, o Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (BT-ICHC) é referência na conservação e armazenagem de pele humana destinada a aloenxerto.

Herson (2004) descreve os procedimentos e os órgãos responsáveis pela seleção de doadores, os critérios para aceite ou recusa do doador (entre eles os resultados da sorologia e microbiologia), a retirada com dermatomo elétrico e avaliação do tecido.

Resumidamente, são considerados doadores para transplante de pele, indivíduos entre 15 e 60 anos dos quais se conhece os antecedentes médicos, em morte cerebral (considerados também doadores de órgãos) ou doadores cadáver após parada cardíaca. A disponibilização de tecidos humanos para transplante foi regulamentada no Brasil pela Lei nº 9.434 (1997), cujo conteúdo estabelece critérios para a retirada de tecidos de doadores *in*

*vivo* ou *post mortem* (precedida de morte encefálica) para transplante ou outras modalidades de tratamento.

São excluídos como doadores os portadores de: doenças autoimunes; enfermidades malignas (câncer, carcinoma, leucemia, linfoma, sarcoma., nevus malignos, nevus múltiplos benignos); doenças transmissíveis bacterianas ou virais, tais como: tuberculose, Aids, hepatite, doenças venéreas. Outras manifestações que excluem o doador, podem ser: infecções na pele, dermatites, lesões inflamadas ou abrasões na área; intoxicações por agentes químicos. Também não são aceitos como doadores, os indivíduos que tenham pertencido a grupos de risco quanto ao comportamento sexual promíscuo, consumidores de drogas injetáveis e tatuados (a menos de 12 meses). Por meio dos exames sorológicos do doador, podem ser detectadas patologias não diagnosticadas.

A pele é destinada à pesquisa no caso de resultados desfavoráveis da triagem ou dos testes microbiológicos e sorológicos.

### **3.3 ESTERILIZAÇÃO**

O conceito de esterilidade refere-se à inativação ou destruição de microorganismos capazes de reprodução. O nível de eficácia obtido com determinado processo esterilizante é aceito para itens que apresentem a probabilidade de serem não estéreis, a um nível de garantia de esterilidade ou *Sterility Assurance Level (SAL)* igual ou superior a  $10^{-6}$ . "Esta definição de esterilidade, como função probabilística, não significa porém inferir que se admita a não esterilidade de um em cada milhão de unidades e sim agregar cuidados adicionais que efetivamente, permitam o emprego seguro do produto" (Pinto, 2000).

#### **3.3.1 Esterilização por Radiação Ionizante**

A inativação de microorganismos por agentes esterilizantes envolve dano irreversível de moléculas essenciais à célula (DNA, proteínas). Da mesma forma, a exposição a estes agentes pode provocar danos ao tecido (Pinto, 2000).

Tecidos biológicos não podem ser esterilizados pelo calor em função da desnaturação de suas proteínas; a utilização de óxido de etileno também não é recomendável pois libera resíduos tóxicos que ficam impregnados no tecido.

A radiação ionizante, de acordo com Phillips (1997), apresenta uma série de vantagens como agente esterilizante de tecidos biológicos, quando comparada aos métodos

tradicionalmente utilizados para esterilização de produtos médico-hospitalares (citados acima):

- não produz resíduos radioativos, não origina substâncias tóxicas nem oferece riscos de contaminação;
- a estrutura do tecido não interfere na esterilização;
- os tecidos podem ser esterilizados na embalagem final e à temperatura de armazenamento;
- não há necessidade de quarentena e a confiabilidade é excelente.

Os princípios adotados no código de práticas para a esterilização de tecidos destinados à aloenxerto por radiação ionizante, são similares àqueles usados para esterilização de produtos para cuidados com a saúde (IAEA, 2002b), isto é, a referência normativa para o estabelecimento da dose esterilizante é a ISO 13409 (1996), que estabelece 25 kGy a dose esterilizante. Entretanto, os vírus são mais radiorresistentes do que outros microorganismos e para garantir a esterilidade nos casos de contaminação viral é necessário irradiar os tecidos com doses mais elevadas. Sullivan (1971) encontrou valores de dose entre 35kGy e 48kGy para inativação de vírus irradiados em suspensão de meio mínimo Eagle.

O efeito da radiação ionizante nos tecidos vivos é bem conhecido. Especificamente, a radiação gama altera o colágeno tipo I da derme em sua estrutura molecular e ocorre aumento da frequência de formação de feixes anormais (Tzaphlidou, 2002).

Em tecidos para aloenxerto, estudos realizados com amostras de tendões e ossos "frescos", indicam que radicais livres (principalmente OH) formados pela radiólise da água disponível nos tecidos, promovem '*cross-linking*' (ligações cruzadas) entre as moléculas de colágeno, tornando-as mais unidas. A cisão das cadeias de polipeptídeos do colágeno ocorre predominantemente quando o ossos e tendões são irradiados em amostras liofilizadas, onde não há disponibilidade de água no tecido (Dziedzic-Goclawaska, 2000).

### 3.4 RADIAÇÃO IONIZANTE

A absorção de energia da radiação nos materiais pode induzir a uma excitação ou ionização. O aumento do nível de energia de um elétron em um átomo ou molécula sem sua ejeção é denominado excitação. Se a radiação tem suficiente energia para ejetá-lo a um ou mais orbitais do átomo, o processo é denominado ionização, e esta radiação é dita radiação ionizante. As radiações ionizantes podem ser emitidas por elementos com núcleos

atômicos instáveis ou produzidas em equipamentos conhecidos como fontes intensas de radiação (Spinks, 1990). As radiações ionizantes são classificadas em eletromagnéticas e particuladas.

A seguir, serão caracterizadas apenas os tipos de radiação que serão utilizadas no processamento das amostras neste trabalho (a caracterização de todos os tipos de radiação ionizante podem ser encontrados em Spinks, 1990).

### **3.4.1 Radiação Gama**

Os raios gama são emitidos por isótopos radioativos; representam o excesso de energia que é lançada pelos núcleos instáveis que decaem para formar elementos estáveis (Hall, 1994). São radiações eletromagnéticas de origem nuclear, com pequeno comprimento de onda, monoenergéticas ou com um pequeno número de energias discretas. O  $^{60}\text{Co}$ , por exemplo, emite fótons de energia igual a 1,332 e 1,173 MeV.

Os raios gama tendem a perder a maior parte de sua energia em uma única colisão. O resultado é que quando uma fração dos raios gama colide com a é completamente absorvida mas os fótons restantes são transmitidos com sua energia inicial total.

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

A energia total transferida pela absorção Compton, em qualquer volume, é diretamente proporcional à densidade eletrônica do meio irradiado. O efeito Compton predomina para energias de fótons entre 1 e 6 MeV. O efeito Compton pode ser tratado como um choque elástico entre o fóton e o elétron (HALL, 1994).

### **3.4.2 Feixe de Elétrons**

Os elétrons são partículas muito pequenas e leves, com carga negativa.

Os feixes de elétrons podem ser produzidos por Aceleradores Industriais de Elétrons, por um cátodo aquecido, por onde passa uma alta corrente que provoca uma saída de elétrons do material. Esses elétrons são acelerados por uma diferença de potencial aplicada entre o cátodo e o ânodo. A formação dos feixes de elétrons está condicionada ao funcionamento dos aceleradores. Uma vez desligado o aparelho não há emissão de

elétrons. O feixe de elétrons possui alta taxa de dose porém com baixo poder de penetração na matéria.

O feixe de elétrons é monoenergético, e por meio da variação do potencial aplicado à aceleração dos elétrons é possível variar a energia cinética dos mesmos aumentando seu poder de penetração. A trajetória do elétron não é linear; os elétrons são desviados e seguem um caminho em “zig-zag” conforme vão perdendo energia para a excitação eletrônica ou ionização dos átomos, de tal forma que o alcance é menor do que a trajetória.

Os elétrons podem provocar diversos eventos ao longo de sua trajetória. Em materiais, cuja densidade é próxima a 1,0 (pele humana, por exemplo), a dose aumenta nos primeiros centímetros de profundidade em decorrência do aumento do número de eventos, devido aos elétrons secundários. Imediatamente abaixo da superfície um pequeno volume do material, interage com os elétrons secundários gerados do feixe primário de elétrons na região e fora da região por espalhamento. Desse modo, os átomos do material interagem com elétrons retro-espalhados vindos de todas as direções. Um pouco mais abaixo da superfície o número de elétrons secundários cai, assim como o feixe primário é atenuado (Spinks, 1990).

### 3.4.3 Efeito Direto e Efeito Indireto da Radiação Ionizante

A alteração química de uma macromolécula, cujos elétrons foram ejetados ocasionada por colisões com partícula carregada de alta energia ou através da ionização direta por fótons. Este efeito é denominado efeito direto da radiação ionizante. O efeito indireto é devido aos radicais livres e moléculas muito reativas produzidos pela radiação em meio aquoso (Biral, 2002).

Alexander (1967) descreve de maneira bem completa, as interações, através dos efeitos direto e indireto, da radiação ionizante com as macromoléculas biológicas.

## 3.5 FONTES DE RADIAÇÃO IONIZANTE

### 3.5.1 Irradiador de Cobalto 60 ( $^{60}\text{Co}$ )

As fontes de  $^{60}\text{Co}$  são fontes seladas que apresentam o núcleo radioativo de cobalto em um compartimento hermeticamente fechado, que não tem contato direto com os materiais externos. O  $^{60}\text{Co}$  utilizado nas fontes de irradiação é produzido pela irradiação do de  $^{59}\text{Co}$ , isótopo estável, sendo formado por uma reação de captura de 1 nêutron. O  $^{60}\text{Co}$  decai com uma meia-vida de 5,27 anos para o isótopo estável  $^{60}\text{Ni}$ :  $^{60}\text{Co} \rightarrow ^{60}\text{Ni} + e^-$

O decaimento é caracterizado pela emissão de dois fótons gama, com energias de 1,17MeV e 1,33MeV, com eficiência de aproximadamente 100% para os dois fótons, e emissão de partícula  $\beta$ , que não atinge o material a ser irradiado pois é barrada pela blindagem da fonte.

O irradiador *Gammacell-220*, do Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR-IPEN/SP), possui 48 lápis de  $^{60}\text{Co}$  de 20cm de altura que circundam internamente a câmara primária totalmente isolada; essa disposição do material radioativo garante uniformidade de dose numa altura de 10 cm do material pois as regiões superior e inferior do cilindro recebem uma dose 15% menor. As amostras são colocadas na câmara secundária, com dimensões limitadas a altura de 20,47 cm e diâmetro de 15,49 cm<sup>2</sup>, e volume total de 3,9 litros. A câmara secundária desce até a meia altura da fonte por um sistema de elevador numa velocidade de 2,8 seg. Dentro da câmara secundária podem ser colocados atenuadores de dose, de chumbo, com diferentes espessuras para 50%, 70% e 90% de atenuação (Silva, 2002) (FIG.3.5).



FIGURA 3.5 – Irradiador de cobalto-60 Gammacell-220. (1) câmara secundária com recipiente para amostras; (2) câmara primária (3) Painel de controle.

O tempo de irradiação, determinado pela taxa de dose do irradiador, é programado no painel de controle e o término da irradiação ocorre automaticamente. As taxas de dose do irradiador são calculadas mensalmente devido ao decaimento do  $\text{Co}^{60}$ .

## 5.2 Acelerador de Elétrons

No acelerador, os elétrons são produzidos em um cátodo aquecido mantido em uma região de potencial mais elevado. Estes elétrons são então acelerados por uma diferença de potencial aplicada entre o cátodo e o ânodo.

Com a aceleração, os elétrons adquirem energia suficiente para atravessar a janela de saída, constituída de uma folha fina de titânio (espessuras entre 20 e 40  $\mu\text{m}$ ), que apresenta resistência mecânica suficiente para suportar a pressão atmosférica do exterior. Toda a região de produção e aceleração dos elétrons é mantida em alto vácuo para permitir que a focalização e a aceleração do feixe em direção à janela sejam adequadas. O acelerador de elétrons deve ser blindados ou estar contido em uma câmara de irradiação construída em concreto para conter os feixes de raios-X gerados pelo freamento de elétrons de alta energia.

O produto da intensidade do feixe ou corrente elétrica formada pelos elétrons em movimento (expressa em mA), pela energia do feixe (expressa em eV), corresponde a potência do feixe de elétrons. A potência média do feixe de elétrons está diretamente relacionada com a taxa de dose de irradiação (SILVA, 2002).

SILVA (2002), descreve os principais componentes do JOB-188 do CTR/IPEN utilizado nos experimentos. Este acelerador possui energia variável entre 0,5 e 1,5 MeV, corrente de até 25 mA e a taxa de dose pode variar de 1,07 kGy/s a 161,67 kGy/s.

O sistema de varredura ("optical and scan system") contém várias bobinas que são utilizadas para centralizar e varrer o feixe de elétrons de 60 a 120cm. Essas bobinas polarizadas determinam a frequência de varredura. O sistema de vácuo no Dynamitron JOB 188 utiliza uma bomba mecânica de vácuo e uma difusora para chegar a um valor de  $10^{-7}$  Torr (FIG.3.6). Ficam em vácuo o filamento, parte interna do tubo de aceleração e o sistema de varredura que é fechado pela janela de titânio.

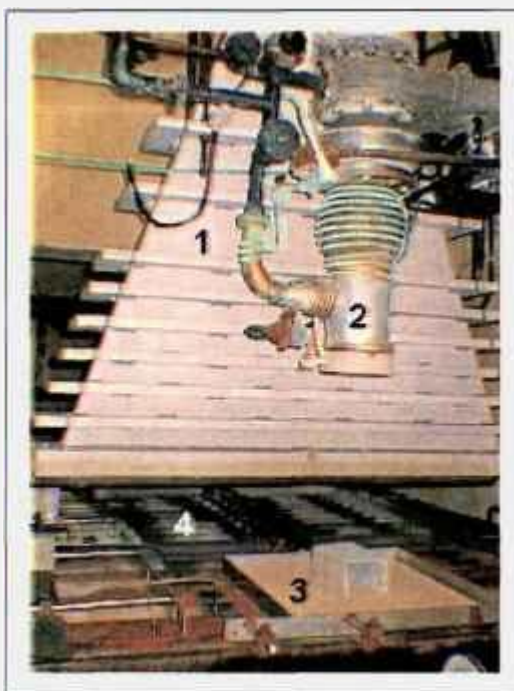


FIGURA 3.6 – Acelerador de elétrons Dynamitron JOB-188. (1) sistema de varredura; (2) bomba de vácuo; (3) bandeja com suporte para amostras; (4) esteira transportadora.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram utilizadas amostras de pele humana para aloenxerto de espessura parcial, (FIG.4.1) retiradas de doador de múltiplos órgãos, com dermatômo elétrico, conservadas em glicerol concentrado (mínimo 85%). As amostras foram cedidas pelo Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As amostras embaladas receberam sensor indicador de radiação e dosímetro. Para amostras irradiadas com gama foi utilizado o dosímetro de polimetilmetacrilato Red Perpex, com range de 5 a 50 kGy. Para amostras irradiadas no acelerador de elétrons foi utilizado o dosímetro de nitrato de celulose CTA Fuji, com range de 5 a 300 kGy.

No irradiador de  $^{60}\text{Co}$ , as amostras foram acondicionadas em recipiente plástico cilíndrico com tampa (14 cm de diâmetro e 20 cm de altura) revestido com espuma de poliuretano

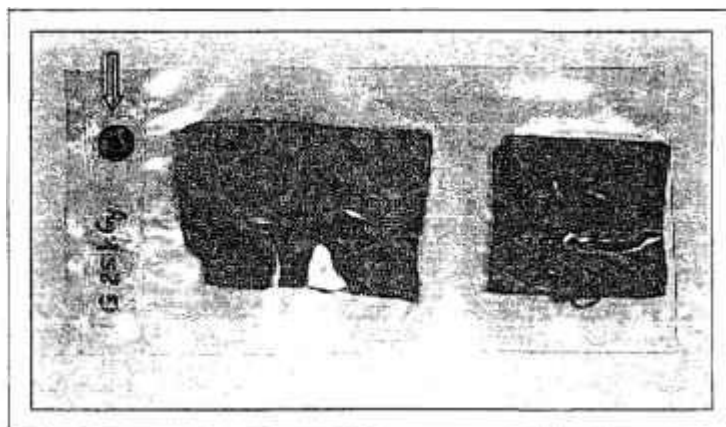


FIGURA 4.1 - Exemplo de amostras de tiras de pele de espessura parcial acondicionadas em embalagem selada térmicamente, com identificação de que o material foi irradiado (seta).

## 4.1.2 IRRADIADORES

### 4.1.2.1 Irradiador de Cobalto-60

As amostras foram irradiadas no irradiador *Gammacell-220*, do Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR-IPEN/SP). Em outubro de 2003, a atividade da *Gammacell-220* era de 5,54 kCi e a taxa de dose 4,58 kGy/h.

### 4.1.2.2 Acelerador de Elétrons

O acelerador de elétrons modelo JOB-188 do Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR-IPEN/SP), foi ajustado para atingir os seguintes parâmetros de irradiação:

- Energia dos elétrons: 0,73 MeV (cálculo em função da espessura e da densidade da pele, considerada a mesma do glicerol em que estava imersa, 1,26 g/cm<sup>3</sup>).
- Corrente: 0,4 mA.
- Freqüência de varredura do feixe de elétrons: 100Hz.
- Velocidade do sistema de transporte (esteira ou bandeja): 3,36 m/min.
- Taxa de dose: 2,44 kGy/s.
- Tempo de exposição da amostra ao feixe de elétrons: 0,5 seg.

Nas condições descritas a dose por uma passagem da amostra sob o feixe de elétrons foi de 1,0875 kGy.

## 4.1.3 ENSAIOS BIOMECÂNICOS DE TRAÇÃO

### 4.1.3.1 Corte do corpo de prova

O corte do corpo de prova foi feito com faca de aço em formato padrão de halteres (*'dumbbell'*) montada em suporte de madeira, com dimensões de acordo com a norma ASTM D 638: comprimento total de 50 mm e extensômetro (G) com largura de 4 mm e comprimento de 30 mm. (FIG. 4.2 A e B). Para realização dos cortes, as amostras de pele foram apoiadas em placa de acrílico com a epiderme voltada para cima; sobre ela foi colocada a faca com a parte cortante voltada para a pele. O corte foi feito com ajuda da prensa hidráulica Carver modelo C com carga de 1500 kg.

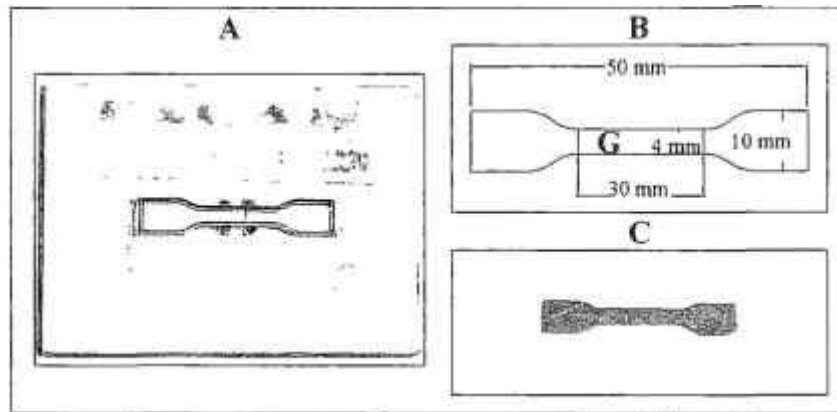


FIGURA 4.2 – (A) Faca de aço, em formato de halteres, para corte de corpo de prova, montada em suporte de madeira; (B) dimensões do corpo de prova; (G) extensômetro; (C) corpo de prova de pele.

#### 4.1.3.2 Ensaio de resistência à tração

Os ensaios de resistência à tração foram realizados na Máquina Universal de Ensaio Instron, modelo 5567, do CTR/IPEN à temperatura ambiente, com módulo de carga de 1 kN e garras adequadas para materiais não rígidos.

### 4.1.4 ESTUDOS MORFOLÓGICOS

#### 4.1.4.1 Microscópio óptico

As observações das lâminas histológicas e registros fotográficos foram realizados no microscópio óptico Axioplan Carl Zeiss®, binocular (ocular 10x e objetiva 40x), dotado de filtro polarizador e câmara fotográfica, do Laboratório de Biologia Molecular do IPEN (LBM/IPEN).

#### 4.1.4.2 Microscópio eletrônico de transmissão

O estudo ultra-estrutural foi realizado no microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-100CXII a uma voltagem de 80kV, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP).

## 4.2 MÉTODOS

Antes de seu início, este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Ipen, processo número 028/CEP-IPEN/SP (ANEXO A).

Foram disponibilizadas para pesquisa pelo BT-ICHC pele, conservada em glicerol concentrado (mínimo 85%) de oito doadores (ANEXO B).

### 4.2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

De cada doador, foram selecionados conjuntos de amostras de pele por meio da técnica de amostragem sistemática (VIEIRA, 2000) limitando a espessura das amostras entre 0,15 mm e 0,25 mm. A espessura foi medida com paquímetro com precisão de 0,05 mm (Mitutoyo®), antes e após a irradiação.

As tiras de pele selecionadas como amostras foram cortadas em retângulos de aproximadamente 6,0 x 5,5 cm e seladas térmicamente em embalagem poli-nylon 5 camadas, com espessura de 0,05 mm e densidade de 1,15 g/cm<sup>3</sup>. Na face externa da embalagem foi fixada o identificador de irradiação (FIG.4.1) e o dosímetro adequado para o tipo de irradiação utilizado.

As amostras levadas para o irradiador de <sup>60</sup>Co foram acondicionadas em recipiente plástico cilíndrico tampado. Para evitar o aquecimento das amostras devido ao tempo de irradiação (5h45min para dose de 25 kGy e 11h31min para dose de 50 kGy) foi adicionado gelo picado dentro do recipiente com as amostras.

Para irradiação com dose de 25 kGy foram selecionados três conjuntos de amostras de seis doadores. O primeiro conjunto de amostras foi mantido nas condições iniciais, não irradiado, denominado grupo controle. O segundo conjunto de amostras foi submetido à irradiação gama em irradiador de <sup>60</sup>Co, Gammacell-220. O terceiro conjunto de amostras foi exposto ao feixe de elétrons, à temperatura ambiente, com sistema de transporte de esteira no Acelerador Dynamitron JOB 188.

Estudos comparativos, do sistema de transporte no acelerador de elétrons – esteira e bandeja – na dose de 25kGy à temperatura ambiente e em recipiente resfriado com gelo, foram realizados em amostras de oito doadores.

Para irradiação com dose de 50 kGy foram selecionados três conjuntos de amostras de três doadores. O primeiro conjunto de amostras foi mantido nas condições iniciais, não irradiado, denominado grupo controle. O segundo conjunto de amostras foi submetido à

irradiação gama em irradiador de  $^{60}\text{Co}$ , Gammacell-220. O terceiro conjunto de amostras foi exposto ao feixe de elétrons no Acelerador Dynamitron JOB 188.

Para estudo do efeito de doses crescentes sobre os valores do módulo de elasticidade da pele irradiada em comparação à pele não irradiada foram selecionadas amostras de três doadores para as doses de 15, 25, 30, 40 e 50kGy no irradiador gama e para as doses de 5, 10, 20, 25, 40 e 50kGy no acelerador de elétrons.

#### **4.2.1.1 Manipulação do material biológico e instrumentos**

Todas as amostras foram manipuladas com equipamento individual de proteção, isto é, luvas de procedimento, máscara cirúrgicas e avental, em laboratório adequado. O equipamento utilizado (faca de corte, Instron) foram higienizados com álcool etílico 70% antes e após sua utilização. Os instrumentos cirúrgicos (pinça, bisturi, tesoura, frascos) foram lavados com sabão líquido especial 'Extran', em seguida embalados em envelope grau cirúrgico e autoclavados. O material plástico, que não suporta autoclavagem, foi embalado adequadamente e esterilizado com radiação ionizante a 25 kGy.

#### **4.2.1.2 Descarte do material biológico**

A pele descartada durante os experimentos foi mergulhada em frasco tampado com hipoclorito de sódio. O descarte final foi feito em saco plástico apropriado, e o material foi então autoclavado. Após esse procedimento, realizado no próprio laboratório, o material foi embalado em saco branco e depositado em "contêiner" próprio para descarte de material biológico de acordo com a NBR-ABTN 12809/1993, que dispõe sobre o manuseio de resíduos de serviços de saúde, e a Portaria Estadual CVS 01, de 18 de janeiro de 2000, que estabelece que a unidade (laboratório de pesquisa) deve instituir ações para garantir o princípio da biossegurança nos programas de garantia da qualidade.

#### **4.2.2 ENSAIOS BIOMECÂNICOS DE RESISTÊNCIA À TRACÇÃO**

Após a irradiação e antes dos ensaios biomecânicos, as amostras foram lavadas em solução salina 0,9% estéril e mergulhadas em nova solução por 15 minutos para retirada do glicerol, reidratação e recuperação das características físicas normais do tecido como a maleabilidade e opacidade (HERSON, 1999), simulando as condições rotineiras de uso no centro cirúrgico.

Os ensaios de resistência à tração foram realizados segundo a norma ASTM D638 (1977) na Máquina Universal de Ensaio Instron com o módulo de carga de 1 kN (FIG. 3.4). Nos ensaios, o corpo de prova (FIG. 4.2 C) foi fixado a uma distância de 27 mm entre garras e submetido à tração até a ruptura da amostra. A velocidade de afastamento das garras foi de 30 mm/min. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente de aproximadamente 23 °C e umidade relativa do ar de 50 %.

