AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Efeitos da radiação ionizante nas proteínas presentes em ossos humanos desmineralizados, liofilizados ou congelados

URI ANTEBI

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
2015**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Efeitos da radiação ionizante nas proteínas presentes em ossos humanos desmineralizados, liofilizados ou congelados

URI ANTEBI

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**

Versão Corrigida

Versão Original disponível no IPEN

**São Paulo
2015**

Dedicatória

Dedico a minha esposa Sirlei Aparecida Lima Antebi por toda a paciência e assistência; aos meus lindos filhos, Guilherme Lima Antebi e Beatriz Lima Antebi por entenderem a minha ausência nos momentos da realização deste trabalho; aos meus pais, Ezra Antebi (in memorian) e Ieda Antebi (in memorian) pelo amor e carinho e que sempre me deram base e suporte para a minha educação e aos meus irmãos Simon Antebi Neto e Saul Antebi pelo incentivo.

Agradecimentos

À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos e me suprir em todas as minhas necessidades.

À minha orientadora Prof. Dra. Monica Beatriz Mathor por me ensinar o caminho da ciência e pesquisa, pelo incentivo, ensinamentos, exemplo de profissional e por ter proporcionado o meu crescimento pessoal e profissional.

À minha família, pelo carinho, paciência e incentivo.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN e aos seus profissionais pela oportunidade de desenvolver o meu projeto de mestrado.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Pereira Guimarães por toda a sua ajuda, pelo incentivo, sabedoria, por acreditar no futuro deste projeto e contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Emerson Kyioshi Honda diretor do Banco de Tecidos da Santa Casa de São Paulo pela disponibilização dos tecidos ósseos, apoio ao projeto, pelo conhecimento compartilhado e exemplo de profissional a seguir.

Aos colegas de trabalho no Banco de Tecidos da Santa Casa de São Paulo, Eva Cristina Mackus pelo apoio intelectual, incentivo, companheirismo, conselhos e pela amizade. André Ferreira da Silva que me ajudou muito na execução deste trabalho, pelo seu apoio técnico e intelectual, a sua amizade, companheirismo e conhecimento compartilhado. A Danielle Pegoraro e Priscila Cristovam pelo incentivo, conhecimento compartilhado, amizade e ajuda na execução do trabalho. A Bianca Morizaki e Juliana Frazão pelo apoio e me ajudar a seguir em frente.

Ao Pablo A. Vasquez Salvador e Paulo de Souza Santos pela ajuda, disponibilidade, conhecimento compartilhado e a irradiação das amostras realizadas no irradiador multipropósito.

Aos engenheiros Carlos Gaia da Silveira e Elizabete Somessari pela irradiação das amostras por acelerador de elétrons e auxílio técnico e científico no preparo das amostras destinadas a este processo.

À Prof. Dra. Dalva L.A. Faria do Instituto de Química da USP, pelos ensinamentos, disponibilidade, realização dos ensaios e análise das amostras em

espectroscopia FT-Raman. O aluno de mestrado Otávio Mendes Gil pelo apoio e estar sempre disposto a ajudar.

Aos colegas do laboratório de Banco de Tecidos do CTR, Nelson Mendes Alves, Jurandir Tomaz de Miranda e Ana Paula Funari, pelo apoio, incentivo e amizade.

As Chefias do Centro das Radiações – CTR, Wilson P. Calvo e Margarida M. Hamada pelo bom aconhimento.

À Stefany Plumeri Santin pela participação e ajuda na análise estatística do trabalho, troca de conhecimentos e amizade.

Aos meus professores pela minha formação educacional e profissional.

Por fim, o meu agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, na parte intelectual ou emocional.

Epígrafe

“Poucos são aqueles que vêem com os seus próprios olhos e sentem com os seus próprios corações.”

Albert Einstein

Efeitos da radiação ionizante nas proteínas presentes em ossos humanos desmineralizados, liofilizados ou congelados

Uri Antebi

RESUMO

Os tecidos ósseos alógenos são utilizados nas cirurgias de reconstrução ortopédicas e odontológicas. O número crescente de transplantes de ossos na última década beneficia diversos pacientes. Os profissionais dos Bancos de Tecidos utilizam protocolos que reduzem os riscos de transmissão de doenças infectocontagiosas, entretanto, não eliminam esta possibilidade. Portanto, é importante que tecidos sejam esterilizados por um método eficaz, sendo usualmente aplicada a radiação ionizante. Porém, a radiação ionizante pode acarretar alterações estruturais e biológicas nos ossos em relação à dose. O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da aplicação da radiação gama e de feixe de elétrons, nas doses de 15 kGy, 25 kGy e 50 kGy nos tecidos ósseos desmineralizados preservados liofilizados ou congelados e avaliar as possíveis alterações no colágeno, na concentração de proteínas totais, BMP-2 e BMP-7. Para tanto foram utilizadas as técnicas de espectroscopia Raman, Bradford e ELISA. Foram utilizadas 5 diáfises de fêmur humano e parte das amostras foram desmineralizadas. As proteínas ósseas foram extraídas e quantificadas. Com os resultados da espectroscopia Raman, observamos que a eficiência da desmineralização foi de 85 a 90% porém com alterações na estrutura do colágeno. Alterações também foram observadas nos ossos congelados e irradiados nas doses de 25 kGy e 50 kGy. Nos resultados da quantificação de proteínas totais e específicas, ocorreram diminuições gradativas das concentrações médias das proteínas em relação à dose de radiação nos grupos estudados. Nas doses de radiação usualmente aplicadas aos tecidos ósseos, 15 kGy ou 25 kGy, as reduções nas concentrações das BMP-2 e BMP-7, foram menores que 20%. As reduções na dose de 50 kGy foram entre 27% a 53%, sendo influenciadas pelo tipo de radiação e pelo tipo de preservação dos ossos.

Palavras chave: osso desmineralizado, radiação ionizante, Banco de Tecidos, BMP-2, BMP-7, proteína óssea.

Effects of ionizing radiation on proteins in demineralized, lyophilized or frozen human bone

Uri Antebi

ABSTRACT

Allogenic bone tissues are used in orthopedic and dental reconstructive surgery. The growing number of bone transplants in the last decade benefits many patients. The professionals of Tissue Banks use protocols that reduce the risk of transmission of infectious diseases, however do not eliminate this possibility. Therefore, it is important that tissues are sterilized by an effective method, usually being applied ionizing radiation. However, ionizing radiation can cause structural and biological changes in the bones relative to the dose. The objective of this work was to study the effects of the application of gamma radiation and electron beam at doses of 15 kGy, 25 kGy and 50 kGy in the bone tissues demineralized preserved freeze-dried or frozen and to evaluate possible changes in collagen, the protein concentration total, BMP-2 and BMP-7. For both Raman spectroscopy techniques, Bradford and ELISA were used. They used 5 diaphyses human femur and part of the samples was demineralized. Bone proteins were extracted and quantified. With the results of Raman spectroscopy, we found that the efficiency of demineralization was 85-90% but with changes in the structure of collagen. Changes were also observed in frozen and irradiated bone at doses of 25 kGy and 50 kGy. The results of quantification of total and specific proteins, there were gradual decreases in average concentrations of proteins in relation to radiation dose in both groups. In the radiation doses usually applied to the bone tissue (15 kGy and 25 kGy) reductions in concentrations of BMP-2 and BMP-7, were lower than 20%. The reductions at a dose of 50 kGy were between 27% to 53%, being influenced by the type of radiation and the kind of preservation of the bones.

Keywords: demineralized bone, ionizing radiation, Tissue Bank, BMP-2, BMP-7 bone protein.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
3.1	Principais características morfológicas e estruturais do tecido ósseo	19
3.1.1	Aspectos macroscópicos	19
3.1.2	Aspectos microscópicos	19
3.1.3	Células do tecido ósseo	20
3.1.4	Matriz extracelular óssea	22
3.1.4.1	As proteínas ósseas	22
3.1.4.2	Colágeno tipo I	22
3.1.4.3	Fatores de crescimento ósseo	23
3.1.4.4	Fatores de crescimento e transformação Beta (TGF- β)	23
3.1.4.5	Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs)	24
3.2	Enxertos ósseos	30
3.2.1	Enxertos ósseos autógenos ou autólogos	30
3.2.2	Enxertos ósseos alógenos ou homólogos	30
3.2.3	Enxertos ósseos xenógenos ou heterólogos	31
3.2.4	Mecanismo de incorporação dos enxertos ósseos alógenos	31
3.3	Bancos de Tecidos	32
3.3.1	Banco de Tecidos Musculoesqueléticos	32
3.3.2	Riscos de transmissão de doenças infecciosas com o uso de tecidos	34
3.4	Esterilização dos tecidos com a utilização de radiação ionizante	35
3.4.1	Interação da radiação gama e feixe de elétrons com o tecido ósseo	35
3.4.2	Princípios da inativação de microorganismos por radiação ionizante e cálculo da dose de radiação	37
3.5	Efeitos da radiação ionizante nos tecidos ósseos	38
3.6	Técnicas utilizadas na avaliação das proteínas ósseas	40
3.6.1	Espectroscopia Raman	40
3.6.2	Princípio dos métodos da dosagem e análise das proteínas ósseas totais, BMP-2 e BMP-7	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	Seleção das amostras	45
4.2	Processamento das amostras e divisão das amostras em grupos	45
4.2.1	Desmineralização óssea	47
4.2.2	Divisão dos grupos	47

4.2.3	Preservação das amostras	48
4.2.4	Irradiação das amostras.....	49
4.2.4.1	Condições de Irradiação.....	49
4.2.5	Espectroscopia Raman.....	50
4.2.6	Extração das proteínas ósseas.....	51
4.2.7	Quantificação das Proteínas Totais	51
4.2.8	Dosagens das BMPs	52
4.3	Análises dos dados.....	52
5	RESULTADOS	53
5.1	Espectroscopia Raman.....	53
5.1.1	Eficácia de desmineralização.....	53
5.1.2	Influência da preservação e processamento dos tecidos.....	55
5.1.3	Efeitos da radiação ionizante nos tecidos liofilizados	56
5.1.4	Efeitos da radiação ionizante nos tecidos congelados.....	61
5.2	Quantificação das proteínas totais	62
5.2.1	Distribuição das concentrações de proteínas ósseas por sexo e idade....	63
5.2.2	Efeitos da radiação ionizante nas proteínas ósseas totais.....	64
5.3	Quantificação das BMP - 2 e BMP – 7.....	67
5.3.1	Efeitos da radiação ionizante na BMP 2	68
5.3.2	Efeitos da radiação ionizante na BMP 7	69
5.3.3	Relação entre as concentrações médias de BMP-2, BMP-7 e proteínas totais, irradiadas e não irradiadas.	70
6	DISCUSSÃO.....	73
7	CONCLUSÕES	83
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXO 1	- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	94
ANEXO 2	- Segmento da Resolução da Diretoria Colegiada nº 220, publicada em 27 de dezembro de 2006, referente a disponibilização e utilização de tecidos musculoesqueléticos para pesquisa.....	96
ANEXO 3	- Segmento da Portaria nº 2.600, publicada em 21 de outubro de 2009, referente a disponibilização e utilização de tecidos musculoesqueléticos para pesquisa.....	97

LISTAS DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Representação da molécula de colágeno tipo I. A imagem ilustra a formação do colágeno por duas cadeias $\alpha 1$ entrelaçadas em hélice com outra cadeia $\alpha 2$. As cadeias são ligadas entre si por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Fonte: Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.....22
- FIGURA 2 - Imagem da estrutura cristalina de BMP-2 que apresenta a proteína de forma globular. (A) porção N-terminal, (B) alfa hélice central, (C) espirais externas. Fonte: Proteopedia.....28
- FIGURA 3 - Estrutura cristalina da BMP-7. Imagem da BMP-7 humana demonstrando a estrutura da proteína com forma globular. Fonte: Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI).....29
- FIGURA 4 – Relação entre a dose absorvida (em porcentagem) pela espessura de osso cortical das radiações gama e 10 MeV de energia dos elétrons, produzidas pelas fontes de ^{60}Co e acelerador de elétrons, respectivamente. Fonte: adaptado de Stachowicz, *et al.*, 1993.....37
- FIGURA 5. Esquema ilustrando os efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante em moléculas de colágeno, carreadores de BMPs. Fonte: adaptado de Dziedzic-Goclawska *et al.*, 2008.....39
- FIGURA 6. Princípio básico de funcionamento do equipamento Raman. Fonte: adaptado de Amer, 2009.....41
- FIGURA 7. Fórmula estrutural com os modos vibracionais da amida I, amida II, amida III, fosfato e carbonato. Fonte: Penel *et. al.*, 2003.....42
- FIGURA 8 – Retirada de partes moles (esqueletização). (E) Epífise; (D) Diáfise ...45
- FIGURA 9 – (A) corte sagital da diáfise; (B) corte transversal – 5 cm.....46
- FIGURA 10 – (A) Moedor de ossos manual – quebra das corticais ósseas em partes menores; (B) Moinho analítico elétrico – transformação das corticais ósseas quebradas em partículas menores.....46
- FIGURA 11 – Fluxograma do plano de trabalho contendo o processamento do tecido ósseo, a forma de preservação e as diferentes doses de radiação gama ou por acelerador de elétrons em kGy. LIO: Grupo liofilizado; CG: Grupo Congelado; M: Grupo mineralizado; NI: Não irradiado; AE: Acelerador de Elétrons; γ : radiação gama; C: Controle.....48

FIGURA 12 - Espectro FT-Raman do osso mineralizado não irradiado. Setas indicam: os picos de fosfato (PO_4^{3-}) presentes nas bandas compreendidas entre 430 cm^{-1} a 1074 cm^{-1} , $\nu(\text{CO}_3)$ tipo B em 1074 cm^{-1} , Amida III em 1246 e 1270 cm^{-1} , $\delta(\text{CH}_2)$ em 1450 cm^{-1} e Amida I em 1656 cm^{-1} . Podemos notar a variação dos espectros das cinco amostras pertencentes ao grupo e o espectro médio.....53

FIGURA 13 - Espectro médio no FT-Raman do osso desmineralizado não irradiado. Setas indicam: os picos de fosfato (PO_4^{3-}) presentes nas bandas compreendidas entre 430 cm^{-1} a 1074 cm^{-1} , $\nu(\text{CO}_3)$ tipo B em 1074 cm^{-1} , Amida III em 1246 e 1270 cm^{-1} , $\delta(\text{CH}_2)$ em 1450 cm^{-1} e Amida I em 1656 cm^{-1} . Podemos notar a variação dos espectros das cinco amostras pertencentes ao grupo e o espectro médio.....54

FIGURA 14 – Espectros médios no FT-Raman dos ossos mineralizados não irradiados (linha de cor preta), ossos desmineralizados após liofilização (linha de cor azul) e ossos desmineralizados após congelamento (linha de cor vermelha). Claramente as bandas em 960 cm^{-1} (A) e 1074 cm^{-1} (B) apresentam intensidade significativamente menores nas amostras desmineralizadas comparadas às amostras mineralizadas.....55

FIGURA 15 – Espectros médios obtidos no FT-Raman das amostras controle (não irradiadas) de ossos mineralizados, desmineralizado liofilizado e desmineralizado congelado, representados nas cores: preto, azul e vermelho, respectivamente. A banda observada é atribuída à amida I. (A) aumento da intensidade do ombro em 1635 cm^{-1} , (B) deslocamento do máximo de intensidade da banda de 1660 cm^{-1} para 1665 cm^{-1} (grupo congelado) e 1667 cm^{-1} (grupo liofilizado).....55

FIGURA 16 - Espectros médios no FT-Raman das amostras de ossos processadas: (a) osso mineralizado liofilizado não irradiado (M LIO NI) ; (b) osso desmineralizado liofilizado não irradiado (LIO C); (c) osso desmineralizado liofilizado irradiado com feixe de elétrons na dosagem de 15 Gy (LIO 15 AE); (d) osso desmineralizado liofilizado tratado com feixe de elétrons na dosagem de 25 Gy (LIO 25 AE) e (e) osso desmineralizado liofilizado tratado com feixe de elétrons na dosagem de 50 Gy (LIO 50 kGy).....56

FIGURA 17 - Espectros médios no FT-Raman das amostras dos grupos liofilizados estudados, detalhando a região de estiramento C-H: (a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 AE; (d) LIO 25 AE; (e) LIO 50 AE.....57

FIGURA 18:- Detalhamento da região da banda amida I dos espectros médios no FT-Raman das amostras: (a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 AE; (d) LIO 25 AE; (e) LIO 50 AE. Região espectral de 1550 cm^{-1} a 1750 cm^{-1}58

FIGURA 19 - Espectros médios do FT-Raman nas amostras dos grupos: (a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 AE; (d) LIO 25 AE; (e) LIO 50 AE. Detalhamento da região espectral entre 1150 e 1450 cm^{-1} . A banda em 1270 está associada à conformação em hélice α e a banda em 1246 cm^{-1} está associada à conformação de folha β , presente na Amida III.....58

FIGURA 20 - Espectros FT-Raman médios obtidos no nas amostras dos grupos:(a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 γ ; (d) LIO 25 γ ; (e) LIO 50 γ	59
FIGURA 21- Espectros FT-Raman médios das amostras dos grupos: (a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 γ ; (d) LIO 25 γ ; (e) LIO 50 γ . Detalhamento da região de estiramento C-H.....	59
FIGURA 22 - Espectros médios do FT-Raman nas amostras dos grupos: (a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 γ ; (d) LIO 25 γ ; (e) LIO 50 γ . Detalhamento da região da banda amida I.....	60
FIGURA 23 - Espectros médios do FT-Raman nas amostras dos grupos: (a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 γ ; (d) LIO 25 γ ; (e) LIO 50 γ . Detalhamento da região da banda amida III.....	60
FIGURA 24 - Espectros médios obtidos no FT-Raman nas amostras dos grupos: (a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 AE; (d) LIO 25 AE; (e) LIO 50 AE. Podemos ter uma visão geral dos espectros no estiramento CH, amida I e amida III.....	61
FIGURA 25 - Espectros médios obtidos no FT-Raman nas amostras dos grupos: (a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 γ ; (d) LIO 25 γ ; (e) LIO 50 γ . Podemos ter uma visão geral dos espectros no estiramento CH, amida I e amida III	62
FIGURA 26 - Relação entre a quantidade de proteínas nos TODs não irradiados e os diferentes tipos de sexo dos doadores.....	63
FIGURA 27 - Relação entre a quantidade de proteínas nos TODs não irradiados e as diferentes idades dos doadores. “F” doadores do sexo feminino.....	64
FIGURA 28 - Efeitos da radiação ionizante nas proteínas dos TODs. Quantificação das proteínas totais extraídas da matriz óssea orgânica em relação aos grupos irradiados e não irradiados (controle) nos distintos doadores (resultados individuais).....	64
FIGURA 29 - Efeitos da radiação ionizante nas proteínas dos TODs. Quantificação das proteínas totais extraídas da matriz óssea orgânica em relação aos grupos irradiados e não irradiados (controle). Representação do resultado da dosagem de proteínas totais por grupos. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).....	66
FIGURA 30 - Efeitos das radiações gama e feixe de elétrons nas concentrações de BMP-2 por grama de TOD nos grupos estudados. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).....	69
FIGURA 31 - Efeitos das radiações gama e feixe de elétrons nas concentrações de BMP-7 por grama de TOD nos grupos estudados. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).....	70
FIGURA 32 - Relação entre a concentração de BMP-2 e de proteínas totais específicas de cada grupo de tecido liofilizado não irradiado e irradiado com	

radiação gama e feixe de elétrons. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05).....71

FIGURA 33 - Relação entre a concentração de BMP-2 e de proteínas totais específicas de cada grupo de tecido congelado não irradiado e irradiado com radiação gama e feixe de elétrons. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05).....71

FIGURA 34 - Relação entre a concentração de BMP-7 e de proteínas totais específicas de cada grupo de tecido liofilizado não irradiado e irradiado com radiação gama e feixe de elétrons. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05).....72

FIGURA 35 - Relação entre a concentração de BMP-7 e de proteínas totais específicas de cada grupo de tecido congelado não irradiado e irradiado com radiação gama e feixe de elétrons. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05).....72

1 INTRODUÇÃO

Existe uma crescente demanda de solicitações de enxertos musculoesqueléticos alógenos para reconstruções ortopédicas e odontológicas no Brasil, destacando-se os tecidos ósseos com 21.681 distribuições em 2014, originando o número anual de 113,7 por milhão de população (ABTO, 2015).

Os bancos de tecidos musculoesqueléticos são organizações que se responsabilizam pela seleção dos doadores, captação, processamento, armazenamento, distribuição e controle de qualidade dos tecidos musculoesqueléticos, regulamentados pelo Ministério da Saúde (Brasil, portaria nº 2.600, 2009; Brasil, RDC nº 220, 2006).

Os tecidos ósseos são obtidos de doadores falecidos ou vivos. Os doadores falecidos têm o diagnóstico de somente morte encefálica ou morte encefálica e parada cardiorrespiratória e os doadores vivos quando submetidos à artroplastia primária do quadril, por meio do consentimento livre e esclarecido autorizando a doação. A cirurgia de captação é realizada em centro cirúrgico, obedecendo às técnicas de assepsia e antisepsia e são extraídos mais frequentemente ossos longos dos membros inferiores (fêmur, tíbia, fíbula), ossos da pelve (Íliaco) e membros superiores (úmero, rádio, ulna) (Herson & Mathor, 2006).

Os tecidos musculoesqueléticos são utilizados principalmente nas revisões de artroplastias do quadril e joelho, no tratamento de pacientes portadores de tumores ósseos, nas reconstruções articulares para tratamento das lesões ligamentares, no levantamento do seio maxilar com atrofia e enxertia em mandíbula para a instalação de implantes dentários (Amatuzzi *et al.*, 2000).

Os enxertos autógenos¹ são considerados como “padrão ouro” para as cirurgias de reconstrução. A técnica de enxertia homóloga² surgiu com a finalidade de substituir o enxerto autógeno e evitar a necessidade de uma segunda incisão, reduzir o tempo cirúrgico, proporcionar menor perda sanguínea, reduzir a morbidade e a possibilidade de reconstruções que requerem uma maior quantidade de tecidos (Gallon, 2006).

¹ Autógeno ou autólogo: é o transplante entre doador e receptor geneticamente idênticos. (Herson & Mathor, 2006).

² Homólogo ou alógeno: é o transplante entre indivíduos da mesma espécie, porém geneticamente diferentes (Herson & Mathor, 2006).

Existem diferentes formas de processamento, conservação e esterilização dos enxertos ósseos e os profissionais dos Bancos de Tecidos buscam métodos para melhorar a qualidade e segurança dos transplantes.

O material alógeno ideal para ser utilizado como alternativa de enxertia deve possuir as seguintes propriedades: biocompatibilidade, não causar infecção, baixa imunogenicidade, ser osteocondutor e osteoindutor (Sasso *et al.* 2005).

A osteoindução é um processo da osteogênese que promove o recrutamento de células indiferenciadas pluripotentes (mesenquimais) e a estimulação para a diferenciação em células formadoras de ossos (Albrektsson & Johansson 2001). Um importante grupo de glicoproteínas, extraídas da matriz óssea desmineralizada é constituído por proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), responsáveis pela indução óssea (Urist *et al.*, 1984; Dimitriou & Gionnoudis *et al.*, 2005).

As BMPs são classificadas como uma subfamília dentro da superfamília dos fatores de crescimento e transformação- β (TGF- β) podendo ser encontradas, além do tecido ósseo, em vários outros tecidos, como cérebro, coração, pulmão, rim, baço e fígado, apresentando papel importante, não só no desenvolvimento do esqueleto, mas também em outros processos fisiológicos, durante a embriogênese (Dimitriou & Gionnoudis, 2005).