Os gráficos, obtidos com o programa Merlin 2.21 da Máquina de Ensaio Instron, apresentaram a curva da relação entre a tensão de tração aplicada e o correspondente alongamento da amostra.

A resistência à tração na ruptura é representada pela tensão ou "stress" ( $\sigma$ , em MPa) que é a razão entre a força aplicada ( $F$ , em N) e a área da seção transversal ( $A$ , em mm):

$$\sigma = F/A \quad (1)$$

A deformação ou "strain" ( $\varepsilon$ , em mm/mm) da amostra é o resultado da variação do comprimento ( $L$ ) pelo comprimento inicial ( $L_1$ ):

$$\varepsilon = L / L_1 ; \text{ sendo que } L = L_2 - L_1 \quad (2)$$

onde,  $L_2$  = comprimento final.

O módulo de elasticidade ( $E$ ) foi calculado na porção linear da curva, como é ilustrado na FIG.4.3, dividindo-se a variação de tensão ("stress") correspondente a uma secção do segmento, pela correspondente variação de alongamento ("strain"):

$$E = \Delta\sigma/\Delta\varepsilon \text{ ou } E = \sigma_2 - \sigma_1 / \varepsilon_2 - \varepsilon_1 \quad (3)$$

O módulo de elasticidade ( $E$ ) ou módulo de Young é a relação entre a tensão e o alongamento do tecido, na região elástica da curva. Assim, quanto mais resistente o tecido ao alongamento, maior o valor do módulo de elasticidade.

A FIG.4.3 ilustra o procedimento de cálculo do módulo de elasticidade no gráfico obtido pelo software Merlin 2.21, programa da Máquina Universal de Ensaio Instron compatível com Windows 3.1.

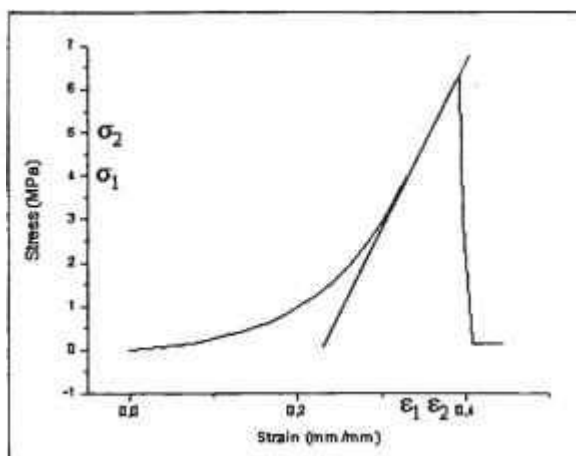


FIGURA 4.3 – Gráfico obtido com o software Merlin 2.21, mostrando o prolongamento da porção linear (/) e a indicação dos valores de tensão ( $\sigma_1$  e  $\sigma_2$ ) e de alongamento ( $\epsilon_1$  e  $\epsilon_2$ ) para cálculo do módulo de elasticidade de acordo com a equação  $E = \Delta\sigma/\Delta\epsilon$  (3).

#### 4.3 HISTOLOGIA

Foram preparadas amostras de pele (3 x 10 mm) do grupo controle e dos grupos experimentais para montagem de lâminas histológicas. As técnicas de coloração utilizadas foram a coloração de rotina com hematoxilina-eosina, tricromo de Mallory e picro-sirius (sendo as duas últimas colorações específicas para colágeno), e resorcina de Weigert (coloração específica para fibras do sistema elástico).

As amostras, inicialmente fixadas em formaldeído 10%, foram desidratadas em banhos com soluções crescentes de etanol (de 70% até o álcool absoluto) e diafanizadas com xilol. Em seguida, foram imersas em parafina e mantidas em estufa. Procedeu-se, então, a inclusão em parafina e montagem em bloco de parafina. Os cortes histológicos foram realizados no micrótomo, com os blocos de parafinas endurecidos e esfriados com gelo, na espessura final de 5  $\mu\text{m}$ . Os cortes foram colocados em banho-maria (40 °C) e em seguida distendidos em lâminas de vidro apropriadas para microscopia de luz. As lâminas secaram em estufa a 56 °C.

Previamente à coloração foi promovida a desparafinização do tecido com xilol e sua hidratação com banhos subsequentes de álcool etílico absoluto até a solução diluída de 70%. A coloração se processou mergulhando-se as lâminas em cubetas com os corantes e seqüência específicos de acordo com o protocolo de determinada técnica de coloração. Os procedimentos descritos foram realizados no Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os protocolos para os tipos de coloração utilizados são encontrados em Behmer (1976).

As observações das lâminas e registro fotográfico foram realizados no LBM/IPEN em microscópio Axioplan Carl Zeiss® (ocular 10x e objetiva 40x) dotado de cassete fotográfico. Para as observações e registro fotográfico das lâminas coradas com picrosirius utilizou-se o filtro polarizador e analisador.

#### 4.4 ULTRA-ESTRUTURA

Foram preparadas amostras de pele do grupo controle e dos grupos experimentais, fixadas em Karnovsky 2% (glutaraldeído 2%: paraformaldeído 2%: tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,3).

Os procedimentos descritos a seguir (Bozzola, 1992) foram realizados no Laboratório de Biologia do Endométrio do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Após a fixação, os fragmentos de 1 x 1 mm foram lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M com pH 7,3 e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato 0,1M à temperatura ambiente. Em seguida, os fragmentos foram desidratados em uma série crescente de concentrações de etanol e infiltrados com resina Spürr e óxido de propileno na proporção de 1:1. Para inclusão os tecidos foram deixados em resina pura à temperatura ambiente. Em seguida os fragmentos foram orientados em forma apropriada para obtenção de corte transversal no qual possam ser observadas epiderme e derme. Os fragmentos permaneceram em estufa seca a 60 °C para polimerização da resina e formação dos blocos.

Os blocos foram cortados em micrótomo com navalha de vidro em cortes semi-finos de 1 µm, que foram corados com azul de toluidina a 0,25% em borato de sódio a 1% em água destilada. A partir da observação dos cortes semi-finos ao microscópio de luz, foram definidos os melhores campos para a realização dos cortes ultrafinos. Os cortes ultrafinos com cerca de 60 nm de espessura, foram identificados por sua cor prateada devido ao índice de refração quando flutuam na água da cuba do micrótomo.

Os cortes selecionados foram depositados em tela de cobre sobre a qual foi realizada a contrastação com solução de acetato de uranila 2%, seguida de contrastação com citrato de chumbo.

As observações e registro fotográfico foram realizadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-100CXII a uma voltagem de 80kV (ICB/USP).

## 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores do módulo de elasticidade para as amostras de pele apresentaram grande dispersão, por isso se fez necessário aplicar testes estatísticos para verificar a significância dos resultados.

### 4.5.1 Análise estatística descritiva

Inicialmente, foi realizada a análise exploratória dos dados e a eliminação de valores “outliers” que pudessem comprometer o estudo.

Definiu-se como unidade amostral, o conjunto de dados de um doador. As medidas estatísticas de tendência central e medidas de variabilidade foram calculadas para os valores do módulo de elasticidade dos grupos controle e de cada um dos grupos experimentais.

### 4.5.2 Teste de significância

Foi proposto o teste de significância *t de Student*, entre os grupos da mesma unidade amostral, ou conjunto de amostras de um doador ( $n < 30$ ).

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

$H_1: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$

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

O teste considerou a independência das amostras e variâncias desconhecidas e diferentes. Dessa forma aplicou-se o teste *t* dado pela equação (4). A diferença entre as médias está indicada na expressão (5) e a variância da diferença das médias está indicada na expressão (6). O cálculo do grau de liberdade está representado na equação (7) :

$$t = \frac{\bar{d}}{\sqrt{s_d^2}} \quad (4)$$

$$\bar{d} = \bar{x}_1 - \bar{x}_2 \quad (5)$$

$$s_d^2 = \left( \frac{s_1^2}{n_1} \right) + \left( \frac{s_2^2}{n_2} \right) \quad (6)$$

$$F = \frac{\left( \frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{\frac{\left( \frac{s_1^2}{n_1} \right)^2}{n_1 - 1} + \frac{\left( \frac{s_2^2}{n_2} \right)^2}{n_2 - 1}} \quad (7)$$

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

Feitos os cálculos, procurou-se o valor de  $t_c$  ( $t$  crítico) na tabela de "valores de  $t$ " (VIEIRA, 2002), ao nível de significância estabelecido de 1% e com "g" graus de liberdade. Toda vez que o valor absoluto de  $t$  calculado foi igual ou maior do que o valor da tabela, concluiu-se que a diferença entre as médias era significativa e a  $H_0$  foi rejeitada.

Para amostras muito pequenas ( $n < 12$ ), foi aplicado o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, que é uma alternativa para o teste  $t$  no caso de amostras independentes. Recorreu-se às tabelas que dão os valores críticos de  $\Sigma R_1$  por que "quando as amostras são pequenas, a distribuição da variável  $z$  não se aproxima, satisfatoriamente, da distribuição normal padronizada" (VIEIRA, 2003).

Pelo *Teorema do Limite Central* (CURSO, 2002) pode ser aplicado um teste de hipótese para comparar as médias dos grupos controle e irradiados de todos os doadores. Foi proposto o teste de significância  $t$  de *Student* para amostras pareadas

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

$H_1: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$

foi aplicado entre a média dos valores do módulo de elasticidade do grupo controle ( $\bar{x}_1$ ) e do grupo irradiado ( $\bar{x}_2$ ), com gama ou com elétrons, de todas as unidades amostrais

Dessa forma aplicou-se o teste  $t$  dado pela equação (9). A diferença entre as unidades de cada um dos pares está indicada na expressão (10), a média das diferenças está indicada em (11) e a variância da diferença das médias está indicada na expressão (12). O cálculo do grau de liberdade está representado na equação (13) :

$$t = \frac{\bar{d}}{\sqrt{\frac{s^2}{n}}} \quad (9)$$

$$d = \bar{x}_1 - \bar{x}_2 \quad (10)$$

$$\bar{d} = \frac{\sum d}{n} \quad (11)$$

$$s_d^2 = \frac{\sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n}}{n-1} \quad (12)$$

$$g = n - 1 \quad (13)$$

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

Feitos os cálculos, procurou-se o valor de  $t_c$  ( $t$  crítico) na tabela de "valores de  $t$ " (VIEIRA, 2002), ao nível de significância estabelecido e com " $g$ " graus de liberdade. Toda vez que o valor absoluto de " $t$ " calculado foi igual ou maior do que o valor da tabela, concluiu-se que a diferença entre as médias era significativa e a  $H_0$  foi rejeitada.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Os doadores, foram caracterizados quanto a idade, sexo e cor da pele (TAB.5.1).

TABELA 5.1 – Caracterização das amostras de pele para pesquisa.

Doador	Nº lote	Idade	Sexo	Cor da pele
I	011/01	43	F	branca
II	013/01	54	M	branca
III	008/02	43	F	parda
IV	016/02	21	M	parda
V	028/02	20	M	branca
VI	033/02	34	M	branca
VII	022/01	20	F	branca
VIII	008/03	42	F	branca

As amostras foram identificadas de acordo com a legenda abaixo:

C – amostras não irradiadas (controle).

G25 – amostras submetidas à radiação gama com dose de 25 kGy.

G50 – amostras submetidas à radiação gama com dose de 50 kGy.

E25 – amostras submetidas ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy.

E50 – amostras submetidas ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy.

As amostras destinadas aos testes de resistência à tração e às análises morfológicas de micro e ultra-estrutura foram selecionadas a partir das tiras de pele dos doadores descritos na TAB.5.1, sendo utilizadas apenas aquelas com espessura entre 0,15 e 0,25 mm (TAB.5.2).

TABELA 5.2 – Média dos valores de espessura das amostras de pele (em mm) para os lotes irradiados a 25 kGy e 50 kGy.

Doador	C	G 25	G 50	E 25	E 50
I	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,02	-	0,22 ± 0,02	-
II	0,19 ± 0,03	0,18 ± 0,03	-	0,18 ± 0,02	-
III	0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,02	-	0,19 ± 0,03	-
IV	0,20 ± 0,04	0,17 ± 0,02	-	0,21 ± 0,03	-
V	0,20 ± 0,04	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,20 ± 0,04
VI	0,19 ± 0,04	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,04	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,04
VII	0,15 ± 0,00	-	-	0,18 ± 0,03	0,15 ± 0,00
VIII	0,15 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,15 ± 0,00	0,15 ± 0,00

## 5.2 TESTES BIOMECÂNICOS DE RESISTÊNCIA À TRAÇÃO

O módulo de elasticidade ou módulo de Young (em MPa) foi calculado, para cada uma das amostras, de acordo com a equação (3) exposta no item 2.2 de Métodos. Como já descrito nesse item, os dados para tais cálculos foram obtidos dos gráficos correspondentes a cada amostra. A FIG.5.1 ilustra, como exemplo, o gráfico confeccionado pelo software Merlin 2.21 para a amostra nº 3 do grupo controle do doador VIIIb. A seguir encontram-se os cálculos do módulo de elasticidade para a referida amostra.

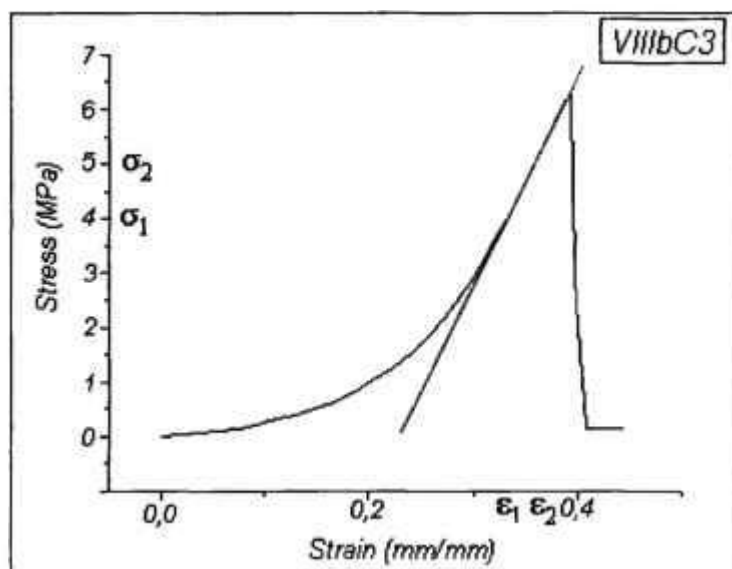


FIGURA 5.1 – Gráfico obtido com o software Merlin 2.21 para a amostra nº 3 do grupo controle do doador VIIIb. (1) A reta em azul foi construída manualmente para evidenciar a parte linear da curva.

Cálculo do módulo de elasticidade:

$$E = \Delta\sigma / \Delta\varepsilon \text{ ou } E = \sigma_2 - \sigma_1 / \varepsilon_2 - \varepsilon_1 \Rightarrow E = 1 \text{ MPa} / 0,03117 \Rightarrow E = 32,08 \text{ MPa}$$

Os cálculos dos valores do módulo de elasticidade para as demais amostras desse doador e dos outros, tanto para os grupos controle quanto para os experimentais, foram realizados de acordo com o exemplificado acima. Os resultados para irradiação com dose de 25 kGy e 50 kGy encontram-se, respectivamente, no APÊNDICE A e APÊNDICE B.

Em 5% das amostras submetidas ao teste de resistência à tração, a curva obtida no gráfico apresentou-se diferente da curva exemplificada na FIG.5.1. O segundo segmento da curva (indicado pela seta) do gráfico ilustrado na FIG.5.2 representa uma pequena resistência da amostra após o pico máximo do valor de "stress". De acordo com as observações, realizadas durante o teste, esses valores indicam a resistência à tração da camada corneificada da epiderme após a ruptura da derme.

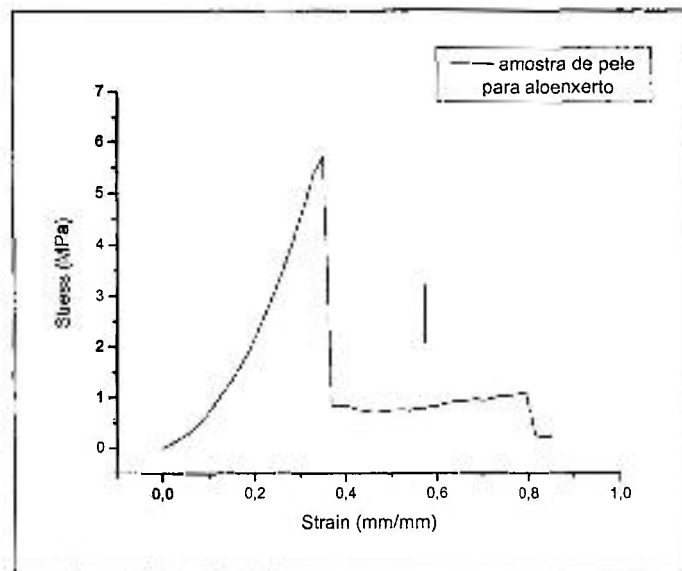


FIGURA 5.2 – Relação entre "stress" x "strain" em 5% das amostras testadas. A seta indica a resistência à tração da camada corneificada da epiderme após a ruptura da derme.

### 5.2.1. Amostras submetidas à irradiação gama e ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy

As amostras de pele de seis doadores foram submetidas à radiação gama e ao feixe de elétrons de alta energia (transportadas pelo sistema de esteira à temperatura ambiente) com dose de 25 kGy. Os efeitos da radiação nas duas fontes foram comparados utilizando os valores do módulo de elasticidade. Foram efetuadas também comparações quanto ao sistema de transporte das amostras até o feixe no acelerador de elétrons (esteira e bandeja) e quanto à temperatura da amostra durante a irradiação (temperatura ambiente e resfriamento).

A TAB.5.3 indica a média dos valores do módulo de elasticidade do grupo controle e grupos experimentais de cada doador, para comparação dos efeitos da radiação gama e do feixe de elétrons.

TABELA 5.3 - Valores da média do módulo de elasticidade (em MPa) do grupo controle, do grupo irradiado com gama e do grupo submetido ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy.

Doador	Controle	Gama	Elétrons
I	37,76 ± 8,48	31,67 ± 12,50	25,19 ± 8,92
IIa	24,36 ± 4,27	20,84 ± 5,47	18,08 ± 5,33
IIIa	14,30 ± 5,05	14,03 ± 2,93	8,51 ± 2,83
IV	27,59 ± 5,83	23,07 ± 7,00	20,69 ± 6,48
Va	30,13 ± 11,02	28,11 ± 8,60	20,69 ± 8,29
VIIIa	46,79 ± 6,25	40,51 ± 2,65	33,07 ± 6,28

Com base nos dados da TAB.5.3, montou-se o gráfico comparativo apresentado na FIG.5.3 no qual se visualiza a correlação entre os valores das médias do módulo de elasticidade (do grupo de amostras controle, do grupo de amostras irradiadas com gama e do grupo de amostras submetidas ao feixe de elétrons) para cada um dos doadores.

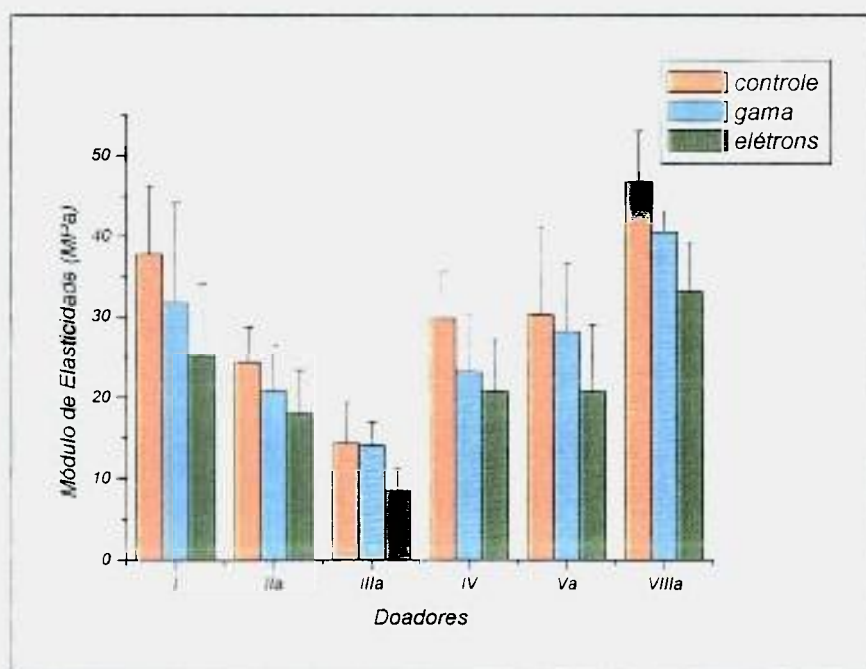


FIGURA 5.3– Valores de Módulo de Elasticidade (em MPa) para amostras irradiadas com gama e submetidas ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy.

Para uma melhor visualização da variabilidade do módulo de elasticidade inter-doadores construiu-se o gráfico da FIG.5.4 (com os dados da TAB.5.3) que compara apenas os valores do grupo controle de cada um dos seis doadores.

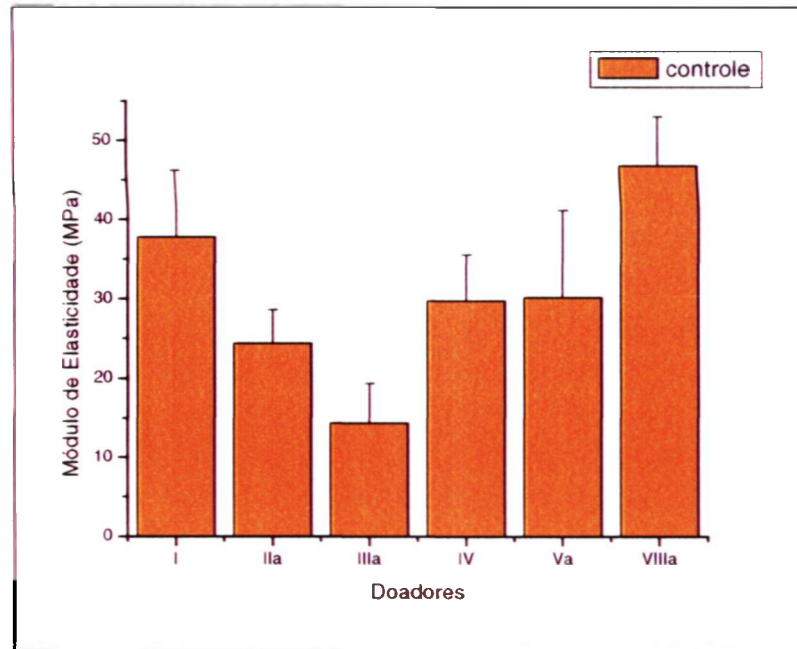


FIGURA 5.4 – Gráfico comparativo dos valores de Módulo de Elasticidade (em MPa) das amostras dos grupos controle dos seis doadores.

Foi estabelecida a proporcionalidade entre as amostras controle e experimentais. Considerou-se a porcentagem de cada grupo experimental (irradiado com gama e submetido ao feixe de elétrons) em relação ao grupo controle. A TAB.5.4 indica a média, em porcentagem, dos valores do módulo de elasticidade dos grupos experimentais de cada doador em relação ao seu grupo controle (considerado 100%).

TABELA 5.4 - Valores da média do módulo de elasticidade (em porcentagem) do grupo controle, do grupo irradiado com gama e do grupo submetido ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy.

Doador	Controle (%)	Gama (%)	Elétrons (%)
I	100	83.87	66.71
IIa	100	85.55	74.22
IIIa	100	98,11	59,51
IV	100	77.62	69.62
Va	100	93.30	68.67
VIIa	100	86.58	70.68

Com base nos dados da TAB.5.4, montou-se o gráfico comparativo apresentado na FIG.5.5 no qual se visualiza a correlação entre os valores das médias do módulo de elasticidade (em porcentagem) dos grupos de amostras irradiadas com gama e submetidas ao feixe de elétrons em relação ao grupo controle para cada um dos doadores.

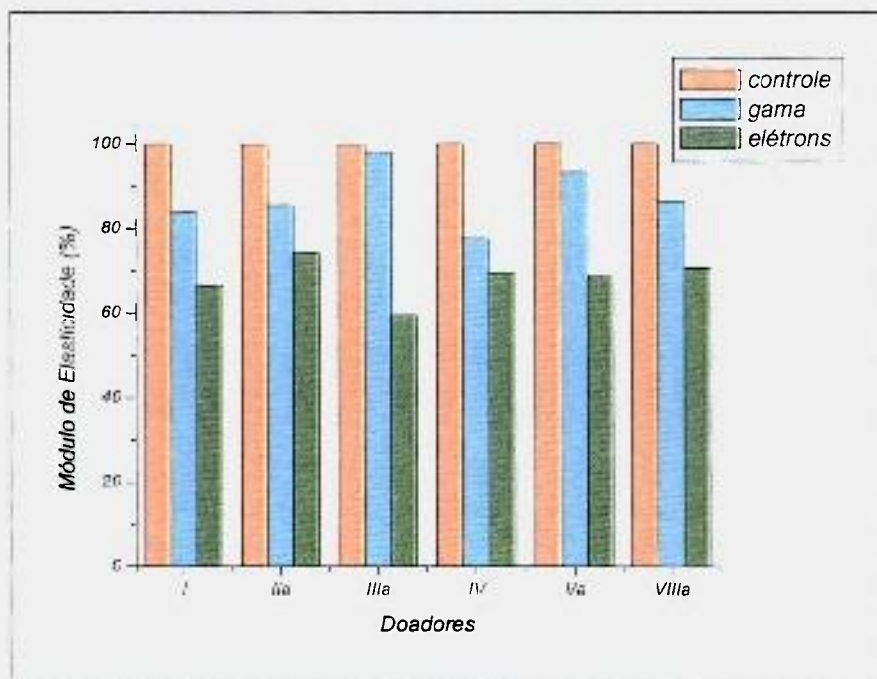


FIGURA 5.5– Gráfico de porcentagem dos grupos experimentais submetidos à irradiação gama e ao feixe de elétrons, com dose de 25kGy, em relação ao controle.

### 5.2.1.1 Análise estatística

#### 5.2.1.1.1 Análise estatística descritiva

A análise estatística preliminar revelou alta variabilidade intrínseca nos valores do módulo de elasticidade de dois doadores, tanto no grupo controle como no grupo submetido ao acelerador de elétrons (grande valor de desvio padrão).

A análise descritiva dos seis doadores, considerando-se as médias do módulo de elasticidade, foi elaborada com os valores de porcentagem dos grupos irradiados em relação aos grupos controle.

Na representação gráfica da FIG.5.6, podem ser observados os efeitos da irradiação com gama e com elétrons sobre os valores do módulo de elasticidade (em porcentagem). Para melhor visualização, foi traçada uma reta (em vermelho) na altura do valor limite entre os dois efeitos.

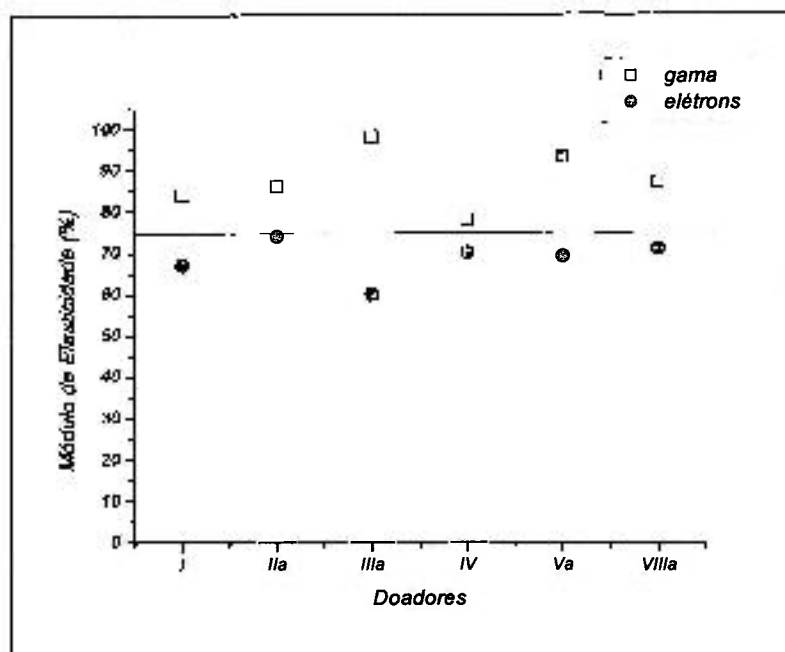


FIGURA 5.6 – Módulo de Elasticidade dos grupos irradiados com gama e com elétrons, em porcentagem em relação ao grupo controle de cada doador. (-) A reta em vermelho representa o valor limite entre os dois efeitos.

As medidas centrais e de variabilidade estão apresentadas na TAB.5.5.

TABELA 5.5 – Medidas centrais e de dispersão do módulo de elasticidade das amostras dos seis doadores para os grupos irradiados com gama e com elétrons (em proporção) a 25kGy.

Estatísticas	P gama	P elétrons
média	0,88	0,69
mediana	0,87	0,70
máximo	0,98	0,74
mínimo	0,78	0,60
variância	0,005	0,002
desvio padrão	0,07	0,05
amplitude	0,20	0,14

#### 5.2.1.1.2 Teste de significância

Cada doador foi analisado em separado por meio do estudo de distribuições amostrais de estatísticas de pequenas amostras ( $n < 30$ ), teste t de "Student", entre as médias do grupo controle e dos grupos irradiados de cada doador. Os resultados calculados (de acordo com as equações (4) a (7) de Métodos) estão apresentados na TAB.5.6.

TABELA 5.6 – Teste de significância de "Student" para média do módulo de elasticidade (E, em MPa) dos grupos irradiados com gama e com elétrons com dose de 25 kGy, comparados à média do grupo controle. Nível de significância=1%.

Doador	Grupo	Média E	s <sup>2</sup>	n	g	t	t <sub>c</sub>	Diferença
I	controle	37,76	71,85	12	-	-	-	-
	gama	31,67	156,21	20	29,43	1,49	2,76	NS
	elétrons	25,19	79,61	15	24,20	3,72	2,80	S
II	controle	24,36	18,24	16	-	-	-	-
	gama	20,84	29,96	18	31,51	2,07	2,75	NS
	elétrons	18,08	28,37	15	26,85	3,63	2,77	S
III	controle	14,30	25,45	13	-	-	-	-
	gama	14,03	8,58	16	18,37	0,17	2,88	NS
	elétrons	8,51	7,99	12	19,14	3,50	2,86	S
IV	controle	29,72	11,35	10	-	-	-	-
	gama	23,07	49,04	3	2,28	2,37	9,96	NS
	elétrons	20,69	42,02	7	8,29	3,77	3,36	S
V	controle	30,13	121,40	25	-	-	-	-
	gama	28,11	74,00	21	43,80	0,68	2,70	NS
	elétrons	20,69	68,74	25	44,58	3,42	2,70	S
VIIIa	controle	46,79	39,12	3	-	-	-	-
	gama	40,51	7,00	3	2,69	1,60	5,84	NS
	elétrons	33,07	39,49	4	4,47	2,86	4,60	NS

s<sup>2</sup> = variância; n = n° de amostras; g = graus de liberdade; t = valor de t calculado; t<sub>c</sub> = valor de t crítico; NS = diferença não significativa; S = diferença significativa.

Para os doadores IV e VIIIa, foi realizado também o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* para amostras muito pequenas (n<12), cujos resultados confirmaram os obtidos pelo teste *t de Student* (APÊNDICE C).

De acordo com o exposto na TAB.5.6, no caso das amostras irradiadas com gama na dose de 25kGy, para todos os doadores, a hipótese H<sub>0</sub>:  $\bar{x}_{controle} = \bar{x}_{gama}$  foi confirmada. No caso das amostras submetidas ao feixe de elétrons com dose de 25kGy, para os doadores I, IIa, IIIa, IV e Va, a hipótese H<sub>0</sub>:  $\bar{x}_{controle} = \bar{x}_{elétrons}$  foi rejeitada. Para o doador VIIIa, a hipótese H<sub>0</sub>:  $\bar{x}_{controle} = \bar{x}_{elétrons}$  foi confirmada.

Para comparar as médias dos grupos controle e irradiados de todos os doadores. Foi proposto o teste de significância *t de Student* para amostras pareadas. Os resultados calculados (de acordo com as equações (9) a (13) de Métodos) estão apresentados na TAB.5.7.

TABELA 5.7 – Teste de significância de "Student" para médias do módulo de elasticidade (E, em MPa) de todos os doadores nos grupos irradiados com gama e com elétrons com dose de 25 kGy, comparados à média do grupo controle p. Nível de significância=1%.

Grupo	Média E	s <sup>2</sup>	n	g	t	t <sub>c</sub>	Diferença
controle	30,51	123,79	6	-	-	-	-
gama	26,37	84,96	6	5	3,86	4,03	NS
elétrons	21,04	65,59	6	5	7,22	4,03	S

s<sup>2</sup> = variância; n = n° de amostras; g = graus de liberdade; t = valor de t calculado; t<sub>c</sub> = valor de t crítico; NS = diferença não significativa; S = diferença significativa.

De acordo com o exposto na TAB.5.7, no caso das amostras irradiadas com gama com dose de 25kGy, para todos os doadores, a hipótese H<sub>0</sub>:  $\bar{x}_{controle} = \bar{x}_{gama}$  foi confirmada e a hipótese H<sub>0</sub>:  $\bar{x}_{controle} = \bar{x}_{elétrons}$  foi rejeitada.

### 5.2.2 Amostras submetidas ao feixe de elétrons com modificação do sistema de transporte e da temperatura com dose de 25 kGy

As amostras de pele de oito doadores foram submetidas ao feixe de elétrons de alta energia utilizando o sistema de transporte de esteira e o de bandeja em duas situações: irradiação à temperatura ambiente e com resfriamento. Os efeitos da radiação nessas situações foram comparados utilizando-se os dados da TAB.5.8.

TABELA 5.8 - Valores da média do módulo de elasticidade (em MPa) do grupo controle e dos grupos submetidos ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy utilizando o sistema de transporte de esteira e o de bandeja, irradiados à temperatura ambiente e com resfriamento.

Doador	CONTROLE	ESTEIRA 25 kGy		BANDEJA 25 kGy	
		temp. ambiente	resfriamento	temp. ambiente	resfriamento
IIb	72,00 ± 0,00	-	-	40,60 ± 10,65	-
IIIc	63,75 ± 5,30	-	-	29,68 ± 3,21	-
IIId	69,69 ± 3,09	-	-	-	58,86 ± 9,26
VIb	72,64 ± 12,25	54,27 ± 4,46	-	32,63 ± 3,90	-
VIc	31,39 ± 8,64	-	21,58 ± 2,58	-	29,73 ± 6,79
VIIIc	30,53 ± 3,51	20,18 ± 2,03	18,64 ± 7,30	-	-
IIId	40,18 ± 5,58	-	-	23,10 ± 4,14	25,36 ± 6,74
IIIf	22,95 ± 4,76	11,73 ± 4,66	-	13,01 ± 2,48	-

Com base nos dados da TAB.5.8, montou-se o gráfico comparativo apresentado na FIG.5.7 no qual se visualiza a correlação entre os valores das médias do módulo de elasticidade (em MPa) do grupo controle e dos grupos de submetidos ao feixe de elétrons na esteira e na bandeja.

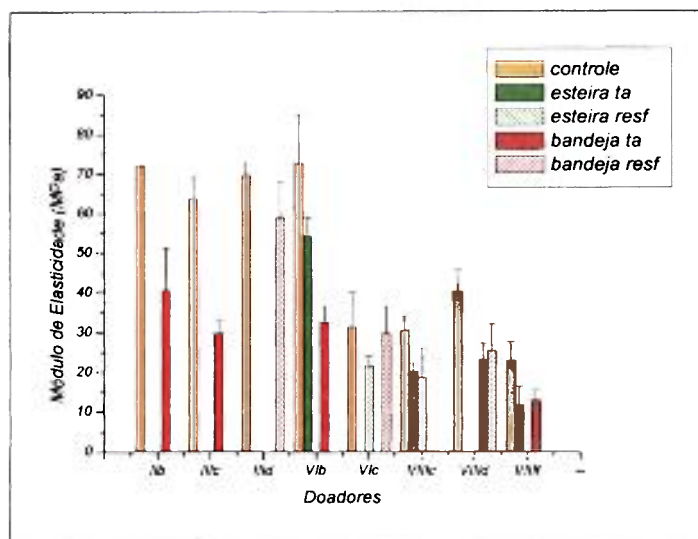


FIGURA 5.7 – Gráfico comparativo dos valores de Módulo de Elasticidade (em MPa) para amostras ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy transportadas por esteira e bandeja à temperatura ambiente (*ta*) e sob resfriamento (*resf*).

As médias dos valores do módulo de elasticidade, em porcentagem, encontram-se na TAB.5.9.

TABELA 5.9 - Valores da média do módulo de elasticidade (em porcentagem) do grupo controle e dos grupos submetidos ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy utilizando o sistema de transporte de esteira e o de bandeja, irradiados à temperatura ambiente e com resfriamento.

Doador	CONTROLE (%)	ESTEIRA 25 kGy		BANDEJA 25 kGy	
		temp.ambiente	resfriamento	temp. ambiente	resfriamento
IIb	100	-	-	56,39	-
IIc	100	-	-	46,56	-
IIId	100	-	-	-	84,46
VIb	100	74,71	-	44,92	-
VIc	100	-	68,75	-	94,71
VIId	100	66,10	61,05	-	-
VIIId	100	-	-	57,49	63,12
VIIIf	100	51,11	-	56,69	-

Com base nos dados da TAB.5.8, montou-se o gráfico comparativo apresentado na FIG.5.8 no qual se visualiza a correlação entre os valores das médias do módulo de elasticidade (em porcentagem) dos grupos de amostras submetidas ao feixe de elétrons em relação ao grupo controle, nos dois sistemas de transporte, para cada um dos doadores.

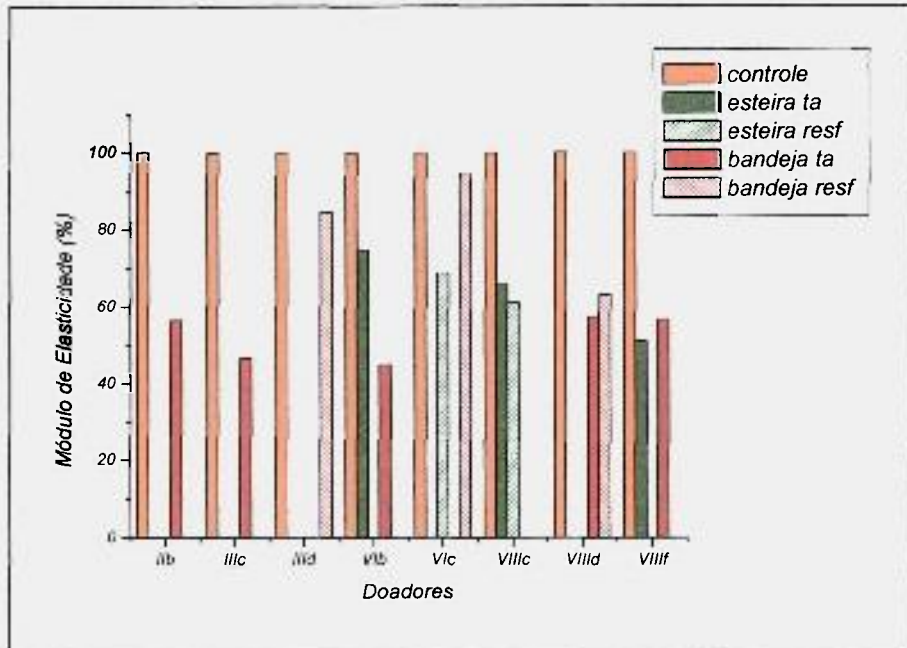


FIGURA 5.8 – Gráfico de porcentagem dos grupos experimentais submetidos ao feixe de elétrons, com dose de 25kGy, transportados em esteira e bandeja à temperatura ambiente (*ta*) e sob resfriamento (*resf*), em relação ao controle.

### 5.2.2.1 Registro de temperaturas no acelerador de elétrons

#### 5.2.2.1.1 Sistema de transporte de esteira

As temperaturas da embalagem com as amostras de pele foram registradas em quatro momentos: **(0)** temperatura no início da esteira; **(1)** temperatura mínima, registrada no local da esteira imediatamente anterior à passagem sob o feixe; **(2)** temperatura máxima, registrada sob o feixe e **(3)** temperatura no final da esteira. Foram registradas as temperaturas das amostras irradiadas sem resfriamento e resfriadas, com gelo, durante 10 passagens (~10 kGy) sob o feixe de elétrons de alta energia.

As temperaturas do ambiente foram registradas em dois momentos: **(0)** temperatura ambiente inicial, registrada concomitantemente à temperatura inicial da amostra; **(3)** temperatura ambiente final, registrada concomitantemente à temperatura final da amostra. A temperatura ambiente inicial foi utilizada como referência para efeito dos cálculos de porcentagem, de modo que pudessem ser feitas comparações em diferentes situações.

Os dados das temperaturas das amostras e do ambiente estão apresentados na TAB.5.10.

TABELA 5.10 – Temperaturas registradas das amostras e do ambiente no sistema de transporte de esteira no acelerador de elétrons. Dados apresentados em graus Celsius (°C) e em porcentagem (%).

Tempo	Amostra (°C)	Amostra (%)	Amostra resf. (°C)	Amostra resf. (%)	Ambiente (°C)	Ambiente (%)
0	25,6	100,4	15,3	60,0	25,5	100,0
1	24,7	96,9	15,3	60,0	-	-
2	25,7	100,8	17,8	69,8	-	-
3	25,3	99,2	17,5	68,6	25,7	100,8

Amostra resf.=amostra com resfriamento.

### 5.2.2.1.2 Sistema de transporte de bandeja

As temperaturas da embalagem com as amostras de pele foram registradas em quatro momentos: (0) temperatura inicial, após o término da preparação das amostras na bandeja; (1) temperatura mínima, registrada no momento imediatamente anterior à passagem sob o feixe; (2) temperatura máxima, registrada sob o feixe; (3) temperatura final. Foram registradas as temperaturas das amostras irradiadas sem resfriamento e resfriadas durante 10 passagens (~10 kGy) e 24 passagens (~25 kGy) sob o feixe de elétrons de alta energia.

As temperaturas do ambiente foram registradas em dois momentos: (0) temperatura ambiente inicial, registrada concomitantemente à temperatura inicial da amostra; (3) temperatura ambiente final, registrada concomitantemente à temperatura final da amostra. A temperatura ambiente inicial foi utilizada como referência para efeito dos cálculos de porcentagem, de modo que pudessem ser feitas comparações em diferentes situações.

Os registros de temperatura das amostras irradiadas com dose de 10 kGy, no sistema de bandeja sem resfriamento e do ambiente durante esse processamento, estão apresentados na TAB.5.11

TABELA 5.11 – Temperaturas do ambiente e das amostras irradiadas a 10 kGy sem resfriamento no sistema de transporte de bandeja no acelerador de elétrons. Dados apresentados em graus Celsius (°C) e em porcentagem (%).

Tempo	Amostra (°C)	Amostra (%)	Ambiente (°C)	Ambiente (%)
0	21,4	105,9	20,2	100,0
1	21,2	105,0	-	-
2	23,4	115,8	-	-
3	23,0	113,9	20,4	101,0

Os registros de temperatura das amostras irradiadas com dose de 10 kGy, no sistema de bandeja com resfriamento e do ambiente durante esse processamento, estão apresentados na TAB.5.12.

TABELA 5.12 – Temperaturas do ambiente e das amostras irradiadas a 10 kGy com resfriamento no sistema de transporte de bandeja no acelerador de elétrons. Dados apresentados em graus Celsius (°C) e em porcentagem (%).

Tempo	Amostra resf. (°C)	Amostra resf. (%)	Ambiente (°C)	Ambiente (%)
0	10,6	49,5	21,4	100,0
1	10,5	49,1	-	-
2	19,6	91,6	-	-
3	19,4	90,6	21,7	101,4

Amostra resf.=amostra com resfriamento.

Os registros de temperatura das amostras irradiadas com dose de 25 kGy, no sistema de bandeja sem resfriamento e do ambiente durante esse processamento, estão apresentados na TAB.5.13. Os registros de temperatura das amostras irradiadas com dose de 25 kGy no sistema de bandeja com resfriamento e do ambiente durante esse processamento estão apresentados na TAB.5.14.

TABELA 5.13 – Temperaturas do ambiente e das amostras irradiadas a 25 kGy sem resfriamento no sistema de transporte de bandeja no acelerador de elétrons. Dados apresentados em graus Celsius (°C) e em porcentagem (%).

Tempo	Amostra (°C)	Amostra (%)	Ambiente (°C)	Ambiente (%)
0	22,1	98,2	22,5	100,0
1	22,1	98,2	-	-
2	29,1	129,3	-	-
3	27,8	123,5	22,8	101,3

TABELA 5.14 – Temperaturas do ambiente e das amostras irradiadas a 25 kGy com resfriamento no sistema de transporte de bandeja no acelerador de elétrons. Dados apresentados em graus Celsius (°C) e em porcentagem (%).

Tempo	Amostra resf. (°C)	Amostra resf. (%)	Ambiente (°C)	Ambiente (%)
0	10,4	47,9	21,7	100,0
1	10,3	47,5	-	-
2	23,3	107,4	-	-
3	22,1	101,8	22,1	101,8

Amostra resf.=amostra com resfriamento.

O tempo de irradiação (em minutos) para os dois sistemas de transporte está relacionado à dose na TAB.5.15.

TABELA 5.15 – Temperaturas do ambiente e das amostras irradiadas a 25 kGy com resfriamento no sistema de transporte de bandeja no acelerador de elétrons. Dados apresentados em graus Celsius (°C) e em porcentagem (%).

Sistema de transporte	Tempo (min) a 10 kGy	Tempo (min) a 25 kGy
Esteira	30	72
Bandeja	3	8

Para comparação dos sistemas de transporte das amostras até o feixe de elétrons foram elaborados dois gráficos com os valores de porcentagem de temperatura.

A FIG.5.9 estabelece a comparação da variação das temperaturas durante a irradiação a 10 kGy pelo sistema de esteira e de bandeja e a FIG.5.10 estabelece a comparação da variação das temperaturas durante a irradiação a 25 kGy pelo sistema de bandeja, ambas com e sem resfriamento .

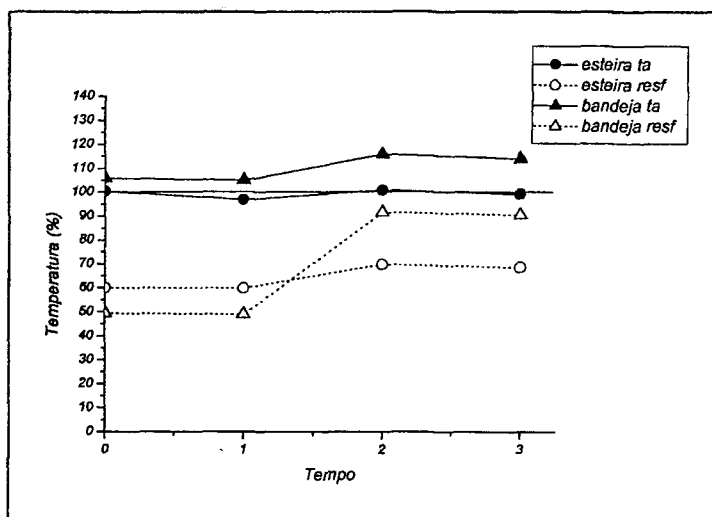


FIGURA 5.9 - Variação da temperatura durante a irradiação a 10 kGy pelo sistema de esteira e de bandeja no acelerador de elétrons, com e sem resfriamento (em porcentagem). A reta (—) indica a temperatura ambiente utilizada como referência.

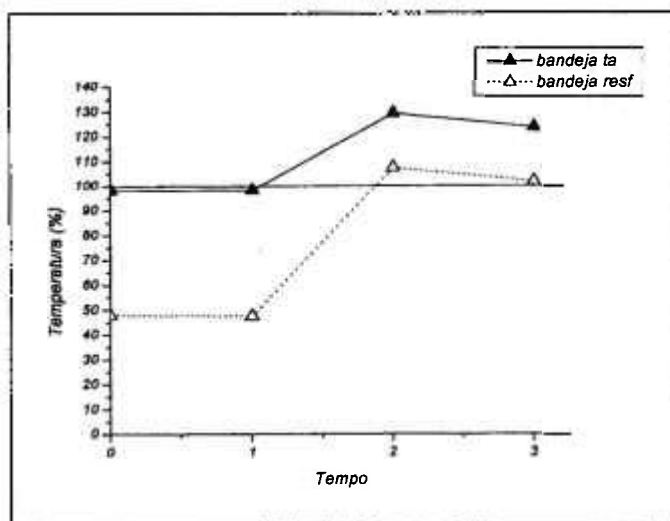


FIGURA 5.10 - Variação das temperaturas durante a irradiação a 25 kGy pelo sistema de bandeja no acelerador de elétrons, com e sem resfriamento (porcentagem). A reta (—) indica a temperatura ambiente utilizada como referência.

## 5.2.2.2 Análise estatística

### 5.2.2.2.1 Análise estatística descritiva

A análise descritiva dos oito doadores, considerando-se as médias do módulo de elasticidade, foi elaborada com os valores de porcentagem dos grupos irradiados em relação aos grupos controle. Na representação gráfica da FIG.5.11, podem ser observados os efeitos dos sistemas de transporte das amostras até o feixe de elétrons em diferentes temperaturas, sobre os valores do módulo de elasticidade (em porcentagem). Para melhor visualização, foi traçada a reta (em vermelho) na altura do valor limite máximo para as amostras transportadas por esteira à temperatura ambiente, já estabelecido na FIG.5.6.

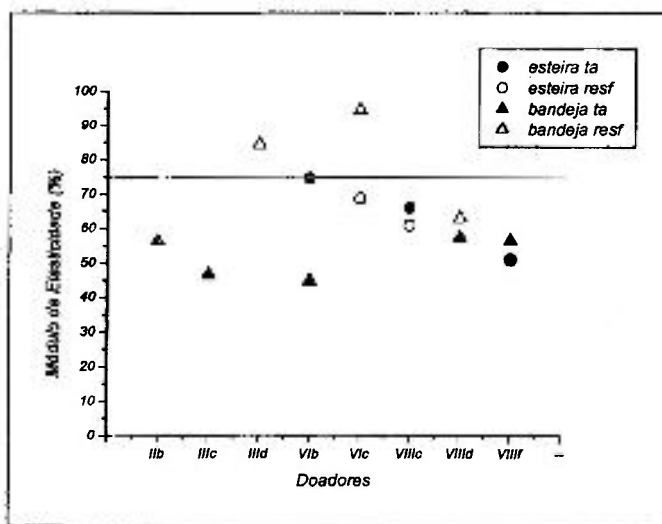


FIGURA 5.11 – Módulo de Elasticidade dos grupos submetidos ao feixe de elétrons, em porcentagem em relação ao grupo controle de cada doador. (—) A reta representa o valor limite máximo para as amostras transportadas por esteira à temperatura ambiente.