Existem mais de 20 BMPs descobertas até o presente momento e há diferenças entre elas sobre a capacidade de induzir a osteogênese. Segundo a literatura, as BMPs 2, 4 e 7 tem um maior potencial na indução da diferenciação osteoblástica a partir das células mesenquimais progenitoras. As BMPs extraídas dos ossos possuem os efeitos de produzir diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos e condroblastos, com conseqüente organização do tecido ósseo; intensa vascularização e o processo completo de remodelação óssea com síntese de estruturas de renovação do tecido calcificado (Urist, 1965).

As BMPs 2 e 7 são mais comumente empregadas clinicamente, com resultados divulgados em literatura. A BMP-2, quando injetada localmente sobre a superfície da calvária de ratos, induz formação óssea periosteal, sem a formação prévia de cartilagem (Pietrzak *et al.*, 2011).

O procedimento de desmineralização em matriz óssea cortical aumenta a disponibilidade biológica de BMPs tornando estes enxertos osteoindutores (Pietrzak *et al.*, 2011). Existe uma correlação positiva entre os conteúdos de BMPs presentes nos enxertos e a osteoindutividade (Blum *et al.*, 2004).

O alvo final das BMPs é o núcleo celular, mais especificamente, alterando as expressões gênicas envolvidas na atividade celular, incluindo o crescimento, diferenciação e síntese de matriz extracelular (Dimitriou & Gionnoudis, 2005).

Há uma intensa preocupação em garantir a qualidade dos tecidos e promover a segurança dos pacientes receptores de tecidos homogêneos em relação à transmissão de doenças infectocontagiosas. Com o propósito de eliminar possíveis contaminações, é realizada, no doador de tecidos ósseos, a triagem sorológica, avaliação do histórico e comportamento social, assim como testes de biologia molecular para detecção de RNA viral de HIV e HCV, exames clínicos e controles microbiológicos, além de serem aplicadas técnicas assépticas durante os procedimentos (Nguyen, 2007). Entretanto, existe a possibilidade de contaminação com microorganismos durante a captação, processamento, preservação e armazenamento dos tecidos (Phillips, 1997).

Diversos profissionais responsáveis pelos bancos de tecidos consideram importante que tecidos biológicos sejam esterilizados por um método eficaz, utilizando a radiação ionizante obtida por fontes de ^{60}Co ou acelerador de elétrons. A esterilização por radiação ionizante é um método que apresenta vantagens sobre outros métodos de esterilização, pois proporciona um aumento mínimo da temperatura e não deixa resíduos tóxicos, o que a torna passível de ser usada, além de ser uma esterilização final, ou seja, na embalagem pronta para uso, evitando o risco da recontaminação por manipulação após a esterilização (Dziedzic-Goclawska, 2000). Porém, alguns autores concluíram que a esterilização por radiação ionizante pode acarretar alterações estruturais e biológicas em relação à dose nos tecidos ósseos (Nguyen, 2007; Pekkarinen *et al*, 2005).

A radiação gama é a mais comumente empregada na esterilização dos tecidos ósseos, porém poucos trabalhos estudam os diferentes efeitos biológicos das radiações ionizantes provenientes de enxertos irradiados com feixe de elétrons em comparação com fonte de ^{60}Co .

Os diferentes tipos de preservação óssea podem afetar tanto a manutenção das proteínas, quanto a interação da radiação ionizante com o tecido. As diferentes doses de radiação ionizante, também podem influenciar a integridade óssea, quanto à manutenção do potencial osteoindutivo destes enxertos.

O melhor conhecimento destes parâmetros pode auxiliar os responsáveis pelos bancos de tecidos na escolha das condições de irradiação e preservação dos tecidos e qualidade dos enxertos usados nos transplantes.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos da aplicação da radiação gama e de feixe de elétrons, produzidas por fontes de ^{60}Co e acelerador de elétrons respectivamente, nas doses de 15 kGy, 25 kGy e 50 kGy nos tecidos ósseos desmineralizados preservados liofilizados ou congelados. Avaliando as possíveis alterações dos principais constituintes da matriz óssea orgânica: colágeno, concentração de proteínas totais e atividade das BMP-2 e BMP-7, de modo a determinar a melhor dose para proporcionar a segurança na esterilidade e a preservação das proteínas osteoindutivas dos enxertos ósseos.

Para identificar as possíveis alterações neste tecido foram utilizadas as seguintes técnicas:

- Espectroscopia Raman, para verificação do rendimento da desmineralização, alterações moleculares dos constituintes do colágeno e das proteínas ósseas,
- Bradford, para determinação da concentração proteica total,
- ELISA para determinação da concentração das BMPs 2 e 7.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Com o propósito de compreendermos as possíveis alterações ou modificações que podem ocorrer no tecido ósseo, é importante conhecermos as principais características do tecido em questão, tais como: morfologia, estrutura, constituintes da matriz óssea extracelular, formas de preservação e sua aplicação clínica. Também será reportada a influência das aplicações das radiações ionizantes empregadas na esterilização e o princípio das técnicas utilizadas no estudo.

3.1 Principais características morfológicas e estruturais do tecido ósseo.

O tecido ósseo tem algumas funções básicas como suporte, proteção e locomoção e está sob o controle de fatores sistêmicos, como os hormônios, e fatores locais, como os fatores de crescimento e citocinas (Katchburian & Arana, 2004).

Os sistemas imune e esquelético encontram-se intimamente relacionados. A homeostase do sistema esquelético está na dependência de uma remodelação óssea equilibrada, ou seja, da dinâmica balanceada entre a atividade dos osteoblastos (células de formação óssea), e osteoclastos (células de reabsorção óssea). Este balanço é firmemente controlado por alguns sistemas regulatórios, como o sistema imune. Se este balanço inclinar-se a favor dos osteoclastos, ocorrerão reabsorções patológicas, como nas periodontites, artrites reumatóides e doenças osteoporóticas (Takayanagi 2005).

3.1.1 Aspectos macroscópicos

Macroscopicamente, o tecido ósseo pode se apresentar como compacto, na região mais periférica dos ossos, denominada cortical, e esponjoso ou trabecular, com rede de trabéculas contendo espaços intercomunicantes que abrigam a medula óssea. As superfícies ósseas internas e externas são revestidas respectivamente pelo endóstio e perióstio (Katchburian & Arana, 2004).

3.1.2 Aspectos microscópicos

O tecido ósseo pode ser classificado em primário (ou imaturo) e secundário (ou maduro, haversiano ou lamelar). O osso primário apresenta as seguintes características: disposição irregular, não organização das fibras de colágeno e pouca quantidade de cristais de hidroxiapatita. Está presente no feto, no calo ósseo,

nas osteomielites, nos tumores ósseos e na doença óssea de Paget. O osso secundário contém fibras colágenas dispostas em lamelas paralelas ou concêntricas em torno dos canais de Harvers, formando osso compacto ou esponjoso (Cotram *et al.*, 2005).

O tecido ósseo tem dois componentes básicos: células e matriz orgânica, sobre a qual se depositam os componentes inorgânicos.

3.1.3 Células do tecido ósseo

Nos processos de formação, reabsorção, manutenção e remodelação óssea, participam quatro tipos celulares distintos que derivam de duas linhagens: uma relacionada à formação e manutenção: osteoblastos, células de revestimento ósseo e osteócitos, e outra à reabsorção: osteoclastos.

Os osteoblastos são células mononucleadas, de origem mesenquimal, que se apresentam como células polarizadas, com núcleo esférico e citoplasma basófilo. São cubóides ou ligeiramente alongadas e formam uma camada celular contínua sobre a superfície óssea que está sendo formada (osteóide). São responsáveis pela produção da matriz orgânica óssea e da sua mineralização (Mackie, 2003).

Sintetizam a matriz orgânica, constituída de várias proteínas colágenas e não colágenas, tais como colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, proteoglicanas, fosfoproteínas e citocinas. Estes componentes interagem entre si e organizam-se, fornecendo um arcabouço que permite a deposição de sais minerais, além do fato de algumas destas moléculas atuarem diretamente na mineralização (Raisz & Rodan, 1998).

No processo inicial de formação do tecido ósseo, os osteoblastos, após secretarem a primeira camada de matriz orgânica assumem um importante papel na sua mineralização (Katchburian & Arana, 2004). A partir dos osteoblastos adjacentes à matriz orgânica óssea recentemente sintetizada, brotam pequenas vesículas de sua superfície. As denominadas vesículas da matriz desprendem-se dos osteoblastos e são observadas entre os constituintes orgânicos da matriz óssea (Katchburian & Cerri, 2002).

Estas células também funcionam como receptores e transmissores de sinais para remodelação, pois possuem receptores para hormônios, como o da tireóide, da paratireoide, estrogênios, glicocorticóides, insulina e vitamina D.

Secretam fatores de regulação como Interleucina-6 (IL-6) e fatores de crescimento como TGF- β que são fatores locais que agem na proliferação, diferenciação e atividade osteoblástica (Katchburian & Arana, 2004; Raizs & Rodan, 1998).

A transição do osteoblasto para células de revestimento ósseo envolve mudanças morfológicas e funcionais graduais que culminam com a diminuição da secreção de proteínas. Esta transformação pode representar o fenótipo final da linhagem osteoblástica (Sodek & Mckee, 2000). No entanto, estas células que revestem a superfície óssea, sob determinados estímulos podem diferenciar-se em osteoblastos e consequentemente produzir matriz óssea (Katchburian & Arana, 2004).

Sendo assim, estas células de revestimento ósseo têm um importante papel na manutenção da matriz óssea e influência no metabolismo de cálcio e fosfato. São responsáveis pela produção de moléculas que ativam a complexa cascata molecular que culmina na remodelação óssea (Miller & Jee, 1987).

Os osteócitos provêm dos osteoblastos que, à medida que secretam a matriz, ficam aprisionados no seu interior, em lacunas situadas no interior de pequenos canais denominados canalículos ósseos, e mostram uma diminuição gradativa da quantidade de organelas de síntese, caracterizando pobre atividade metabólica, porém indispensável para a manutenção da homeostase óssea (Katchburian & Arana, 2004; Raizs & Rodan, 1998).

Os canalículos ósseos constituem uma complexa rede que interconecta a superfície óssea às porções mais internas, sendo responsável pela manutenção e vitalidade da matriz óssea (Katchburian & Cerri, 2002). Portanto, os osteócitos são considerados essenciais para a manutenção bem como para a remodelação óssea, desde que tem sido sugerido que a apoptose dos osteócitos pode atrair e estimular a atividade dos osteoclastos (Jilka *et al*, 1998; Boabaid *et al*, 2001).

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleadas da linhagem hematopoiética. São responsáveis pela reabsorção óssea, promovendo escavações na superfície óssea denominadas lacunas de Howship. O processo de reabsorção pode ser auto regulável, devido à dissolução mineral que precede a degradação da matriz orgânica, o que favorece o desenvolvimento de uma matriz porosa adjacente à borda em escova do osteoclasto (Jilka *et al*, 1998).

3.1.4 Matriz extracelular óssea

3.1.4.1 As proteínas ósseas

O osso é composto por 70% de parte inorgânica, 20% de matriz orgânica, que conferem propriedades mecânicas de rigidez e flexibilidade, respectivamente, e 10% de água. A parte inorgânica é constituída por íons fosfato, cálcio, bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. A união do fosfato e do cálcio forma cristais com estrutura de hidroxiapatita que, associados às fibras colágenas, fornecem a resistência e dureza características do tecido ósseo. A matriz orgânica é formada de colágeno tipo I, II, III, V e XI, proteoglicanas, glicoproteínas (BMPs), osteocalcina, osteoconectina, sialoproteína, citocinas, osteopontina, fibronectina, fatores de crescimento e enzimas (Junqueira & Carneiro, 2004).

3.1.4.2 Colágeno tipo I

O colágeno tipo I é o constituinte predominante da matriz óssea orgânica (aproximadamente 90%), dispostos em fibrilas e apresenta uma estrutura com disposição em tripla hélice, possuindo três cadeias polipeptídicas que torcidas entre si como uma corda helicoidal (conforme FIGURA 1), conferem as principais propriedades físicas ao tecido ósseo (Alberts *et al.*, 2002).

Essa proteína possui uma cadeia longa com 1.464 aminoácidos e massa molecular de 139 kDa. As moléculas se agrupam formando fibrilas de colágeno que são estruturas dispostas em cabos finos e se juntam, formando as fibras de colágeno (Alberts, *et al.*, 2002).

FIGURA 1 – Representação da molécula de colágeno tipo I. A imagem ilustra a formação do colágeno por duas cadeias $\alpha 1$ entrelaçadas em hélice com outra cadeia $\alpha 2$. As cadeias são ligadas entre si por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Fonte: Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.

Algumas proteínas não colágenas, típicas dos tecidos mineralizados, como a osteocalcina, sialoproteína, osteonectina e osteopontina são liberadas do osso durante a sua desmineralização. Há, ainda, proteínas derivadas do sangue e fluidos teciduais que são concentradas no osso devido à sua afinidade com os cristais minerais, como a albumina, α_2 HS-glicoproteína e imunoglobulinas (Sodek & Mckee, 2000).

Um importante grupo de glicoproteínas, extraídas da matriz óssea desmineralizada, são as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs). As BMPs são responsáveis pela osteoindução (Urist *et al.*, 1984; Dimitriou & Gionnoudis, 2005).

3.1.4.3 Fatores de crescimento ósseo

Os fatores de crescimento ósseo (FCO) estão relacionados com a formação e reparação óssea envolvendo a migração e mitose de mesenquimais células estaminais, bem como a sua diferenciação em célula osteoprogenitora e posteriormente a maturação em osteócito.

Os fatores de crescimento envolvidos nos eventos biológicos na formação e reparação de osso e de outros tecidos conjuntivos são classificados, de acordo com suas atividades biológicas, em: fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) e fatores de crescimento e transformação Beta (TGF- β). Os TGF- β é uma grande família (Lieberman *et. al.*, 2002; Long, 2001).

3.1.4.4 Fatores de crescimento e transformação Beta (TGF- β)

A superfamília TGF- β inclui as ativinas, inibinas, proteínas nodais, substância de inibição mulleriana (MIS), fatores de crescimento e diferenciação (GDFs) e BMPs que representam o maior subgrupo desta família (Kingsley, 1994).

Uma característica estrutural da superfamília TGF- β é a presença de sete cisteínas conservadas, que estão envolvidas no dobramento da molécula em uma única estrutura tridimensional chamada “nó de cistina”. A cisteína que não está envolvida na formação do “nó de cistina” faz uma ponte dissulfeto entre as duas subunidades, resultando na formação de dímeros ligados covalentemente, que é essencial para a atividade biológica dessas proteínas (Vitt *et al.*, 2001).

Membros da superfamília TGF- β são sintetizados e secretados como proteínas precursoras de grandes dimensões, compostas por uma sequência sinal aminoterminal, um domínio e um pró-domínio carboxiterminal (Chang *et al.*, 2002).

O sinal aminoterminal orienta o precursor para uma via de sinalização, onde as proteínas são clivadas por uma enzima proteolítica para gerar a proteína dimérica biologicamente ativa e madura. O pró-domínio variável pode facilitar a dimerização, sendo importante no processamento da proteína e na regulação dos membros da superfamília TGF- β . A sinalização da superfamília TGF- β é regulada em vários níveis, incluindo ligação e processamento dos ligantes extracelulares e interações intracelulares dos receptores (Di Pasquale *et al.*, 2006).

A superfamília TGF- β atua por meio de uma família de receptores transmembranares do tipo serina/treonina/quinase, conhecidos como os receptores para a superfamília TGF- β . Esses receptores são divididos em duas subfamílias: receptores do tipo I e do tipo II. Os dois tipos de receptores possuem propriedades estruturais semelhantes, cada um compreendendo um domínio extracelular, um pequeno domínio transmembranar e um grande domínio intracelular do tipo serina/treonina/quinase (Otsuka, 2010).

Após a identificação das BMPs no processo de ossificação endocondral e o seu papel no desenvolvimento embrionário, foi descoberto que as BMPs são um dos principais fatores de crescimento relacionados com o reparo ósseo, a sua função celular tem sido extensivamente estudada (Gazzerro & Canalis, 2006; Wordinge & Clark, 2007).

3.1.4.5 Proteínas morfogénicas ósseas (BMPs)

As BMPs são classificadas como uma subfamília dentro da superfamília dos fatores de crescimento e transformação- β (TGF- β), podendo ser encontradas, além do tecido ósseo, em vários outros tecidos, como cérebro, coração, pulmão, rim, baço e fígado, apresentando papel importante, não só no desenvolvimento do esqueleto, mas também em outros processos fisiológicos, durante a embriogênese (Dimitriou & Gionnoudis, 2005).

Foram descobertas e pesquisadas mais de 20 tipos distintos de BMPs e existem diferenças entre elas na capacidade de induzir a osteogênese. As BMP-2, BMP-4 e BMP-7 possuem a propriedade de maior potencial na indução da

diferenciação osteoblástica a partir das células mesenquimais progenitoras (Cao & Chen, 2005).

As BMPs são secretadas por vários tipos celulares e regulam alguns dos processos do desenvolvimento embrionário, incluindo cartilagem e formação óssea. No adulto, as BMPs regulam a proliferação, a diferenciação e apoptose de vários tipos de células, tais como células mesenquimais, osteoblastos, condroblastos, células epiteliais e do tecido nervoso. O alvo final das BMPs é a alteração da expressão gênica no núcleo, mudando, assim, a atividade celular, incluindo o crescimento, diferenciação e síntese de matriz extracelular (Dimitriou & Gionnoudis, 2005).

3.1.4.5.1 História e desenvolvimento dos estudos das BMPs

A formação heterotópica ou ectópica de osso sob condições patológicas é observada desde 1692, com o primeiro relato de Gui Patin. Posteriormente em 1868, Von Dusch descreveu a miosite ossificante progressiva (Smith *et al*, 1976)

O tecido formado neste processo apresenta características morfológicas e metabólicas iguais ao do osso ortotópico incluindo a formação de medula óssea.

Os processos envolvidos na formação óssea ectópica podem ocorrer no trauma muscular, miosite ossificante progressiva e traumática, tumores derivados de células osteogênicas ou condrogenicas, osteossarcoma, osteoma osteóide, osteoblastoma.

Estes processos sempre despertaram o interesse da comunidade científica em descobrir os motivos da formação de tecido extraósseo, não apenas na terapêutica dos processos patológicos, mas também com o propósito de utilizar os conhecimentos adquiridos para a reparação do tecido ósseo.

Por muitos anos, acreditava-se que o periósteo era o responsável pela calcificação, especialmente em áreas traumatizadas, porém, no entanto, não explicava as causas de formação ectópica na ausência de trauma ou em áreas distantes do periósteo (Lee, 1997).

As descobertas sobre os processos que determinam a formação de osso em sítios ectópicos de animais e humanos foram relatadas primeiramente por Marshall Urist em 1965, que iniciou a análise de substâncias indutoras de formação óssea, presentes na matriz óssea. Apesar de não ter sido Urist o primeiro a especular sobre a existência de uma substância osteoindutora, deve ser creditado a ele a maior parte do trabalho precoce no isolamento das BMPs.

Os primeiros relatos de pesquisadores sobre o uso da matriz óssea desmineralizada com o objetivo de preencher defeitos ósseos cirurgicamente, levaram a conduta de avaliar a capacidade osteoindutora óssea de um implante de osso desmineralizado em sítios subcutâneos ou intramusculares, sem a interferência do osso ortotópico. Várias espécies de animais eram testadas com implantes de tecidos ósseos desmineralizados, utilizando uma variedade de agentes químicos em diferentes concentrações, certas condições de temperatura e tempo (Van De Putte & Urist, 1966).

O termo osteoindução foi designado para um princípio fundamental de regeneração óssea desencadeada pela ação das proteínas ósseas morfogenéticas (Urist, 1965; Urist & Strat, 1971). Urist descobriu que a matriz óssea desmineralizada quando implantada em sítios não ósseos induziu à formação ectópica de novo tecido cartilaginoso e ósseo (Urist, 1965). O autor definiu este processo como autoindução e mostrou que extratos de proteína poderiam ser separados do tecido ósseo desmineralizado e seriam responsáveis por essa formação de osso novo (Urist *et al.*, 1973).

Nesse modelo, a osteogênese era observada seguindo eventos bem caracterizados de ossificação endocondral, com a formação de tecido cartilaginoso antes da formação de osso. (Urist *et al.*, 1979; Sampath & Reddi, 1981). A procura dos fatores responsáveis pela osteoindução resultou na identificação da família de BMPs.

Muitos fatores de crescimento presentes nos ossos foram isolados e testados a capacidade destes para estimular o seu crescimento. Atuam sobre as células osteoprogenitoras presentes no osso em desenvolvimento ou no osso pré-existente e seus efeitos são limitados em defeitos ósseos amplos e praticamente nulos na formação óssea, com ausência de células osteoprogenitoras. A vantagem da utilização das BMPs na formação óssea, é que a mesma pode ocorrer na ausência de células osteoprogenitoras (Reddi & Cunningham, 1993).

3.1.4.5.2 Características das BMPs

Por meio de uma sequência de aminoácidos de extrato ósseo altamente purificado e o isolamento de vários polipeptídeos associados, Wozney *et al.* determinaram sua sequência de aminoácidos e sintetizaram sondas de

oligonucleotídios. Dessa forma, foi possível a clonagem das BMPs de números 2 a 9 (Wozney *et al.*, 1990).

As proteínas morfogenéticas possuem efeitos proliferativos sobre diferentes tipos celulares, exibindo propriedades quimiotáticas e podendo induzir a diferenciação de células mesenquimais em células de linhagem osteoblástica e condroblástica (Reddi & Cunningham, 1993).

Entre os membros da família dessas proteínas, as BMP-2, BMP-4 e BMP-7, demonstram importância fundamental na osteogênese (Hogan, 1996; Rosen *et al.*, 1996).

Atualmente as BMP-2 e BMP-7 recombinantes carregadas com colágeno tipo 1, são as mais aplicadas clinicamente nas reparações ósseas.

As disponibilidades das BMPs recombinantes (rh-BMPs) permitiram provar a capacidade osteoindutora dessas proteínas bem como a caracterização detalhada de suas atividades *in vivo*. A rhBMP-2 foi a primeira molécula estudada em detalhe, produzida a partir de células do ovário de ratos (Wang *et al.*, 1990). A purificação e a caracterização bioquímica dessas moléculas demonstraram sua semelhança com as moléculas de BMP encontradas no osso humano (Israel *et al.*, 1992).

3.1.4.5.3 BMP-2

A BMP-2 possui ponto isoelétrico de 8.5, é expressa no cromossomo 20, formada por 396 aminoácidos e possui a sequência conforme a QUADRO 1.

A estrutura molecular da BMP-2, conforme ilustrado na FIGURA 2, apresenta forma globular, porção N-terminal e a orientação da α -hélice central, bem como duas espiras externas com formato de pontas de laços (Scheufler *et al.*, 1999).

QUADRO 1 – Sequencia de aminoácidos da BMP-2

Sequência aa	Nº aa
MVAGTRCLLA LLLPQVLLGG AAGLVPGLGR RKFAAASSGR PSSQPSDEVL	50
SEFELRLLSM FGLKQRPTPS RDAVPPYML DLYRRHSGQP GSPAPDHRLE	100
RAASRANTVR SFHHEESLEE LPETSGKTTR RFFFNLSIP TEEFITSDEL	150
QVFREQMQDA LGNNSSFHHR INIYEIIKPA TANSKFPVTR LLDTRLVNQN	200
ASRWESFDVT PAVMRWTAQG HANHGFFVEV AHLEEKQGVV KRVHRISRL	250
HQDEHSWSQI RPLLVTFGHD GKGHPLHKRE KRQAKHKQRK RLKSSCKRHP	300
LYVDFSDVGW NDWIVAPPGY HAFYCHGECF FPLADHLNST NHAIVQTLVN	350
SVNSKIPKAC CVPTELSAIS MLYLDENEKV VLKNYQDMVV EGCGR	396

Fonte: Uniprot – Banco de dados proteínas.

FIGURA 2 - Imagem da estrutura cristalina de BMP-2 que apresenta a proteína de forma globular. (A) porção N-terminal, (B) alfa hélice central, (C) espirais externas. Fonte: Proteopedia.