As medidas centrais e de variabilidade são apresentadas na TAB.5.16.

TABELA 5.16 – Medidas centrais e de dispersão do módulo de elasticidade das amostras dos oito doadores para os grupos submetidos ao feixe de elétrons (em proporção) em sistema de transporte de esteira e de bandeja, à temperatura ambiente e com resfriamento.

Estatísticas	P esteira temp. amb.	P esteira resfriada	P bandeja temp.amb.	P bandeja resfriada
média	0,64	0,65	0,49	0,81
mediana	0,66	0,65	0,56	0,84
máximo	0,75	0,69	0,57	0,94
mínimo	0,51	0,61	0,45	0,63
variância	0,015	0,003	0,003	0,026
desvio padrão	0,12	0,06	0,06	0,16
amplitude	0,24	0,08	0,12	0,31

### 5.2.3 Amostras submetidas à irradiação gama e feixe de elétrons com dose de 50kGy

As amostras de pele de três doadores foram submetidas à radiação gama e ao feixe de elétrons de alta energia com dose de 50 kGy. Os efeitos da radiação nas duas fontes foram comparados utilizando os valores do módulo de elasticidade. Foram efetuadas também comparações quanto ao sistema de transporte das amostras até o feixe no acelerador de elétrons (esteira e bandeja) e quanto à temperatura da amostra durante a irradiação (temperatura ambiente e resfriamento).

A TAB.5.17 indica a média dos valores do módulo de elasticidade (em MPa) do grupo controle e grupos experimentais de cada doador, para comparação dos efeitos da radiação gama e do feixe de elétrons.

TABELA 5.17 - Valores da média do módulo de elasticidade (em MPa) do grupo controle, do grupo irradiado com gama e do grupo submetido ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy.

Doador	Controle	Gama	Elétrons
Va	30,13 ± 11,02	16,99 ± 2,98	8,98 ± 2,06
VIa	51,20 ± 13,98	36,10 ± 4,31	16,57 ± 8,70
VIIIb	34,79 ± 3,83	19,22 ± 1,79	18,07 ± 1,68

Com base nos dados da TAB.5.17, montou-se o gráfico comparativo da FIG.5.12 no qual se visualiza a correlação entre os valores das médias do módulo de elasticidade (do grupo de amostras controle, do grupo de amostras irradiadas com gama e do grupo de amostras submetidas ao feixe de elétrons) para cada um dos doadores.

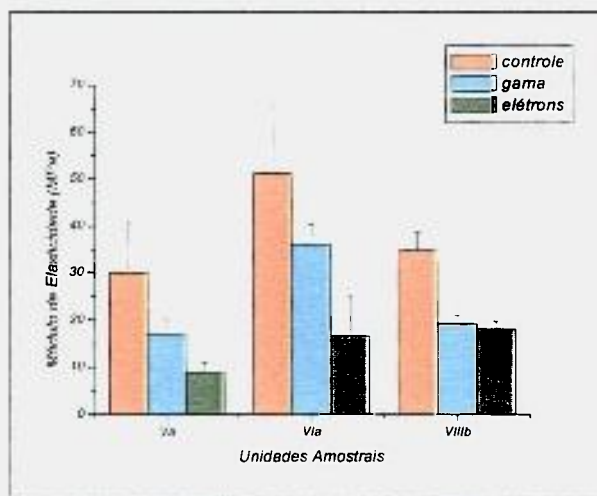


FIGURA 5.12 - Valores de Módulo de Elasticidade (em MPa) para amostras controle e irradiadas com gama e submetidas ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy.

Para uma melhor visualização da variabilidade do módulo de elasticidade inter-doadores construiu-se o gráfico da FIG.5.13 (com os dados da TAB.5.16) o qual compara apenas os valores do grupo controle de cada um dos três doadores.

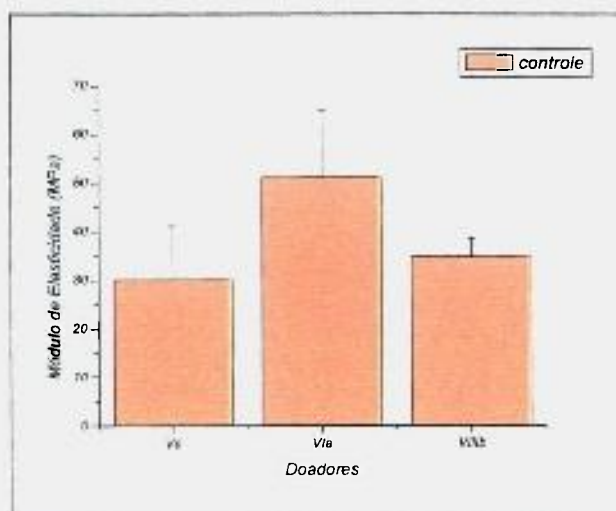


FIGURA 5.13 – Valores do módulo de elasticidade (em MPa) das amostras dos grupos controle para amostras irradiadas com dose de 50kGy.

Foi estabelecida a proporcionalidade entre as amostras controle e experimentais. Considerou-se a porcentagem de cada grupo experimental (irradiado com gama e submetido ao feixe de elétrons) em relação ao grupo controle. A TAB.5.18 indica a média, em porcentagem, dos valores do módulo de elasticidade dos grupos experimentais de cada doador em relação ao seu grupo controle (considerado como sendo 100%).

TABELA 5.18 - Valores da média do módulo de elasticidade (em porcentagem) do grupo controle, do grupo irradiado com gama e do grupo submetido ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy.

Doador	Controle (%)	Gama (%)	Elétrons (%)
Va	100	56,39	29,80
Vla	100	70,51	32,36
VIIIb	100	55,25	51,94

Com base nos dados da TAB.5.18, montou-se o gráfico comparativo apresentado na FIG.5.14 no qual se visualiza a correlação entre os valores das médias do módulo de elasticidade (em porcentagem) dos grupos de amostras irradiadas com gama e submetidas ao feixe de elétrons em relação ao grupo controle para cada um dos doadores.

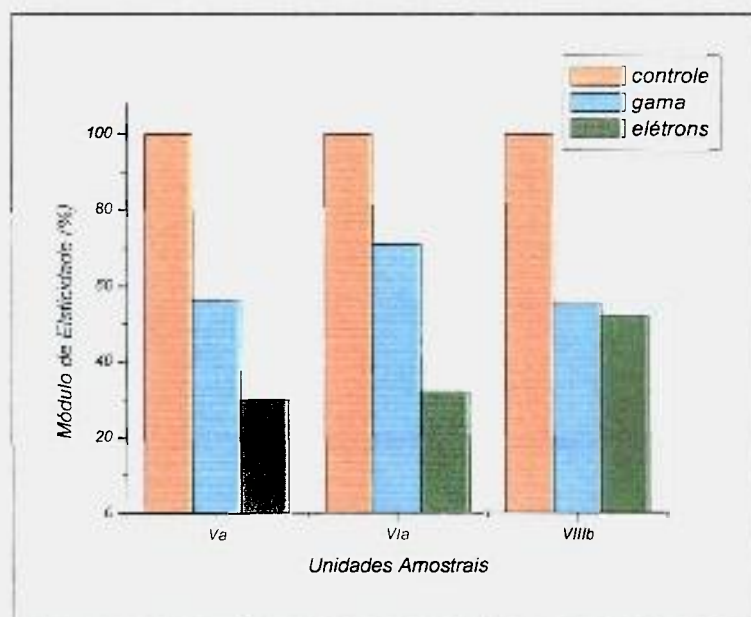


FIGURA 5.14 – Gráfico de porcentagem dos grupos experimentais submetidos à irradiação gama e ao feixe de elétrons, com dose de 50kGy, em relação ao controle.

### 5.2.3.1 Análise estatística

#### 5.2.3.1.1 Análise estatística descritiva

A análise descritiva dos três doadores, considerando-se as médias do módulo de elasticidade, foi elaborada com os valores de porcentagem dos grupos irradiados em relação aos grupos controle.

No gráfico da FIG.5.15, podem ser observados os efeitos da irradiação com gama e com elétrons sobre os valores do módulo de elasticidade (em porcentagem). Para melhor

visualização, foi traçada a reta (em vermelho) na altura do valor limite entre os dois efeitos.

As medidas centrais e de variabilidade são apresentadas na TAB.5.19.

TABELA 5.19 – Medidas centrais e de dispersão do módulo de elasticidade (em proporção) das amostras dos três doadores para os grupos irradiados com gama e com elétrons a 50kGy.

Estatísticas	P gama	P elétrons
média	0.60	0.38
mediana	0.56	0.32
máximo	0.70	0.52
mínimo	0,55	0.30
variância	0.007	0.015
desvio padrão	0.08	0.12
amplitude	0.25	0.22

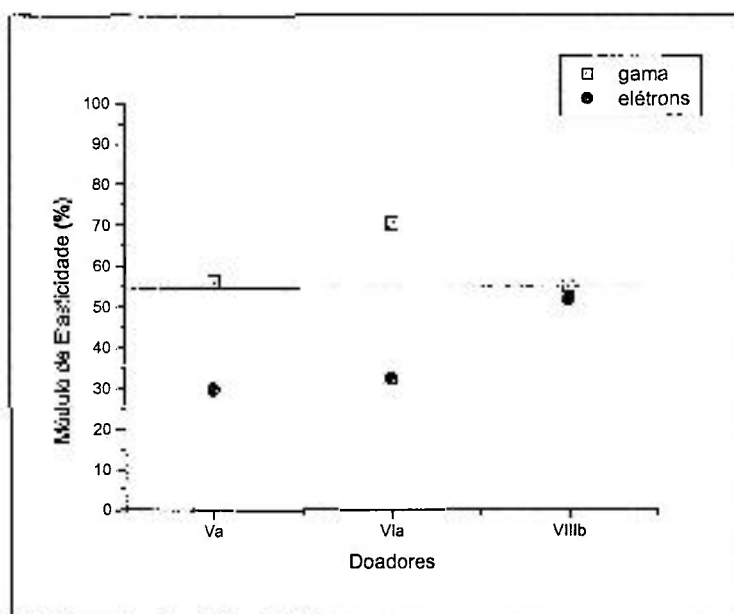


FIGURA 5.15 – Módulo de Elasticidade dos grupos irradiados a 50kGy com gama e com elétrons, em porcentagem em relação ao grupo controle de cada doador. (—) A reta em vermelho representa o valor limite entre os dois efeitos.

#### 5.2.3.1.2 Teste de significância

Cada doador foi analisado em separado por meio do estudo de distribuições amostrais de estatísticas de pequenas amostras ( $n < 30$ ), teste t de "Student", entre as médias do grupo controle e dos grupos irradiados. Os resultados calculados (de acordo com as equações (4) a (8) de Métodos) são apresentados na TAB.5.20.

TABELA 5.20 – Teste de significância de "Student" t para média do módulo de elasticidade (E, em MPa) dos grupos irradiados com gama e com elétrons com dose de 50 kGy, comparados à média do grupo controle não irradiado. Nível de significância=5%.

Doador	Grupo	Média E	s <sup>2</sup>	n	g	t	t <sub>c</sub>	Diferença
Va	controle	30,13	121,40	25	-	-	-	-
	gama	16,99	8,88	11	30,61	3,86	2,04	S
	elétrons	8,98	4,25	9	28,10	5,67	2,05	S
VIa	controle	51,20	195,32	7	-	-	-	-
	gama	36,10	18,59	7	7,13	2,73	2,36	S
	elétrons	16,57	75,75	10	9,25	6,32	2,26	S
VIIIb	controle	34,79	14,69	2	-	-	-	-
	gama	19,22	3,21	4	1,23	7,29	12,71	NS
	elétrons	18,07	2,81	2	1,37	5,65	12,71	NS

s<sup>2</sup> = variância; n = n° de amostras; g = graus de liberdade; t = valor de t calculado; t<sub>c</sub> = valor de t crítico; NS = diferença não significativa; S = diferença significativa.

Para os doadores VIa e VIIIb, foi realizado também o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* para amostras muito pequenas (n<12), cujos resultados confirmaram os obtidos pelo teste *t de Student* (APÊNDICE C).

De acordo com o exposto na TAB.5.20, no caso das amostras irradiadas com gama na dose de 50kGy, para os doadores Va e VIa, a hipótese H<sub>0</sub>:  $\bar{x}_{controle} = \bar{x}_{gama}$  foi rejeitada e para o doador e VIIIb a hipótese H<sub>0</sub>:  $\bar{x}_{controle} = \bar{x}_{gama}$  foi confirmada. No caso das amostras submetidas ao feixe de elétrons com dose de 50kGy, para os doadores Va e VIa, a hipótese H<sub>0</sub>:  $\bar{x}_{controle} = \bar{x}_{elétrons}$  foi rejeitada; para o doador VIIIb a hipótese H<sub>0</sub>:  $\bar{x}_{controle} = \bar{x}_{elétrons}$  foi confirmada.

Para comparar as médias dos grupos controle e irradiados de todos os doadores, foi proposto o teste *t de Student* para amostras pareadas. Os resultados calculados (de acordo com as equações (9) a (13) de Métodos) estão apresentados na TAB.5.21.

TABELA 5.21 – Teste de significância de "Student" para médias do módulo de elasticidade (E, em MPa) de todos os doadores nos grupos irradiados com gama e com elétrons com dose de 25 kGy, comparados à média do grupo controle. Nível de significância=5%.

Grupo	Média E	s <sup>2</sup>	n	g	t	t <sub>c</sub>	Diferença
controle	38,71	122,49	3	-	-	-	-
gama	24,10	109,18	3	2	19,62	4,30	S
elétrons	14,54	23,75	3	2	4,48	4,30	S

s<sup>2</sup> = variância; n = n° de amostras; g = graus de liberdade; t = valor de t calculado; t<sub>c</sub> = valor de t crítico; NS = diferença não significativa; S = diferença significativa.

De acordo com o exposto na TAB.5.21, no caso das amostras irradiadas com gama com dose de 25kGy, para todos os doadores, as hipóteses  $H_0: \bar{x}_{controle} = \bar{x}_{gama}$  e  $H_0: \bar{x}_{controle} = \bar{x}_{elétrons}$  foram rejeitadas.

#### 5.2.4 Amostras submetidas a irradiação gama e feixe de elétrons irradiadas com doses crescentes de 10 kGy a 50 kGy

A TAB.5.22 apresenta as médias do módulo de elasticidade para um doador de amostras irradiadas com radiação gama em doses crescentes de 15 kGy a 50 kGy e a TAB.5.23 apresenta as médias do módulo de elasticidade para três doadores de amostras submetidas ao feixe de elétrons em doses crescentes de 5 kGy a 50 kGy.

TABELA 5.22 - Médias dos valores do módulo de elasticidade para um doador de amostras irradiadas com radiação gama em doses crescentes.

Doador	Controle	15 kGy	25 kGy	30 kGy	40 kGy	50 kGy
VIa	51,20 ± 13,98	50,89 ± 22,12	49,52 ± 6,82	41,10 ± 10,80	35,06 ± 6,79	36,10 ± 4,31

TABELA 5.23 - Médias dos valores do módulo de elasticidade para três doadores de amostras submetidas ao feixe de elétrons em doses crescentes.

Doador	Controle	05 kGy	10 kGy	20 kGy	25 kGy	40 kGy	50 kGy
Vb	42,13 ± 11,16	-	29,40 ± 4,51	-	21,76 ± 6,11	15,44 ± 2,58	10,92 ± 2,07
VIa	51,20 ± 13,98	-	34,30 ± 7,70	29,11 ± 7,50	24,27 ± 4,76	17,62 ± 6,74	16,57 ± 8,70
VII	34,06 ± 6,28	23,70 ± 2,93	19,93 ± 2,32	-	17,01 ± 2,63	12,54 ± 2,62	9,54 ± 1,64

As TAB.5.24 e TAB.5.25 apresentam os dados das TAB.5.22 e TAB.5.23, convertidos em porcentagem.

TABELA 5.24 - Médias dos valores do módulo de elasticidade para um doador de amostras irradiadas com radiação gama em doses crescentes (em porcentagem).

Doador	Controle (%)	15 kGy (%)	25 kGy (%)	30 kGy (%)	40 kGy (%)	50 kGy (%)
VIa	100	99,39	96,72	80,27	68,48	70,51

TABELA 5.25 - Médias dos valores do módulo de elasticidade para três doadores de amostras submetidas ao feixe de elétrons em doses crescentes (em porcentagem).

Doador	Controle	05 kGy	10 kGy	20 kGy	25 kGy	40 kGy	50 kGy
Vb	100	-	69,78	-	51,65	36,65	25,92
VIa	100	-	66,99	56,86	47,40	34,41	32,36
VII	100	69,58	58,51	-	49,94	36,82	28,01

A FIG.5.16 ilustra a seqüência dos efeitos da irradiação crescente sobre os valores das médias do módulo de elasticidade para radiação gama e feixe de elétrons apresentados na TAB.5.22 e TAB.5.23.

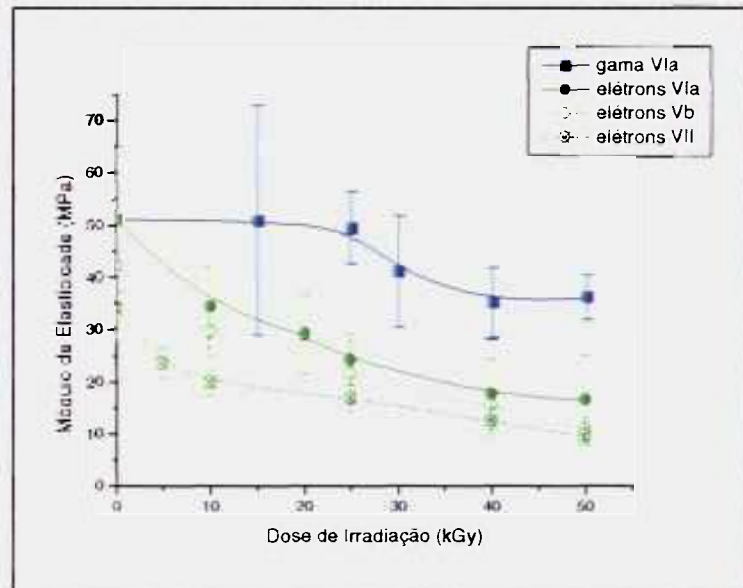


FIGURA 5.16 - Efeito da irradiação crescente sobre os valores das médias do módulo de elasticidade das amostras submetidas à radiação gama e ao feixe de elétrons.

A FIG.5.17 ilustra a seqüência dos efeitos da irradiação crescente sobre os valores das médias do módulo de elasticidade (em porcentagem) para radiação gama e feixe de elétrons apresentados nas TAB.5.24 e TAB.5.25.

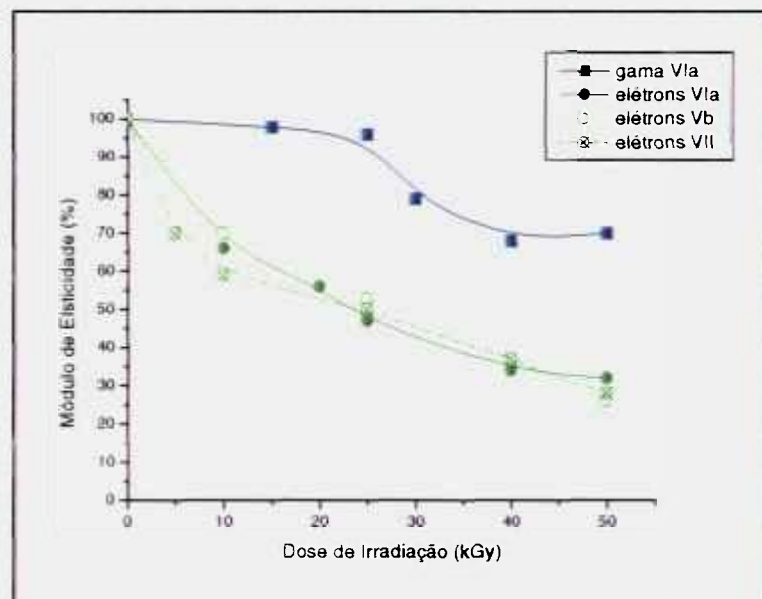


FIGURA 5.17 - Efeito da irradiação crescente sobre os valores das médias do módulo de elasticidade das amostras submetidas à radiação gama e ao feixe de elétrons, em porcentagem.

### 5.3 ESTUDO HISTOLÓGICO

O estudo histológico das amostras foi realizado com diferentes técnicas de coloração: hematoxilina-eosina, tricromo de Mallory, picro-sírius e resorcina de Weigert.

#### 5.3.1 Hematoxilina-eosina

A FIG.5.18 mostra o aspecto histológico de amostras de pele para aloenxerto coradas com hematoxilina-eosina, observado ao microscópio de luz, em aumento de 400x. Foram preparadas amostras de pele não irradiada (controle), submetidas à radiação gama com dose de 25kGy e de 50 kGy e amostras submetidas ao feixe de elétrons transportadas por esteira à temperatura ambiente com as mesmas doses. Esta coloração permite observar a manutenção da morfologia tecidual.

#### 5.3.2 Mallory

A FIG.5.19 mostra o aspecto histológico de amostras de pele para aloenxerto coradas com Mallory, observadas ao microscópio de luz, em aumento de 400x. A coloração azul intensa caracteriza o colágeno presente na derme.

As amostras ilustradas, foram submetidas à irradiação gama (**B e D**) e ao feixe de elétrons (**C e E**) com dose de 25kGy (**B e C**) e 50 kGy (**D e E**), para serem comparadas com o controle (**A**) não irradiado.

#### 5.3.3 Picro-sírius

Na FIG.5.20 podem ser observadas fotomicrografias de pele para aloenxerto coradas com picro-sírius, observadas ao microscópio de luz com filtro polarizador. Os feixes de fibras de colágeno I (indicados pelas setas) são formados por moléculas orientadas e birrefringentes, que modificam o eixo da luz vinda do polarizador, tornando-se brilhantes e destacando-se do fundo escuro. A seqüência fotográfica seguiu a mesma ordem das colorações anteriores.

#### 5.3.4 Resorcina

A FIG.5.21 apresenta preparados de pele para aloenxerto corados com resorcina sem coloração de fundo. Epiderme e derme apresentam-se não coradas. As fibras de elastina (indicadas pelas setas), são coradas em negro.

#### 5.4 ESTUDO ULTRA-ESTRUTURAL

Na FIG.5.22 visualizam-se ultramicrografias de pele para aloenxerto ao microscópio eletrônico de transmissão. Este estudo permite a observação de possíveis alterações das fibrilas de colágeno I presentes na derme.

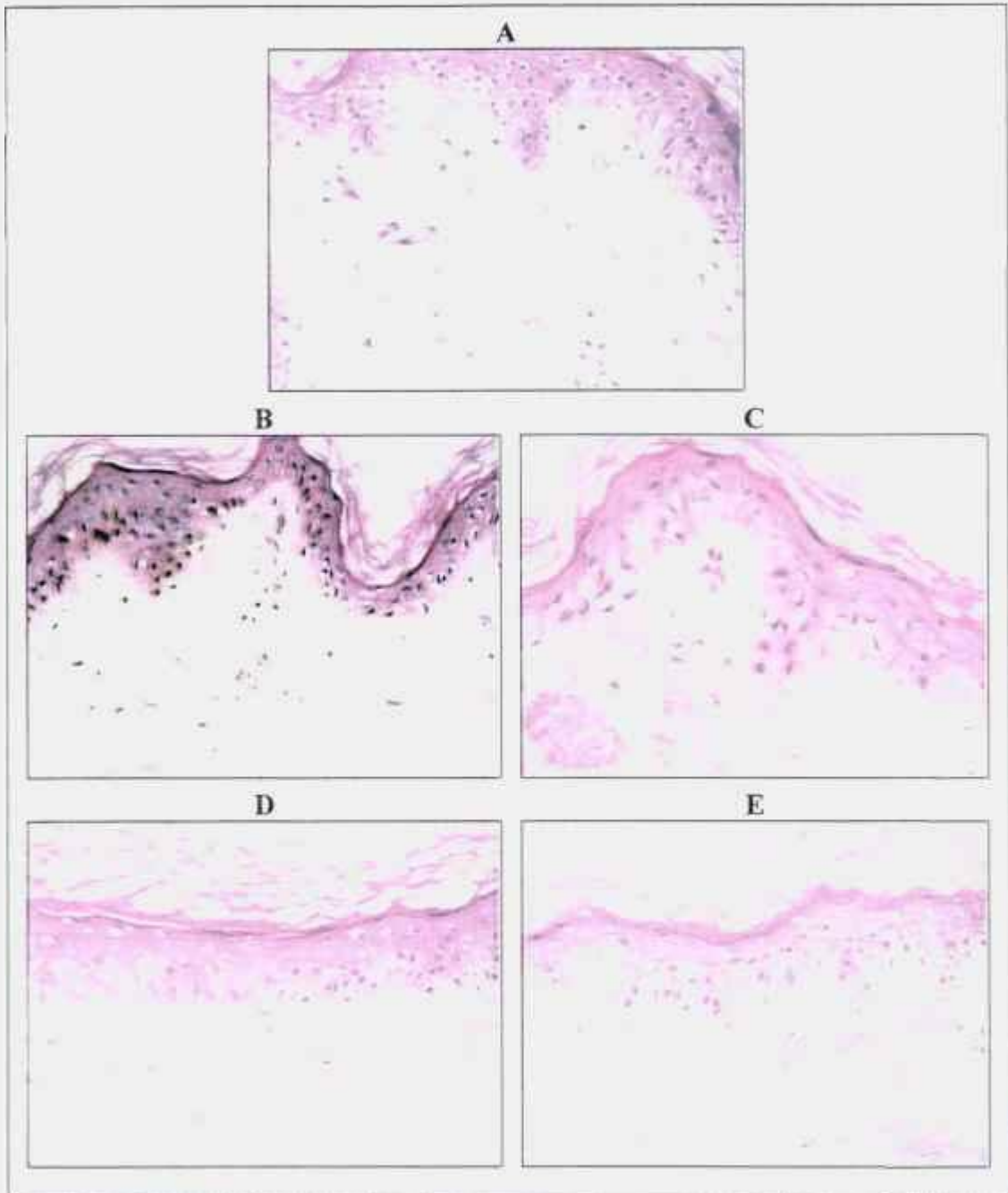


FIGURA 5.18 - Fotomicrografias de pele para aloenxerto coradas com hematoxilina-eosina, observadas ao microscópio de luz. (A) Amostra controle; (B) Amostra submetida à irradiação gama com dose de 25 kGy; (C) Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy; (D) Amostra submetida à irradiação gama com dose de 50 kGy; (E) Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy. Aumento: 400x.

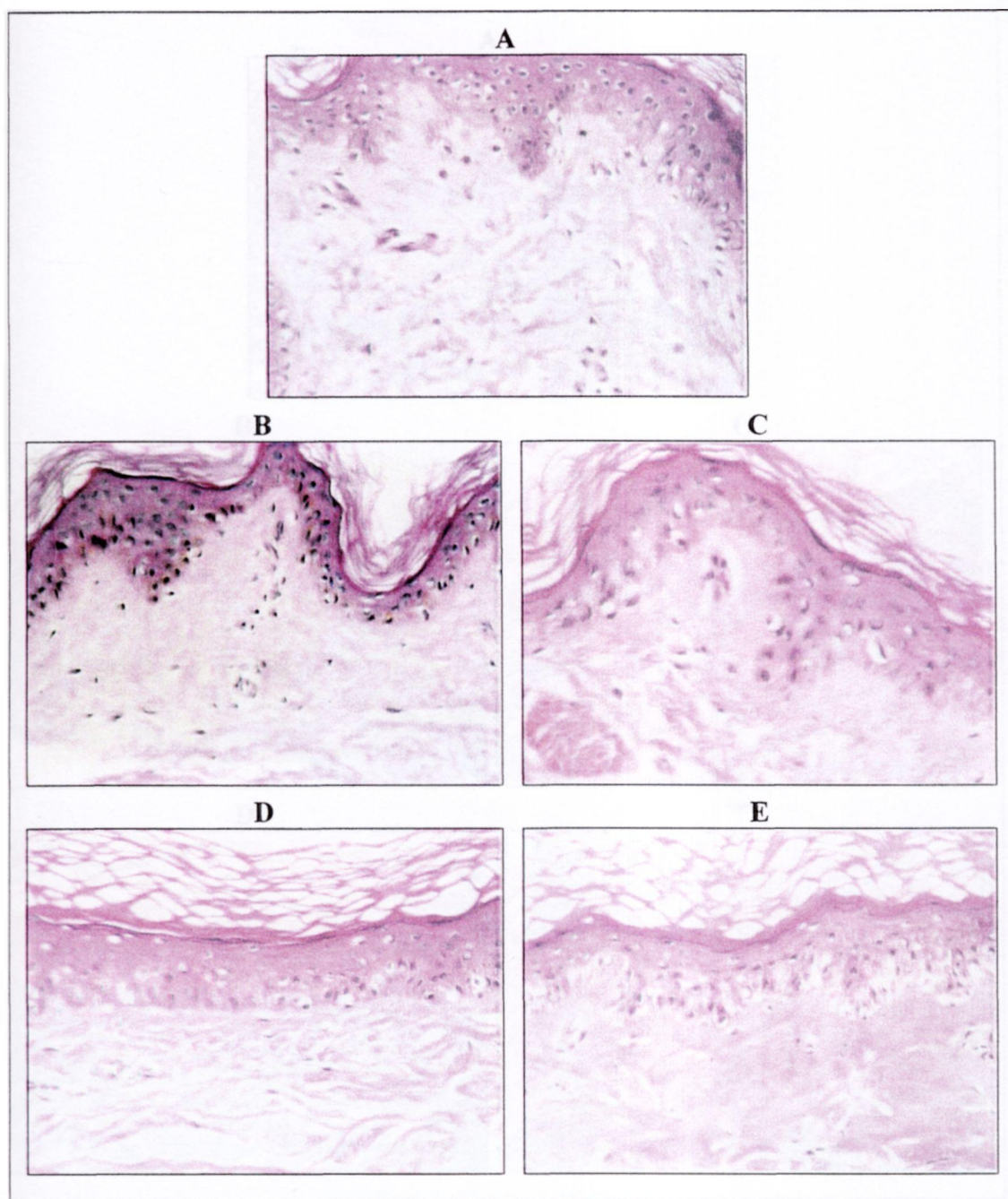


FIGURA 5.18 - Fotomicrografias de pele para aloenxerto coradas com hematoxilina-eosina, observadas ao microscópio de luz. (A) Amostra controle; (B) Amostra submetida à irradiação gama com dose de 25 kGy; (C) Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy; (D) Amostra submetida à irradiação gama com dose de 50 kGy; (E) Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy. Aumento: 400x.

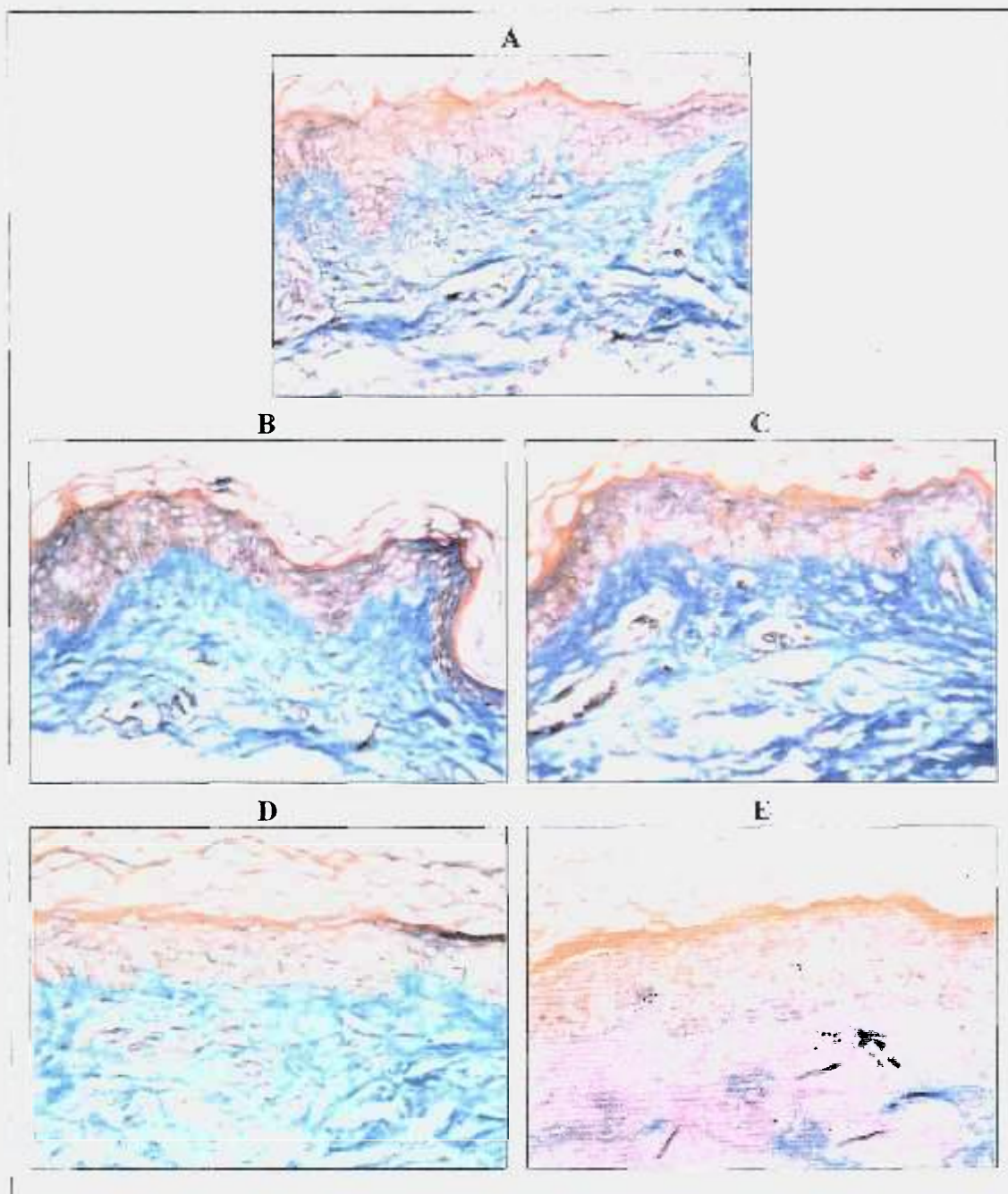


FIGURA 5.19 - Fotomicrografias de pele para aloenxerto coradas com Mallory, observadas ao microscópio de luz. (A) Amostra controle; (B) Amostra submetida à irradiação gama com dose de 25 kGy; (C) Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy; (D) Amostra submetida à irradiação gama com dose de 50 kGy; (E) Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy. Aumento: 400x .

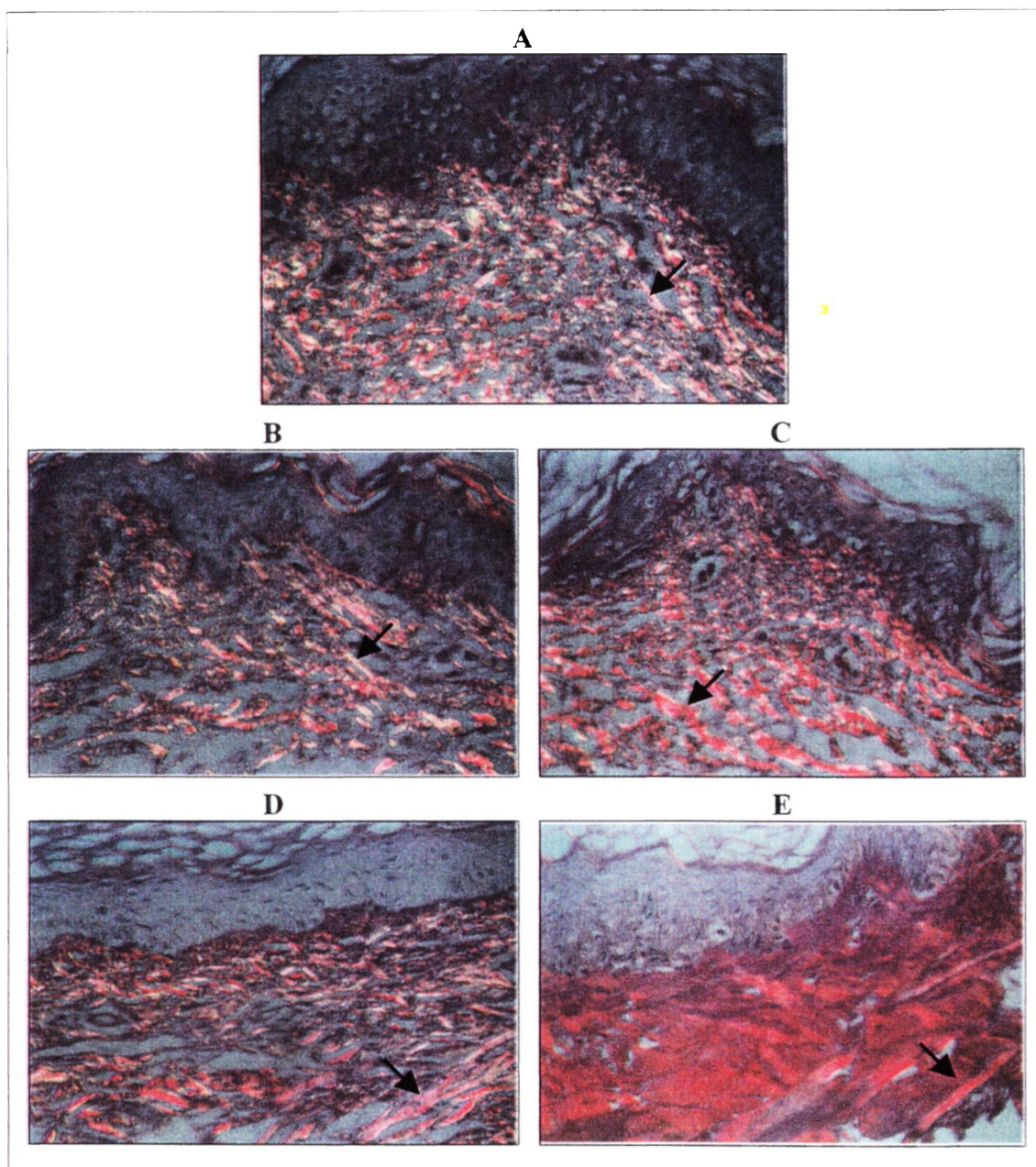


FIGURA 5.20 - Fotomicrografias de pele para aloenxerto coradas com pico-sirius, observadas ao microscópio de luz polarizada. (A) Amostra controle; (B) Amostra submetida à radiação gama com dose de 25 kGy; (C) Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy; (D) Amostra submetida à radiação gama com dose de 50 kGy; (E) Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy. As setas (→) indicam feixes de fibras de colágeno I. Aumento: 400x.

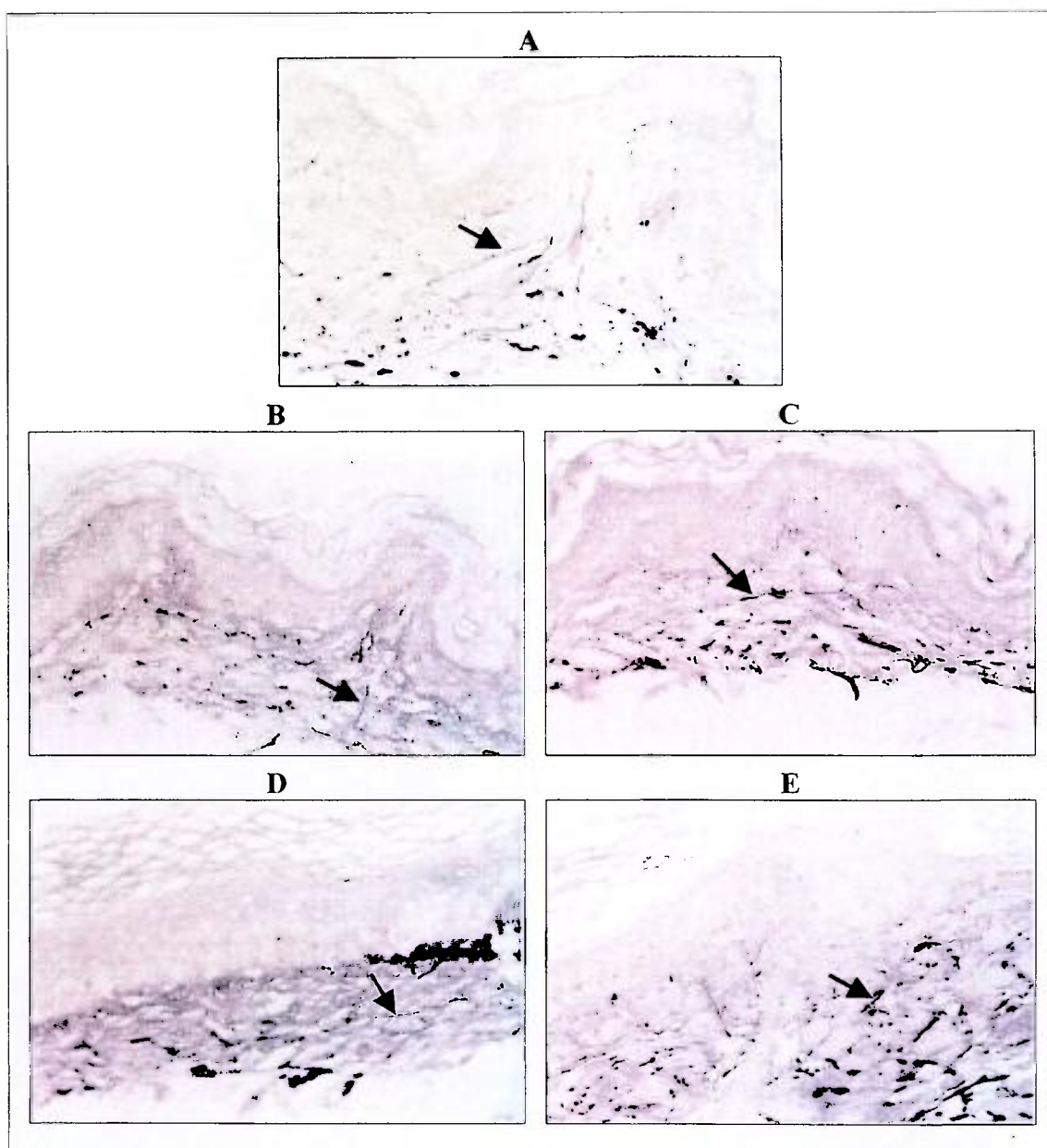


FIGURA 5.21 - Fotomicrografias de pele para aloenxerto coradas com resorcina, observadas ao microscópio de luz. (A) Amostra controle; (B) Amostra submetida à radiação gama com dose de 25 kGy; (C) Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy; (D) Amostra submetida à radiação gama com dose de 50 kGy; (E) Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy. As setas (→) indicam fibras de elastina. Aumento: 400x.

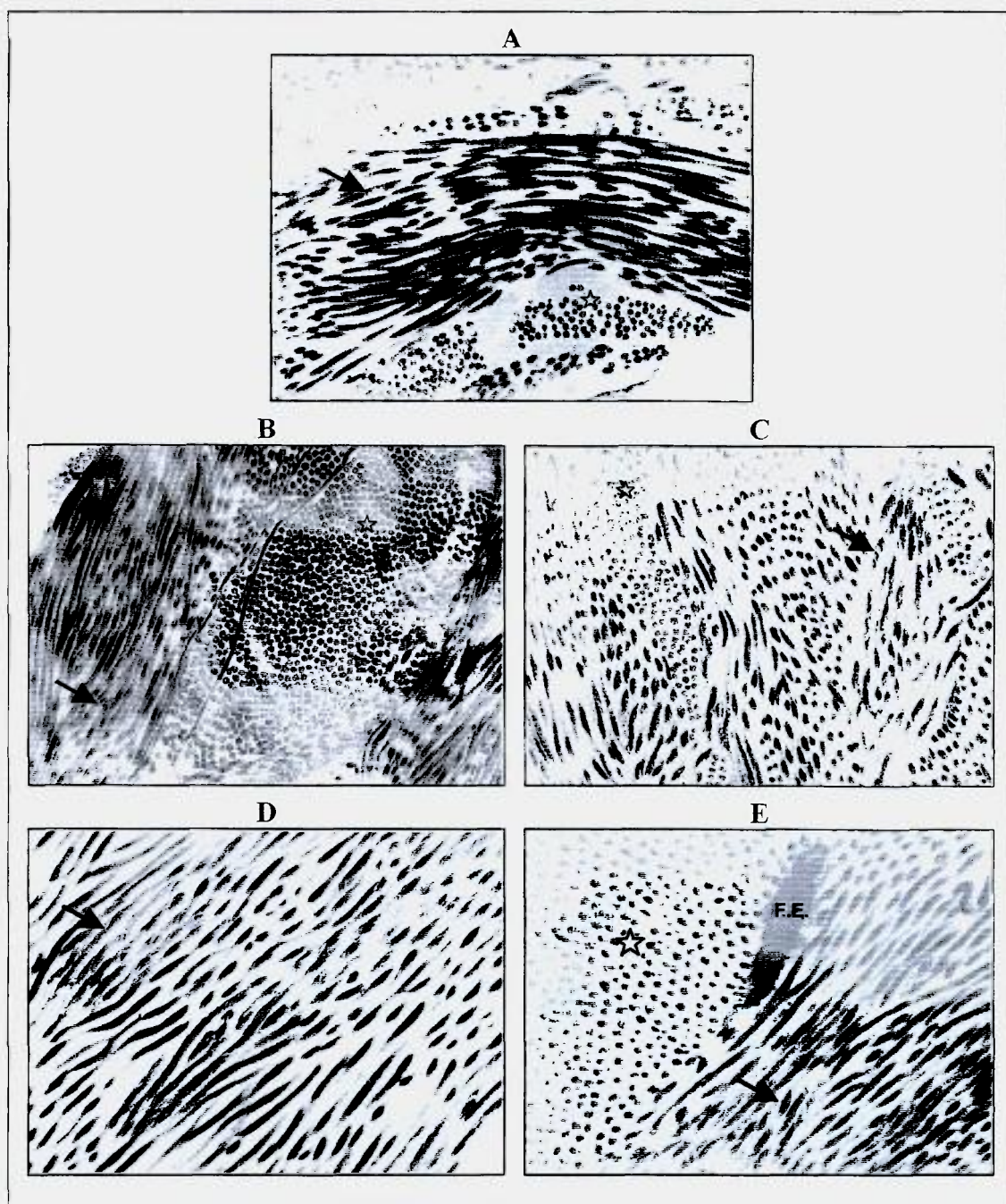


FIGURA 5.22 - Ultramicrografias de pele para aloenxerto observadas ao microscópio eletrônico de transmissão. (A) Amostra controle; (B) Amostra submetida à radiação gama com dose de 25 kGy; (C) Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy; (D) Amostra submetida à radiação gama com dose de 50 kGy; (E) Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy, F.E. – fibra elástica. As setas (→) indicam fibrilas de colágeno I em corte longitudinal. As estrelas (★) indicam fibrilas de colágeno I em corte transversal. Aumento: 10000x.

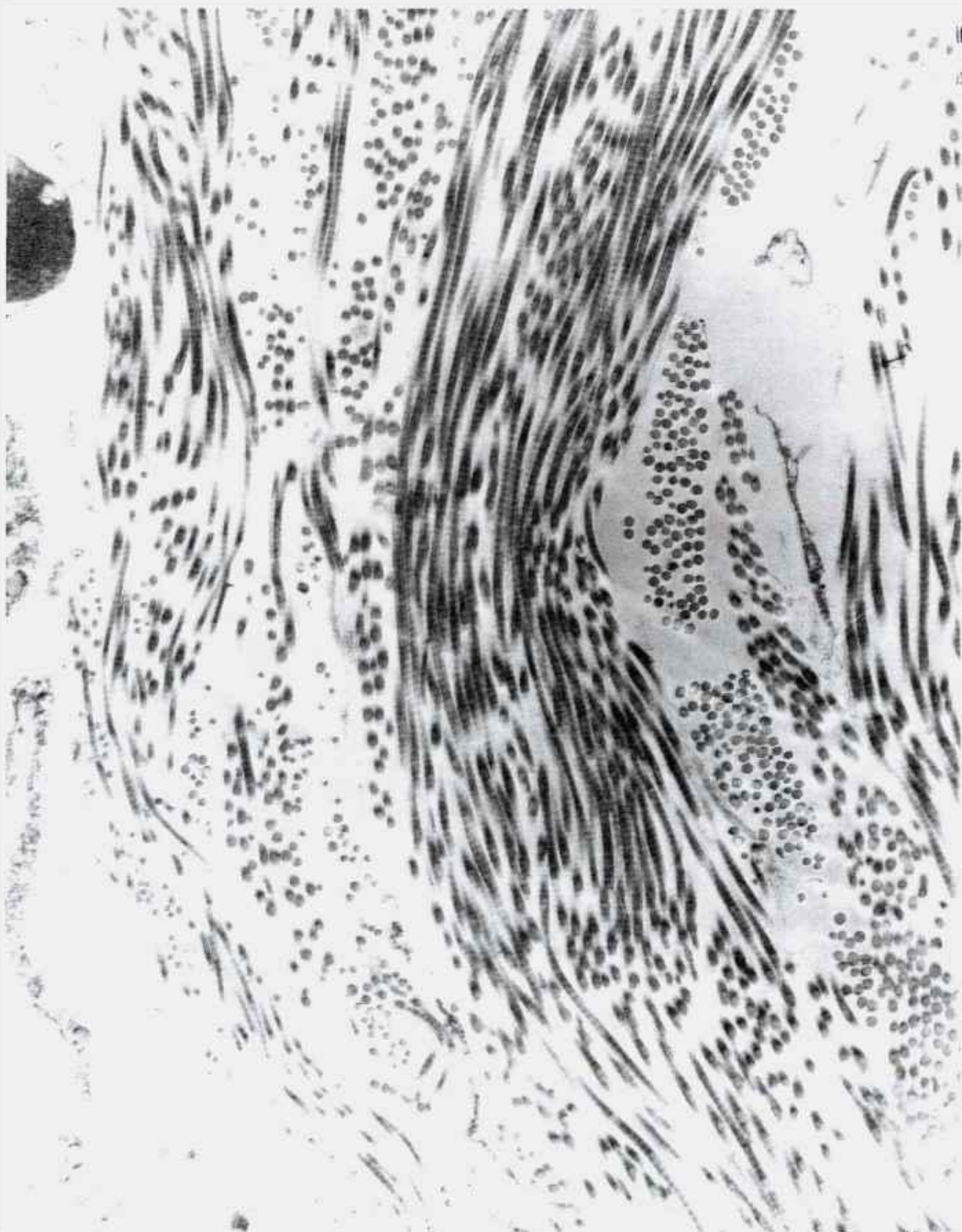


FIGURA 5.23 - Ultramicrografias de pele para aloenxerto observadas ao microscópio eletrônico de transmissão: Amostra controle (ampliada). Aumento: 10000x.