A BMP-2 como outras proteínas morfogenéticas do osso, desempenha um papel importante no desenvolvimento de osso e cartilagem além de estar envolvida na diferenciação de células cardíacas e no processo de células epiteliais para transição mesenquimal (Chen *et al.*, 2004).

A BMP-2 recombinante (rhBMP-2) é amplamente sintetizada e está disponível para uso ortopédico e odontológico. A implantação de rhBMP-2 para tratamento de defeitos ósseos é feita com a presença de um carreador, normalmente colágeno, induz a formação de osso novo e pode ser usado para o tratamento de defeitos ósseos, união óssea atrasada ou a não união (Geiger, *et al.*, 2003).

3.1.4.5.4 BMP-7

A BMP-7 possui 431 aminoácidos, é expressa no cromossomo 20, possui peso molecular de 49.313 Da e ponto isoelétrico de 7.74 (banco de dados de proteínas – UniProt). A seguir, pode-se observar a sequência genética expressa no Quadro 2.

QUADRO 2 – Sequencia de aminoácidos da BMP-7

Sequência aa	Nº aa
MHVRSLRAAA PHSFVALWAP LFLRLSALAD FSLDNEVHSS FIHRRLRSQE	50
RREMQREILS ILGLPHRPRP HLQGHNSAP MFMLDLYNAM AVEEGGGPGG	100
QGFSYPYKAV FSTQGPPLAS LQDSHFLTDA DMVMSFVNLV EHDKEFFHPR	150
YHHREFRFDL SKIPEGEAVT AAEFRIYKDY IRERFDNETF RISVYQVLQE	200
HLGRESDLFL LDSRTLWASE EGWLVFDITA TSNHWVVNPR HNLGLQLSVE	250
TLDGQSINPK LAGLIGRHGP QNKQPFMVAF FKATEVHFRS IRSTGSKQRS	300
QNRSKTPKNQ EALRMANVAE NSSSDQRQAC KKHELYVSFR DLGWQDWIIA	350
PEGYAAYYCE GECAFPNSY MNATNHAIVQ TLVHFINPET VPKPCCAPTQ	400
LNAISVLYFD DSSNVILKKY RNMVVRACGC H	431

Fonte: UniProt – Banco de dados proteínas.

A BMP-7 também é conhecida como proteína osteogênica (OP-1). Os membros da superfamília TGF- β possuem similaridade da sequência em partes suas regiões C-terminal, conforme FIGURA 3 e está implicada no desenvolvimento embrionário e reparação no tecido adulto.

FIGURA 3 - Estrutura cristalina da BMP-7. Imagem da BMP-7 humana demonstrando a estrutura da proteína com forma globular. Fonte: Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI).

A BMP-7 Induz a formação de cartilagem e osso, desempenhando funções na regulação do cálcio e homeostase óssea, sendo expressa nos ossos, rins, cérebro e bexiga. Induz a fosforilação de SMAD1 e SMAD5, que induzem transcrição de inúmeros genes osteogênicos (Itoh, *et al.*, 2001).

O tratamento com BMP-7 é suficiente para induzir todos os marcadores genéticos de diferenciação de osteoblastos, em muitos tipos de células. A BMP-7 é utilizada cirurgicamente no reparo de fusão de corpos vertebrais, evitando traumas neurológicos, no tratamento da tíbia não unificada, nos casos de falha do enxerto

ósseo transplantado, além do potencial para o tratamento da doença renal crônica, entre outras (Vaccaro, *et al.*, 2008).

3.2 Enxertos ósseos

O enxerto ósseo é um processo cirúrgico que consiste em retirar um fragmento ósseo de uma determinada localidade e implantar em outro local que se pretende reparar. O cirurgião holandês Job Van Meekeren divulgou pela primeira vez em 1668, o transplante bem sucedido da calota craniana de um cão que foi implantada em um soldado russo. Porém apenas em 1915, foi criado o primeiro protocolo cirurgico com a utilização de enxerto ósseo (WEIGEL, 1996).

Os enxertos ósseos são classificados conforme a origem, tais como os enxertos autógenos, alógenos e xenógenos. As suas propriedades biológicas podem ser classificadas em osteogênese, osteoindução e osteocondução sendo essenciais para o mecanismo de reparação ósseo e responsável pela integração do enxerto ósseo.

3.2.1 Enxertos ósseos autógenos ou autólogos

Os enxertos ósseos autógenos ou autólogos são tecidos ósseos obtidos do próprio paciente, com a finalidade de transplante, no mesmo indivíduo. É considerado como tecido “padrão ouro” para realização de cirurgia de enxertia óssea. Estudos têm comprovado a eficácia do uso deste material obtido da crista do osso ilíaco, e tem sido considerado o melhor, dentre os materiais de reconstrução (Finkemeier, 2003; Silva Junior *et al.*, 2001; Assael & Feinerman, 1994).

São os únicos entre os tipos de enxerto ósseo a fornecer células ósseas vivas compatíveis imunologicamente, essenciais à fase I da osteogênese, que é responsável pela proliferação das células ósseas. Os enxertos autógenos podem ser obtidos de diferentes regiões do corpo, sendo as preferidas: crista do osso ilíaco, calota craniana e mandíbula (Silva Junior *et al.*, 2001).

Entretanto apresentam desvantagens, tais como: necessidade de uma nova incisão cirúrgica, o aumento da morbidade, maiores perdas sanguíneas, maior tempo cirúrgico e quantidade limitada de tecido que pode ser retirado (Gallon, 2006).

3.2.2 Enxertos ósseos alógenos ou homólogos

Os enxertos ósseos alogênicos ou homólogos são tecidos ósseos extraídos de um doador de tecidos musculoesqueléticos da mesma espécie, e com genes não

idênticos ao do paciente receptor, com a finalidade de transplante. Este tipo de enxerto é processado em uma instituição denominada Banco de Tecidos (vide item 3.3) que utiliza técnicas para reduzir a sua imunogenicidade. Diversos estudos avaliaram a utilização do enxerto alógeno e não observaram qualquer rejeição, reação alérgica, ou anticorpo inesperado, por longos períodos de tempo, chegando até a serem encontrados estudos avaliando a imunogenicidade por 30 anos (Virolainen, 2003; Aho *et al*, 1998).

3.2.3 Enxertos ósseos xenógenos ou heterólogos

Os enxertos xenógenos ou heterólogos são tecidos ósseos retirados e transplantados entre indivíduos de espécies diferentes. A principal fonte de utilização na prática clínica é o enxerto de osso bovino.

3.2.4 Mecanismo de incorporação dos enxertos ósseos alógenos

A osteoindução e a osteocondução são os processos biológicos envolvidos na osteointegração dos enxertos alógenos, determinando o sucesso deste tipo de procedimento. O primeiro estágio da incorporação, comum a todos os enxertos ósseos não vascularizados, é constituído pela formação do hematoma, seguido de reação inflamatória e a sua reorganização em tecido de granulação que infiltra o enxerto de forma idêntica à primeira fase da cicatrização das fraturas ósseas (Bauer & Muschler 2000). Os estágios posteriores apresentam modificações, de acordo com o tipo de enxerto utilizado, porém consiste na estimulação à migração das células mesenquimais do indivíduo receptor e diferenciação destas em osteoblastos para a neoformação e remodelação óssea, conhecido como processo de osteoindução. Este processo é mediado por uma cascata de sinais e pelas ativações de vários receptores, extra e intracelulares, destacando-se os pertencentes à superfamília TGF-Beta (MULLIKEN *et al*, 1984). A osteocondução é um processo em que o enxerto funciona como um arcabouço, facilitando a orientação e neoformação dos vasos sanguíneos e a invasão de células, principalmente osteoblastos, do leito receptor para o interior do enxerto, gerando novos sistemas de Havers (Bauer & Muschler 2000).

3.3 Bancos de Tecidos

Os Bancos de Tecidos são instituições responsáveis pela captação, processamento, armazenamento, distribuição, rastreabilidade e controle de qualidade dos tecidos humanos destinados à transplantes.

O banco de tecidos, “US Navy”, foi o primeiro banco de tecidos construído em 1949, por cirurgiões ortopédicos da “Naval Medical Center” localizado em Bethesda, nos Estados Unidos da América e ainda está em atividade, sendo mais de 60 anos de prestação de serviços à sociedade (Strong, 2000).

Distintos bancos de tecidos foram criados, um para cada tecido, tais como: banco de tecidos musculoesqueléticos, banco de pele, banco de tecidos oculares, banco de válvulas cardíacas e banco multitecidos responsável por dois ou mais tipos diferentes de tecidos.

Os bancos de tecidos no Brasil são credenciados, autorizados, regulados e fiscalizados por órgãos do Ministério da Saúde, Sistema Nacional de Transplantes (SNT) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de acordo com normas e resoluções específicas e leis no âmbito geral.

3.3.1 Banco de Tecidos Musculoesqueléticos

Os bancos de tecidos musculoesqueléticos (BTME) surgiram da necessidade de utilização de enxertos homogêneos em substituição aos enxertos autólogos.

O material alógeno ideal para ser utilizado como alternativa de enxertia deve possuir as propriedades: biocompatibilidade, não causar infecção, baixa imunogenicidade, ser osteocondutor e osteoindutor (Sasso *et al.*, 2005; Silber *et al.*, 2003; Skaggs *et al.*, 2000).

Os BTME do Brasil são regulamentados pela lei nº 9.434, 1997 – que “Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento e dá outras providências” (Brasil, 1997); Lei nº 10.211 que altera os dispositivos da lei nº 9.434, 2001 (Brasil, 2001); Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 220, 2006 – que “Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o funcionamento de Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos e de Bancos de Pele de origem humana” (Brasil, 2006) e Portaria nº 2006, 2009 – que “Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes” (SNT) (Brasil, 2009).

Os tecidos musculoesqueléticos (TME) são doados ao BTME por meio do consentimento livre e esclarecido de familiares do doador. Existem dois tipos de doadores: os falecidos e vivos. Os doadores falecidos podem ser de pacientes com diagnóstico de morte encefálica ou de parada cardiorespiratória e os doadores vivos são de pacientes submetidos a cirurgia de artroplastia do quadril ou de retirada de calota craniana na cirurgia de craniotomia.

Os doadores de tecidos musculoesqueléticos são avaliados investigando: o histórico social; exames clínicos (exame físico e avaliação do prontuário médico) e laboratoriais (exames sorológicos e testes de amplificação e detecção de ácidos nucleicos – PCR ou NAT) e critérios epidemiológicos, com o objetivo de evitar a transmissão de doenças infectocontagiosas (Ross *et al.*, 2000).

Os TME são retirados em centro cirúrgico com técnicas de assepsia e antisepsia. Podem ser extraídos ossos, tendões, tecidos osteocronais e facia lata. Normalmente são captados ossos longos de membros superiores e inferiores, tais como fêmur, tíbia, fíbula, úmero, rádio, ulna e de ossos da pelve, íliaco e acetábulo (Herson & Mathor, 2006).

O processamento de tecidos musculoesqueléticos inclui a retirada de partes moles (músculo e periósteo), cortes em medidas usuais e imersão em soluções antibióticas e antissépticas (Ross *et al.*, 2000), que reduzem a carga microbiológica se presentes nos tecidos. O processamento é realizado em sala limpa contendo sistema de ar que garante o controle de partículas no mínimo com a classificação ISO Classe 5. Podem ser gerados diferentes tipos de preparo dos tecidos ósseos, sendo caracterizados como: bloco cortical, bloco cortico-medular, anéis diafisários corticais, osso particulado, segmentos de tecidos proximais, distais e diafisários (réguas), dentre outros. Os tecidos ósseos podem ser preparados como mineralizados, desmineralizados e preservados como congelados ou liofilizados.

Todas as etapas do processamento são feitas de forma asséptica e coletadas amostras para o controle microbiológico dos tecidos com a investigação de bactérias aeróbias, anaeróbias e fungos (Amatuzzi *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2006).

Existem diferentes formas de processamento, conservação e esterilização dos enxertos ósseos e os profissionais dos bancos de tecidos buscam métodos para melhorar a qualidade, disponibilidade e segurança dos transplantes.

Os TME são distribuídos, para transplantes, somente para cirurgiões cadastrados no SNT e são utilizados nas cirurgias de revisões de artroplastias do

quadril e joelho, no tratamento de pacientes portadores de tumores ósseos, nas reconstruções articulares para tratamento das lesões ligamentares, no levantamento do seio maxilar com atrofia e enxertia em mandíbula para a instalação de implantes dentários, entre outras (Amatuzzi *et al.*, 2000).

3.3.2 Riscos de transmissão de doenças infecciosas com o uso de tecidos

O risco de transmissão de doenças infecciosas com o uso de enxertos homogêneos é uma preocupação constante dos responsáveis dos bancos de tecidos. Os tecidos podem ser contaminados por microorganismos durante a captação dos tecidos, processamento, preservação e armazenamento, embora todos esses procedimentos sejam realizados sob condições assépticas, existe a possibilidade de transmissão de doenças ao receptor, tais como, infecções bacterianas, fúngicas e transmissão de doenças virais (Nguyen *et al.*, 2006; Tomford *et al.*, 1981).

Com o objetivo de minimizar o risco de transmissão de doenças infecciosas, os profissionais dos bancos de tecidos, com protocolos bem definidos, fazem a seleção rigorosa dos doadores, analisando os seguintes critérios: a causa da morte, o tempo decorrido desde a morte e condições de armazenamento do corpo, idade, história médica e social, exame físico do corpo, exame de sangue sorológico.

São critérios de exclusão os potenciais doadores que apresentam risco para transmissão de doenças infectocontagiosas. Os tecidos devem ser coletados e processados em condições assépticas e recomenda-se preservar o tecido congelado ou liofilizado, para diminuir a proliferação de microorganismos e a atividade das enzimas proteolíticas que podem degradar os componentes biologicamente importantes dos tecidos, tais como as BMPs (Dziedzic-Goclauska, *et al.*, 2008).

Muitos bancos de tecidos adotam a esterilização em todos ou em parte dos enxertos com o objetivo de aumentar a segurança dos transplantes e aumentar a disponibilidade dos tecidos, pois a esterilização pode viabilizar tecidos contaminados dependendo da carga microbiológica, espécie de microorganismos e o processo de validação da esterilização.

Vários métodos de esterilização têm sido aplicados nos tecidos, incluindo produtos químicos como o óxido de etileno, glutaraldeído, formaldeído, ácido paracético e glicerol, calor (ponto de ebulição, esterilização em autoclave, a

pasteurização), e radiações ionizantes (raios gama ou feixe de elétrons) (Dziedzic-Goclausk, *et al.*, 1997).

3.4 Esterilização dos tecidos com a utilização de radiação ionizante

A radiação ionizante é um tipo de radiação eletromagnética ou partículas alfa de alta energia, que possuem energia suficiente para retirar elétrons de átomos e moléculas, transformando em íons, ou seja, partículas carregadas eletricamente (Drobny, 2012). A radiação ionizante tem sido aplicada a mais de 50 anos na esterilização de produtos destinados a medicina. Segundo Dziedzic-Goclawska e colaboradores, em 2008, afirmaram que 40% a 50% dos produtos médicos descartáveis são esterilizados por irradiadores contendo fontes de radiação gama ou acelerador de elétrons.

Existem algumas controvérsias do uso da radiação ionizante para esterilizar tecidos. Tem sido discutida a influência do nível e taxa de dose de esterilização e a avaliação dos efeitos da radiação ionizante nas propriedades físicas, químicas e biológicas dos tecidos. Observa-se que a eficácia da esterilização por radiação ionizante e a intensidade dos danos ao tecido, dependem das condições de esterilização (dose, taxa de dose, temperatura da irradiação, presença ou ausência de oxigênio) e as condições dos tecidos a serem irradiados: por exemplo, presença ou ausência de água (Dziedzic-Goclawska, *et al.*, 2005).

A eficácia da esterilização por radiação ionizante depende da boa penetrabilidade da maior parte dos enxertos e da inativação dos microorganismos sem acarretar problemas associados, como o aumento excessivo da temperatura. O tratamento de radiação resulta em um aumento moderado de temperatura, porém mantendo-a suficientemente baixa para não prejudicar os enxertos esterilizados. A radiação é eficiente tanto em temperatura ambiente quanto em baixas temperaturas. Outra vantagem do emprego da radiação ionizante, é permitir que a esterilização seja aplicada no tecido na embalagem final, pronta para uso clínico, evitando os riscos de uma recontaminação acidental (Dziedzic-Goclawska, *et al.*, 2005).

3.4.1 Interação da radiação gama e feixe de elétrons com o tecido ósseo

A energia mínima de radiação para promover a ionização, possui cerca de 1 MeV. Entretanto, para evitar a radioatividade induzida, a energia de raios gama ou do feixe de elétrons não pode exceder a 5 MeV e 10 MeV, respectivamente, sendo portanto recomendada a utilização de energias menores ou iguais a estas, como

limite máximo, na prática da esterilização. Na prática, são utilizados, para a esterilização, os raios gama produzidos por radioisótopos de ^{60}Co , emissores de 1,17 MeV e 1,33 MeV de fótons (média de 1,25 MeV) e feixes de elétrons com emissão energia de 8 MeV a 10 MeV gerados em aceleradores de elétrons (Dziedzic-Goclawska, *et al.*, 2008).

A eficácia da esterilização de raios gama e de feixes de elétrons é comparável. No entanto, o mecanismo da absorção da energia (interação com a matéria) depende da densidade do produto irradiado e das características de radiação utilizada (FIGURA 4). Os raios gama apresentam poder de penetração muito maior quando comparado aos feixes de elétrons. Portanto, os feixes de elétrons tem maior interação com a matéria e absorvem mais energia.

Consequentemente, na aplicação da mesma dose de radiação ionizante ao tecido, quando utilizados os raios gama, o tempo do processo é feito em horas e com feixe de elétrons em minutos. Outra questão relevante é a distribuição da dose de radiação. No irradiador contendo fontes de ^{60}Co , é realizado o mapeamento da dose de radiação, que para a sua padronização, leva em conta a distância da fonte em relação ao material a ser irradiado e a dimensão e distribuição das embalagens que contem o material, garantindo de maneira eficiente a dose aplicada no mesmo. No caso da utilização de feixes de elétrons, a absorção da radiação ionizante não é homogênea e para melhorar a homogeneidade na distribuição de dose absorvida de radiação no interior do tecido, a radiação deve ser aplicada a partir de dois lados, simultaneamente ou sequencialmente (Dziedzic-Goclawska, *et al.*, 2008).

FIGURA 4 – Relação entre a dose absorvida (em porcentagem) pela espessura de osso cortical das radiações gama e 10 MeV de energia dos elétrons, produzidas pelas fontes de ⁶⁰Co e acelerador de elétrons, respectivamente. Fonte: adaptado de Stachowicz, *et al.*, 1993.

3.4.2 Princípios da inativação de microorganismos por radiação ionizante e cálculo da dose de radiação

A radiação ionizante causa danos nos microorganismos, principalmente nos ácidos nucleicos (DNA ou RNA). De forma direta, a radiação provoca quebras nas cadeias simples ou dupla do DNA, levando a alterações estruturais e funcionais, e indiretamente, por meio da radiólise de água, gerando radicais livres. Os radicais hidroxila (OH•) são produzidos na presença de água, e predominam sobre os efeitos diretos nesta condição (Russell, 1999).

A presença de oxigênio aumenta o efeito prejudicial. O oxigênio reage com radicais produzindo radicais peróxidos e peroxidases que causam diversos tipos de danos ao DNA ou RNA. Ocorre inibição da síntese de DNA ou RNA, causando erros na síntese de proteínas que conduzem a morte celular. No entanto, com o emprego de baixas doses de radiação, algumas bactérias possuem a capacidade de reparar os danos no DNA ou RNA, gerando microorganismos mutantes resistentes à radiação, como *Deinococcus radiodurans* (Russell, 1999).

O cálculo da dose e os resultados da esterilização por radiação nos tecidos dependem da dose de radiação aplicada, o número de microorganismos viáveis

(*bioburden*) e a sua resistência à radiação ionizante que é caracterizada por valores de D_{10} . O termo "*bioburden*" refere-se à população de microorganismos, ou seja, carga biológica ativa e viável presente no produto e quantificada em unidades formadoras de colônias (UFC). Para o cálculo da dose de radiação necessária aos tecidos, o valor D_{10} , normalmente expresso em kGy, refere-se a dose de irradiação necessária para reduzir a população microbiana inicial em 1 $\log_{10}$, ou seja, redução em 90% (Dziedzic-Goclawska, *et al.*, 2008).

Os níveis de segurança da esterilidade previstos e recomendados pela ISO 11.137 são de 10^{-6} (SAL 10^{-6}), ou seja, a probabilidade de encontrar um microorganismo viável é de um para um milhão após a esterilização. Seguindo esta recomendação, na revisão de 2006 a ISO 11.137 descreve que quando o resultado da carga microbiológica for igual a "0 UFC", a dose mínima de 15 kGy pode ser aplicada. A *Internacional Atomic Energy Agency (IAEA)* recomenda a dose de 25 kGy para a esterilização dos tecidos e muitos bancos de tecidos no mundo adotam estas condições, porém existem controvérsias sobre o valor da dose ideal, principalmente na inativação de vírus, pois estes possuem os valores mais altos de D_{10} . Alguns autores defendem a aplicação de doses de 35 kGy para a eliminação viral, porém Conway & Tomford em 1992 demonstram que apenas doses ≥ 50 kGy são efetivas.

Os responsáveis pelos bancos de tecidos, com a colaboração e parceria dos profissionais do centro irradiador, devem incluir nos protocolos a escolha da dose de irradiação e as condições da esterilização dos tecidos, considerando os parâmetros abordados acima e condições específicas, tais como: os efeitos biológicos e estruturais nos tecidos, a resistência específica à radiação das bactérias nas formas germinativas, vegetativas ou esporuladas, fungos, vírus, a presença ou ausência de água e oxigênio, a presença de radioprotetores nos tecidos, o tipo de preservação dos tecidos (liofilizados ou congelados) e sua temperatura de armazenamento, condições das embalagens e posicionamento uniforme dos tecidos em relação à fonte.

3.5 Efeitos da radiação ionizante nos tecidos ósseos

As propriedades biológicas e biomecânicas dos tecidos devem ser preservadas no processo de esterilização. O potencial osteoindutivo dos enxertos ósseos, induzidos pelas BMPs que estão presentes na matriz óssea orgânica, como

descrito anteriormente, é de grande importância clínica, pois é responsável pela capacidade de induzir a formação de osso novo no local de transplante. Portanto, a preservação da matriz óssea é essencial para a qualidade do enxerto.

Existem resultados controversos sobre os efeitos da esterilização por radiação ionizante no potencial de enxertos ósseos. A radiação gama pode afetar negativamente as propriedades mecânicas e biológicas com a degradação do colágeno na matriz óssea, pois os raios gama pela ação direta podem quebrar as cadeias polipeptídicas. A presença de água no tecido é uma das condições em que a radiação gama aplicada promove a liberação de radicais livres e de forma indireta, podendo induzir a reticulação das moléculas de colágeno (FIGURA 5) (Dziedzic-Goclawska, *et al.*, 2008).

FIGURA 5. Esquema ilustrando os efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante em moléculas de colágeno, carreadores de BMPs. Fonte: adaptado de Dziedzic-Goclawska *et al.*, 2008.

Estes efeitos nos tecidos dependem da dose de radiação utilizada, as condições da irradiação e o tipo de preservação do tecido. As alterações nas propriedades mecânicas nos ossos, são mais evidentes em doses acima de 25 kGy no osso cortical e acima de 60 kGy nos ossos esponjosos (Nguyen, *et al.*, 2007).

Entretanto as doses usuais entre 15 kGy e 25 kGy devem ser melhores investigadas. Segundo estudos anteriores do nosso grupo (Santin, 2014), os tecidos ósseos tem alterações nas estruturas do colágeno em diferentes doses, principalmente nas doses entre 25 kGy e 50 kGy. Entretanto as modificações não são suficientes para alterar a organização das fibras de colágeno. Doses de 15 kGy promovem pequena diminuição da resistência mecânica e parecem ser reversíveis, porém testes complementares devem ser feitos para melhor investigação.

O potencial de osteoindução pode ser diminuído tanto pela degradação das BMPs, quanto pela alteração estrutural do colágeno, durante a irradiação (Ijiri et al, 1994) Para que as BMPs possam desempenhar a suas funções no processo de remodelação óssea, e expressar o seu potencial osteogênico, elas precisam do colágeno como proteína carreadora, sendo considerada a melhor transportadora de BMPs. Portanto se a esterilização por radiação ionizante pode degradar o colágeno, o processo de remodelação óssea e a cura do receptor do enxerto podem ser afetados (Dziedzic-Goclawska et al. 2005; Ijiri et al. 1994).

3.6 Técnicas utilizadas na avaliação das proteínas ósseas

Existem várias técnicas disponíveis para avaliar a concentração, estrutura molecular e a atividade das proteínas ósseas, responsáveis pelas propriedades biomecânicas e biológicas. O presente estudo utiliza as técnicas a seguir para a avaliação da concentração e da estrutura molecular. A atividade funcional das proteínas será feita em outro estudo, em continuidade ao atual.

Para avaliar o tecido ósseo são utilizados modelos vivos de implantes de enxertos ósseos ou experimentos “in vitro”, analisando os resultados com inúmeras técnicas, tais como, microscopia eletrônica de varredura e testes de análise para propriedades mecânicas,. No entanto, estes métodos são demorados e muitas vezes destroem as amostras, portanto as análises da qualidade dos tecidos não são rotineiramente realizadas pelos bancos de tecidos após os procedimentos de processamento e esterilização (Yamamoto, *et. al.*, 2012).

3.6.1 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma técnica de medição utilizada para investigar os materiais biológicos, incluindo os tecidos humanos, conforme ilustrado na FIGURA 6. Fornece informações sobre a sua estrutura a um nível molecular e é

utilizada na medicina como técnica diagnóstica, com a avaliação das alterações no tecido devido a processos patológicos (Parker, 1983).

FIGURA 6. Princípio básico de funcionamento do equipamento FT-Raman. Fonte: Silva, 2010.

O princípio da técnica de espectroscopia Raman é o uso da espectroscopia vibracional. A luz incidente nas moléculas é gerada por laser e produz movimentos vibracionais e perda da energia (aproximadamente 107 fótons), provocando alterações no comprimento de onda da luz espalhada, ou seja, comprimento de onda mais longo após a interação dos elétrons.

A diferença entre o comprimento da luz incidente e o da luz espalhada corresponde às vibrações moleculares que produzem bandas de deslocamento com frequências características no espectro Raman. Estas mudanças são representadas em unidades de número de onda correspondentes a energia vibracional (cm^{-1}) (Morris & Mandair, 2011).

3.6.1.1 Uso da espectroscopia Raman como ferramenta de controle de qualidade dos tecidos ósseos preparados para transplante

A espectroscopia Raman tem sido utilizada como uma importante ferramenta para a avaliação da qualidade do tecido ósseo, como o estudo das alterações na

composição óssea, pois a técnica permite a análise dos componentes inorgânicos e orgânicos da matriz óssea extracelular (Sylwia *et al.*, 2012).

O espectro Raman de tecido ósseo, conforme QUADRO 3, revela uma banda intensa em aproximadamente 960 cm^{-1} e refere-se a $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ que corresponde as vibrações de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO})_46(\text{OH})_2$), constituindo de 60% a 70% da massa dos minerais ósseo. As vibrações $\nu_2(\text{PO}_4^{3-})$ e $\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$ ocorrem em 430 cm^{-1} a 590 cm^{-1} , respectivamente. A presença de uma banda em aproximadamente 1074 cm^{-1} , no espectro Raman, representa também a estrutura da hidroxiapatita. Os grupos PO_4^{3-} são substituídos isomorficamente por íons CO_3^{2-} que correspondem de 5% a 8% em massa mineral óssea (Penel *et al.*, 2003), indicando a presença do carbonato apatita do tipo B que é típico dos sistemas biológicos (Elliott *et al.*, 1985). Na figura 7 está representada a fórmula estrutural e os modos vibracionais das moléculas encontradas nos tecidos ósseos.

FIGURA 7. Fórmula estrutural com os modos vibracionais da amida I, amida II, amida III, fosfato e carbonato. Fonte: Penel *et al.*, 2003.

Bandas mais largas no espectro de 1200 cm^{-1} a 1300 cm^{-1} e 1620 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} correspondem a amida III e amida I, respectivamente. Os intervalos nestas bandas são correspondentes às faixas vibracionais de ligações peptídicas em proteínas.

Posições da banda em 1246 cm^{-1} (amida III) e 1.656 cm^{-1} (amida I) são típicas do colágeno I, que constitui aproximadamente 90% da massa orgânica óssea. A banda a 1450 cm^{-1} é atribuída pelas vibrações de deformação dos grupos CH_2 e CH_3 , enquanto que a banda em 2935 cm^{-1} refere-se a vibrações de alongamento (Smith & Rehman, 1995; Kozielski *et al.*, 2011).

QUADRO 3 - Principais atribuições das bandas do Raman e as moléculas correspondentes do tecido ósseo mineralizado: adaptado de Nikodem. & Dobrzanski, 2011.

Posição da banda (cm ⁻¹)	Atribuição*	
2935	$\nu(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$	Lipídeos e proteínas
1656	$\delta(\text{NH}), \nu(\text{CO})$	Amida I
1450	$\delta(\text{CH}_2, \text{CH}_3)$	Lipídeos e proteínas
1270	$\delta(\text{NH}), \nu(\text{CN}), \nu(\text{C}-\text{C})$	Amida III
1246		
1074	$\nu_1(\text{CO}_3^{2-}) / (\text{PO}_4^{3-})$	HA
960	$\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$	HA
590	$\nu_4(\text{PO}_4^{3-})$	HA
450	$\nu_2(\text{PO}_4^{3-})$	HA
430		

* Abreviaturas: ν - alongamento; δ - modo de flexão; HA – hidroxiapatita.

O transplante ósseo é o segundo tipo de transplante mais realizado no mundo, sendo superado apenas pelos transplantes sanguíneos. Portanto, uma caracterização completa deste tecido é de fundamental importância.

Apesar de ter sido aceito que toda a resistência óssea está relacionada com a densidade mineral, alterações neste parâmetro muitas vezes não se correlacionam com a probabilidade de fratura.

Existem diferentes tipos de processamento, esterilização, armazenamento e preservação dos enxertos entre os Bancos de Tecidos. Portanto, para melhorar o desempenho biológico e mecânico dos tecidos ósseos, devem ser estudados e compreendidos os processos relacionados ao preparo do tecido para transplante com o objetivo de minimizar possíveis efeitos indesejáveis e aumentar a sua qualidade.

A espectroscopia Raman constitui uma excelente ferramenta para caracterizar a matriz óssea e os seus principais componentes (hidroxiapatita, colágeno e outras proteínas). Os fatores mais estudados nas propriedades mecânicas são: relações de proporção entre mineral/matriz óssea, e carbonato/matriz óssea (Yerramshetty & Akkus, 2008).

3.6.2 Princípio dos métodos da dosagem e análise das proteínas ósseas totais, BMP-2 e BMP-7

Os princípios dos métodos de dosagem e análise das proteínas ósseas totais e das BMP-2 e BMP-7 utilizados no estudo foram descritos a seguir.

3.6.2.1 Método de Bradford

O método de Bradford é um procedimento analítico que utiliza a espectrofotometria para medir a concentração de proteínas na solução. O ensaio de Bradford é um ensaio colorimétrico e baseia-se na mudança de absorvância do corante Coomassie Brilliant Blue que, quando livre apresenta coloração marrom-avermelhada e quando se liga à proteína, desenvolve coloração azul.

Em condições ácidas, o corante fica predominantemente em sua forma catiônica protonada de cor vermelha com absorvância máxima de 470 nm. Quando o corante se liga as proteínas, ele é convertido a uma forma estável não protonada de cor azul com absorvância máxima no comprimento de onda de 595 nm que é utilizada para quantificar a concentração de proteínas. As densidades óticas (D.O.) das diluições do padrão são registradas em gráfico para a confecção da curva padrão, possibilitando calcular a partir das D.O., as concentrações das amostras a serem analisadas.

3.6.2.2 Método de enzaimunoensaio quantitativo tipo “sandwich” (ELISA) para quantificar BMP-2 e BMP-7

O método de ELISA utilizado emprega a técnica de enzima imunoensaio quantitativo tipo sanduíche. Os poços da microplaca são pré-revestidos com anticorpos monoclonais específicos para BMP-2 ou BMP-7. Padrões e amostras são pipetados nos poços e as BMP-2 ou BMP-7 presentes são ligadas aos anticorpos imobilizados e depois lavados com tampão e quaisquer substâncias não ligadas são retiradas.

Um segundo anticorpo monoclonal ligado a enzimas específicas de BMP-2 e BMP-7 são adicionado aos poços. Após é feito uma lavagem para remover qualquer anticorpo não ligado e uma solução com substrato é adicionada aos poços e ocorre a formação de cor na proporção à quantidade de BMP-2 ou BMP-7 ligado na etapa inicial. O desenvolvimento da cor é interrompido e a intensidade da cor é medida no comprimento de onda de 450 nm. As D.O. das diluições do padrão são registradas em gráfico para a confecção da curva padrão, possibilitando calcular a partir das D.O., as concentrações das amostras a serem analisadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção das amostras

Após a aprovação do projeto pelo CEP, sob o nº 238/12 (Anexo 1), a pesquisa se iniciou com a seleção das amostras de cinco diáfises femorais obtidas da captação de tecidos ósseos de cinco doadores falecidos distintos, sendo dois do sexo masculino e três femininos, com idade entre 39 a 65 anos (média de 52 anos) de acordo com o protocolo do Banco de Tecidos Musculoesqueléticos da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, respeitando as normas da RDC nº 220 (ANVISA, 2006, Anexo 2) e a portaria nº 2600 (SNT, 2009, Anexo 3).

O processo de doação dos tecidos obtidos nesta pesquisa contempla o consentimento familiar livre e esclarecido por meio do termo de doação com a finalidade de investigação científica contendo a autorização e devidamente assinado pelos familiares.

4.2 Processamento das amostras e divisão das amostras em grupos

As amostras foram preparadas de maneira asséptica no Banco de Tecidos da Santa Casa de São Paulo. Na sala exclusiva de processamento de tecidos musculoesqueléticos, foi feita a esqueletização (retirada de partes moles das diáfises femorais), conforme ilustrado na FIGURA 8.

FIGURA 8 – Retirada de partes moles (esqueletização). (E) Epífise; (D) Diáfise.

As epífises dos fêmures foram cortadas e desprezadas e as diáfises cortadas sagitalmente obtendo duas réguas ósseas e transversalmente com medidas

aproximadas de 5 cm (FIGURA 9), utilizando a serra de autópsia marca Stryker® - modelo 810.

FIGURA 9 – (A) corte sagital da diáfise; (B) corte transversal – 5 cm.

As medulares ósseas foram retiradas e desprezadas, permanecendo apenas as partes corticais que foram particuladas com moedor de ossos manual (Noviomagus® Bone Mill, Holanda) (FIGURA 10A) e posteriormente no moinho analítico elétrico (modelo M20 – IKA®, Alemanha) (FIGURA 10B). Foi feita a separação das partículas menores que 1 mm por meio da peneira granulométrica.

FIGURA 10 – (A) Moedor de ossos manual – quebra das corticais ósseas em partes menores; (B) Moinho analítico elétrico – transformação das corticais ósseas quebradas em partículas menores.

4.2.1 Desmineralização óssea

Foram obtidos 48 g de tecidos ósseos (3 g por amostra) de cada diáfise femoral, pesados na balança marca Filizola[®], com precisão de $\pm 0,01$ g, para a produção de 16 grupos distintos (vide item 4.2.2) para cada doador, totalizando 80 amostras provenientes dos 5 doadores.

Posteriormente parte das amostras (42 g) foi desmineralizada em solução de 0,5 mol/L HCL em um béquer de vidro, na proporção de 50 mL de solução por um grama de tecido, por 90 minutos à temperatura de 18 ± 2 °C. Foi utilizado agitador mecânico orbital em baixa rotação para a agitação constante durante todo o processo de desmineralização (Pietrzak, 2011). Após, as amostras foram lavadas com 100 mL de solução tampão fosfato (PBS) 0,02 mol/L no mesmo agitador por 1 minuto com o objetivo de remover o excesso de HCL e neutralização do pH 7,0 – 7,2. O PBS apresenta osmolaridade e concentrações de íons semelhantes às encontradas no sangue humano.

4.2.2 Divisão dos grupos

Todas as amostras contêm 3 g de tecido ósseo particulado. Foram criados dois grupos controles de tecido mineralizado, um liofilizado (M LIO NI) e outro congelado (M CG NI).

Os tecidos ósseos desmineralizados (TODs) foram divididos em dois grupos: liofilizados ou congelados.

As amostras dos grupos (TODs) liofilizados e congelados foram irradiadas nas doses de 15, 25 e 50 kGy por duas fontes de radiação: acelerador de elétrons (AE) e por Cobalto-60 (γ). As amostras foram classificadas como: LIO 15; 25; 50 AE, LIO 15; 25; 50 γ , CG 15; 25; 50 AE e CG 15; 25; 50 γ . Duas amostras controle de tecidos não irradiados desmineralizados foram criadas (grupos controles LIO C; CG C). No fluxograma representado na FIGURA 11, tem-se uma visão geral da divisão dos grupos e classificação das amostras.

FIGURA 11 – Fluxograma do plano de trabalho contendo o processamento do tecido ósseo, a forma de preservação e as diferentes doses de radiação gama ou por acelerador de elétrons em kGy. LIO: Grupo liofilizado; CG: Grupo Congelado; M: Grupo mineralizado; NI: Não irradiado; AE: Acelerador de Elétrons; γ : radiação gama; C: Controle.

4.2.3 Preservação das amostras

As amostras do grupo congelado foram preservadas a -80°C no freezer marca Revco[®]. As amostras do grupo liofilizado, após congelamento das amostras e do termobloco (acessório do equipamento), foram sublimadas com o protocolo de secagem principal de 14 horas com pressão do vácuo de 0,011 mbar e temperatura de -60°C . A secagem secundária foi feita por 8 horas com pressão do vácuo de 0,001 mbar e temperatura de -86°C , utilizando o liofilizador da marca Chirst[®]. Após a liofilização, os frascos foram fechados a vácuo e mantidos à temperatura

ambiente. Este procedimento foi realizado no Banco de Tecidos da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo.

4.2.4 Irradiação das amostras

A irradiação das amostras foi realizada no Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN SP). As amostras dos grupos foram irradiadas conforme descrito no fluxograma do item 4.2.2., utilizando fontes de ^{60}Co do Irradiador Multipropósito tipo compacto ou feixe de elétrons do acelerador de elétrons industrial Radiation Dynamics Incorporation[®].

4.2.4.1 Condições de Irradiação

Os tecidos ósseos foram embalados em tripla embalagem plástica de polietileno. Cada embalagem possui densidade média de $0,92 \text{ g/cm}^3$ e espessura de 0,5 mm. A densidade média do osso desmineralizado analisado foi de $1,43 \text{ g/cm}^3$ e a espessura média do osso desmineralizado distribuído na embalagem foi de 2,2 mm.

Para evitar a variação da temperatura, as amostras foram irradiadas na presença de elementos refrigerantes. As amostras liofilizadas e congeladas foram refrigeradas com gelo reciclável e gelo seco respectivamente, segundo a temperatura de conservação.

4.2.4.1.1 Irradiador Multipropósito

As amostras foram irradiadas com radiação gama no irradiador multipropósito com taxa de dose de $0,00138 \text{ kGy/s}$ (5 kGy/h).

As amostras foram colocadas em suportes de alumínio (2 mm de espessura) e acondicionadas em caixas térmicas de poliuretano vegetal (fibra de mamona) da marca Clariza[®] validada pelo Banco de Tecidos da Santa Casa de São Paulo para esta finalidade. Os tecidos foram dispostos de forma homogênea de forma a evitar sobreposição.

Foram utilizados dosímetros poliméricos Red Pers-Pex (5-50 kGy) posicionados na parte anterior e posterior da caixa contendo os tecidos, com o objetivo de quantificar a irradiação. Após a irradiação das amostras, foram verificadas as doses mínimas de 15,0 kGy; 24,8 kGy e 49,4 kGy e máximas de 15,7 kGy; 25,6 kGy e 50,0 kGy, respectivamente.

4.2.4.1.2 Acelerador de Elétrons

O acondicionamento dos tecidos ósseos foi feito em recipientes de vidro Pyrex[®] contendo os tecidos na parte superior e na inferior o gelo reciclável ou gelo seco para os tecidos liofilizados e congelados, respectivamente.

As amostras liofilizadas e congeladas foram irradiadas no acelerador de elétrons Dynamitron II, fabricado pela empresa Radiation Dynamics Incorporation[®], com taxa de dose de 3,92 kGy/s. A energia, largura e corrente do feixe de elétrons foi de 1,5 MeV, 112 cm e 1,1 mA, respectivamente. A velocidade da bandeja foi de 6,72 m/minuto, proporcionando uma dose por passada de 0,9 kGy. As doses aplicadas foram descritas na Quadro 4.

Quadro 4 - Dose de radiação aplicada nas amostras de TODs em relação ao número de passadas e voltas no acelerador de elétrons.

Dose (kGy)	Nº de voltas	Nº de Passadas
15,8	9	18
24,5	14	28
50,8	29	58

4.2.5 Espectroscopia Raman

As amostras foram analisadas pela técnica de espectroscopia FT-Raman e os espectros foram obtidos no equipamento da Bruker[®], RFS 100/S do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O equipamento possui detector de Ge, refrigerado com nitrogênio líquido e radiação excitante em 1.064 nm, gerada por laser de Nd:YAG (Neodímio com Ítrio e alumínio). A potência do laser utilizada foi de 100 mW e foram feitas aproximadamente 230 varreduras com resolução de 6 cm⁻¹ em todas as amostras.

As amostras de tecidos ósseos foram colocadas em porta-amostra do próprio equipamento e os testes nas amostras foram feitos no mínimo em duplicata. As análises foram realizadas pela obtenção do espectro médio das amostras pertencentes aos grupos estudados por meio de software Grams AI (Thermo Scientific[®]) e Unscrambler X10.1 (Camo).

A técnica de espectroscopia Raman foi utilizada para obter informações químicas e estruturais das moléculas nas amostras, estudando a eficácia da desmineralização dos tecidos e os efeitos da radiação ionizante nas frações

proteicas, correspondentes às bandas da amida I, amida III, CH₂ e CH₃, dentre outras informações relevantes dos tecidos ósseos.

4.2.6 Extração das proteínas ósseas

Para a dissociação e extração das BMPs e das proteínas totais da matriz óssea, foi utilizado tampão contendo Guanidina.HCL (Pietrzak, 2011), como descrito a seguir: foram adicionados 0,5 g de tecido de cada amostra em tubos tipo Falcon (capacidade de 15 mL) e 5 mL da solução fresca de 4 mol/L Guanidina.HCL/0,05 mol/L Tris.HCL com pH de 6,0, contendo uma mistura de inibidores de proteases: 5 mmol/L benzamidina.HCL; 0,1 mol/L 6-ácido aminohexanóico; 0,5 mol/L fluoreto de fenilmetilsulfonil; 5 mmol/L N-etilmaleimida, sob agitação e temperatura de 4°C por um período de 24 horas. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 697 g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e acondicionado em um segundo tubo.

Foram adicionados novamente 5 mL de solução fresca de 4 mol/L guanidina.HCL/0,05 mol/L Tris.HCL e a mistura de inibidores de proteases resuspendendo o sedimento. As amostras ficaram sob agitação a temperatura de 4°C por um período de 5 horas. Após as amostras foram novamente centrifugadas a 697 g por 5 minutos, os sobrenadantes adicionados ao tubo anterior e posteriormente alíquotados em criotubos de 2 mL e congelados a - 80°C até a realização dos ensaios.

4.2.7 Quantificação das Proteínas Totais

As proteínas totais foram quantificadas pela técnica de Bradford utilizando o reagente de Bradford da marca Sigma-Aldrich® com número de catálogo B6916.

Os padrões das proteínas foram preparados nas concentrações de 0; 0,25; 0,50; 1,00 e 1,44 mg/mL para a construção da curva padrão. Foram adicionados 50 µl das amostras em 1,5 mL do reagente de Bradford em tubos de ensaio na temperatura ambiente. Posteriormente os tubos foram inseridos no espectrofotômetro, da marca Celm, modelo E-225D, para a leitura das absorbâncias em 595 nm. As proteínas totais foram quantificadas em triplicata e o resultado foi a média aritmética das mesmas. Os resultados das amostras foram expressos em µg/mL e µg/g de TOD.

4.2.8 Dosagens das BMPs

As análises das amostras foram feitas pelo método de ELISA, por meio dos “Kits” Quantikine® da marca R&D Systems para a detecção de BMPs 2 e 7 de origem humana, marca Biorad® números de catálogos DBP200 e DBP700 respectivamente.

O ensaio emprega a técnica de enzima imunoensaio tipo sanduíche quantitativo. Anticorpos monoclonais específicos para BMP-2 e BMP-7 foram pré-revestido sobre microplacas. Padrões e amostras foram pipetados e as BMP-2 e BMP-7 presentes foram ligadas por anticorpos imobilizados nos poços das placas.

Posteriormente, foram retiradas as substâncias não ligadas por enxague com tampão de lavagem e utilização de lavadora automática de microplacas da marca BioTeck® e foram adicionados aos poços das placas os anticorpos monoclonais específicos ligados a enzimas específicas de BMP-2 e BMP-7. Novamente os poços das placas foram lavados com tampão de lavagem para remover qualquer anticorpo-enzima não ligado e uma solução de substrato é adicionada aos poços e a cor desenvolve-se em proporção à quantidade de BMP-2 e BMP-7 ligado na etapa inicial. O desenvolvimento da cor foi interrompido e a sua intensidade foi medida no espectrofotômetro com ajuste do comprimento de onda de 450 nm. As BMPs foram dosadas em triplicata e o resultado foi a média aritmética das mesmas.

As etapas dos procedimentos propostos contidas nas instruções dos “Kits” foram obedecidas para garantir o controle de qualidade das análises.

4.3 Análises dos dados

Os resultados foram inseridos em tabelas e gráficos, relacionando os tipos de grupos pesquisados correspondentes e os resultados das concentrações de BMPs. Os resultados de cada grupo foram comparados aos seus respectivos controles, assim como foram comparados os controles entre si.

A análise estatística dos dados foi realizada por comparação dos resultados pelo método one-Way ANOVA e seguido do teste de Tukey para diferenças estatísticas de ($p < 0,05$). As diferenças estatisticamente significantes foram representadas nos gráficos e tabelas com o símbolo (*). Na espectroscopia Raman foram utilizados os softwares Unscrambler X10.1 (Camo), Grams/AI, e aplicação do perfil de Voigt (Gaussiana e Lorentziana).

5 RESULTADOS

5.1 Espectroscopia Raman

As amostras foram analisadas pela técnica de espectroscopia Raman para obter as informações químicas e estruturais das moléculas, avaliando assim a eficácia da desmineralização (razão mineral/matriz) dos tecidos ósseos e os efeitos da radiação ionizante nas frações proteicas, correspondentes às bandas da amida I, amida III, CH₂ e outras informações relevantes.

5.1.1 Eficácia de desmineralização

Na FIGURA 12 observamos os espectros do FT-Raman médio do osso mineralizado, utilizando o software Unscrambler X 10.1 (Camo).

FIGURA 12 - Espectro FT-Raman médio do osso mineralizado não irradiado. Setas indicam: os picos de fosfato (PO_4^{3-}) estão compreendidos na região entre 430 cm^{-1} a 1074 cm^{-1} , $\nu(\text{CO}_3)$ tipo B em 1074 cm^{-1} , Amida III em 1246 e 1270 cm^{-1} , $\delta(\text{CH}_2)$ em 1450 cm^{-1} e Amida I em 1656 cm^{-1} . Podemos notar a variação dos espectros das cinco amostras pertencentes ao grupo e o espectro médio.