FIGURA 5.24 - Ultramicrografias de pele para aloenxerto observadas ao microscópio eletrônico de transmissão: Amostra submetida à radiação gama com dose de 25 kGy (ampliada). Aumento: 10000x.

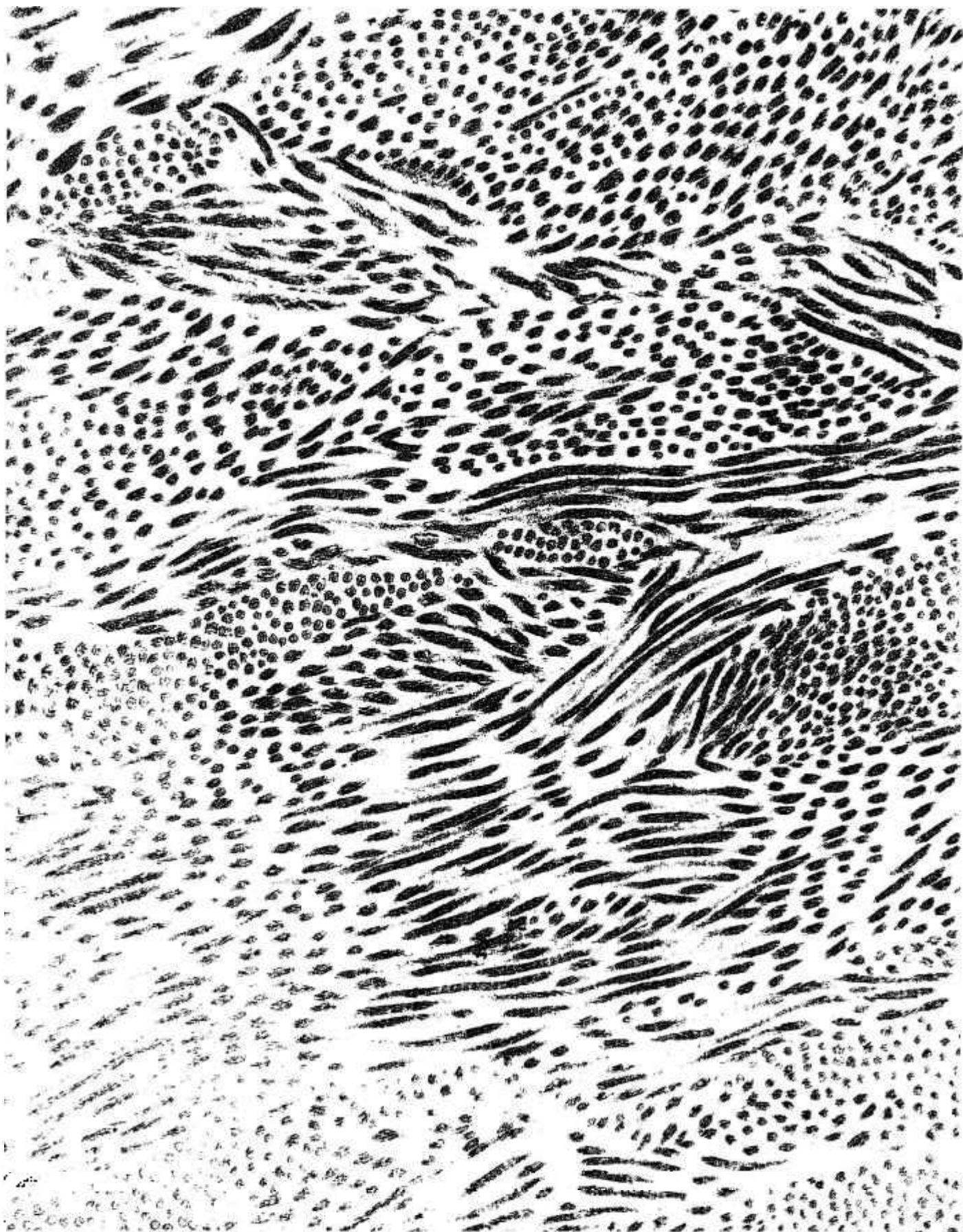


FIGURA 5.25 - Ultramicrografias de pele para aloenxerto observadas ao microscópio eletrônico de transmissão: Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy (ampliada). Aumento: 10000x.

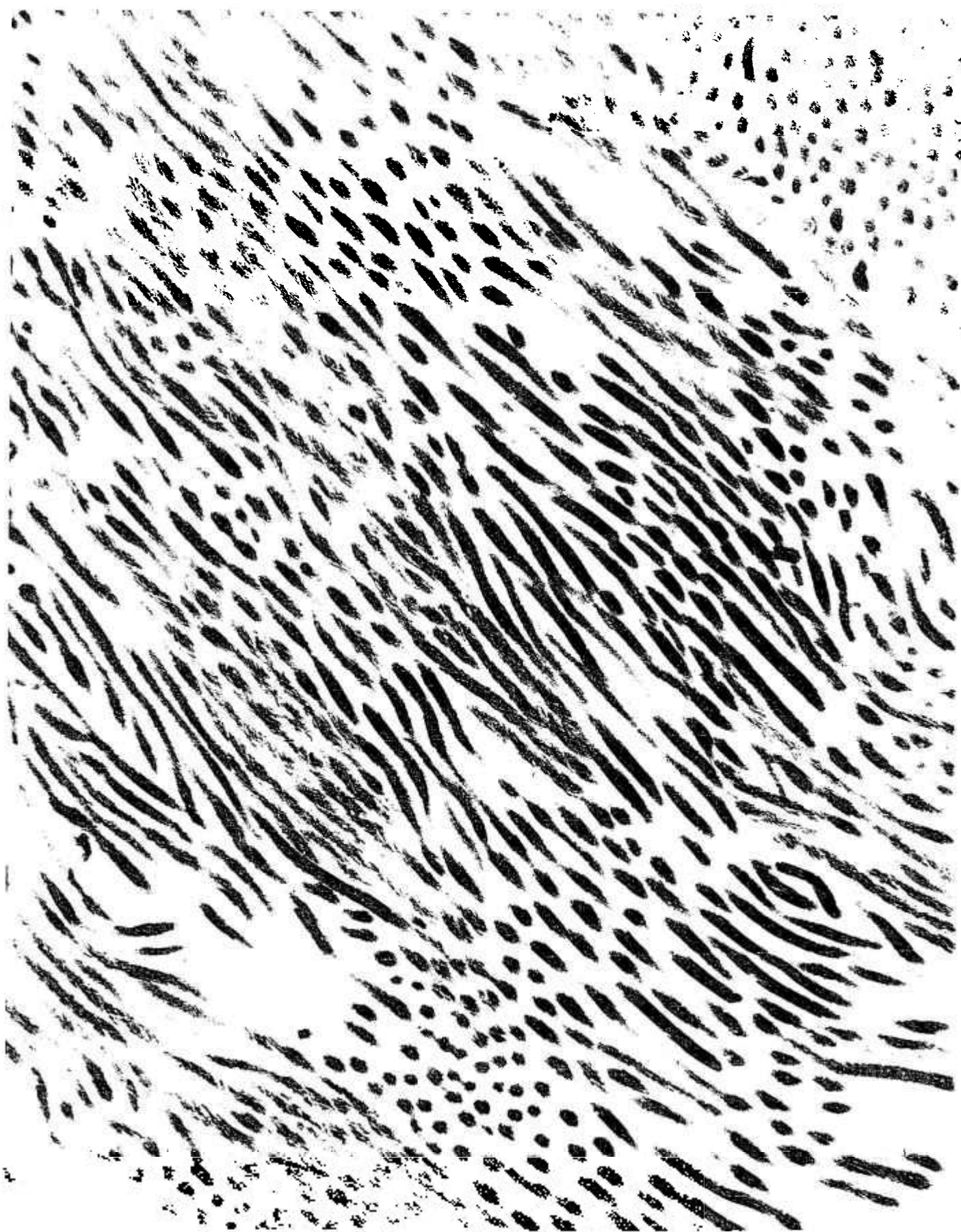


FIGURA 5.26 - Ultramicrografias de pele para aloenxerto observadas ao microscópio eletrônico de transmissão: Amostra submetida à radiação gama com dose de 50 kGy (ampliada). Aumento: 10000x.

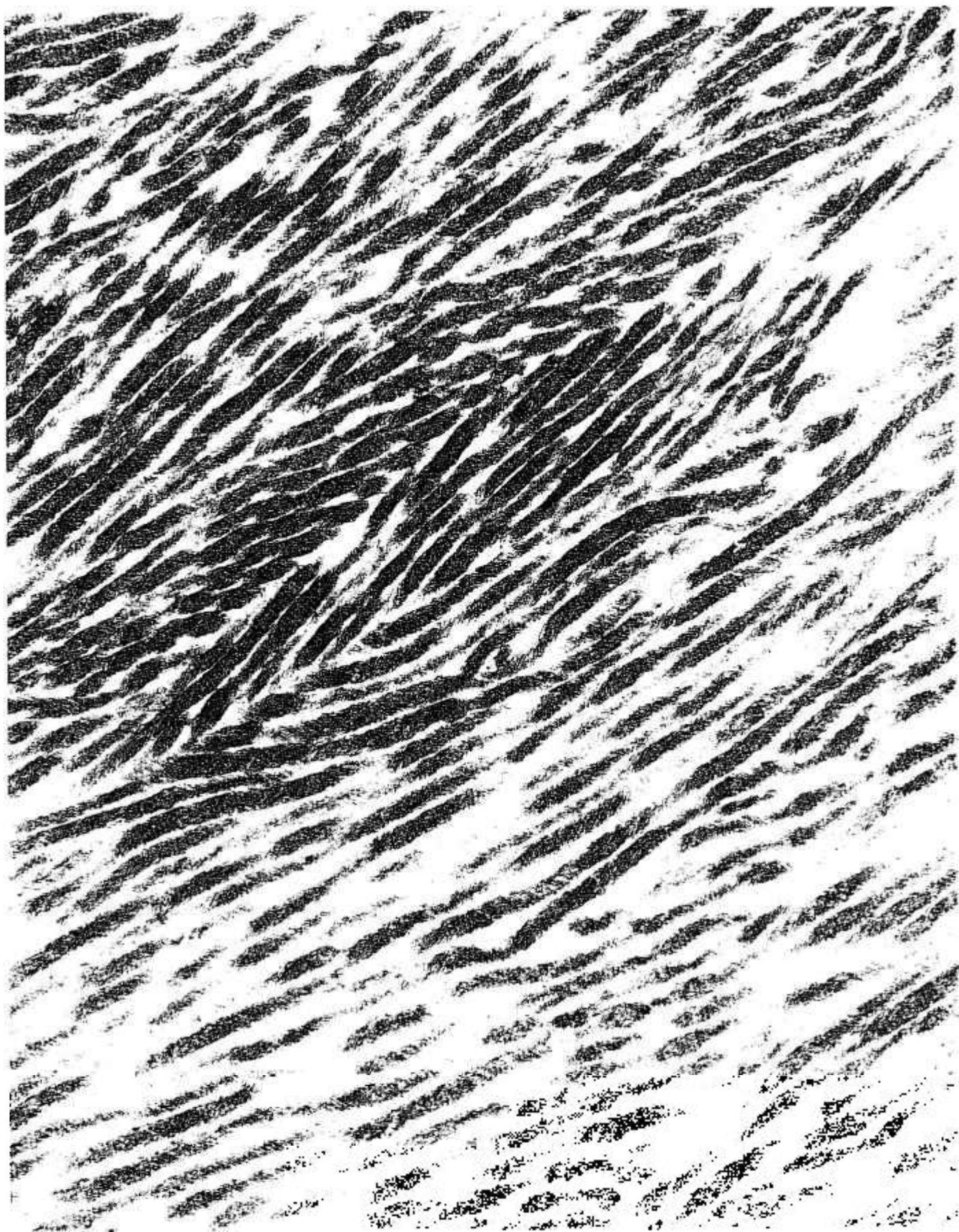


FIGURA 5.27 - Ultramicrografias de pele para aloenxerto observadas ao microscópio eletrônico de transmissão: Amostra submetida ao feixe de elétrons com dose de 50 kGy (ampliada). Aumento: 10000x.

## 6 DISCUSSÃO

A caracterização das propriedades biomecânicas da pele suscita grande interesse pois permite o entendimento da estrutura do tecido normal, a identificação de patologias ou ainda do comportamento e resposta da pele quando submetida à diferentes tipos de forças, como por exemplo, tração, compressão ou flexão. Vogel (1994) afirma que "in vivo" as propriedades biomecânicas são influenciadas pela idade e sexo do indivíduo. Em seus experimentos "in vitro" utilizando amostras de pele "ex vivo" (biópsias) ou de doador cadáver, o autor destaca a vantagem do ensaio biomecânico em fornecer resultados confiáveis e reproduzíveis.

Vogel (1987) estabeleceu vários parâmetros para pele humana "in vivo", a partir dos ensaios biomecânicos com pele de espessura total de doador cadáver "in natura" em solução salina, isto é, sem ser submetida aos processos de conservação. Da mesma forma, os resultados de ensaios biomecânicos "in vitro" com pele conservada para aloenxerto podem ser usados como referência para estudos comparativos com pele conservada que foi submetida a mais um processo, como por exemplo, esterilização por irradiação ionizante. Devido ao número limitado de doadores para pesquisa (TAB.5.1) não foi possível estabelecer relação entre as propriedades biomecânicas da pele e os parâmetros de idade e sexo dos doadores, como observado por Vogel (1987).

O critério de espessura, para seleção das amostras (TAB.5.2), foi necessário para tornar a amostragem mais homogênea, além de ser fundamental para os cálculos da tensão exercida sobre o corpo de prova. A tensão, conforme mostrado na equação (1) está relacionada à área do corpo de prova (item 4.2.2 de Materiais e Métodos). O range de 0,15 mm a 0,25 mm foi estabelecido em função de serem esses os valores utilizados, na maioria dos casos, para pele destinada a aloenxerto que será processada no Banco de Tecidos. A retirada da pele do doador com dermatomo elétrico garante a qualidade do tecido (Herson, 2004).

A amostragem dos doadores I a VI considerou o lote como um todo. Foi constatado, porém, grande variabilidade de características da pele no mesmo lote devido a presença de fissuras, poros, cicatrizes, e diferença em até 30% na espessura. Esses fatores podem ter contribuído para a dispersão das medidas obtidas nos testes de resistência à tração (APÊNDICE A). Optou-se, então, por diferente método de seleção de amostras para

os ensaios com pele dos doadores VII e VIII. Assim, uma única tira de pele foi dividida em três partes, a saber: uma para corte dos corpos de prova controle e duas partes para corte de corpos de prova experimentais, isto é, que foram irradiados no irradiador gama e no acelerador de elétrons. Assim, conseguiu-se várias unidades amostrais de um mesmo doador, que receberam uma identificação com índice (ex.: VIIIa, VIIIb, onde VIII é o número do doador e a ou b, indicam unidades amostrais diferentes). Vale ressaltar que o controle de cada unidade amostral possui um valor de média de módulo de elasticidade diferente.

Os procedimentos dos ensaios biomecânicos foram executados segundo a norma ASTM D638 (1977) adaptada para as características específicas de um tecido biológico não rígido.

As curvas dos gráficos obtidos com o programa Merlin 2.21 (FIG.5.1), em geral, seguiram a curva teórica (Pereira, 2001; Daly, 1982). Entretanto, em 5% das amostras, o gráfico apresentou um segundo segmento que correspondeu à resistência à tração da epiderme (FIG.5.2). Esse resultado está de acordo com o exposto por Chistolini (1999). É interessante notar que, embora na maior parte dos corpos de prova irradiados tenha havido uma aparente manutenção da coesão derme-epiderme, nesses 5%, a derme se rompeu mas a epiderme manteve a resistência à tensão até a ruptura. O módulo de elasticidade da epiderme correspondeu a cerca de 16% do valor do módulo de elasticidade da derme.

Amostras de pele de seis doadores foram submetidas à irradiação gama e ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy. Observando os dados da TAB.5.3 e o gráfico ilustrativo dessa tabela (FIG.5.3), é notável a grande diferença, em números absolutos, das médias do módulo de elasticidade de cada doador. A FIG.5.4 coloca em evidência essa diferença, pois são marcados apenas os valores dos controle (há uma diferença de cerca de 30% entre o valor mais baixo e o valor mais alto).

Considerando-se a porcentagem que cada grupo experimental (irradiado com gama e submetido ao feixe de elétrons) representa em relação ao grupo controle, pretendeu-se evitar análises errôneas em função da grande variabilidade dos valores absolutos das médias do módulo de elasticidade para cada doador. Utilizando valores relativos, isto é, com as porcentagens dos valores de módulo de elasticidade das amostras experimentais em relação ao controle (TAB.5.4 e FIG.5.5), foi possível constatar um padrão de resposta quanto à resistência à tração, em função do tipo de fonte, para mesma dose.

Amostras irradiadas com radiação gama a 25 kGy apresentaram módulo de elasticidade com cerca de 80% do valor do módulo de elasticidade dos grupos controle.

Amostras submetidas ao feixe de elétrons com dose de 25 kGy apresentaram módulo de elasticidade com cerca de 60% do valor do módulo de elasticidade dos grupos controle. É interessante notar que o valor máximo para amostras irradiadas com elétrons não ultrapassa o valor mínimo das amostras irradiadas com gama (FIG.5.6). Pode-se, portanto, estabelecer um valor limite, entre os dois efeitos, de 75%.

Devido à grande dispersão dos valores do módulo de elasticidade das amostras, foi necessário realizar análise estatística por meio de testes de significância. Testes paramétricos, como o teste *t de Student*, são muito utilizados na área biomédica para comparar médias de dados quando a variável em análise tem distribuição normal ou, pelo menos, simétrica. Mas quando essas pressuposições não são atendidas, ou as amostras são de pequeno tamanho ( $n < 12$ ), deve-se aplicar um teste não-paramétrico (Vieira, 2003).

Pode ser observado na TAB.5.6, que apresenta os resultados do teste *t de Student*, que as amostras irradiadas a 25kGy com radiação gama não apresentam diferença significativa quanto ao Módulo de Elasticidade em relação às amostras não irradiadas. Este fato é um indício de que a radiação gama, nas condições de irradiação deste experimento, não alterou significativamente a estrutura ou os componentes responsáveis pela resposta à tração das amostras de pele humana conservadas para aloenxerto. Para o doador VIIIa, com  $n < 12$ , para amostras controle e para amostras irradiadas com gama, foi aplicado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, que apresentou a mesma conclusão (Apêndice C). Estes resultados confirmam os dados obtidos por Bourroul et al. (2002).

Quanto às amostras submetidas ao feixe de elétrons a 25kGy, pode-se observar na TAB.5.6, que apresenta os resultados do teste *t de Student*, que, em cerca de 80% dos lotes das amostras testadas, ocorreu uma diferença significativa no valor da média do Módulo de Elasticidade, quando comparado ao grupo controle. Isto significa que a incidência do feixe de elétrons, nas condições de irradiação do experimento, pode ter alterado significativamente a estrutura da pele quanto a sua resposta ao teste de tração. Para o doador VIIIa, com  $n < 12$ , para amostras controle e para amostras irradiadas com elétrons, foi também aplicado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Em ambas as análises o resultado foi que a diferença de valores não é significativa mas deve-se levar em consideração que o número de amostras é muito baixo e o teste estatístico ficou comprometido.

Foram realizados testes comparativos com as médias de cada grupo (TAB.5.7) – controle, irradiado com gama e irradiado com elétrons – e o resultado corrobora a não significância das diferenças entre os valores do módulo de elasticidade para amostras

irradiadas com gama e os do controle. Por outro lado, é confirmada a diferença significativa entre os valores do módulo de elasticidade para amostras irradiadas com elétrons e os do controle. Percebe-se, então, a influência do tipo de irradiação e de sua interação com a matéria (Dziedzic-Goclawska, 2000).

Aplicando a mesma dose de 25 kGy, no mesmo irradiador, o acelerador de elétrons, foram comparados os valores do módulo de elasticidade em dois tipos de sistemas de transporte – esteira e bandeja – com modificação da temperatura – à temperatura ambiente e resfriado. Esses ensaios foram elaborados por que pretendeu-se verificar se a deposição de energia e de calor pelos feixes de elétrons interfere na resposta das amostras aos ensaios biomecânicos. Assim como no experimento anterior, a variação intrínseca das amostras é muito grande (TAB.5.8 e FIG.5.7), por este motivo analisou-se a porcentagem de cada grupo irradiado em relação ao controle (TAB.5.9 e FIG.5.8). Registrou-se também a variação da temperatura em cada sistema de transporte (TAB.5.10 a TAB.5.15). As temperaturas foram medidas com termopar, com registro de temperatura máxima e mínima, especialmente envolvido em uma caixa de chumbo para não ser afetado pela irradiação. As temperaturas de comparação são as iniciais e finais.

Pode-se perceber, analisando os gráfico da FIG.5.9, que amostras irradiadas à temperatura ambiente no sistema de esteira, com dose de 10 kGy, praticamente se mantém à temperatura ambiente e que as amostras irradiadas inicialmente à temperatura ambiente no sistema de bandeja apresentam elevação de temperatura de 2 °C, que equivalem a 15% de aumento em relação à temperatura ambiente. As amostras resfriadas que iniciaram o procedimento de irradiação com aproximadamente 10 °C, ou seja, 50% da temperatura ambiente, se mantiveram abaixo da temperatura ambiente, porém mostrando uma tendência a atingir a temperatura ambiente, principalmente no caso das amostras irradiadas no sistema de bandeja.

Com dose de 25 kGy em sistema de bandeja, é nítido o aumento de temperatura das amostras irradiadas à temperatura ambiente que chegam ao final da irradiação apresentando temperatura até 30% superior à temperatura do meio (o que se traduziu numa elevação de 5 °C). As amostras irradiadas com resfriamento (a 10 °C) atingem a temperatura ambiente, numa elevação absoluta de 12 °C.

Apesar da diferença entre as temperaturas finais das amostras irradiadas com dose de 25 kGy, inicialmente à temperatura ambiente e resfriadas, não ser muito grande, a resposta dessas amostras no ensaio de tração apresentam diferença significativa (FIG.5.10 e FIG.5.11). As amostras irradiadas em bandeja inicialmente resfriadas apresentam módulo

de elasticidade de cerca de 80% do controle, comparáveis aos valores das amostras irradiadas com gama a 25 kGy. As amostras irradiadas nas outras situações apresentam valores abaixo do limite de 75%, estabelecido anteriormente para amostras irradiadas com feixe de elétrons em sistema de esteira à temperatura inicial igual à ambiente. Isto significa que o resfriamento inicial das amostras irradiadas em sistema de esteira não interfere na manutenção das propriedades biomecânicas da pele. Este fato se deve provavelmente ao tempo de irradiação, que no sistema de esteira é de 72 min. para dose de 25 kGy e no sistema de bandeja é de 8 min.

Os experimentos realizados com irradiação a 50 kGy, seguiram os mesmos procedimentos estabelecidos para irradiação com dose de 25 kGy e foi constatada também grande variação dos valores do módulo de elasticidade (TAB. 5.17 e FIG. 5.12 e 5.13). Lançando-se os valores em porcentagem (FIG.5.14 e FIG.5.15), percebe-se que as amostras irradiadas com gama a 50 kGy apresentam melhor resposta aos testes de tração (65% do valor do módulo de elasticidade do controle) do que as amostras irradiadas com feixe de elétrons a 50 kGy (40%). Pode-se também estabelecer um limite entre os dois efeitos, no caso, de 55%, pois o valor máximo do módulo de elasticidade das amostras irradiadas com elétrons não ultrapassa o valor mínimo do módulo de elasticidade das amostras irradiadas com gama.

Realizando-se os testes de significância, constata-se que tanto para gama como para elétrons as diferenças nas propriedades biomecânicas de resistência à tração são significativas para 50 kGy, pois a dose é bastante elevada.

O último experimento realizado com doses crescentes, teve como objetivo estabelecer uma possível padronização de curva de irradiação de pele no irradiador de  $^{60}\text{Co}$  e no acelerador de elétrons. Como é percebido no gráfico da FIG. 5.17, apesar das diferenças de valores absolutos (apresentada no gráfico da FIG.5.16), quando a curva é construída com os valores de porcentagem, as três unidades amostrais irradiadas com elétrons apresentam o mesmo comportamento. Mostrando que, quando as amostras são submetidas a irradiação gama, iniciam a apresentar algum indicio de alteração na resposta à tração, com doses a partir de 25 kGy, ao passo que as amostras irradiadas com feixe de elétrons apresentam tais alterações a partir da primeira dose testada de 5 kGy.