Na FIGURA 13, observamos o espectro FT-Raman médio do osso desmineralizado. Nota-se a diminuição da banda característica do íon fosfato (PO_4^{3-}) presente nas bandas compreendidas entre 420 cm^{-1} a 1074 cm^{-1} , indicando a eficiência do processo da desmineralização.

FIGURA 13 – Espectro FT-Raman médio do osso desmineralizado não irradiado. Setas indicam: os picos de fosfato (PO_4^{3-}) na região compreendida entre 430 cm^{-1} a 1074 cm^{-1} , $\nu(\text{CO}_3)$ tipo B em 1074 cm^{-1} , Amida III em 1246 e 1270 cm^{-1} , $\delta(\text{CH}_2)$ em 1450 cm^{-1} e Amida I em 1656 cm^{-1} . Podemos notar a variação dos espectros das cinco amostras pertencentes ao grupo e o espectro médio.

Na FIGURA 14, podemos observar e comparar os espectros FT-Raman médio das amostras não irradiadas (controle) dos grupos mineralizados, desmineralizados congelados e desmineralizados liofilizados na região compreendida entre 960 a 1074 cm^{-1} . Com o intuito de quantificar a eficiência de desmineralização, as intensidades das bandas em 960 cm^{-1} foram tomadas como áreas integradas e calculadas utilizando o formato de Voigt (convolução de forma de

linha lorentziana e gaussiana). O grau de desmineralização situou-se entre 85 e 90%, nas amostras liofilizadas e congeladas.

FIGURA 14 – Espectros FT-Raman médios dos ossos mineralizados não irradiados (linha de cor preta), ossos desmineralizados após liofilização (linha de cor azul) e ossos desmineralizados após congelamento (linha de cor vermelha). Claramente as bandas em 960 cm^{-1} (A) e 1074 cm^{-1} (B) apresentam intensidade significativamente menores nas amostras desmineralizadas comparadas às amostras mineralizadas.

5.1.2 Influência da preservação e processamento dos tecidos

Os resultados da influência dos tipos de preservação dos tecidos e do processo de desmineralização podem ser observados na FIGURA 15, onde notamos as diferenças nas bandas atribuídas à vibração da amida I, sugerindo mudanças da conformação da estrutura do colágeno (FIGURA 15, setas A e B).

FIGURA 15 – Espectros FT-Raman médios obtidos das amostras controle (não irradiadas) de ossos mineralizados, desmineralizado liofilizado e desmineralizado congelado, representados nas cores: preto, azul e vermelho, respectivamente. A banda observada é atribuída à vibração da amida I. (A) aumento da intensidade do ombro em 1635 cm^{-1} , (B) deslocamento do máximo de intensidade da banda de 1660 cm^{-1} para 1665 cm^{-1} (grupo congelado) e 1667 cm^{-1} (grupo liofilizado).

5.1.3 Efeitos da radiação ionizante nos tecidos liofilizados

5.1.3.1 Feixe de elétrons

Na Figura 16, podemos observar os espectros médios das amostras mineralizada liofilizada, desmineralizada liofilizada não irradiada e as desmineralizadas irradiadas nas doses de 15, 25 e 50 Gy.

Figura 16 - Espectros FT-Raman médios das amostras de ossos processadas: (a) osso mineralizado liofilizado não irradiado (M LIO NI) ; (b) osso desmineralizado liofilizado não irradiado (LIO C); (c) osso desmineralizado liofilizado irradiado com feixe de elétrons na dosagem de 15 Gy (LIO 15 AE); (d) osso desmineralizado liofilizado tratado com feixe de elétrons na dosagem de 25 Gy (LIO 25 AE) e (e) osso desmineralizado liofilizado tratado com feixe de elétrons na dosagem de 50 Gy (LIO 50 kGy).

Comparando-se os espectros (a) e (b) da Figura 16, é possível notar que há alterações na composição da banda amida I (1660 cm^{-1}) e na região de estiramento C-H (3000 cm^{-1}), além obviamente da presença de bandas associadas aos grupos fosfato e carbonato presentes na amostra mineralizada.

A região de estiramento da ligação C-H é mostrada em detalhe na Figura 17 e pode-se observar que a banda em 2988 cm^{-1} possuem maiores intensidade nas amostras liofilizadas irradiadas e na amostra controle (não irradiada) quando comparadas ao grupo (M LIO NI). Na região compreendida entre 2825 cm^{-1} a 2900 cm^{-1} , ocorre um aumento da intensidade das bandas nas amostras irradiadas por feixe de elétrons na dose de 15 kGy em relação ao controle (LIO C) e diminuição de intensidade da banda região em 2851 cm^{-1} no grupo LIO C, e nos grupos LIO 25 AE e LIO 50 AE em relação ao controle mineralizado (M LIO NI).

Figura 17 - Espectros FT-Raman médios das amostras dos grupos liofilizados estudados, detalhando a região de estiramento C-H: (a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 AE; (d) LIO 25 AE; (e) LIO 50 AE.

Na Figura 18, foi detalhada a região da banda amida I que corresponde a um modo normal de vibração que tem contribuição majoritária da vibração de estiramento C=O do grupo amida da proteína. Notamos diferenças no espectro da amostra mineralizada liofilizada em 1659 cm^{-1} e o deslocamento para maiores número de onda 1667 cm^{-1} nos grupos de amostras desmineralizadas liofilizadas irradiadas e não irradiada. Também podemos observar o aumento da intensidade dos espectros em 1633 cm^{-1} das amostras dos grupos LIO C, LIO 15 AE, LIO 25 AE e LIO 50 AE em relação ao controle liofilizado mineralizado não irradiado (M LIO NI). Não foram observadas diferenças significativas entre as amostras desmineralizadas irradiadas e não irradiada (controle).

Figura 18:- Detalhamento da região da banda amida I dos espectros FT-Raman médios das amostras: (a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 AE; (d) LIO 25 AE; (e) LIO 50 AE. Região espectral de 1550 cm^{-1} a 1750 cm^{-1} .

Na Figura 19 pode-se observar a região espectral compreendida entre 1150 e 1450 cm^{-1} . Notamos o aumento da razão entre as intensidades das bandas em 1246 cm^{-1} e 1270 cm^{-1} (I_{1246}/I_{1270}) da amida III nas amostras dos grupos LIO C, LIO 15 AE, LIO 25 AE e LIO 50 AE em relação às amostras do grupo mineralizado liofilizado (LIO M NI). Não é possível, entretanto, diferenciar as amostras irradiadas com diferentes doses.

Figura 19 - Espectros FT-Raman médios das amostras dos grupos: (a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 AE; (d) LIO 25 AE; (e) LIO 50 AE. Detalhamento da região espectral entre 1150 e 1450 cm^{-1} . A banda em 1270 cm^{-1} está associada à conformação em α - hélice e a banda em 1246 cm^{-1} está associada à conformação de folhas β presentes na Amida III.

5.1.3.2 Radiação gama

A radiação gama possui, por sua característica, maior poder penetrante do que partículas (elétrons). Na Figura 20, podemos observar os espectros médios obtidos para as amostras dos grupos M LIO NI, LIO C, LIO 15 γ , LIO 25 γ e LIO 50 γ .

Figura 20 - Espectros FT-Raman médios obtidos nas amostras dos grupos: (a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 γ ; (d) LIO 25 γ ; (e) LIO 50 γ .

Na Figura 21, foi realizado o detalhamento da região de estiramento C-H e o comportamento dos espectros nessa região foram os mesmos que o observado com feixe de elétrons, conforme o item 5.1.3.1. (FIGURA 17).

FIGURA 21- Espectros FT-Raman médios das amostras dos grupos: (a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 γ ; (d) LIO 25 γ ; (e) LIO 50 γ . Detalhamento da região de estiramento C-H.

As regiões da banda amida I e amida III foram detalhadas, conforme podemos notar nas FIGURAS 22 e 23.

Nas bandas amida I, conforme FIGURA 22, ocorre o mesmo comportamento quando observados as bandas analisadas utilizando feixe de elétrons, conforme item 5.1.3.1. (FIGURA 18).

FIGURA 22 - Espectros FT-Raman médios das amostras dos grupos: (a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 γ ; (d) LIO 25 γ ; (e) LIO 50 γ . Detalhamento da região da banda amida I.

FIGURA 23 - Espectros FT-Raman médios das amostras dos grupos: (a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 γ ; (d) LIO 25 γ ; (e) LIO 50 γ . Detalhamento da região da banda amida III.

Quando as bandas em 1246 cm^{-1} e 1270 cm^{-1} são colocadas em uma mesma escala (FIGURA 23), notamos o aumento da razão (I_{1270}/I_{1246}) entre as intensidades das bandas nas amostras desmineralizadas liofilizadas irradiadas por radiação gama nas doses de 25 kGy e 50 kGy em relação a amostra controle desmineralizada liofilizada não irradiado. Na dose de 50 kGy podemos também notar o alargamento destas duas bandas, ou seja, os deslocamentos do número de onda de 1246 cm^{-1} para o menor número de onda e 1270 cm^{-1} para o maior número de onda.

5.1.4 Efeitos da radiação ionizante nos tecidos congelados

5.1.4.1 Acelerador de elétrons

Na FIGURA 24, podemos observar os espectros obtidos nas amostras de ossos congeladas e irradiadas com feixe de elétrons em diferentes doses e as respectivas amostras controles (mineralizada congelada não irradiada e desmineralizada congelada não irradiada). O mesmo comportamento das bandas na região CH_2 , amida I e amida III quando comparadas as amostras liofilizadas, visto anteriormente no item 5.1.3.1., exceto pela ausência de alteração dos espectros na amostra irradiada na dose de 15 kGy em relação ao controle não irradiado (CG C).

FIGURA 24 - Espectros FT-Raman médios obtidos no nas amostras dos grupos: (a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 AE; (d) LIO 25 AE; (e) LIO 50 AE. Podemos ter uma visão geral dos espectros no estiramento CH, amida I e amida III.

5.1.4.2 Radiação Gama

Na FIGURA 25, podemos observar os espectros obtidos nas amostras de ossos congeladas e irradiadas com radiação gama em diferentes doses e as respectivas amostras controles (mineralizada congelada não irradiada e desmineralizada congelada não irradiada). Notamos o mesmo comportamento das bandas na região CH_2 , amida I e amida III quando comparadas as amostras liofilizadas, visto anteriormente no item 5.1.3.2.

FIGURA 25 - Espectros médios obtidos no FT-Raman nas amostras dos grupos: (a) M LIO NI; (b) LIO C; (c) LIO 15 γ ; (d) LIO 25 γ ; (e) LIO 50 γ . Podemos ter uma visão geral dos espectros no estiramento CH, amida I e amida III.

5.2 Quantificação das proteínas totais

As proteínas totais foram quantificadas com o objetivo de verificar se possíveis interferências dos tipos de sexo e idade, além de prováveis alterações pela radiação ionizante. As quantidades obtidas foram utilizadas para relacionar as proteínas específicas (BMP-2 e BMP-7).

5.2.1 Distribuição das concentrações de proteínas ósseas por sexo e idade

Na FIGURA 26 e FIGURA 27, podemos comparar as diferenças quantitativas das proteínas ósseas nos TODs dos doadores de diferentes tipos de sexo e idade, respectivamente.

A concentração média de proteínas totais dosadas nos grupos controles (liofilizados e congelados não irradiados) dos doadores do sexo masculino foi de $10,78 \pm 3,08$ mg/g TOD e no feminino de $11,62 \pm 2,80$ mg/g TOD. Ao dividirmos os doadores por idade, observamos as concentrações médias de proteínas totais de: $9,24 \pm 0,28$ mg/g TOD (39 anos), $13,02 \pm 0,42$ mg/g TOD (47 anos), $10,22 \pm 0,42$ mg/g TOD (51 anos), $11,06 \pm 0,14$ mg/g TOD (59 anos) e $12,04 \pm 0,84$ mg/g TOD (65 anos).

FIGURA 26 - Relação entre a concentração média de proteínas nos TODs não irradiados e os diferentes tipos de sexo dos doadores.

FIGURA 27 - Relação entre a quantidade de proteínas nos TODs não irradiados e as diferentes idades dos doadores. “F” doadores do sexo feminino.

5.2.2 Efeitos da radiação ionizante nas proteínas ósseas totais

Os resultados da quantificação das proteínas totais de todos os grupos de TODs dos cinco doadores estão representados na TABELA 1 e na FIGURA 28.

FIGURA 28 - Efeitos da radiação ionizante nas proteínas dos TODs. Quantificação das proteínas totais extraídas da matriz óssea orgânica em relação aos grupos irradiados e não irradiados (controle) nos distintos doadores (resultados individuais).

TABELA 1 – Concentração de proteínas totais extraídas dos TODs irradiados e não irradiados dos cinco doadores.

Doadores	Grupos Liofilizados	mg/g TOD	Grupos Congelados	mg/g TOD
Doador 1:	LIO CONTROLE	12,60	CG CONTROLE	13,44
	LIO 15 γ	9,24	CG 15 γ	10,92
	LIO 25 γ	8,96	CG 25 γ	9,24
	LIO 50 γ	7,00	CG 50 γ	7,01
	LIO 15 AE	9,80	CG 15 AE	10,36
	LIO 25 AE	9,52	CG 25 AE	10,08
	LIO 50 AE	7,56	CG 50 AE	7,28
Doador 2:	LIO CONTROLE	8,96	CG CONTROLE	9,52
	LIO 15 γ	7,56	CG 15 γ	7,28
	LIO 25 γ	6,44	CG 25 γ	7,28
	LIO 50 γ	5,32	CG 50 γ	5,04
	LIO 15 AE	7,00	CG 15 AE	7,56
	LIO 25 AE	6,72	CG 25 AE	7,28
	LIO 50 AE	5,60	CG 50 AE	5,88
Doador 3:	LIO CONTROLE	10,92	CG CONTROLE	11,20
	LIO 15 γ	9,52	CG 15 γ	8,68
	LIO 25 γ	9,24	CG 25 γ	8,68
	LIO 50 γ	7,00	CG 50 γ	6,45
	LIO 15 AE	9,52	CG 15 AE	9,80
	LIO 25 AE	9,25	CG 25 AE	9,24
	LIO 50 AE	6,44	CG 50 AE	7,28
Doador 4:	LIO CONTROLE	9,8	CG CONTROLE	10,64
	LIO 15 γ	8,96	CG 15 γ	8,68
	LIO 25 γ	8,40	CG 25 γ	8,12
	LIO 50 γ	7,56	CG 50 γ	5,88
	LIO 15 AE	8,68	CG 15 AE	8,12
	LIO 25 AE	7,02	CG 25 AE	7,56
	LIO 50 AE	6,72	CG 50 AE	6,44
Doador 5:	LIO CONTROLE	11,20	CG CONTROLE	12,88
	LIO 15 γ	11,48	CG 15 γ	10,92
	LIO 25 γ	10,92	CG 25 γ	10,36
	LIO 50 γ	9,52	CG 50 γ	7,84
	LIO 15 AE	10,08	CG 15 AE	10,36
	LIO 25 AE	10,10	CG 25 AE	9,52
	LIO 50 AE	8,12	CG 50 AE	7,28
CV%		20,2		22,6

É possível verificar variações individuais para cada doador (TABELA 1 e FIGURA 28), porém a influência do tipo de processamento e da dose da radiação é melhor visualizada quando os dados médios são comparados porcentualmente em relação aos seus respectivos controles ($10,70 \pm 2,63$ e $11,54 \pm 3,25$ mg/g), como ilustrado na TABELA 2 e FIGURA 29, onde observamos as reduções gradativas nas concentrações médias de proteínas totais dos grupos irradiados. As alterações

estatisticamente significativas foram observadas nos grupos LIO 50 γ (31,9%), LIO 50 γ AE (35,6%), CG 25 γ (18,3%), CG 50 γ (39,8%), CG 15 AE 13,6%, CG 25 AE (18,3%) e CG 50 AE (36,1%).

TABELA 2 - Diminuição da concentração média de proteína total em porcentagem dos diferentes grupos estudados com relação ao controle.

Grupos Liofilizados	mg/g TOD	Redução (%)	Grupos Congelados	mg/g TOD	Redução (%)
LIO CONTROLE	10,70	-----	CG CONTROLE	11,54	-----
LIO 15 γ	9,35	12,5	CG 15 γ	9,29	13,1
LIO 25 γ	8,79	17,8	CG 25 γ	8,74	18,3 *
LIO 50 γ	7,28	31,9*	CG 50 γ	6,44	39,8 *
LIO 15 AE	9,02	15,7	CG 15 AE	9,24	13,6 *
LIO 25 AE	8,52	20,3	CG 25 AE	8,74	18,3 *
LIO 50 AE	6,89	35,6*	CG 50 AE	6,83	36,1 *

(*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

FIGURA 29 - Efeitos da radiação ionizante nas proteínas dos TODs. Quantificação das proteínas totais extraídas da matriz óssea orgânica em relação aos grupos irradiados e não irradiados (controle). Representação do resultado da dosagem de proteínas totais por grupos. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

5.3 Quantificação das BMP - 2 e BMP – 7

As BMPs 2 e 7 foram quantificadas com o objetivo de analisar os efeitos da radiação ionizante e as possíveis alterações nas concentrações destas proteínas. Os resultados das concentrações obtidas foram correlacionados em gramas de TOD e por grama de proteína total. Em todas as amostras analisadas foi detectada a presença de BMP-2 e BMP-7.

TABELA 3 – Concentração das BMPs 2 e 7 extraídas dos TODs irradiados e não irradiados dos cinco doadores.

Doador	Grupos Liofilizados	BMP- 2 µg/g TOD	BMP-7 ng/g TOD	Grupos Congelados	BMP- 2 µg/g TOD	BMP-7 ng/g TOD
Doador 1	LIO CONTROLE	2,46	144,92	CG CONTROLE	3,26	146,99
	LIO 15 γ	2,44	130,65	CG 15 γ	2,39	140,08
	LIO 25 γ	2,43	127,28	CG 25 γ	2,37	125,64
	LIO 50 γ	2,40	123,70	CG 50 γ	2,32	97,90
	LIO 15 AE	2,46	99,80	CG 15 AE	2,39	99,94
	LIO 25 AE	2,45	93,38	CG 25 AE	2,39	89,19
	LIO 50 AE	1,43	77,26	CG 50 AE	1,96	72,35
Doador 2	LIO CONTROLE	2,32	112,38	CG CONTROLE	2,95	126,71
	LIO 15 γ	2,34	96,65	CG 15 γ	2,31	105,28
	LIO 25 γ	2,34	95,93	CG 25 γ	2,29	99,08
	LIO 50 γ	2,33	87,69	CG 50 γ	1,94	44,76
	LIO 15 AE	2,33	80,52	CG 15 AE	2,31	80,88
	LIO 25 AE	2,35	78,05	CG 25 AE	2,29	89,19
	LIO 50 AE	1,38	66,08	CG 50 AE	1,34	54,94
Doador 3	LIO CONTROLE	2,90	140,99	CG CONTROLE	2,96	156,12
	LIO 15 γ	2,89	143,02	CG 15 γ	2,77	149,87
	LIO 25 γ	2,84	138,20	CG 25 γ	2,76	130,98
	LIO 50 γ	2,83	126,34	CG 50 γ	2,42	89,75
	LIO 15 AE	2,87	116,03	CG 15 AE	2,72	98,10
	LIO 25 AE	2,84	103,33	CG 25 AE	2,69	89,64
	LIO 50 AE	1,88	88,98	CG 50 AE	1,87	75,50
Doador 4	LIO CONTROLE	2,95	119,10	CG CONTROLE	3,46	126,74
	LIO 15 γ	3,07	100,98	CG 15 γ	2,76	101,71
	LIO 25 γ	3,06	99,98	CG 25 γ	2,72	94,13
	LIO 50 γ	3,04	88,20	CG 50 γ	2,44	70,09
	LIO 15 AE	3,07	87,03	CG 15 AE	2,70	84,96
	LIO 25 AE	3,05	80,22	CG 25 AE	2,65	80,32
	LIO 50 AE	2,31	73,96	CG 50 AE	2,26	66,45
Doador 5	LIO CONTROLE	3,45	175,90	CG CONTROLE	3,73	184,42
	LIO 15 γ	3,45	170,78	CG 15 γ	3,34	169,52
	LIO 25 γ	3,46	165,89	CG 25 γ	3,33	160,32
	LIO 50 γ	3,43	160,74	CG 50 γ	2,79	111,73
	LIO 15 AE	3,38	122,85	CG 15 AE	3,31	107,11
	LIO 25 AE	3,38	113,91	CG 25 AE	3,28	101,49
	LIO 50 AE	2,50	97,56	CG 50 AE	2,46	81,67
CV%		19,6	26,1		19,2	31,3

Na TABELA 3 podemos observar as concentrações das BMPs 2 e 7 analisadas individualmente em todas as amostras dos grupos.

5.3.1 Efeitos da radiação ionizante na BMP 2

Os resultados obtidos dos grupos analisados foram registrados na TABELA 4 e nas FIGURAS 30.

Na TABELA 4, podemos observar os resultados da concentração média de BMP-2 nos grupos liofilizados e congelados e também a redução, em porcentagem, das concentrações médias de BMP-2 dos grupos irradiados em relação ao controle (não irradiado).

TABELA 4 – Registro das dosagens de BMP-2 dos grupos estudados. Redução da concentração da BMP-2 dos grupos irradiados em porcentagem com relação ao controle (não irradiado).

Grupos Liofilizados	BMP- 2 µg/g TOD	%	Grupos Congelados	BMP- 2 µg/g TOD	%
LIO CONTROLE	2,82	—	CG CONTROLE	3,27	—
LIO 15 γ	2,84	0,0	CG 15 γ	2,72	16,8
LIO 25 γ	2,83	0,0	CG 25 γ	2,70	17,4
LIO 50 γ	2,81	0,3	CG 50 γ	2,38	27,2*
LIO 15 AE	2,82	0,0	CG 15 AE	2,67	18,3
LIO 25 AE	2,82	0,0	CG 25 AE	2,66	18,6
LIO 50 AE	1,90	32,6*	CG 50 AE	1,98	39,4*

(*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05).

Na FIGURA 30, podemos notar os efeitos da radiação ionizante nas concentrações de BMP-2 dos grupos estudados. As alterações estatisticamente significativas com redução das concentrações médias em relação ao respectivo controle foram observadas nos grupos LIO 50 AE (32,6%), CG 50 γ (27,2%) e CG 50 AE (39,4%).

FIGURA 30 - Efeitos das radiações gama e feixe de elétrons nas concentrações de BMP-2 por grama de TOD nos grupos estudados. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p<0,05$).

5.3.2 Efeitos da radiação ionizante na BMP 7

Os resultados obtidos dos grupos analisados foram registrados na TABELA 5 e na FIGURA 31.

Na TABELA 5, podemos observar os resultados da concentração média de BMP-7 nos grupos liofilizados e congelados e também a redução, em porcentagem, das concentrações médias de BMP-7 dos grupos irradiados em relação ao controle (não irradiado).

TABELA 5 - Redução da concentração das BMPs 7 dos grupos irradiados em porcentagem com relação ao controle (não irradiado).

Grupos Liofilizados	BMP-7 ng/g TOD	%	Grupos Congelados	BMP-7 ng/g TOD	%
LIO CONTROLE	138,66	—	CG CONTROLE	148,20	—
LIO 15 γ	128,42	7,4	CG 15 γ	133,29	10,1
LIO 25 γ	125,46	9,5	CG 25 γ	122,03	17,6
LIO 50 γ	117,33	15,4	CG 50 γ	82,85	44,1*
LIO 15 AE	101,25	26,9*	CG 15 AE	94,20	36,4*
LIO 25 AE	93,78	32,4*	CG 25 AE	89,97	39,3*
LIO 50 AE	80,77	41,7*	CG 50 AE	70,18	52,6*

(*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p<0,05$).

Na FIGURA 31, podemos notar os efeitos da radiação ionizante nas concentrações de BMP-7, nos diferentes grupos estudados. As alterações estatisticamente significativas com redução das concentrações médias de BMP-7 em relação ao respectivo controle foram observadas nos grupos LIO 15 AE (26,9%), LIO 25 AE (32,4%), LIO 50 AE (41,7%), CG 50 γ (44,1%), CG 15 AE (36,4%), CG 25 AE (39,3%) e CG 50 AE (52,6%).

FIGURA 31 - Efeitos das radiações gama e feixe de elétrons nas concentrações de BMP-7 por grama de TOD nos grupos estudados. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

5.3.3 Relação entre as concentrações médias de BMP-2, BMP-7 e proteínas totais, irradiadas e não irradiadas.

Nas FIGURAS 32 e 33 observamos as concentrações médias de BMP-2 em relação às proteínas totais dosadas nos grupos irradiados e não irradiados. Houve alteração significativa estatisticamente nos grupos LIO 50 γ e CG 50 γ em relação ao controle.

FIGURA 32 - Relação entre a concentração de BMP-2 e de proteínas totais específicas de cada grupo de tecido liofilizado não irradiado e irradiado com radiação gama e feixe de elétrons. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

FIGURA 33 - Relação entre a concentração de BMP-2 e de proteínas totais específicas de cada grupo de tecido congelado não irradiado e irradiado com radiação gama e feixe de elétrons. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

Nas FIGURAS 34 e 35 observamos as concentrações médias de BMP-7 em relação às proteínas totais dosadas nos grupos irradiados e não irradiados. Notamos

diferenças estatisticamente significantes nos grupos LIO 50 γ , CG 15 AE, CG 25 AE, CG 50 AE em relação aos respectivos controles.

FIGURA 34 - Relação entre a concentração de BMP-7 e de proteínas totais específicas de cada grupo de tecido liofilizado não irradiado e irradiado com radiação gama e feixe de elétrons. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

FIGURA 35 - Relação entre a concentração de BMP-7 e de proteínas totais específicas de cada grupo de tecido congelado não irradiado e irradiado com radiação gama e feixe de elétrons. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

O aumento da utilização dos enxertos de tecido musculoesquelético em cirurgias de reconstrução e o objetivo de promover uma maior segurança nos transplantes e na qualidade dos tecidos levaram os Bancos de Tecidos a buscar melhores técnicas de processamento, preservação e esterilização dos mesmos.

Como mencionado anteriormente (vide Introdução), o fornecimento de tecido ósseo estéril pode ser realizado seguindo várias etapas, que incluem triagem de doadores, testes microbiológicos, técnicas assépticas de captação e processamento, desinfecção e esterilização terminal (McAllister *et al.*, 2007). A esterilização final com radiação ionizante proporciona efeitos bactericidas e virucidas (dependendo da dose), por meio da alteração direta dos ácidos nucleicos que conduzem a disfunção e destruição dos microorganismos (Vangness *et al.* 2003).

A segurança microbiológica dos tecidos musculoesquelético é estritamente relacionada com a carga microbiana, “bioburden”, do material, portanto, o cálculo da dose de radiação é baseado nos parâmetros microbiológicos dos tecidos (Dziedzic-Goclawska *et al.*, 2008).

A radiação gama é a mais utilizada nos bancos de tecidos e demonstra ser um método eficaz para proporcionar esterilização terminal do tecido biológico, porém há relatos sobre os possíveis efeitos deletérios das propriedades mecânicas e biológicas dos tecidos, dependendo da dose de radiação aplicada (Nguyen *et al.*, 2007). Por este motivo, usualmente são aplicadas doses menores de radiação, entre 15 kGy a 25 kGy e com menor frequência doses mais altas (superiores a 25 kGy).

A radiação por feixe de elétrons é uma alternativa promissora no processo de esterilização dos tecidos, apesar de não ser usualmente aplicada na esterilização dos tecidos ósseos. Possui algumas vantagens quando comparadas à radiação gama, tais como, operação com um sistema rápido de transferência da radiação (Seto *et al.*, 2008; Dziedzic-Goclawska *et al.*, 2005). Como exemplo de desvantagem podemos citar o baixo poder de penetrabilidade dos feixes de elétrons nos materiais, dificultando ou impossibilitando a irradiação, dependendo da estrutura e densidade dos tecidos.

Portanto, é importante estudar as possíveis modificações dos tecidos ósseos irradiados e para isso, podemos utilizar técnicas como: espectroscopia Raman,

quantificação de proteínas totais por técnica de Bradford e técnicas de ELISA utilizadas na quantificação de BMP-2 e BMP-7.

A espectroscopia Raman é uma técnica não invasiva, podendo ser utilizada nas medições “*in vivo*” e “*in vitro*”, sem prejudicar os pacientes e as amostras, respectivamente. Recentemente, tem sido utilizada para avaliar o conteúdo mineral, cristalinidade mineral, fosfato e conteúdo de carbonato, e maturidade de colágeno em tecidos ósseos humanos. As alterações na estrutura bioquímica dos tecidos também podem ser observadas por esta técnica (Downes & Elfick, 2010; Morris & Mandair, 2011; Smith & Rehman, 1995; Yerramshetty & Akkus, 2008).

Além de possuir vantagens como a sensibilidade, rapidez para obtenção dos espectros, é um teste não destrutivo às amostras, requer pequeno volume de material a ser analisado, baixa interferência da água na obtenção dos espectros e alta sensibilidade, sendo uma técnica espectroscópica que permite fornecer informações completas da composição do osso (Yamamoto *et. al.*, 2012, Carden, A. & Morris, M.D., 2000).

A espectroscopia FT-Raman foi utilizada para detectar a eficiência da desmineralização óssea, influência do tipo de armazenamento e desmineralização na matriz orgânica e os efeitos da radiação ionizante nas proteínas ósseas.

A intensidade das bandas em um espectro Raman depende, entre outros motivos, do número de espalhadores presentes e, portanto, depende da concentração da espécie química que gera o espectro (Carden, A. & Morris, M.D., 2000). A intensidade do espectro como um todo, pode ser afetada por fatores experimentais como a potência do laser incidente, ajuste de foco, a frequência de radiação dispersa pela amostra, a absorvidade da amostra envolvida na dispersão, homogeneidade da amostra, dentre outros, o que faz da comparação de valores absolutos de intensidade uma prática que pode estar sujeita a falhas, porém, válida do ponto de vista quantitativo, desde que se procure obter os espectros nas mesmas condições (Kontoyannis, C.G. & Vagenas, N.V., 2000).

Considerando o tipo de aplicação dos tecidos que essas amostras representam, uma questão importante a ser esclarecida é descobrir se é possível quantificar o grau de desmineralização do osso utilizando a espectroscopia Raman, pois o potencial osteoindutivo deste tipo de processamento do tecido depende deste fator e, portanto, está associado à qualidade do tecido destinado para transplante.

O processo de desmineralização visa à remoção da fase inorgânica existente nas amostras de ossos, a qual é constituída por hidroxiapatita de cálcio, carbonatada em grau variável. Tanto o grupo fosfato quanto o grupo carbonato apresentam bandas Raman em posições características, sendo a vibração de estiramento simétrico P-O em 960 cm^{-1} e a de estiramento simétrico C-O em 1070 cm^{-1} . É possível, portanto, avaliar a desmineralização por meio da avaliação da intensidade dessas bandas.

Nas FIGURAS 12 e 13, podemos comparar o osso mineralizado não irradiado e desmineralizado não irradiado, respectivamente. Notamos a intensa redução das bandas de fosfato (PO_4^{3-}), que estão presentes no número de onda compreendido entre 420 cm^{-1} e 1074 cm^{-1} . Deve ser destacado, entretanto, que existem variações nas intensidades relativas de amostras de ossos provenientes de diferentes doadores, uma vez que osso não é um material perfeitamente homogêneo. Podemos observar que as amostras do grupo contendo osso mineralizado possuem pouca variação nos espectros. No grupo desmineralizado, notamos uma maior variação dos espectros, sugerindo que o processo de desmineralização aumenta a heterogenicidade das amostras provavelmente pela diferença da eficiência de desmineralização entre o tamanho das partículas, ou seja, partículas menores possuem melhor rendimento de desmineralização que partículas maiores (Pietrzak *et al*, 2011).

O grau de desmineralização foi obtido a partir da intensidade da banda de estiramento simétrico P-O em 960 cm^{-1} , a qual foi obtida para os espectros médios das amostras de ossos mineralizados e ossos desmineralizados liofilizados e congelados não irradiados, conforme podemos observar na FIGURA 14. Como a intensidade é dada pela área integrada da banda e na região de interesse ($900 - 990\text{ cm}^{-1}$) há, além da banda do grupo fosfato, outras duas bandas pertencentes ao colágeno, foi necessário discriminar a contribuição da fase orgânica (colágeno) da inorgânica (hidroxiapatita) por meio do ajuste de curva usando três bandas e formato Voigt (convolução de forma de linha lorentziana e gaussiana), adotando correção linear de linha base entre os pontos 900 e 990 cm^{-1} . As áreas então obtidas para o grupo fosfato foram normalizadas pela intensidade da banda do colágeno em 920 cm^{-1} , a fim de obter intensidades relativas e evitar as flutuações de intensidade inerentes às condições experimentais de cada medida realizada. Finalmente, tomou-

se a intensidade relativa da banda em 960 cm^{-1} da amostra de osso mineralizado como 100%.

Adotando esse procedimento e considerando que o processo de desmineralização é comum a ambos os tipos de amostras (liofilizadas e congeladas), pode-se considerar um único intervalo de grau de desmineralização situado entre 85 e 90%.

Com os resultados obtidos neste trabalho e os divulgados pelos autores Kontoyannis e Vagenas em 2000, que divulgaram o uso da espectroscopia FT-Raman como ferramenta para o monitoramento da desmineralização dos ossos pelo método de padronização da quantificação do conteúdo de fosfato de ossos, por meio da criação da curva padrão obtida da mistura de hidroxiapatita e colágeno tipo I. Portanto, podemos propor a utilização da espectroscopia FT-Raman para a avaliação do grau de desmineralização, colaborando para acrescentar mais esta função à técnica e aumentar o potencial da utilização desta ferramenta como controle de qualidade dos tecidos.

De acordo com a literatura, a conformação de proteínas afeta a posição da banda amida I, sendo possível discriminar entre estruturas do tipo hélice alfa, folha beta pregueada, desordenada, dentre outras (Alix *et al*, 1988).

Na FIGURA 15 (setas A e B), podemos notar nos espectros FT-Raman a influência da preservação dos tecidos ósseos (congelamento e liofilização) e ou do processamento (desmineralização) na estrutura das proteínas analisando a banda amida I, representativa da fase orgânica. As alterações observadas nessa região espectral não podem ser associadas à dispersão que existe entre as diferentes amostras e provavelmente estão relacionadas à forma de processamento (desmineralização) e da preservação dos tecidos. Observamos o aumento da intensidade das bandas na região em 1635 cm^{-1} e deslocamento do máximo de intensidade da banda de 1660 cm^{-1} para maiores número de onda, 1665 cm^{-1} e 1667 cm^{-1} , nos tecidos desmineralizados congelados e desmineralizados liofilizados respectivamente, quando comparados ao osso controle mineralizado. As alterações encontradas nos espectros da amida I, onde a banda em 1635 cm^{-1} é compatível com a estruturação do colágeno em folhas β desordenada, ao passo que o deslocamento para maiores valores de números de onda pode ser explicado pelo aumento da contribuição de voltas β .

Com os resultados dos espectros FT-Raman, podemos também analisar os efeitos da radiação gama e de feixe de elétrons nos grupos estudados. A banda amida I, corresponde a um modo normal de vibração que tem contribuição majoritária da vibração de estiramento C=O do grupo amida. Esta vibração é sensível à conformação proteica, permitindo a identificação de arranjos do tipo α -hélice, folha β -pregueada e desordenada. Mudanças no perfil dessa banda podem ser diretamente associadas com alterações de conformação das proteínas (Alix *et al*, 1988).

A banda amida III tem composição mais complexa do que a amida I, correspondendo a uma mistura de estiramento C-N e deformação angular N-H do grupo amida e é um envoltório contendo diversas bandas; a razão de intensidade de duas delas (1245 e 1270 cm^{-1}) é usada para obter informação sobre o desordenamento da estrutura secundária da proteína. A banda referente à estrutura desordenada apareceria entre 1245 e 1255 cm^{-1} , ou seja, entre as bandas características da conformação de hélice α ($1270 - 1300\text{ cm}^{-1}$) e folha β ($1230 - 1235\text{ cm}^{-1}$).

Nas FIGURAS 16 a 23, observamos os espectros FT-Raman referente aos ossos desmineralizados liofilizados, irradiados com feixe de elétrons e por raios gama e os controles desmineralizados liofilizados não irradiados e os controles mineralizados liofilizados. Podemos notar as modificações espectrais referente a conformação das proteínas, principalmente do colágeno, pela avaliação da banda de estiramento C-H, amida I e amida III que estão associadas principalmente ao processamento do osso (desmineralização), pois as principais diferenças foram encontradas quando comparamos as amostras controles de osso mineralizado não irradiado e osso desmineralizado não irradiado. Na FIGURA 17, detalhamento da região CH_2 , observamos que há um aumento das intensidades das bandas na região compreendida entre 2825 cm^{-1} a 2900 cm^{-1} na amostra desmineralizada liofilizada irradiada com feixe de elétrons na dose de 15 kGy , quando comparada ao controle não irradiado (LIO C). As duas bandas com número de onda em 2850 cm^{-1} e 2883 cm^{-1} , são atribuídas a CH_2 estiramentos simétricos e assimétricos de lipídeos e proteínas, respectivamente (Movasaghi, Z. *et al*, 2007). Podemos também notar que ocorre um aumento na intensidade da banda em 2983 cm^{-1} nas amostras desmineralizadas liofilizadas (irradiadas e não irradiada) quando comparadas ao

controle mineralizado (não irradiado). Esta região é atribuída ao alongamento CH (Movasaghi, Z. *et al*, 2007). Na FIGURA 21, podemos notar o mesmo comportamento da intensidade das bandas em 2983 cm^{-1} como discutido na FIGURA 17, no entanto, não observamos modificações das bandas na região compreendida entre 2825 cm^{-1} a 2900 cm^{-1} nas amostras irradiadas na dose de 15 kGy com raios gama em relação ao controle.

Nas FIGURAS 16, 18, 20 e 22, não observamos alterações na banda atribuída a amida I nas amostras liofilizadas e congeladas desmineralizadas em diferentes doses de radiação por feixe de elétrons e por raios gama, quando comparadas ao controle. As diferenças encontradas são observadas somente entre o controle mineralizado e as amostras desmineralizadas, conforme as encontradas e discutidas no item 5.1.2. (FIGURA 15).

Na FIGURA 19 e, podemos notar o aumento da razão entre as intensidades das bandas em 1246 cm^{-1} e 1270 cm^{-1} (I_{1246}/I_{1270}) da amida III nas amostras dos grupos LIO C, LIO 15 AE, LIO 25 AE e LIO 50 AE em relação às amostras do grupo mineralizado liofilizado (LIO M NI), ou seja, a diferença encontrada trata-se do processo de desmineralização dos tecidos. Não é possível, entretanto, diferenciar as amostras irradiadas com diferentes doses por feixe de elétrons em relação ao controle (não irradiado).

No entanto na FIGURA 23, podemos observar o aumento da razão (I_{1270}/I_{1246}) entre as intensidades das bandas nas amostras desmineralizadas liofilizadas irradiadas por radiação gama nas doses de 25 kGy e 50 kGy em relação a amostra controle desmineralizada liofilizada não irradiado. Estas alterações na amida III ocorrem pelo aumento na quantidade de estruturas secundárias tipo α - hélice do colágeno em relação à dose de radiação, ou seja, favorecendo as interações entre as moléculas de hidrogênio do grupo amino (-NH) e o oxigênio da carbonila (C=O) das proteínas.

Na dose de 50 kGy podemos também notar o alargamento destas duas bandas, ou seja, os deslocamentos das bandas em 1246 cm^{-1} para o menor número de onda e 1270 cm^{-1} para o maior número de onda. Esta alteração está associada a desnaturação do colágeno (Bandekar, 1992). Estes resultados são comparáveis aos encontrados pelos autores Kubisz e Polomska em 2007 que analisaram os efeitos da radiação gama em diferentes doses de radiação (10, 25, 50, 100, 500, e 1.000 kGy) com taxa de dose de 1,5 kGy/h nos ossos bovinos mineralizados e

particulados. Estes autores também concluíram que as alterações significativas no componente orgânico foram notadas apenas nas doses de radiação superiores a 100 kGy.

Nas FIGURAS 24 e 25 observamos os espectros FT-Raman referente aos ossos desmineralizados congelados, irradiados com feixe de elétrons e por raios gama, respectivamente, e os controles desmineralizados congelados não irradiados e os controles mineralizados congelados. Podemos notar o mesmo comportamento dos espectros FT-Raman referente aos resultados dos tecidos liofilizados anteriormente discutidos, exceto por não observarmos alterações nos espectros do grupo congelado, referente à dose de 15 kGy irradiado com feixe de elétrons.

Como já mencionado anteriormente, o colágeno funciona como carreador das BMPs e a sua conformação tridimensional também parece estar ligada à atividade destas (Dziedzic-Goclawska *et al.*, 2005). Portanto, a eficaz osteoindução dos enxertos ósseos também dependem da atividade e da concentração das BMPs e dos outros fatores de crescimento pertencentes aos TGF- β , essenciais para (vide item 3.1.4.4). Sendo assim, não só é importante detectar a presença destas proteínas, como também se as mesmas se encontram potencialmente ativas após o processo de esterilização por radiação ionizante, evitando o comprometimento do transplante ósseo (Puolakkainen *et al.*, 1993; Ijiri *et al.*, 1994; Dziedzic-Goclawska *et al.*, 2005).

A técnica de quantificação das proteínas é um importante parâmetro, visto que existe uma correlação positiva entre os conteúdos de BMPs presentes nos enxertos e a osteoindutividade (Blum *et al.*, 2004, Biswas *et al.*, 2010, Han *et al.*, 2003, Ripamonti *et al.*, 2006). Biswas *et al.* em 2010, no seu estudo comparou o potencial de osteoindução de: enxertos autógenos (controle) ou TODs de dois doadores distintos (xenoenxerto), que foram implantados em 145 ratos fêmeas, suplementados ou não com rhBMP 2, além de adição de rhBMP 2 adicionada a colágeno, em diferentes concentrações (0,35 a 10 $\mu\text{g/g}$ de colágeno). Os melhores resultados de osteoindução e porcentagem de fusão espinhal, foram obtidos com maiores concentrações de BMP 2 e também foram observados diferentes resultados entre os TODs dos dois doadores (60% e 35% de novo osso formado), fato que sugere que os TODs processados pelos Bancos de Tecidos devem possuir um sistema de análise do conteúdo de BMPs dos lotes de tecidos gerados. Em todos os grupos de amostras foram notados resultados superiores aos enxertos autógenos.

Ripamonti e colaboradores em 2006, verificaram que as melhores concentrações de rhBMP 7 ou rhOP-1 para a nova formação óssea em babuínos foi na faixa entre 100 e 500 µg/g matrix óssea. Maiores concentrações resultaram em excessiva formação óssea, enquanto que em menores concentrações não foi verificada nova formação óssea.

Nos nossos estudos, os resultados das dosagens das proteínas totais (cerca de 10 mg proteína/g de TOD) extraídas com o uso de 4 mol/L guanidina.HCL, apresentaram valores comparáveis aos encontrados por Wildemann et al., 2007.

Neste estudo, não foram encontradas alterações significativas na concentração das proteínas totais em relação à idade dos doadores, porém, nos doadores do sexo feminino, obtivemos maiores concentrações de proteínas totais quando comparadas a do sexo masculino, conforme as FIGURAS 26 e 27.

Podemos observar a diminuição gradativa das concentrações das proteínas totais em relação à dose de radiação quando comparadas aos grupos controle, conforme demonstrados nas TABELAS 1 e 2 e FIGURAS 28 e 29.

Apesar das reduções das concentrações, em relação ao controle não irradiado, terem sido dose dependentes, notamos reduções maiores que 20% somente nas doses de 50 kGy, em todas as condições(LIO e CG; ⁶⁰Co e AE).

Alguns autores relataram em seus experimentos que o colágeno é mais lábil à radiação gama do que as BMPs (Dziedzic-Goclawska *et al*, 2005; Ijiri *et al*, 1994) e a atividade osteoindutiva é mantida em doses de radiação menores ou iguais que 25 kGy (Puolakkainen et al., 1993).

Existem estudos com resultados controversos sobre os efeitos da radiação gama no potencial osteoindutivo dos enxertos ósseos desmineralizados. Os autores, Urist (1967) e Munting (1988), concluíram que a osteoindução é totalmente inibida com doses de radiação gama superiores a 20 kGy. Os estudos se realizaram com a implantação de TODs nos músculos de ratos e coelhos. Porém todos os enxertos foram irradiados à temperatura ambiente o que pode explicar o comprometimento da qualidade dos tecidos.

Em contraste, outros autores (Dziedzic-Goclawska et al, 1991 e 2002; Wientroub & Reddi,1988; Glowacki, 2005) irradiaram os TODs com radiação gama em condições controladas de temperatura com o uso de gelo seco e obtiveram resultados promissores o que reforça a hipótese que os tecidos ósseos irradiados a baixas temperaturas são menos suscetíveis à radiação. Wientroub & Reddi (1988)

concluíram que uma dose padrão (25 kGy) de radiação gama não alterou o potencial osteoindutivo dos TODs implantados em músculo de rato e doses mais elevadas (30 a 50 kGy) até aumentou esta propriedade. Da mesma forma, Glowacki (2005) relatou que os TODs irradiados com doses de 20 kGy a 40 kGy mantiveram 80% da sua atividade osteoindutiva. Dziedzic-Goclawska em 2002 divulgou os resultados encontrados dos tecidos ósseos congelados a temperatura de -72°C e irradiados com doses de 35 kGy e 50 kGy, quando concluiu que não havia diferenças no potencial de osteoindução quando comparado ao tecidos ósseos não irradiados. Entretanto os tecidos preservados liofilizados e irradiados a temperatura ambiente nas mesmas doses, foram completamente reabsorvidos e perderam a capacidade de produzir a osteoindução.

Com os resultados obtidos dos efeitos da radiação ionizante na concentração das proteínas osteoindutoras, no presente estudo, conforme registrados na TABELAS 3 e 4 e FIGURA 30, constatamos a reduções significativas de BMP-2 em relação ao controle (não irradiado) somente nos grupos irradiados nas doses de 50 kGy (LIO 50 AE, CG 50 γ e CG 50 AE). As maiores reduções (acima de 32%) foram encontradas nos grupos irradiados por acelerador de elétrons. Nas doses de 15 e 25 kGy, em quaisquer das condições, não observamos variação dose dependente.

Os resultados da dosagem da BMP-7, conforme TABELAS 3 e 5 e FIGURA 31, evidenciam reduções significativas em relação aos respectivos controles em todos os grupos irradiados por acelerador de elétrons (LIO 15 AE, LIO 25 AE, LIO 50 AE, CG 15 AE, CG 25 AE, CG 50 AE) e no grupo congelado irradiado por radiação gama na dose de 50 kGy (CG 50 γ). Nos grupos onde a redução não foi significativa, pudemos observar uma tendencia a uma diminuição dose-dependente (de 7 a 18%).

Comparando os efeitos da radiação nos grupos liofilizados e congelados estudados, apesar de não serem estatisticamente significativos, os grupos congelados tiveram maior redução da concentração das proteínas totais (13,1 a 36,1%) e das BMP-2 (16,8 a 39,4%) e BMP-7 (10,1 a 52,6%) quando comparados aos grupos liofilizados (12,5 a 35,6%; 0,0 a 32,6%; 7,4 a 41,7, respectivamente). Esta evidência pode ser explicados pelos maiores efeitos biológicos indiretos da radiação ionizante nos tecidos que apresentam a maior presença de água, pela radiólise da mesma, gerando maiores quantidades de radicais livres e

consequentemente produzindo possíveis danos aos tecidos (Dziedzic-Goclawska *et al*, 2008).