O efeito da radiação no tecido certamente ocorreu de modo direto (Hall, 1994), uma vez que em glicerol, não existe água disponível para sofrer radiólise (Richters, 1996). Pelos resultados dos ensaios biomecânicos realizados, nas amostras em que houve redução

significativa das propriedades biomecânicas dos tecidos, é provável que tenha ocorrido quebra das ligações nas moléculas de colágeno como descrito por Dziedzic-Goclawska, (2000), para amostras de tendões e ossos. Assim, é provável que os feixes de colágeno das amostras submetidas ao acelerador de elétrons tenham sofrido tais alterações de modo mais intenso do que as amostras irradiadas na Gammacell. Uma vez que nos casos em que a dose de irradiação foi a mesma, a diferença observada na resposta das amostras ao teste de resistência à tração pode ser creditada à diferença na taxa de dose, isto é, à quantidade de energia depositada no tecido por unidade de tempo, do acelerador de elétrons (2,44kGy/seg) que é consideravelmente mais alta do que a taxa de dose da Gammacell (5,01kGy/h). O efeito da taxa de dose nas amostras irradiadas com a mesma dose foi observado por Reynolds et al. (1993) em materiais poliméricos.

O procedimento para cálculo de dose é diferente entre o irradiador de  $^{60}\text{Co}$  e o acelerador de elétrons. À parte toda a fundamentação teórica para o estabelecimento das doses requeridas nos dois tipos de irradiadores, na prática, a determinação da dose na Gammacell é feita pelo tempo e no acelerador de elétrons JOB-188 é calculada pelo número de passagens sob o feixe de elétrons (1 passagem equivale a  $\sim 1,08$  kGy). Como a cada volta na esteira a amostra deve passar duas vezes sob o feixe, a dose de 25 kGy requerida para irradiação nesse acelerador de elétrons, sempre equivalerá a 26,1 kGy. Além disso, raios gama atravessam o material e tendem a perder a maior parte de sua energia em uma única colisão. A trajetória dos elétrons na matéria é irregular e assim, a deposição de energia no tecido é maior no interior do tecido do que na superfície (Spinks, 1990). Como a dose indicada pelos dosímetros é a dose depositada na superfície do material e não em seu interior, é provável que os tecidos irradiados com elétrons estejam recebendo uma dose maior do que os tecidos irradiados com gama. Esses fatores podem ter contribuído nas diferenças observadas em relação aos ensaios biomecânicos nas amostras irradiadas com gama e com elétrons.

Analisando as fotomicrografias de pele para aloenxerto, coradas com hematoxilina-eosina (FIG. 5.18), percebe-se nas amostras irradiadas a manutenção do aspecto geral da pele com a camada córnea mais externa, a epiderme e suas várias camadas de queratinócitos e a derme como uma região de material não muito definido além da presença de núcleo de fibroblastos e um ou outro capilar. Como a coloração com hematoxilina-eosina não é específica, essas imagens não podem informar detalhes sobre a manutenção da estrutura do sistema de fibras de colágeno e elastina da derme.

As fotomicrografias de pele para aloenxerto coradas com tricromo de Mallory (FIG.5.19), coloração específica para colágeno, mostram uma progressiva alteração na intensidade da coloração azul que identifica o colágeno na derme. As amostras irradiadas com dose de 50 kGy apresentam a derme com um tom azul menos intenso do que as amostras irradiadas com dose de 25 kGy. A alteração é mais notável na imagem da amostra irradiada no acelerador de elétrons (FIG.5.19 E), na qual a derme não se apresenta corada, indicando que as fibras de colágeno ficaram alteradas de tal forma que não foram reconhecidas pelo corante.

A coloração com método picrosirius observada à luz polarizada, método mais indicado para colágeno, segundo Montes (1996), apresenta resultados interessantes (FIG.5.20). A amostra irradiada no irradiador de  $^{60}\text{Co}$  com dose de 25 kGy (FIG.5.20 B) apresenta fibras de colágeno na derme com brilho amarelado; na amostra irradiada com dose de 50 kGy (FIG.5.20 D), as fibras apresentam brilho mais avermelhado em comparação ao observado no controle (FIG.5.20 A). A amostra irradiada no acelerador de elétrons com dose de 25 kGy (FIG.5.20 C) apresenta fibras avermelhadas e nitidamente com maior espessura, comparadas às fibras do controle (FIG.5.20 A). A maior alteração pode ser notada na imagem da amostra irradiada com dose de 50 kGy no acelerador de elétrons (FIG.5.20 E): a estrutura das fibras está bastante alterada, mas ainda identificadas como colágeno I (mostram um brilho vermelho não muito intenso).

As alterações nas fibras de colágeno I da derme, indicadas pelo estudo com coloração picrosirius são claras nas imagens de ultramicrografias (FIG.22), nas quais se observam desestruturação da estriação característica, que revela a desestruturação da periodicidade das moléculas de tropocolágeno nas fibrilas. Além disso, é marcante o aspecto de "espirais que desenrolam" das fibrilas das amostras irradiadas. Esta observação indica que a radiação ionizante pode ter agido nas pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, afrouxando a agregação das moléculas de tropocolágeno. O aumento das alterações observadas se dá em função do aumento da dose e também em função do tipo de irradiador: as alterações mais frequentes ocorrem na amostra irradiada com dose de 50 kGy no acelerador de elétrons (FIG.5.22 E).

As amostras coradas com corante de Weigert, específico para fibra elástica, não mostram alteração das fibras elásticas nas amostras irradiadas em relação ao controle (FIG.5.21).

O estudo morfológico das amostras de pele humana para aloenxerto mostra alterações da estrutura das fibrilas de colágeno I nas amostras irradiadas em função da dose e do tipo de irradiador. Estas alterações são significantes, e se traduzem na diminuição das propriedades biomecânicas do tecido em relação à resistência à tração. Uma vez que ocorre a quebra das cadeias peptídicas, aumenta a solubilidade da proteína e diminui a resistência que o componente colágeno oferece à tração, como consequência, a redução nos valores do módulo de elasticidade também se dá em função da dose e do tipo de irradiador.

## 7 CONCLUSÕES

A radiação ionizante em doses acima de 25 kGy no irradiador de  $^{60}\text{Co}$ , e em doses acima de 5 kGy no irradiador de elétrons JOB-188 nas condições utilizadas, provoca significativa alteração na estrutura das fibrilas de colágeno I da derme de pele para aloenxerto conservada em glicerol concentrado.

A intensidade das alterações observadas foi diretamente proporcional ao aumento da dose e mostrou-se dependente do tipo de irradiação.

As alterações das fibrilas de colágeno têm consequência na resposta do tecido aos ensaios de tração com a redução significativa dos valores do módulo de elasticidade nas amostras irradiadas em doses acima de 25 kGy no irradiador de  $^{60}\text{Co}$ , e em doses acima de 5 kGy no irradiador de elétrons JOB-188.

Altas doses de irradiação (40kGy a 50kGy), utilizadas para eliminar prováveis contaminações virais, provocaram significativa redução dos valores de Módulo de Elasticidade que se traduzem em uma maior fragilidade do tecido. Neste caso estes resultados deveram ser discutidos clinicamente para estudo risco/benefício da utilização destas doses.

Os procedimentos para esterilização com radiação ionizante de pele de espessura parcial conservada em glicerol concentrado (mínimo 85%) destinada a aloenxerto, foram estabelecidos para as características dos irradiadores do CTR/IPEN: Gammacell e acelerador de elétrons JOB-188. Esses procedimentos visam a alterar o menos possível as características iniciais da pele irradiada com dose de 25 kGy e 50 kGy.

O principal parâmetro que deve ser controlado para irradiador de  $^{60}\text{Co}$  Gammacell-220, é a manutenção da temperatura em torno de 8 °C, obtida com a adição de gelo picado ao recipiente das amostras.

O acelerador de elétrons JOB-188, deve ser ajustado para os parâmetros de irradiação conforme o exposto no item 4.1.2.2. de Métodos. Além disso, a utilização do sistema de transporte de bandeja com adição de gelo ao recipiente das amostras de modo a manter a temperatura de irradiação próxima à temperatura ambiente, foi o procedimento

que apresentou maiores vantagens em termos de redução do tempo de irradiação e manutenção das características biomecânicas da pele.

Os resultados deste trabalho ajudam a caracterizar a pele, conservada em glicerol concentrado e submetido à irradiação ionizante, quanto às suas propriedades biomecânicas. As alterações constatadas no sistema colágeno da derme nas condições de irradiação, já descritas, não dão indicação de como esse tipo de tecido vai se comportar quando utilizado como aloenxerto. Dessa forma, este estudo "in vitro" deve ter sua continuidade com estudos "in vivo", em modelo animal, que indiquem a viabilidade da pele humana, conservada em glicerol concentrado e irradiada com doses esterilizantes, para ser utilizado como enxerto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997, p. 971-1000.
- ALEXANDER, P.; LETT, J.T. Effects of ionizing radiations on biological macromolecules. In: FLORKIN, M.; STOTZ, E.H. (Ed.) *Comprehensive Biochemistry – Photobiology, ionizing radiations*. Amsterdam: Elsevier, 1967, v.27, p. 267-313.
- AMERICAN NATIONAL STANDARD. *Standard test method for tensile properties of plastics*, 1977 (ANSI/ASTM D 638 – 77a).
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *Manuseio de resíduos de serviços de saúde – Procedimento*. Rio de Janeiro: ABNT, 1993. (NBR 12809).
- BAARE, J. van; BUITENWERF, M.J.; HOEKSTRA, M.J.; DU PONT, J.S. Virucidal effect of glycerol as used in donor skin preservation. *Burns* v. 20, n.1, S77-S80, 1994.
- BALASUBRAMANI, M.; KUMAR, T.R.; BABU, M. Skin substitutes: a review. *Burns* v. 27, p. 534-544, 2001.
- BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo: Edart/Edusp, 1976.
- BIRAL, A.R. *Radiações ionizantes para médicos, físicos e leigos*. Florianópolis: Insular, 2002.
- BOLGIANI, A.; BENAIN, F. *Actualización en el tratamiento de las quemaduras*. 1993. Cap. 12, Primer Banco de Piel de Argentina, organización y funcionamiento. p. 90-99.
- BOROJEVIC, R.; SERRICELLA, P. Próteses vivas de pele humana. *Biotechnologia* v. 2, n. 7, p. 16-18, 1999.
- BOURROUL, S.C.; HERSON, M.R.; PINO, E.S.; MATHOR, M.B. Sterilization of skin allografts by ionizing radiation. *Cellular and Molecular Biology* v. 48, n. 7, p. 803-807, 2002.
- BOZZOLA, J.J.; RUSSELL, L.D. *Electron microscopy*. Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers, 1992.
- BRAVO, D.; RIGLEY, T.H.; GIBRAN, N.; STRONG, D.M.; NEWMAN-GAGE, H. Effect of storage and preservation methods on viability in transplantable human skin allografts. *Burns* v. 26, p. 367-378, 2000.
- CHISTOLINI, P.; DE ANGELIS, G.; DE LUCA, M.; PELLEGRINI, G.; RUSPANTINI, I. Analysis of the mechanical properties of in vitro reconstructed epidermis: preliminary results. *Med. Biol. Eng. Comput.* v. 37, p. 670-672, 1999.

CURSO DE INTRODUÇÃO À BIOESTATÍSTICA, 6. 26 jun. – 11 ago., 2002. São Paulo. Coordenação de Luis Gerk de Azevedo Quadros. [Apostila ...]. São Paulo, Unifesp Virtual, 2002. Disponível em: <http://www.virtual.epm.br/cursos/bioest/conteudo/aula3a.htm>. Acesso em: 31 jul.2002.

DALY, C.H. Biomechanical properties of dermis. *The Journal of Investigative Dermatology* v.79, p.17s-20s, 1982. Supplement I.

DZIEDZIC-GOCLAWSKA, A.; STACHOWICZ, W. Sterilisation of tissue allografts. In: PHILLIPS, G.O. (Ed.) *Advances in Tissue Banking*. Singapore: World Scientific./IAEA, 1997, v.1, p.261-315.

DZIEDZIC-GOCLAWSKA, A. The application of ionising radiation to sterilise connective tissue allografts. In: PHILLIPS, G.O. (Ed.) *Radiation and Tissue Banking*. Singapore: World Scientific./IAEA, 2000, p. 57-99.

EASTLUND, T. Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: reducing the risk through donor selection. *Cell Transplantation* v.4, n. 5, p. 455-477, 1995.

FREEDLANDER, E.; BOYCE, S.G.; GHOSH, M.M.; RALSTON, D.R.; MACNEIL, S. Skin Banking in the UK: the need for proper organization. *Burns* v. 24, p.19-24, 1998.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. *Color Textbook of Histology*. Philadelphia: WB Saunders, 2001.

GAVA, A.J. *Princípios de tecnologia de alimentos*. São Paulo: Nobel, 1979, p. 197-199.

GIBSON, T.; KENEDI, R.M. Biomechanical properties of skin. *Surg Clin North Am*, v. 47, n.2, p.279-294, 1967.

HALL, E.J. *Radiobiology for the Radiologist*. Philadelphia: JB Lippincott, 1994.

HERNDON, D.N. Perspectives in the use of allograft. *Burn Care & Rehabilitation*, v. 18, S6, 1997. Supplement.

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

HERSON, M.R. Bancos de pele. In: LIMA JR, E.R.; SERRA, M.C. (Ed.) *Tratado de Queimaduras*. São Paulo: Atheneu, 2004.

HLAEAC, C. Skin: a vital organ. Changes which occur in the Eldery Population. *Fall* v. 2, p. 4, 1995.

HOLBROOK, K.A.; WOLFF, K. The structure and development of skin. In: FITZPATRICK et al. (Ed.) *Dermatology in General Medicine*. New York: McGraw Hill, 1999, v. 1, cap. 8, p. 97-145.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *The IAEA programme in radiation and tissue banking – International standards on tissue banks*, First Meeting of the IAEA Technical Advisory Committee. Boston: 2002a.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *The IAEA programme in radiation and tissue banking – Code of practice for the radiation sterilization of tissue allografts: Requirements for validation and routine control*, First Meeting of the IAEA Technical Advisory Committee. Boston: 2002b.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *The IAEA radiation & tissue banking program – Workplan for 2003-2004*. Viena, 2003.

Disponível em: <http://www.int-tissuebank.com>. Acesso em: 22 jan. 2004.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *Sterilization of health care products – radiation sterilization - substantiation of 25kGy as a sterilization dose for small or infrequent production batches*, 1996 (ISO 13409).

JUNQUEIRA, L.C.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* v. 11, p. 447-455, 1979 *apud* NOORLANDER, M.L. et al. A quantitative method to determine the orientation of collagen fibers in the dermis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* v. 50, n. 11, p. 1469-1474, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1995, cap. 18, p. 301-312.

KEALEY, G.P. Disease transmission by means of allograft. *Journal of Burn Care & Rehabilitation* v. 18, n. 1, part 2, p. S10, 1997.

KEARNEY, J.N. Quality issues in Skin Banking: a review. *Burns* v. 24, p.299-305, 1998.

KERR, J.B. *Atlas de Histologia Funcional*. São Paulo: Artes Médicas, 2000, cap. 8, p. 145-161.

KOLLER, J. Basic anatomy and physiology of human skin. In: NATHER, A. *Advances in Tissue Banking – The scientific basis of tissue transplantation*. Singapore: World Scientific, 2001, v. 5, p. 123-138.

LEHNINGER, A.L. *Bioquímica*. São Paulo: Edgar Blücher, 1976, v. 1, p. 28-95.

LEI FEDERAL no. 9.434 – Diário Oficial da União, Brasília, 5 de Fevereiro de 1997, Seção 1. Dispõe sobre a remoção de tecidos ou partes do corpo humano para fins de transplante.

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

MACKIE, D.P. The Euro Skin Bank: Development and application of glycerol-preserved allografts. *Journal of Burn Care & Rehabilitation* v. 18, n. 1, part 2, p. S7-S9, 1997.

MACKIE, D.P. The Use of allogeneic skin in burns. In: PHLLIPS, G.O. (Ed.). *Advances in Tissue Banking*. Singapore: World Scientific./IAEA, 2001. v. 3, p. 149-165.

MARSHALL, L.; GHOSH, M.M.; BOYCE, S.G.; MACNEIL, S.; FREEDLANDER, E.; KUDESIA, G. Effect of glycerol on intracellular virus survival: Implications for the clinical use of glycerol-preserved skin. *Burns* v. 21, n. 5, p. 356-361, 1995.

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

NOORLANDER, M.L.; MELIS, P.; JONKER, A.; NOORDEN, C.J.F. van. A quantitative method to determine the orientation of collagen fibers in the dermis. *The Journal of Histochemistry & Citochemistry* v. 50, n. 11, p. 1469-1474, 2002.

OLDE DAMINK, L.H.H.; DIJKSTRA, P.J.; LUYN, M.J.A. van; WACHEM, P.B. van; NIEUWENHUIS, P.; FEIJEN, J. Changes in the mechanical properties of dermal sheep collagen during *in vitro* degadation. *Journal of Biomedical Materials Research* v. 29, n. 2, p. 139-147, 1995.

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

PEDRAZA, J.M. Past, present and future IAEA radiation and tissue banking programme. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *The IAEA radiation & tissue banking program*. Viena, 2003.

Disponível em: <http://www.int-tissuebank.com>. Acesso em: 22 jan. 2004.

PEREIRA, B.P. Some principles of biomechanis – Structural and material properties. In: NATHER, A. (Ed.). *Advances in Tissue Banking - The Scientific Basis of Tissue Transplantation*. Singapore: World Scientific./IAEA, 2001. v. 5, p. 507-533.

PORTARIA ESTADUAL CVS 01, São Paulo, 18 de janeiro de 2000. Estabelece as obrigações dos laboratórios de pesquisa em instituir ações para garantir o princípio da biossegurança.

PHILLIPS, G.O. (Coord. Ed.) *Multi-media distance learning package on Tissue Banking*. Singapore: National University of Singapore, IAEA/NUS Regional Training Centre (RCA), IAEA/NUS Interregional Training Centre 5, 1997.

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

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. *Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*. São Paulo: Atheneu, 2000.

- PIRNAY, J.P.; VANDENVELDE, L.; REPER, P.; VANDERKELEN, A.  
HIV Transmission by transplantation of allograft skin: a review of the literature. *Burns* v. 23, n. 1, p. 1-5, 1997.
- PUGLIESE, P.T. The skin's antioxidant systems. *Dermatologia Nursing* v.10, n. 6, p. 401, 1998.
- REYNOLDS, A.B.; BELL, R.M.; BRYSON, N.M.N.; DOYLE, T.E.; HALL, M.B.; MASON, L.R.; QUINTRIC, L.; TERWILLINGER, P.L. Dose-rate effects on the radiation-induced oxidation of electric cable used in nuclear power plants. *Radiat. Phys. Chem.* v. 45, n.1, p.103-110, 1995.
- RENNEKAMPFF, H.; SCHALLER, M.P.H. Acellular allograft dermal matrix: immediate or delayed epidermal coverage? *Burns* v. 28, p. 100-101, 2002.
- RICHTERS, C.D.; HOEKSTRA, M.J.; VAN BAARE, J.; DU PONT, J.S.; KAMPERDIJK, E.W.A.. Morphology of glycerol-preserved human cadaver skin. *Burns* v. 22, n. 2, p. 113-116, 1996.
- ROBB, E.C.; BECHMANN, N.; PLESSINGER, R.T.; BOYCE, S.T.; WARDEN, G.D.; KAGAN, R.J. Storage media and temperature maintain normal anatomy of cadaveric human skin for transplantations to full-thickness Skin Wounds. *Journal of Burn Care & Rehabilitation* v. 22, n.6, p. 393-396, 2001.
- SCHMUTH, M.; SZTANKAY, A.; WEINLICH, G.; LINDER, D.M.; WIMMER, M.A.; FRITSCH, P.O.; FRITSCH, E. Permeability barrier function of skin exposed to ionizing radiation. *Archives of Dermatology*, v. 137, n. 8, p. 1019, August 2001.
- SHERIDAN, R.L.; TOMPKINS, R.G. Skin substitutes in burns. *Burns* v. 25, p. 97-103, 1999.
- SILVA, L.G.A. *Aplicações de Fontes Intensas de Radiação*. São Paulo: IPEN. [Apostila ...], 2002.
- SPINKS, J.W.T.; WOODS, R.J. *An Introduction to Radiation Chemistry*. New York: John Willey & Sons, 1990.
- STRYER, L. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996.
- SULLIVAN, R; FASSOLITIS, A.C.; LARKIN, E.P.; RALSTON, B.D.; PEELER, J.T. Inactivation of thirty viruses by gamma radiation. *Appl. Microbiol.* v.22, n.1.p.61-65, 1971.
- TROTT, K.R.; SHIRAZI, A.; HEASMAN, F. Modulation of accelerated repopulation in mouse skin during daily irradiation. *Radiother Oncol.* v. 50, p.261-266, 1999 *apud* SCHMUTH, M et al. Permeability barrier function of skin exposed to ionizing radiation. *Archives of Dermatology*, v. 137, n. 8, p. 1019, August 2001.

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

TZAPHLIDOU, M. The role of collagen and elastin in aged skin: an image processing approach. *Micron* 2004 (*no prelo*).

VIEIRA, S. *Introdução à Bioestatística*. Rio de Janeiro: Campus, 2002. cap. 12, p. 121-136.

VIEIRA, S. *Bioestatística – Tópicos Avançados*. Rio de Janeiro: Campus, 2003. cap. 2, p. 12-50.

VOGEL, H.G. Age dependence of mechanical and biochemical properties of human skin. Part I: Stress-strain experiments, skin thickness and biochemical analysis. *Bioengineering and the Skin* v. 3, p. 67-91, 1987.

VOGEL, H.G. Mechanical measurements of skin. *Acta Derm Venereol* v. 74, p. 39-43, 1994. Supplement.

**APÊNDICE A – Valores do módulo de elasticidade (MPa) das amostras do grupo controle e dos grupos irradiados a 25 kGy**

Doador amostra	I			IIa			IIIa			IV			V			VIIIa		
	controle	gama	elétrons	controle	gama	elétrons	controle	gama	elétrons	controle	gama	elétrons	controle	gama	elétrons	controle	gama	elétrons
1	28,41	53,47	40,00	28,86	18,87	18,02	21,60	12,19	9,72	32,15	31,15	13,75	8,13	15,87	28,65	54,00	37,50	30,00
2	37,45	45,04	27,17	14,75	22,67	16,42	16,93	9,82	7,72	30,30	18,76	15,58	25,00	28,17	10,41	42,78	41,54	27,00
3	39,68	28,17	27,17	24,57	17,30	27,17	8,31	15,11	9,78	27,03	19,30	15,29	37,45	39,37	38,61	43,60	42,48	33,75
4	32,15	48,31	13,60	22,90	22,67	17,27	10,83	17,73	7,94	27,85		27,17	37,45	15,87	28,17			41,54
5	41,49	33,78	13,60	30,21	19,49	14,62	18,76	10,83	12,36	26,45		28,17	33,78	25,00	30,03			
6	38,91	45,04	30,26	19,42	21,69	30,21	9,82	13,60	5,68	24,39		17,73	28,17	28,09	17,73			
7	56,18	33,78	27,17	22,52	18,73	12,28	16,00	17,01	4,86	34,96		27,17	28,17	35,97	20,49			
8	45,45	42,19	10,46	24,39	27,62	13,59	13,60	9,00	5,68	34,01			45,45	25,97	19,30			
9	37,45	35,59	34,60	27,25	16,08	15,10	9,75	18,02	6,00	30,03			14,99	28,17	22,52			
10	22,62	30,21	38,86	27,25	25,00	21,60	9,71	13,60	11,25	30,03			45,04	42,19	27,85			
11	33,33	50,66	20,79	27,85	27,03	15,82	24,01	15,01	7,56				11,26	16,86	18,02			
12	40,00	22,3	27,17	27,85	16,89	15,85	10,46	18,02	13,51				25,00	32,47	27,25			
13		17,01	22,50	27,25	13,49	22,52	16,08	13,93					32,47	39,06	12,19			
14		24,29	17,30	17,73	32,47	11,34		15,11					45,04	25,97	8,03			
15		15,13	27,17	22,52	14,99	19,42		10,46					32,47	40,98	30,03			
16		13,60		24,39	13,24			15,11					32,47	21,69	10,57			
17		13,59			18,76								35,59	33,78	25,00			
18		27,17			28,17								9,01	27,03	22,52			
19		27,17											32,15	32,05	16,26			
20		26,80											32,15	13,20	20,45			
21													48,78	22,52	16,26			
22													19,49		32,15			
23													27,85		9,09			
24													33,78		16,67			
25													32,15		9,05			



## APÊNDICE C - Teste de Mann-Whitney para pequenas amostras (n<12)

IV	E (Mpa)		postos	
	n	gama	controle	R1 R2
1	31,15	32,15	10	11
2	18,76	30,3	1	9
3	19,3	27,03	2	5
4		27,85		6
5		26,45		4
6		24,39		3
7		34,96		13
8		34,01		12
9		30,03		7,5
10		30,03		7,5
<b>soma</b>			<b>13</b>	<b>63</b>

Valores críticos  $7 < SR1 < 35$

nível de significância 1%

portanto, diferença não significativa

VIIIa	E (Mpa)		postos	
	n	gama	controle	R1 R2
1	37,5	54,00	1	6
2	41,54	42,78	2	4
3	42,48	43,6	3	5
<b>soma</b>			<b>6</b>	<b>15</b>

Valores críticos  $6 < SR1 < 15$

nível de significância 5%

portanto, diferença não significativa

VI	E (Mpa)		postos	
	n	gama	controle	R1 R2
1	33,5	57,97	2,5	11
2	37,59	33,5	7	2,5
3	38,83	60,79	8	13
4	31,06	39,53	1	9
5	43,86	69,06	10	14
6	33,84	37,52	4	6
7	34,01	60,06	5	12
8				
9				
10				
<b>soma</b>			<b>35</b>	<b>65</b>

Valores críticos  $39 < SR1 < 66$

nível de significância 5%

portanto, diferença significativa

VIIIb	E (Mpa)		postos	
	n	controle	gama	1 2
1	37,5	19,25	7	2,5
2	32,08	21,39	5	4
3	#DIV/0!	17,00	6	1
4		19,25		2,5
<b>soma</b>			<b>18</b>	<b>5</b>

Valores críticos  $6 < SR1 < 18$

nível de significância 5%

portanto, diferença não significativa

IV	E (Mpa)		postos	
	n	elétrons	controle	R1 R2
1	13,75	32,15	1	15
2	15,58	30,3	3	14
3	15,29	27,03	2	8
4	25,17	27,85	6	10
5	28,17	26,45	11	7
6	17,73	24,39	4	5
7	27,17	34,96	9	17
8		34,01		16
9		30,03		12,5
10		30,03		12,5
<b>soma</b>			<b>36</b>	<b>92</b>

Valores críticos  $39 < SR1 < 87$

nível de significância 1%

portanto, diferença significativa

VIIIa	E (Mpa)		postos	
	n	controle	elétrons	R1 R2
1	54,00	30,00	7	2
2	42,78	27,00	5	1
3	43,6	33,75	6	3
4		41,54		4
<b>soma</b>			<b>18</b>	<b>6</b>

Valores críticos  $6 < SR1 < 18$

nível de significância 5%

portanto, diferença não significativa

VI	E (Mpa)		postos	
	n	controle	elétrons	R1 R2
1	57,97	25,97	14	9
2	33,5	27,47	11	10
3	60,79	7,13	16	2
4	39,53	8,02	13	4
5	69,06	7,7	17	3
6	37,52	24,04	12	7
7	60,06	5,92	15	1
8		24,1		8
9		16,03		5
10		19,3		6
<b>soma</b>			<b>98</b>	<b>55</b>

Valores críticos  $39 < SR1 < 87$

nível de significância 1%

portanto, diferença significativa

VIIIb	E (Mpa)		postos	
	n	controle	elétrons	1 2
1	37,5	19,25	6	3
2	32,08	16,88	4	1
3	#DIV/0!	18,06	5	2
<b>soma</b>			<b>15</b>	<b>6</b>

Valores críticos  $6 < SR1 < 15$

nível de significância 5%

portanto, diferença não significativa

**ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética do IPEN**

**Parecer - Projeto Nº 028/CEP-IPEN/SP**

Com base nos pareceres apresentados pelos relatores, o protocolo de pesquisa "**Preservação e esterilização por radiação de pele humana para banco de tecidos**", de responsabilidade da pesquisadora **Dra. Monica Beatriz Mathor**, foi considerado **APROVADO**.