Nas FIGURAS 32 e 33 observamos as concentrações de BMP-2 em relação às proteínas totais dosadas nos grupos irradiados e não irradiados. Notamos um aumento significativo na concentração médias de BMP-2 por grama de proteína na dose de 50 kGy por radiação gama nos grupos, congelado e liofilizado. Na FIGURA 34, notamos redução significativa na concentração médias de BMP-7 por grama de proteína no grupo liofilizado e irradiado na dose de 50 kGy e na FIGURA 35 houve redução significativa nas concentrações médias de BMP-7 por grama de proteína nas amostras dos grupos congelados e irradiados por feixe de elétrons nas doses de 15, 25 e 50 kGy. Este fato deve-se aos diferentes efeitos das radiações ionizantes nas concentrações de proteínas totais e nas proteínas específicas (BMPs 2 e 7).

Comparando o efeito da radiação nas BMP-2 e BMP-7 em relação ao efeito da radiação nas proteínas totais, podemos concluir que, nos grupos congelados e irradiados por feixe de elétrons, a BMP-7 foi mais radiosensível contribuindo para a redução da quantidade de proteínas totais integras, enquanto que as BMP-2 são mais resistentes à radiação, levando proporcionalmente a um aumento destas em relação às proteínas totais.

Portanto os efeitos da radiação ionizante em provocar danos aos enxertos ósseos dependem principalmente de dois fatores: (1) as condições da irradiação (dose de radiação, taxa de dose, tipo de radiação ionizante, temperatura de radiação); (2) o estado físico das amostras, principalmente na quantidade de água presente nos tecidos ósseos (Dziedzic-Goclawska *et al*, 2008).

Compete aos responsáveis pelos Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos a seleção das melhores condições da irradiação dos tecidos com a finalidade de evitar alterações significativas, que possam comprometer o sucesso do transplante ósseo.

Lembramos ainda que, embora as BMPs 2 e 7 irradiadas respondam às reações antígeno-anticorpo, se faz necessário, no futuro, verificar diretamente seu potencial osteoindutivo, por exemplo confirmando sua capacidade de diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos ou diretamente em estudos “in vivo” com o tecido irradiado.

7 CONCLUSÕES

O grau de desmineralização dos tecidos ósseos situou-se entre 85 a 90%.

Foram observadas alterações na estrutura do colágeno, tais como a estruturação do colágeno em folhas β desordenada e aumento da contribuição de voltas β , causadas pelo tratamento ácido (desmineralização) e pela preservação dos tecidos ósseos. Além do aumento da quantidade de estruturas tipo α hélice nas amostras irradiadas por radiação gama nas doses de 25 e 50 kGy, a desnaturação do colágeno apenas foi observada na dose de 50 kGy.

As reduções nas concentrações das proteínas ósseas totais nas amostras irradiadas foram dose dependentes e diminuições acima de 20% foram observadas somente na dose de 50 kGy em todas as condições.

A radiação ionizante em altas doses (50 kGy) causa reduções significativas, entre 32% a 53%, nas concentrações das proteínas osteoindutoras (BMP 2 e 7). Foi observado também que a radiação por feixe de elétrons provoca mais efeitos deletérios quando comparada a radiação gama, nas quantidades destas proteínas ósseas, entretanto estas condições não são usualmente aplicadas na esterilização dos tecidos biológicos para transplante.

Nas condições usuais de esterilização, ou seja, aplicando aos tecidos ósseos doses de 15 kGy a 25 kGy, utilizando raios gama, as reduções nas concentrações de proteínas osteoindutivas, BMP-2 e BMP-7, foram menores que 20%.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHO, A.J.; ESKOLA, J.; EKFORS, T.; MANNER, I.; KOURI, T.; HOLLMEN, T. Immune responses and clinical outcome of massive human osteoarticular allografts. **Clin Orthop Res**, v. 346, p. 196-206, 1998.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Biologia molecular da célula**. ed. n. 5, 2002.
- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osteointegration. **Eur Spine J**. v. 10, p. 96-101, 2001.
- ALIX, A.J.P.; PEDANOU, G.; BERJOT, M. Fast determination of the quantitative secondary structure of proteins by using some parameters of the Raman amide I band. **Journal of Molecular Structure**, v.174, p.159-164, 1988.
- AMATUZZI, M.M.; CROCI, A.T.; GIOVANI, A.M.M.; SANTOS, L.A.U. Banco de tecidos: estruturação e normatização. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v.35, n. 5, p. 165-172, 2000.
- AMER, M.S. Raman spectroscopy for soft matter applications. **John Wiley&Sons, Inc.** v. 1, n. 2, p. 11-14, 2009.
- ARANA CHAVES V.E.; SOARES A.M.V.; KATCHBURIAN E. Junctions between early developing osteoblasts of rat calvaria as revealed by freeze fracture and ultrathin section electron microscopy. **Arch Histol Cytol.**, 58: p.285-292, 1995.
- ASSAEL A.L.; FEINERMAN D.M. Lag screw technique for orbital floor reconstruction with autologous bone grafts. **J Oral Maxillofac Surg**. v.52:646-647, 1994.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS (ABTO). **Registro Brasileiro de Transplantes**. Ano XX; v. 4: p.15, 2014.
- BANDEKAR, J. Amide modes and protein conformation. **Biochim Biophys Acta**. v. 1120(2): p. 123-43, 1992.
- BAUER, T.W.; MUSCHLER, G.F. Bone graft materials. An overview of the basic science. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 371:p. 10-27, 2000.
- BLUM, B.; MOSELEY, J.; MILLER, L.; RICHELSON, K.; HAGGARD, W. Measurement of bone morphogenetic proteins and other growth factors in demineralized bone matrix. **Orthopedics**. v. 27: p.161–165, 2004.

BOABAID, F.; CERRI, P.S.; KATCHBURIAN, E. Apoptotic bone cells may be engulfed by osteoclasts during alveolar bone resorption in young rats. **Tissue Cell.** v. 33, p. 318-25, 2001.

BRASIL, lei nº 9.434, de 04 de fevereiro de 1997. Dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento para outras providências. **D.O.U. – Diário Oficial da União; Poder Executivo.** Disponível em <http://planalto.gov.br/ccivil03/leis/l9434.htm>. Acesso em: 02/03/2014.

BRASIL, lei nº 10.211, de 23 de março de 2001. Altera dispositivos da lei nº 9.434, de 04 de fevereiro de 1997 – dispõe sobre a remoção de órgãos, tecidos e partes do corpo humano para fins de transplante e tratamento para outras providências. **D.O.U. – Diário Oficial da União; Poder Executivo.** Disponível em <http://planalto.gov.br/ccivil03/leis/leis2001/l10211.htm>. Acesso em: 02/03/2014.

BRASIL, portaria nº lei nº 2.600, de 21 de outubro de 2009. Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes. Disponível em: <http://bvsms.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2009/prt260021102009.htm>. Acesso em: 02/03/2014.

BRASIL, Resolução Colegiada nº220, de 27 de dezembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos e de Bancos de Pele de origem humana. **D.O.U. – Diário Oficial da União; Poder Executivo.** Disponível em http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2006/rdc/220_06rdc.htm. Acesso em: 20/01/2014.

BURING, K.; URIST, R.M. Effects of ionizing radiation on the bone induction principle in the matrix of bone implants. **Clin Orthop.** v. 55, p. 225–234, 1967.

CALVO, W.A.P. Desenvolvimento do sistema de irradiação em um irradiador Multipropósito de Cobalto-60 tipo compacto. **Tese de doutorado**, 2005. Disponível: http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/Wilson%20Aparecido%20Parejo%20Calvo_D.pdf.

CAO, X.; CHEN, D. The BMP signaling and in vivo bone formation. **Gene.** p. 357: 1-8, 2005.

CERRI, P.S. Osteoblasts engulf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.**, v. 86:p. 833-840, 2005.

CHANG, H.; BROWN, C.W.; MATZUK, M.M. Genetics analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. **Endocr Rev.**, v. 23, n. 6, p. 787-823, 2002.

CHEN, D.; ZHAO, M.; MUNDY, G.R. Bone morphogenetic proteins. **Growth Factors**, v. 22 (4): p. 233–241, 2004.

COTRAM, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Ossos, articulações e tumores de partes moles. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1088-90, 2005.

CONWAY, B; TOMFORD W.W. Radiosensitivity of Human Immunodeficiency Virus Type I. *Clinical infections diseases*. v. 14, n. 4, p. 978-979, 1992.

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

BISWAS, D.; BIBLE, J.E.; WHAN, P.G.; MILLER, C. P.; JAW, R.; MILLER, S.; GRAUER, J.N. Augmented demineralized bone matrix: a potential alternative for posterolateral lumbar spinal fusion. **Am J Orthop**. v.39(11): p.531-538, 2010.

CARDEN, A.; MORRIS, M.D. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). **Journal of Biomedical Optics**. v. 5, n. 3, p. 259–268, 2000.

DIMITRIOU, R.; GIONNOUDIS, P.V. Discovery and development of BMPs. **Int J Care Injured**, v. 36, p. 28-33, 2005.

DOWNES A.; ELFICK A., Raman spectroscopy and related techniques in biomedicine, **Sensor**, v. 10, p. 1871–1889, 2010.

DROBNY, J.G. Ionizing Radiation and Polymers: Principles, Technology, and Applications. **Elsevier**, 1 ed., Estados Unidos, 2012.

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

DZIEDZIC-GOCLAWSKA, A.; KAMINSKI, A.; UHRYNOWSKA-TYSZKIEWICZ, I.; MICHALIK, J.; STACHOWICZ, W. Trends in radiation sterilization of health care products, International Atomic Energy Agency, Vienna. p. 231-256, 2008. Disponível: http://www.pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/Pub1313_web.pdf. Acesso em: 11/05/2014.

DZIEDZIC-GOCLAWSKA, A.; OSTROWSKI, K.; STACHOWICZ, W.; MICHALIK, J.; GRZESIK, W. Effect of radiation sterilization on the osteoinductive properties and the

rate of remodeling of bone implants preserved by lyophilization and deep-freezing. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 272:30-7, 1991.

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

DZIEDZIC-GOCLAWSKA, A.; STACHOWICZ, W., Sterilisation of tissue allografts, *Advances in Tissue Banking*, ***World Scientific, Singapore***. v. 1, p. 261–321, 1997.

DZIEDZIC-GOCLAWSKA, A. "Evaluation of the osteoinductive potential of preserved bone grafts", *Research Methodology in Orthopaedics and Reconstructive Surgery*. (Nather, A., Ed.), ***World Scientific, Singapore***. p. 263-281, 2002.

ELLIOTT, J.; HOLCOMB, D.; YOUNG, R. Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel, ***Calcif. Tissue Int.***, v. 37, p. 372–375, 1985.

FINKEMEIER, G.C. Current Concepts Review Bone-grafting and Bone-graft substitutes. ***J Bone Joint Surg***; 84-A:454-64, 2003.

GALLON, S.M. Estudo comparativo em enxerto ósseo autógeno em tíbia de coelho, realizado com laser de Er,Cr: YSGG ou com Brocas 701. Dissertação (mestrado). ***Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). USP, São Paulo***. 2006. Disponível em: <http://www.fo.usp.br/lelo/wp-content/uploads/150.pdf>. Acesso em: 12/04/2014.

GAZZERRO, E.; CANALIS E. ***Rev. Endocr. Metab. Disord.*** Bone morphogenetics proteins and their antagonists. v.7, p. 51–65, 2006.

GEIGER, M.; LI, R.H.; FRIESS, W. Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. ***Adv. Drug Deliv. Rev.*** v. 55 (12): p. 1613–1629, 2003.

GRIEB, T.A.; FORNG, R.Y.; STAFFORD, R.E.; LIN, J.; ALMEIDA, J.; BOGDANSKY, S.; RONHOLDT, C.; DROHAN, W.N.; BURGESS, W.E. Effective use of optimized, high-dose (50 kGy) gamma irradiation for pathogen inactivation of human bone allografts. ***Biomaterials***. May: v. 26(14): p. 2033-2042, 2005.

GLOWACKI, K.A. Hemiresection arthroplasty of the distal radioulnar joint. ***Hand Clin.***, v. 21p. 591-601, 2005.

HALLFELDT, K.K.J.; STUTZLE, H.; PUHLMANN, M.; KESSLER, S.; SCHWEIBERER, L. Sterilization of partially demineralized bone-matrix = the effects

of different sterilization techniques on osteogenetic properties. **J Surg Res.** v. 59, p.614–620, 1995.

HAN, B.; TANG, B.; NIMNI, M.E. Quantitative and sensitive in vitro assay for osteoinductive activity of demineralized bone matrix. **J Orthop Res.** v. 21(4): p.648-654, 2003.

HERSON, M.R.; MATHOR, M.B. Banco de Tecidos. In: GARCIA, V.D.; ABBUD, M.; NEUMANN, J.; PESTANA, J.O.M. **Transplantes de Órgãos e Tecidos**, 2. ed. São Paulo: Segmento Farma, Cap. 16, p.174-185, 2006.

HOGAN, B.L. Bone morphogenetic proteins: Multifunctional regulators of vertebrate development. **Genes. Dev.**, v. 10, p. 1580-1594, 1996.

IJIRI, S.; YAMAMURO, T.; NAKAMURA, T.; KOTANI S.; NOTOYA, K. Effect of sterilization on bone morphogenetic protein. **J Orthop Res.** v. 12, p. 628–636, 1994.

ISRAEL, D.I.; NOVE, J.; KERNS, K.M.; MOUTSATSOS, I.K.; KAUFMAN, R.F. Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. **Growth Factor.**, v. 7, p. 139-150, 1992.

ITOH, F.; ASAO, H.; SUGAMURA, K.; HELDIN, C.H.; DIJKE, P.; ITOH, S. Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads. **Embo J.** v. 20, p. 4132–4142, 2001.

JILKA, R.L.; WEINSTEIN, R.S.; BELLIDO, T.; PARFITT, A.M.; MANOLAGAS, S.C. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. **J Bone Miner Res.** p. 13:793-802, 1998.

JINNO, T.; MIRIC, A.; FEIGHAN, J.; KIRK, S.K.; DAVY, D.T.; STEVENSON, S. The effects of processing and low dose irradiation on cortical bone grafts. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.375, p. 275-285, 2000.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 111-128, 2004.

KATCHBURIAN, E. Membrane bound bodies as initiators of mineralization of dentine. **J Anat.**, p. 116:285-302, 1973.

KATCHBURIAN, E.; CERRI, P.S. Formação e destruição óssea. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. Cirurgia para implantes. São Paulo: **Artes Médicas**; p. 437-45, 2002.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Histologia e embriologia oral. **Texto atlas correlações clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

KINGSLEY, D.M. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. **Genes Dev.**, v.8, p.133-146, 1994.

KONTOYANNIS, C.G.; VAGENAS, N.V. FT-Raman Spectroscopy: a tool for monitoring the demineralization of bones. **Applied Spectroscopy**, v.54, p. 1605-1609, 2000.

KOZIELSKI, M.; BUCHWALD, T.; SZYBOWICZ, M.; BŁASZCZAK, Z.; PIORTOWSKI, A.; CIESIELCZYK, B. Determination of composition and structure of spongy bone tissue in human head of femur by Raman spectral mapping. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v.22, p. 1653–1661, 2011.

KUBISZ, L.; POLOMSKA, M. FT NIR Raman studies on gamma-irradiated bone. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.** v. 66, n. 3, p. 616-625, 2007.

LEE, M.B. Bone morphogenetic proteins: background and implications for oral reconstruction. *J. Clin. Periodont.*, v.24, p. 355-365, 1997.

LIEBERMAN, J.R.; DALUISKI, A.; EINHORN T.A. The role of growth factors in the repair of bone. **J. Bone Joint Surg. Am.** 84-A p. 1032–1044, 2002.

LONG M.W. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. **Blood Cells Mol. Dis.** v. 27, p. 677–690, 2001.

MACEDO, C.A.S. Comparação da resistência à compressão do osso bovino congelado e liofilizado. **Revista Brasileira de Ortopedia e Traumatologia**, v.34 , n.9, p. 529-534, 1999.

MACKIE, E.J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **Int J Biochem Cell Biol**, p. 35:1301-5, 2003.

MILLER, S.C.; JEE, W.S. The bone lining cell: a distinct phenotype? **Calcif Tissue Int.** v. 41, n. 1, p. 1-5, 1987.

MORRIS, M.D.; MANDAIR, G.S. Raman assessment of bone quality. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 469, n. 8, p. 2160-2169, 2011.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I.U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues, **Applied Spectroscopy Reviews**, v.42(5), p. 493-541, 2007.

MULLIKEN, J.B.; KABAN, L.B.; GLOWSACKI, J. Current research review - Induced osteogenesis - The biological concept and clinical application. **J. Surg. Res.**, v. 37:p. 487-496, 1984.

MUNTING, E.; WILMART, J.F.; WIJINE A.; HENNEBERT, P.; DELLOYE, C. Effect of sterilization on osteoinduction-comparison of 5 methods in demineralized rat bone. **Acta Orthop Scand** 59:34–38, 1988.

NGUYEN, H., MORGAN, D.A.F., FORWOOD, M.R. Sterilization of allograft bone: effects of gamma irradiation on allograft biology and biomechanics. **Cell and Tissue Banking**, v.8, n.2, p. 93-105, 2007.

NIKODEM, A.; DOBRZAŃSKI, Z. Influence of calcium content in feed phosphate on mechanical properties of bone tissue, **Eng. Biomater.**, v. 14. P. 109–111.

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

PARKER F.S., Application of infrared Raman and resonance Raman spectroscopy in biochemistry, **Plenum Press**, New York, 1983.

PEKKARINEN T, HIETALA O, JAMSA T, JALOVAARA P. Gamma irradiation and ethylene oxide in the sterilization of native reindeer bone morphogenetic protein extract. **Scandinavian Journal of Surgery**, v. 94: p. 67-70, 2005.

PENEL, G.; CAU, E.; DELFOSSE, C.; REY, CH.; HARDOUIN, P.; JEANFILS, J.; DELECOURT, CH.; LEMAITRE, J.; LEROY, G. Raman Microspectrometry Studies of Calcified Tissues and Related Biomaterials. **Raman Studies of Calcium Phosphate Biomaterials, Dent. Med. Probl.** v.40, 1, p. 37–43, 2003.

PIETRZAK W S, ALI S N, CHITTURI D, JACOB M, WOODSELL-MAY J E. BMP depletion occurs during prolonged acid demineralization of bone: characterization and implications for graft preparation. **Cell and Tissue Banking**, v.12:81-88, 2011.

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

PUOLAKKAINEN, P.A.; RANCHALIS J.E.; STRONG D.M.; TWARDZIK D.R. The effect of sterilization on transforming growth-factor-beta isolated from demineralized human bone. **Transfusion**. v. 33, p. 679–685, 1993

RAIZS LG, RODAN GA. Embriology and cellular biology of bone. In: Avioli LV, Krane SM. Metabolic bone diseases and clinically related disorders. San Diego: **Academic Press**, p. 1-22, 1998.

REDDI, A.H.; CUNNINGHAM, N.S. Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetics proteins. **J. Bone. Miner. Res.**, v. 8, p. S499-S502, 1993.

RIPAMONTI, U.; VAN DEN HEEVER, B.; SAMPATH, T.K.; TUCKER, M.M.; RUEGER, D.C.; REDDI, A.H. Complete regeneration of bone in the baboon by recombinant human osteogenic protein-1 (rhOP-1, bone morphogenetic protein-7). **Growth Factors**. v.13, p. 273–289, 1996.

ROSEN, V.; COX, K.; HATTERSLEY, G. Bone morphogenetic proteins. **Principles of bone biology**. San Diego: Academic; p. 661-671, 1996.

ROOS, M.V.; CAMISA JR. A.; MICHELIN, A.F. Procedimentos de um banco de ossos e a aplicabilidade dos enxertos por ele proporcionados. **Acta Ortopédica Brasileira**. v.8, n.3, p. 122-127, 2000.

RUSSELL, A.D. Radiation sterilization. Ionising radiation, Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization (RUSSELL, A.D., HUGO, W.B., AYLIFFE, G.A.J., Eds), **Blackwell Science**. 3rd edn, p. 675–687, 1999.

SASSO, R.C.; LEHUEC, J.C.; SHAFFREY, C. Iliac crest bone graft donor site pain after anterior lumbar interbody fusion: a prospective patient satisfaction outcome assessment. **J. Spinal Disord Tech**. v. 18, p. 77-81, 2005.

SILVA JUNIOR, A.N; SOMACAL T.P.; QUESADA G.; BELTRÃO G.C. Tratamento cirúrgico avançado na reconstrução de defeito ósseo maxilar utilizando enxerto autógeno de mandíbula. **Rev Bras Cirurg Implant**; 8(31):207-210, 2001.

SMITH D.M.; RUSSEL R.G.G.; WOODS C.G. Myositis ossificans progressiva. Clinical features of eight patients and their response to treatment. **J. Bone Joint Surg** v. 58, p. 48-57, 1976.

SMITH, R.; REHMAN, I. Fourier transform Raman spectroscopic studies of human bone. **J. Mater. Sci: Mater. Med**. v. 5, p. 775–778, 1995.

SODEK, J.; MCKEE, M.E. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology**. p. 99-126, 2000.

STACHOWICZ, W.; BURLINSKA, G.; MICHALIK, J.; Dziedzic-Goclawska, A.; Ostrowski, K. The role of long lived EPR active species produced by ionizing radiation in biological materials as used in medical, dosimetric, and agricultural studies, **Nukleonika**. v. 38, p. 67–82, 1993.

STRONG, D.M. The US Navy Tissue Bank: 50 Years on the Cutting Edge. **Cell Tissue Banking**. v.1(1):9-16, 2000.

SYLWIA, O.J.; MARLENA, G.G.; KATARZYNA, S.M.; MAŁGORZATA, K.; WOJCIECH, W.; CELINA, P.; SYLWIA, S.; MAGDALENA, K. Spectroscopic techniques in the study of human tissues and their components. Part II: Raman spectroscopy. **Acta of Bioengineering and Biomechanics Review article** v. 14, n. 4, 2012.

TASSI, R.; BONADIO, F.; STORRER, C.M. Aumento do rebordo alveolar com enxerto ósseo: Relato de caso. **Revista Dens**, v.15, n.2, p.88, 2007.

TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **J Periodontal Res**. v. 40:287-293, 2005.

TOMFORD, W.W; STARKWEATHER, R.J.; GOLDMAN, M.H. A study of the clinical incidence of infection in the use of banked allograft bone. **J Bone Joint Surg Am**. v.63, p.244-8, 1981.

URIST M.R. Bone formation by autoinduction. **Science**, Washington, v.150, p.893-899, 1965.

URIST MR, HUO YK, BROWNELL AG, HOHL WM, BUYSKE J, LIETZE A, et al. Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 81, p. 371-475, 1984.

URIST, M.R.; STRAT, B.S. Bone morphogenetic protein. **J. Dent. Res.**, v. 50, p.1392-1406, 1971.

VACCARO A.R.; WHANG, P.G.; PATEL, T.; PHILLIPS F.M.; ANDERSON D.G.; ALBERT T.J.; HILIBRAND A.S.; BROWER R.S.; KURD, M.F.; APPANNAGARI, A.; PATEL M.; FISCHGRUND J.S. The safety and efficacy of OP-1 (rhBMP-7) as a replacement for iliac crest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis: minimum 4-year follow-up of a pilot study. **Spine J**. v. 8, p. 457–465, 2008.

VAN DE PUTTE, K.A.; URIST M.R. Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of descalcified bone matrix. **Clin. Orthop.**, v 43, p.257- 270, 1996.