São Paulo, 30 de junho de 2003

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

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



À  
Comissão de Ética e Pesquisa  
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares  
Nesta

São Paulo, 18 de Maio de 2003

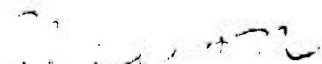
Prezados senhores:

Vimos por meio desta confirmar a disponibilidade do Banco de Tecidos do Instituto Central – Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da USP, em ceder lâminas de enxertos de pele humana conservados em glicerol para utilização no trabalho de pesquisa “Preservação e esterilização por radiação de pele humana para Bancos de Tecidos”, pesquisadora responsável: Dra. Monica Mathor.

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

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

Respeitosamente,

  
Dra. Marisa R. Herson  
Médica Responsável

**ANEXO C – Sterilization of skin allograft by ionizing radiation – artigo  
publicado na revista *Cellular and Molecular Biology* 48(7), 803-807**

## STERILIZATION OF SKIN ALLOGRAFTS BY IONIZING RADIATION

Selma Cecília BOURROUL<sup>1</sup>, Marisa Roma HERSON<sup>2</sup>, Eddy PINO<sup>1</sup>  
and Monica Beatriz MATHOR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN, SP)  
Av. Professor Lineu Prestes, 2242, Butantã, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil  
Fax: +55 11 3816 9186; E-mail: mathor@ipen.br

<sup>2</sup> Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455 Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brazil

Received November 11, 2002; Accepted December 15, 2002

**Abstract** - The skin has a fundamental role in the viability of human body. In the case of extensive wounds, skin allografts provide an alternative to cover temporarily the damaged areas. After donor screening and preservation in glycerol 85%, the skin can be stored in a Skin Bank. Glycerol at this concentration has a bacteriostatic effect after certain time of preservation. On the other hand, skin sterilization by ionizing radiation may reduce the quarantine period for transplantation in patients. The objective of this work was to evaluate allograft sterilization using two sources of ionizing radiation. Through the analysis of stress-strain, it was intended to verify possible effects of the radiation on the structure of preserved grafts. Three groups of skin samples were selected. The first group was maintained in the initial conditions, not irradiated. The second was exposed to cobalt-60, while the third one was irradiated using an Dynamitron Accelerator JOB188 electron beam. The irradiation dose was 25 kGy for both tests. Both irradiation sources, and the Instron Universal Machine used for biomechanical experiments, are installed at the Centro de Tecnologia das Radiações / Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (São Paulo, Brazil). According to the preliminary results, biomechanical characteristics of the samples irradiated seem to be maintained with regard to the non irradiated group.

**Key words:** ionizing radiation, allograft, skin, biomechanical properties, Young's modulus

### INTRODUCTION

A tenuous layer covers our body and isolates it from the surrounding environment. Covering the totality of the organism surface, the skin corresponds to 16% of the body weight and, although it is not more than 2.0 mm thick, it is an efficient barrier against a wide variety of physical, chemical and biological agents, resisting to mechanical forces, extreme temperatures, toxins and ionizing radiation at low doses. The skin is also responsible for the organism homeostatic maintenance process, the body temperature regulation, the hydric and osmotic equilibrium (22). It possesses also a complex antioxidative system that includes enzymatic and non-enzymatic components, which consists in the first defense against free radicals originated either by environment or by endogenous processes (17). The protection against the harmful effects of sunrays, especially ultraviolet, is provided by the skin pigment melanin produced by melanocytes which gives maximum protection against UV light.

Due the important role the skin performs, it is comprehensible that vast injuries compromise patient survival (16). It is the case, for example, of serious, extensive and deep burns of full thickness, that destroy the epidermis, dermis and subcutaneous tissue making impossible the spontaneous regeneration of the skin. The decrease of mortality rate is thus related to the efficiency to provide a protection to the burned region in the way to diminish substantially the dehydration and to allow the infection control (9). Besides, this cover allows or promotes regeneration more adequately, avoiding the adjacent tissue retraction and the development of deformed scars.

When donor areas are available, it is possible to proceed with autografting, which means the use of tissue from the same person. In immunogenic aspect, this is the best option, because the risk of rejection is inexistent. Nevertheless, such procedure is not always possible when the damaged region represent a large surface of the body and the donor surface is not enough. The bioengineering research of dermis-epidermis replacement synthesis (polymeric or biologic) has brought to the market products that can replace the original tissue (2,18).

Tissue Banks in several parts of the world provide allografts (skin grafts from individuals of the same species but

**Abbreviations:** PHG: human skin preserved in glycerol not irradiated; PHGle: human skin preserved in glycerol submitted to electron sheaf; PHGlg: human skin preserved in glycerol gamma irradiated

of different genetic constitution), which are preferentially used as temporary cover for serious burns due to their relatively easy preservation and storage (3,7,13). Many authors refer to skin allografts as being the best, most used and efficient wound coverage alternative for burn patients, with documented data of efficacy (5,14,19,20).

Skin allograft rejection is more complex than that which occurs with transplanted internal organs because the skin, as an organ that interfaces with the external environment, is extremely competent in inducing an immune rejection response (4,10). The epidermis has among the epithelial cells, special cells of the immune system, the Langerhans cells, which have immunoglobulin receptors and that can process and accumulate in their surface the cutaneous antigens and later present them to lymphocytes.

Cadaveric skin grafts, even submitted to preservation processes and posterior sterilization, preserve their antigenicity. Therefore, within three weeks the grafts tend to be rejected, necrosis is produced and should be removed (11). The graft disruption seems to be related more to the invasion of mononuclear cells (lymphocytes and macrophages) than the surrounding antibody action into the grafted cells (21).

In case of very serious lesions, during which the dermis is also damaged, allografts can be composed by dermis and epidermis. Herson (10) describes the definitive incorporation of allogenic dermis grafted in burned subjects. Some days after using partial thickness skin allotransplants, for covering full-thickness burned areas, only the epidermis was removed and replaced by epithelial tissue from the same patient. The follow-up of the cases showed that not only the allodermis was incorporated but also that the autoepidermis kept its functional characteristics.

The possibility of human skin preservation for further use as a graft is not new. Since the beginning of the 20<sup>th</sup> Century, several studies have been reported about skin conservation in refrigeration and about developing different methods of preservation (10).

Glycerol at high concentrations (85%) can be used as a biological tissue preservation medium. When the skin cells are dehydrated, glycerol maintains their structure because it replaces the water extracted from the cells and distributes the remaining water throughout the tissue (15,19). Furthermore, it does not affect the collagen and elastin fibers present in the dermis (19). Together with being a simple technique of preservation, glycerol presents confirmed bacteriostatic and anti-viral action. To obtain the maximal bacteriostatic effect, a minimum quarantine period of 3 to 4 weeks exposure to glycerol is recommended before clinical use (1,15).

#### *Sterilization by ionizing radiation*

The use of a sterilization method together with the preservation in glycerol contributes to shorten the time of

graft quarantine and assure sterility.

The Instituto Central do Hospital das Clínicas (IHC) of the Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo in collaboration with the Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN)-CNEN / São Paulo, Brazil are operating since 2000, the first tissue bank in Brazil that uses tissue sterilization by ionizing radiation. Large scale use of ionizing radiation to sterilize hospital products was started in the 1950's. This practice was increased between the 70's and 80's, when the use of polymeric products sensitive to heat treatment was introduced in the market. In a similar fashion, biological tissues cannot be autoclaved or sterilized by heat, while the use of ethylene oxide produces toxic residues which require a period of days before the tissues can be used safely.

Ionizing radiation does not produce radioactive residues or toxic residues, does not present contamination risks and the materials can be processed both at room temperature or frozen. Gamma radiation and high energy electrons have high penetrating power so that products can be irradiated already wrapped. Nevertheless, it is necessary to note that these sources generate heat; therefore, high energy electrons doses must be cumulative to reach the total established levels so as to avoid damage of the tissue.

The effect of ionizing radiation on living tissues is well known. Specifically, the collagen I of the dermis presents alterations in its molecular organization, with the reduction of the diameter of the fibers and the increase in frequency of abnormal fiber bundles formation (23). Tissue Bank allografts processed in glycerol have minimal water available as target for ionizing radiation and the formation of free radicals, which brought forward the possibility of a reduced direct radiation effect on the grafts. The aim of this study was to evaluate possible interferences of the direct radiation on the structure and biomechanical characteristics of these skin grafts through the analysis of changes in tensile strength and histological observations.

#### *Skin structure and biomechanical characterization*

Two layers, epidermis and dermis, with distinct embryonic characteristics and origin, form the skin but have a great adhesion and interactivity (10).

Biomechanical features of the skin are determined mainly by the direction and the resistance presented by the network of collagen and elastin from the dermis. From the bioengineering point of view, the skin is not composed of a homogenous material. Analyzing histologically a skin sample that was fixed in the relaxed state, its collagen fibers are apparently randomly arranged. Nevertheless, if the skin is kept stretched during fixation, an amount of fibers are orientated in the direction of the traction; therefore, the higher the force applied to the skin, the higher the amount of lined up collagen fibers. Concerning the elastic fibers, those present in

the relaxed skin, are arranged in spirals around collagen fibers. When the skin is distended, the elastic fibers are bounded by molecular bridges to collagen fibers and also align in the direction of the stretch (8).

Another component that contributes to the mechanical characterization of the skin is the epidermis. This layer is more superficial, formed by keratinized stratified epithelial tissue, originated by ectodermis, and generally very thin in most parts of the body (0.06–0.12 mm). The resistance of the epidermis is due to several characteristics of this epithelium. It presents a compact structure of contiguous cells and very little extracellular matrix. Among the keratinocytes there are adhering structures (desmosomes) that keep the cells attached to each other. The skeleton responsible for the firmness of the epithelium is formed during the maturation process with the accumulation of intracellular (filamentous) keratin; in the corneal layer the keratin represents 80% of the epidermal proteins. When keratinocytes finally die, they remain adherent to each other and rest of the epithelium thanks to intercellular junctions so that mechanical resistance of the epidermis is observed only when the stretching force is higher than 70% (6). Thanks to the structure of the superficial corneal scales, skin resists to friction forces of moderate intensity, changes in environmental pH, temperature and enzymatic digestion (12).

The adhesion between epidermis and dermis results from a basement membrane which is produced by both layers. The transmembrane proteins of the epidermal cells interact with collagen fibrils synthesized by fibroblasts, assuring the adhesion and physical continuity between both layers. The interface between them is papillar conformation, increasing the contact surface allowing the skin to stretch without breaking up (10).

## MATERIALS AND METHODS

### *Samples preparation*

Skin from cadaveric donors was provided by the ICHC-IPEN Tissue Bank, after approval of the Research Committee. The partial thickness grafts were originally taken with an electric dermatome and later processed in glycerol 85% and kept under 4°C.

The technique of systematic samples was used in the biomechanical tests and with the material thickness around 0.10 mm. The average thickness was measured with a watch pachymeter (Mituayo), before and after irradiation, using tree points set within the same distances in each sample.

The samples were flattened and wrapped in 5 layer polynylon bags (the same as used in the Tissue Bank) in to which 2 ml of glycerol 85% were added and the maximum air possible was extracted. The bags were sealed thermally and identified.

Three sets of 10 skin grafts samples were established. The first set was kept in the initial conditions, i.e. not irradiated. The second set was submitted to the dose of 25 kGy of gamma radiation in a cobalt-60 irradiator (Gammacell), installed in the Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) / IPEN, with an activity of  $3.1 \times 10^{11}$  Bq (8.35 kCi) and a dose rate of 5.89 kGy/hr. The third set was exposed to an electron beam in a Dynamitron Accelerator JOB 188, installed in the CTR / IPEN, calibrated with the following parameters: total dose of 25 kGy, energy of 0.73 MeV, beam current 0.4 mA, dose rate of 2.44 kGy/sec, tray speed 3.36 m/min, passage

dose 1.0875 kGy in the total of 24 passages of the tray by the beam.

### *Biomechanical tests*

After the irradiation and before having been mechanically tested, the samples were rinsed in sterile saline solution 0.9%, immersed in a fresh solution for 24 hr so as to wash out the glycerol, to re-hydrate the tissue and to recover normal physic characteristics such as opacity and flexibility (10), simulating the routine of clinical use.

Each sample was taken out from the saline solution, stretched and fixed in na acrylic plaque with the epidermis facing up. The skin was cut with a special knife assembled in a wooden plate into a pattern form of halters dumbbell with the width of 4 mm in the most narrow position (proof body), a width of 10 mm in the most wide position and 50 mm in length (25).

The knife was supported with the blade turned to the skin in the longitudinal position and submitted to homogenous pressure of 500 kg in a manual press to obtain the cut. The cut test samples were kept in Petri plates with sterile saline solution 0.9% at room temperature until the assay time.

For the tensile strength tests the samples were fixed in claws at a distance of 27 mm in an Instron Assay Universal Machine, installed at CTR / IPEN. This equipment has a computerized system installed which files the data obtained during the assay that can later be later processed and printed into tables and graphs. A force of 1 kN was applied with the module resulting in, a distancing claw speed of 50 mm/min until, the sample rupture.

The graphs obtained with the Instron program present the relationship between the stretching  $\times$  tension; the tensile strength at the rupture point is represented by tension ( $\sigma$  in MPa) which is the ratio between applied force ( $F$ , in N) and the area of the transversal section ( $A$ , in  $\text{mm}^2$ ):

$$\sigma = F/A \quad \text{Eq. 1}$$

The deformation or stretching ( $\epsilon$ , in mm/mm) of the sample is the result of the length variation ( $L$ ) divided by initial length ( $L_1$ ):

$$\epsilon = L/L_1; \text{ where } L = L_2 - L_1 \quad \text{Eq. 2}$$

The elasticity modulus ( $E$ , in MPa) or Young modulus is the measurement of the resistance to the traction force, thus, the higher the tension applied to the sample at the rupture moment, the higher the elasticity:

$$E = \Delta\sigma / \Delta\epsilon \text{ or } E = \sigma_2 - \sigma_1 / \epsilon_2 - \epsilon_1 \quad \text{Eq. 3}$$

The values of  $\Delta\sigma$  and  $\Delta\epsilon$  are obtained directly from the graph.

Each set of samples received an identification:

PHG: human skin preserved in glycerol not irradiated.

PHGig: human skin preserved in glycerol gamma irradiated.

PHGie: human skin preserved in glycerol submitted to electron beam.

### *Statistics analysis*

The statistical analysis was performed using the average values of elasticity module calculated for the 10 samples in each group of skin samples. For the significance test the Student *t*-test for independent samples was performed.

### *Histological analysis*

Histological slides stained with hematoxylin-eosin were prepared for each group of samples (Fig. 1).

## RESULTS

The Table 1 shows the obtained elasticity average values. The data in Table 1 was used to build the comparative graph

Table 1 Values of elasticity modulus average

	PHG	PHGig	PHGie
Media E (MPa)	8.88 $\pm$ 3.74	6.15 $\pm$ 1.77	7.15 $\pm$ 2.85



**Fig. 1** Histological slides stained with hematoxylin-eosin. Human skin processed in glycerol not irradiated (A); Human skin processed in glycerol gamma irradiated (B) and human skin processed in glycerol submitted to electron beam (C).

shown in the Fig. 2 in order to obtain a better visualization of the correlation between the average values of the elasticity modules, for each sample group.

The calculation for the independent samples *t*-test (24) (Table 2), show that the PHGie and PHGig measurements not present any significant difference for the significance level of 0.01, when compared to the average of PHG.

The values of calculated *t* are smaller than tabled *t* (2.88), for the safety level of 0.01 and 18 freedom degrees; therefore, the averages are not significantly different.

**Table 2** Student's test *t*

Sample	Average (X)	Variance ( $s^2$ )	n	<i>t</i>
PHG	8.875	13.97872	10	
PHGie	7.150	8.14513	10	-1.15973
PHGig	6.148	3.13955	10	-2.08428

$n = n^{\circ}$  of samples; *t* = Student's test for independent samples

## DISCUSSION

Human skin samples processed in glycerol and later rehydrated, were used as material for the tests performed on non and irradiated skin treatment following the protocols for processing and clinical use of alloskin grafts at the Tissue Bank from ICHC.

Because it is a biological material, allograft samples are not uniform, presenting pores and microclefts that can compromise the results depending on the test carried out to evaluate material resistance. Thus, it was necessary to proceed with a systematic sampling, which at the same time represented the batch and had homogenous characteristics. The tested samples were selected following the established thickness between 0.15 mm and 0.25 mm and also by the individual checking of the test samples for the absence of microclefts.

The statistical analyses indicate that there is no difference when the tensile strength of the irradiated samples is compared with the control group in this assay. This is an indication that the ionizing radiation may not change significantly skin structure. The observation of the histological preparations supports these results through the preservation of the adhesion between dermis and epidermis and the anatomical integrity of both structural layers. However, complementary experiments should be carried out in order to verify the occurrence of ultra-structural changes.

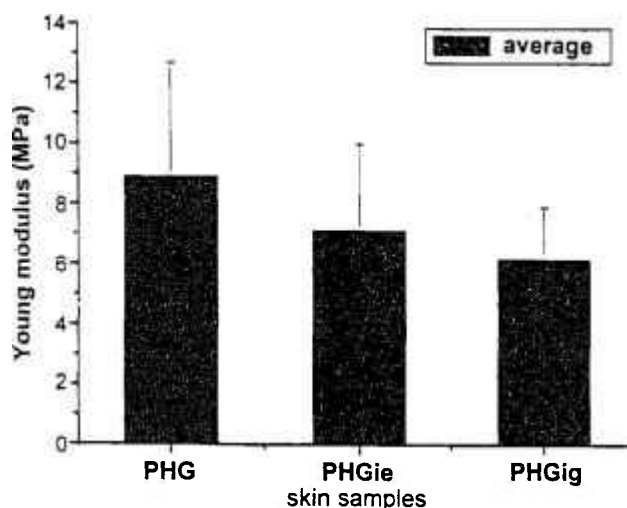


Fig. 2 Elasticity modulus

**Acknowledgments** – This work was financially supported by Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). The authors wish to thank the professionals from Centro de Tecnologia das Radiações of Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR-IPEN): Manuel Nunes Mori for biomechanical tests technical assistance, Eng. Elizabeth Sebastiana Ribeiro Somessari and Eng. Carlos Gaia da Silveira for sample irradiation, Dra. Célia Marina Napolitano and Ethel Martins Pedroso for dosimetry.

## REFERENCES

- Baare, J. van, Buitenwerf, M.J., Hoekstra, M.J. and du Pont, J.S., Virucidal effect of glycerol as used in donor skin preservation. *Burns* 1994, **20**: S77-S80.
- Balasubramani, M., Kumar, T.R. and Babu, M., Skin substitutes: a review. *Burns* 2001, **27**: 534-544.
- Bolgian, A. and Benain, F., Primer banco de piel de Argentina, organización y funcionamiento. *Actualización en el tratamiento de las quemaduras. VI Congreso de Quemaduras*, Argentina, 1993, pp. 90-99.
- Borojevic, R. and Serricella, P., Próteses vivas de pele humana. *Biotecnologia* 1999, **7**: 16-18.
- Bravo, D., Ringley, T.H., Gibran, N., Strong, D.M. and Newman-Gage, H., Effect of storage and preservation methods on viability in transplantable human skin allografts. *Burns* 2000, **26**: 367-378.
- Chistolini, P., de Angelis, G., de Luca, M., Pellegrini, G. and Ruspantini, I., Analysis of the mechanical properties of *in vitro* reconstructed epidermis: preliminary results. *Med. Biol. Eng. Comput.* 1999, **37**: 670-672.
- Freedlander, E., Boyce, S.G., Ghosh, M.M., Ralston, D.R. and Macneil, S., Skin banking in the UK: the need for proper organization. *Burns* 1998, **24**: 19-24.
- Gibson, T. and Kenedi, R.M., Biomechanical properties of skin. *Surg. Clin. North Am.* 1967, **47**: 279-294.
- Herndon, D.N., Perspectives in the use of allograft. *Burn Care Rehabil.* 1997, Suppl. **18**: S6.
- Herson, M.R., *Estudo da Composição in Vitro de Substituto cutâneo Dermo-epidérmico Constituído por Epitélio de Queratinócitos Cultivados Sobre Base Dérmica Alógena*. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- Hettich, R., Ghofrani, A. and Hafemann, B., The immunogenicity of glycerol-preserved donor skin. *Burns* 1994, **20**: S71-S76.
- Hlaeac, C., Skin: a vital organ. Changes which occur in the elderly population. *Fall* 1995, **2**: 4.
- Kearney, J.N., Quality issues in skin banking: a review. *Burns* 1998, **24**: 299-305.
- Mackie, D.P., The Euro Skin Bank: Development and application of glycerol-preserved allografts. *J. Burn Care Rehabil.* 1997, **18**: S7-S9.
- Marshall, L., Ghosh, M.M., Boyce, S.G., Macneil, S., Freedlander, E. and Kudesia, G., Effect of glycerol on intracellular virus survival: Implications for the clinical use of glycerol-preserved skin. *Burns* 1995, **21**: 356-361.
- Phillips, G.O., *Multi-media Distance Learning Package on Tissue Banking*, Singapore: National University of Singapore, IAEA-NUS Regional Training Centre (RCA), IAEA-NUS Interregional Training Centre, 1997, vol. 5.
- Pugliese, P.T., The skin's antioxidant systems. *Dermatol. Nurs.* 1998, **10**: 401.
- Rennekampff, H. and Schaller, M.P.H., Acellular allograft dermal matrix: immediate or delayed epidermal coverage? *Burns* 2002, **28**: 100-101.
- Richters, C.D., Hoekstra, M.J., van Baare, J., du Pont, J.S. and Kamperdijk, E.W.A., Morphology of glycerol-preserved human cadaver skin. *Burns* 1996, **22**: 113-116.
- Robb, E.C., Bechmann, N., Plessinger, R.T., Boyce, S.T., Warden, G.D. and Kagan, R.J., Storage media and temperature maintain normal anatomy of cadaveric human skin for transplantations to full-thickness skin wounds. *J. Burn Care Rehabil.* 2001, **22**: 393-396.
- Roitt, I.M., *Imunologia*. São Paulo: Atheneu, 1998, pp. 221-232.
- Schmuth, M., Sztankay, A., Weinlich, G., Linder, D.M., Wimmer, M.A., Fritsch, P.O. and Fritsch, E., Permeability barrier function of skin exposed to ionizing radiation. *Arch. Dermatol.* 2001, **137**: 1019.
- Tzaphlidou, M., Collagen as a model for the study of radiation induced side effects: use of image processing. *Micron* 2002, **33**: 117-120.
- Vieira, S., *Introdução à Bioestatística*. Campinas, Campus, 1998.
- Vogel, H.G., Mechanical measurements of skin. *Acta Derm. Venereol.* 1994, **185**(Suppl.): 39-43.