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

VIROLAINEN, P., HEIKKILA, J., HIRN, M., ARO, H.T., AHO, A.J. 30 years of bone banking at Turku bone bank. **Cell Tissue Banking**, v.4, p. 43-48, 2003.

VITTI U.A., HSU S.Y., HSUEH A.J.W. Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. **Mol. Endocrinol.**, v.15, p.681-694, 2001.

WEIGEL, J. P. Enxerto ósseo. In: BOJRAB, M. J. Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais. São Paulo: **Manole**, 98, p. 791-798, 1996.

WIENTROUB, S.; REDDI, H.A. Influence of irradiation on the osteoinductive potential of demineralized bone matrix calcif. **Tissue Int.** v. 42, p. 255–260, 1988.

WILDEMANN, B.; KADOW-ROMACKER, A.; PRUSS, A.; HAAS, N.P.; SCHMIDMAIER, G. Quantification of growth factors in allogenic bone grafts extracted with three different methods. **Cell Tissue Banking.** 8:107-114, 2007.

WORDINGER, R.J.; CLARK, A.F. Bone morphogenetic proteins and their receptors in the eye. **Exp. Biol. Med.** v. 232, p. 979–992, 2007.

WOZNEY, J.M.; ROSEN, V.; BYRNE, M.; CELESTE, A.J.; MOUTSATSOS, I.; WANG, E.A. Growth factors influencing bone development. **J. Cell. Sci.**, v. 13, p. 149-156, 1990.

YAMAMOTO, T.; UCHIDA, K.; NARUSE, K.; SUTO, M.; URABE, K.; UCHIYAMA, K.; SUTO, K.; MORIYA, M.; ITOMAN, M.; TAKASO, M. Quality assessment for processed and sterilized bone using Raman spectroscopy. **Cell Tissue Banking.** v.13, p. 409–414, 2012.

YERRAMSHETTY, J.S.; AKKUS, O. The associations between mineral crystallinity and the mechanical properties of human cortical bone. **Bone.** v. 42, p. 476–482, 2008.

ANEXO 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICÓRDIA DE SÃO
PAULO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo dos efeitos da radiação ionizante nas concentrações de proteínas morfogênicas presentes em ossos humanos desmineralizados, liofilizados e congelados.

Pesquisador: URI ANTEBI

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 07957312.9.0000.5479

Instituição Proponente: FUNDACAO ARNALDO VIEIRA DE CARVALHO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 158.573

Data da Relatoria: 28/11/2012

Apresentação do Projeto:

Estudo comparativo entre os efeitos da radiação ionizante nas concentrações das BMPs 2 e 7 dos tecidos mineralizados e desmineralizado, buscando observar a diminuição das concentrações das BMPs, proporcionalmente ao aumento das doses de irradiação ionizantes empregadas em amostras de tecido esquelético (femural) armazenadas em banco de tecidos.

Objetivo da Pesquisa:

Descrever a influência de doses variáveis de irradiação ionizantes sobre as concentrações das BMPs.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

sem risco

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

pesquisa de interesse prático e sem risco adicional.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Justificativa adequada para isenção de TCLE

Orçamento a ser submetido à FAPESP

Recomendações:

ndn

Endereço: SANTA ISABEL

Bairro: VILA BUARQUE

CEP: 01.221-010

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: 1111-7676

Fax: 1111-7676

E-mail: eticamedbemadete@santacasasp.org.br

**IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICÓRDIA DE SÃO
PAULO**

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

sem pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 29 de Novembro de 2012

Assinador por:
Nelson Keiske Ono
(Coordenador)

ANEXO 2 - Segmento da Resolução da Diretoria Colegiada nº 220, publicada em 27 de dezembro de 2006, referente a disponibilização e utilização de tecidos musculoesqueléticos para pesquisa.

Nº 249, sexta-feira, 29 de dezembro de 2006

Diário Oficial da União - Seção 1

ISSN 1677-7042

613

142. Os tecidos devem ser transportados em recipientes térmicos, exclusivos para esta finalidade, identificados com o nome e endereço do BTME/BP.

143. Os recipientes térmicos devem garantir a manutenção de temperatura de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ positivos até sua chegada no BTME/BP.

144. O BTME/BP deve apresentar registros da validação de cada recipiente térmico utilizado no transporte, levando em conta as variações climáticas.

15. Recepção dos Tecidos no BTME/BP

15.1. Deve ser realizada conferência da documentação e registro das condições de embalagem dos tecidos recebidos.

15.2. Deve ser realizado registro de entrada dos tecidos, com identificação que permita a rastreabilidade do doador.

15.3. Os tecidos podem ser armazenados na sala de recepção por no máximo 72 (setenta e duas) horas, se previsto em protocolo, em equipamentos (congeladores de 20°C negativos/ refrigeradores de $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) adequados e exclusivos para a preservação dos tecidos, até sua transferência para a sala de processamento ou para sala de armazenamento, onde deverão ser armazenados em equipamentos identificados para guarda de tecidos não liberados.

16. Processamento

16.1. Os métodos utilizados pelo BTME/BP para o processamento dos vários tecidos musculoesqueléticos e cutâneos devem estar baseados em experiência nacional ou internacional documentada em literatura e descritas em POPs.

16.2. Novos métodos de processamento devem ter sua eficácia devidamente comprovada "in vitro" e "in vivo" no sentido de conferir aos materiais as características desejadas para a sua utilização.

16.3. Não é permitido o processamento simultâneo de tecidos de mais de um doador na mesma sala de processamento.

16.4. Não é permitido o processamento simultâneo de diferentes tecidos do mesmo doador em um mesmo ambiente de processamento.

16.5. As unidades de tecido produzidas devem ser identificadas de forma a garantir a sua rastreabilidade.

16.6. O processamento deve ser realizado em ambiente controlado e classificado de acordo com o item 7.1.4. Durante todo o processamento, os tecidos devem estar expostos, exclusivamente, a ambiente ISO classe 5 (NBR/ISO 14644-4 da ABNT).

16.7. O liofilizador deve estar em ambiente ISO classe 7, de acordo com norma NBR/ISO 14644-4 da ABNT. O teor de água residual deverá ser determinado e validado, não ultrapassando 6% do peso inicial estabelecido por análise de gravimetria ou análise de Karl Fischer ou 8% por espectrometria de ressonância magnética.

16.7.1. A embalagem deve assegurar este teor de unidade durante a validade do produto para distribuição.

16.7.2. A esterilidade dos tecidos após a liofilização e antes da liberação para distribuição deve ser garantida por processo validado de esterilização complementar.

16.8. Todas as etapas de processamento que precedem a colocação dos tecidos no liofilizador, e o fracionamento e a embalagem devem ser realizados em ambiente classificado como ISO classe 5 (NBR/ISO 14644-4 da ABNT).

16.9. Todas as etapas e lotes de insumos utilizados no processamento devem ser registrados em formulários identificados e anexados à documentação do doador.

16.10. Todos os materiais utilizados e que mantêm contato com os tecidos, devem ser estéreis, apirrogênicos e atóxicos, devendo ser registrados a respectiva origem e o número da unidade.

17. Controles microbiológicos dos tecidos

17.1. O BTME/BP deve possuir protocolos de controle microbiológico dos tecidos que permitam garantir sua qualidade no momento da sua liberação.

17.2. Esse controle deve ser feito, no mínimo, em amostras (fragmentos, esfregões ou lavados) coletados no momento da retirada dos tecidos, antes da exposição a agentes antimicrobianos, conforme item 12.1.5, e quando de sua última manipulação, no momento da embalagem final pré-distribuição.

17.3. Os exames microbiológicos devem investigar a presença de patógenos aeróbios, anaeróbios e fúngicos, em tecidos musculoesqueléticos e em tecidos cutâneos.

17.4. Os resultados dos exames microbiológicos devem ser analisados pelo responsável técnico do banco, que avaliará se o microrganismo possui patogenicidade que inviabilize seu processamento, a sua liberação imediata para uso terapêutico, a necessidade da realização de esterilização complementar ou o descarte do tecido.

17.5. Se o tecido for liofilizado já na embalagem para distribuição, deve ser feito, por amostragem, exame microbiológico para excluir a ocorrência de contaminação por patógenos aeróbios, anaeróbios e fúngicos após o procedimento ou após a esterilização terminal complementar, quando realizada, dentro do nível de segurança (SAL) 10^{-4} .

18. Embalagem Pós-Processamento

18.1. Não é permitida a embalagem de tecidos provenientes de mais de um doador em uma mesma embalagem.

18.2. Não é permitida a embalagem conjunta de diferentes tecidos de um mesmo doador.

18.3. A embalagem deve ser realizada dentro do espaço privativo do banco, em ambiente controlado e classificado como ISO classe 5 (NBR/ISO 14644-4 da ABNT).

18.4. Os procedimentos devem ser documentados, e as embalagens das unidades de tecidos produzidos devem ser rotuladas permitindo sua identificação e rastreabilidade. Esta identificação deve ser anexada à documentação do doador.

18.5. As peças devem ser acondicionadas em embalagens que assegurem a integridade e a esterilidade de seu conteúdo e que não ofereçam risco de liberação de substâncias citotóxicas ou pirogênicas do material da embalagem para o produto.

18.6. As peças ósseas devem ser acondicionadas em embalagens plásticas, triplas, estéreis, adequadas para o armazenamento dos tecidos até seu uso, ou embalagem primária de vidro estéril e secundária de plástico estéril, ou única, de vidro estéril lacrado.

18.7. Os tecidos moles e pele devem ser acondicionados em embalagens plásticas, duplas, estéreis adequadas para o armazenamento dos tecidos até seu uso, ou embalagem primária de vidro estéril, com secundária de plástico estéril.

18.8. As unidades para distribuição devem portar rótulo que mantenha sua integridade durante o procedimento de armazenamento e liberação, contendo obrigatoriamente as seguintes informações:

a) Nome, endereço e telefone de contato do BTME/BP;

b) Código alfa-numérico, único, de identificação da unidade de tecido;

c) Tipo de tecido (p. ex. pele, osso, cartilagem);

d) Tipo de processamento (p. ex. fresco, congelado, criopreservado, liofilizado, em glicol, etc);

e) Medida em área, massa, gramas ou medidas lineares para osso, área ou medidas lineares para pele ou fascias;

f) Apresentação (grânulos, moído, em cubos);

g) Data de validade (dia, mês e ano);

h) Condições para armazenamento;

i) Produto liberado para uso em humanos;

j) Possíveis resíduos de produtos químicos utilizados no processamento e que possam desencadear reações adversas;

k) Informação sobre tipo de esterilização complementar e prazo de validade.

18.8.1. Informar em rótulo adicional quando tecido for destinado à pesquisa ou ensino.

19. Exame radiológico

19.1. Os segmentos osteoarticulares e ossos longos mantidos como tal para utilização terapêutica devem ser submetidos a exames de imagem para mensuração e diagnóstico de anomalias estruturais.

19.2. Estes exames devem ser arquivados fisicamente ou em formato digital até a distribuição dos tecidos. Os registros (ex. laudos, descrições) devem ficar arquivados no prontuário do doador por no mínimo 20 (vinte) anos após seu uso terapêutico.

19.3. O transporte para realização do exame radiológico é de responsabilidade do BTME, e deve seguir as mesmas exigências para a disponibilização dos tecidos, no item 24.1.

20. Esterilização Complementar

20.1. O BTME/BP pode utilizar técnicas de esterilização complementar por métodos físicos (p. ex.: calor úmido e radioesterilização) descritos em POPs, e baseados em experiência nacional e internacional documentada na literatura.

20.2. A dose de radioesterilização deve ser certificada pelo centro irradiador para a proposta de esterilização SAL 10^{-6} ("sterility assurance level") - norma ISO 11.137/2006. Durante a irradiação os tecidos devem manter a temperatura de armazenamento.

20.3. O processo de esterilização deve ser documentado e ter sua eficácia comprovada por indicadores biológicos e testes microbiológicos.

20.4. O transporte para a esterilização complementar é de responsabilidade do BTME/BP, e deve seguir as mesmas exigências para o acondicionamento dos tecidos, como descrito no item 24.1.

21. Armazenamento

21.1. A forma de armazenamento deve ser definida em POPs baseados em experiência nacional, internacional e validada pelo banco.

21.2. Os tecidos criopreservados, com ou sem criopreservantes, em quarentena, ou processados e não liberados para uso, devem ser armazenados em ultracongeladores identificados como "TECIDOS NÃO LIBERADOS PARA USO", e que atinjam temperaturas inferiores ou iguais a 70°C negativos.

21.3. Os tecidos criopreservados, com ou sem criopreservantes, liberados para uso devem ser armazenados em ultracongeladores identificados como "TECIDOS LIBERADOS", e que atinjam temperaturas inferiores ou iguais a 70°C negativos.

21.4. Os tecidos refrigerados, em quarentena ou processados mas não liberados para uso, devem ser armazenados em refrigerador identificado como "TECIDOS NÃO LIBERADOS" que atinja temperaturas de $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

21.5. Os tecidos refrigerados liberados para uso, devem ser armazenados em refrigerador identificado como "TECIDOS LIBERADOS" que atinja temperaturas de $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

21.6. Caso sejam armazenados tecidos para uso autólogo, estes devem ser armazenados em refrigeradores/ultracongeladores específicos para "TECIDOS NÃO LIBERADOS", devendo ficar em compartimento específico para esta finalidade.

21.7. O BTME/BP deve dispor de sistema seguro de registro, que permita a localização, de forma ágil, dos tecidos dentro dos ultracongeladores e dos refrigeradores.

22. Tempo de armazenamento de tecidos processados

22.1. Tecidos refrigerados (cartilagens, meniscos, osteocondrais e pele) a temperatura de $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, mantidos em meio nutritivo, devem ser armazenados por um período máximo de até 14 (quatorze) dias.

22.2. Tecidos refrigerados a temperatura de $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, conservados em glicol, devem ser armazenados por um período máximo de até 2 (dois) anos.

22.3. Tecidos moles criopreservados a temperatura máxima de 70°C negativos devem ser armazenados por um período máximo de 2 (dois) anos.

22.4. Tecidos ósseos criopreservados a temperatura máxima de 70°C negativos devem ser armazenados por um período máximo de 5 (cinco) anos.

22.5. Tecidos liofilizados, embalados à vácuo, mantidos em temperatura ambiente devem ser armazenados por no máximo 5 (cinco) anos, caso o vácuo não possa ser garantido, este período deve ser reduzido para 2 (dois) anos.

23. Disponibilização dos tecidos

23.1. Os tecidos somente serão disponibilizados para uso terapêutico com solicitação documentada do profissional transplantador autorizado pelo CGSNT contendo informações sobre o receptor que permita a rastreabilidade, nome do profissional transplantador (nome completo, especialidade, endereço e telefone de contato), características e quantidade de tecido, procedimento a ser realizado, local onde será realizado o procedimento, data prevista para utilização do tecido.

23.2. Os tecidos somente serão disponibilizados para pesquisa com solicitação documentada do pesquisador que o utilizará, que deve apresentar documento que comprove a aprovação do projeto de pesquisa por comitê de ética em pesquisa, e que contenha seus dados (nome completo, RG, endereço, telefone, vínculo acadêmico ou profissional), local onde será realizado o projeto, características e quantidade do tecido solicitado, data prevista para utilização dos tecidos, e declaração do pesquisador reconhecendo a impossibilidade de uso destes tecidos para pesquisa clínica em humanos.

23.3. Os tecidos somente serão disponibilizados para ensino com solicitação documentada da instituição que o utilizará, contendo seus dados (nome da instituição, CGC, endereço, telefone), características e quantidade do tecido solicitado, data prevista para utilização dos tecidos e declaração do responsável reconhecendo a impossibilidade de uso destes tecidos para finalidade terapêutica em humanos.

23.4. Deve ser acompanhada de instruções técnicas, com informações que complementem as contidas no rótulo da unidade de tecido, e que sejam consideradas importantes pelo BTME/BP para a manutenção da qualidade e utilização do tecido, tais como:

a) utilização de cada unidade de tecido em apenas um receptor e uma única vez em um único procedimento ou unicamente no projeto de pesquisa para o qual o material foi solicitado;

b) informações de como o tecido deve ser armazenado e/ou manipulado antes da sua utilização;

c) instruções especiais sobre sua utilização;

d) informações sobre os possíveis riscos biológicos presentes no material (por exemplo: contaminantes e contato com alérgenos);

e) alerta para a obrigatoriedade de informar ao banco e órgãos competentes sobre a ocorrência de reações adversas após seu uso;

f) informações sobre a necessidade do descarte do tecido de acordo com legislação vigente, caso o tecido enviado não seja transplantado total ou parcialmente, ou utilizado total ou parcialmente no projeto de pesquisa ou ensino para o qual foi solicitado. Deve ser enviado ao banco um relatório comunicando o fato, acompanhado de justificativa.

24. Acondicionamento e transporte do BTME/BP para o serviço que utilizará os tecidos

24.1. O BTME/BP fica responsável em acondicionar os tecidos em recipientes térmicos que assegurem o trânsito dos materiais em temperaturas adequadas por um período de 24 horas além do tempo estimado para a chegada do material até o local de destino.

24.2. O transporte até o local de utilização deve ser realizado de forma a garantir a qualidade e integridade do tecido e de seus derivados.

24.3. O armazenamento adequado do tecido até o seu uso deve ser realizado de maneira a assegurar sua integridade e qualidade, sendo de responsabilidade do profissional que o utilizará.

24.4. Os tecidos distribuídos não podem ser re-armazenados ou destinados a uso terapêutico em outro receptor, bem como ao uso em projetos de pesquisa ou ensino, devendo ser descartados.

25. Controle de Qualidade

25.1. O BTME/BP deve desenvolver um programa de controle de qualidade dos tecidos que inclua entre outros, um manual de qualidade, critérios de aceite ou exclusão de doadores de tecidos específicos, registros completos desde a entrevista até a distribuição dos tecidos, manuais de procedimentos, propostas de monitoração ambiental, das temperaturas de ultracongeladores e refrigeradores, da manutenção de equipamentos, dos insumos utilizados, registros de efeitos adversos, descarte de materiais impróprios para uso, instruções de procedimentos corretivos de emergência bem como monitorar a presença de patógenos nos tecidos processados e embalados previamente à sua liberação para uso.

25.2. Todo tecido disponibilizado ou descartado deve ter registro lógico que possibilite seu rastreamento a qualquer momento.

25.3. Deve existir sistema de notificação aos órgãos competentes para a ocorrência de efeitos adversos após o uso terapêutico.

26. Descarte de resíduos

26.1. Os resíduos de processamento e os tecidos com prazo de validade vencido ou impróprios para uso devem ser descartados de acordo com a legislação que regulamenta o descarte de resíduos de serviços de saúde.

26.2. O BTME/BP deve ter um Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (PGRSS), de acordo com a legislação vigente.

27. Registros

27.1. O BTME/BP deve ter um sistema de registro apropriado que permita a rastreabilidade do tecido, desde o doador até o seu destino final, incluindo-se a identificação do receptor e os resultados dos exames referentes a cada produto.

ANEXO 3 - Segmento da Portaria nº 2.600, publicada em 21 de outubro de 2009, referente a disponibilização e utilização de tecidos musculoesqueléticos para pesquisa.

4.20.5. A temperatura dos ultracongeladores e refrigeradores deve ser registrada no mínimo duas vezes ao dia, com intervalo máximo de duas horas entre os registros.

4.21. Armazenamento conforme o tipo de processamento

4.21.1. Tecidos congelados ou criopreservados a temperatura máxima de 70°C negativos podem ser armazenados por um período máximo de 5 (cinco) anos.

4.21.2. Tecidos liofilizados, embalados a vácuo, mantidos em temperatura ambiente ou refrigerados, podem ser armazenados por um período máximo de 5 (cinco) anos. Caso a eficiência do vácuo não possa ser assegurada, este período deve ser reduzido para 2 (dois) anos.

4.22. Eutocagem de Tecidos Processados e Liberados:

4.22.1. Os tendões e fálcias devem ser ultracongelados a 80°C negativos por período de no máximo 2 anos.

4.22.2. Os tendões podem ser eutocados a 80°C negativos com viabilidade de no máximo 2 anos, liofilizado com prazo de validade de 5 anos ou a 4°C (+/- 2°) com meio de cultivo por período de 5 dias.

4.22.3. Os tecidos ósteo-condrais processados e refrigerados devem ser eutocados em refrigeradores a 4°C (+/- 2°) Celsius em prazo máximo de trinta dias (em meio que permita manter certa viabilidade de condrito).

4.22.4. Os tecidos ósseos devem ser armazenados a temperatura igual ou inferior a 80°C negativos por período máximo de 5 anos. Caso a temperatura de armazenamento seja entre 20° e 40° C negativos, o tempo de armazenamento deve ser de no máximo 6 meses. Quando de temperatura transitória por período inferior a 12 horas não inviabiliza os tecidos ósseos.

4.22.5. Os tecidos ósseos liofilizados podem ser armazenados em frascos de vidro hermeticamente fechados a temperatura ambiente por período de 5 anos.

5. DISPONIBILIZAÇÃO DOS TECIDOS MUSCULOESQUELÉTICOS:

5.1. Deve existir um programa de controle de qualidade em passo que assegure a comprovação nos registros a ausência de patógenos nos tecidos processados e embalados previamente à sua liberação.

5.1.2. Os tecidos musculoesqueléticos e seus derivados serão distribuídos para transplante somente com solicitação documentada do profissional transplantador autorizado pela Coordenação do SNT, que contém informações sobre o receptor (nome completo, sexo, nome da mãe, endereço, data de nascimento, CPF) e informações sobre o profissional transplantador (nome completo, especialidade, endereço e telefone de contato), características e quantidade de tecido, indicação terapêutica e procedimento a ser realizado, local onde será realizado o procedimento e data prevista.

5.1.3. Os tecidos musculoesqueléticos e seus derivados serão distribuídos para pesquisa somente se não houver demanda assistencial.

5.1.4. Havendo solicitação documentada do pesquisador, que contenha seus dados (nome completo, RG, endereço e telefone, vínculo acadêmico ou profissional), local onde será realizado o projeto, características e quantidade dos tecidos solicitados, nome dos pacientes em que os tecidos serão utilizados, quando se aplicar, data prevista para a utilização dos tecidos, objeto do parecer favorável do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da instituição e declaração do Pesquisador Responsável reconhecendo a responsabilidade de uso dentro dos limites estabelecidos no projeto de pesquisa aprovado pelo CEP.

5.2. O transporte até o local de utilização deve ser realizado de maneira a assegurar sua integridade e qualidade.

5.2.1. O transporte dos tecidos processados é de responsabilidade do Banco.

5.2.2. Os tecidos, depois de acondicionados, devem ser considerados viáveis se transportados em recipientes térmicos que assegurem as temperaturas desejadas durante o período de transporte.

5.2.3. Os tecidos disponibilizados não utilizados não podem ser reentocados, devendo ser descartados.

5.2.4. É de responsabilidade da equipe transplantadora a notificação completa ao Banco até 15 (quinze) dias após o transplante, de todas as informações relativas ao receptor.

5.2.5. É de responsabilidade do Banco, antes dos dados ao registro e prontuário do doador e comunicá-los à CNCD e VISA local em relatório mensal.

6. ACONDICIONAMENTO E TRANSPORTE DOS TECIDOS DO BANCÃO ATÉ O TRANSPLANTADOR OU PESQUISADOR QUE UTILIZARÁ OS TECIDOS:

6.1. O Banco é responsável em acondicionar os tecidos em recipientes térmicos que assegurem o trânsito dos materiais em temperaturas adequadas por um período de 24(vinte e quatro) horas além do tempo estimado para a chegada do material até o local de destino.

6.2. O transporte até o local de utilização e armazenamento adequado até o uso deve ser realizado de maneira a assegurar sua integridade e qualidade, sendo de responsabilidade do profissional transplantador ou pesquisador.

7. CONTROLE DE QUALIDADE:

7.1. Banco deve desenvolver um programa de controle de qualidade dos tecidos musculoesqueléticos que inclua entre outros, um manual de qualidade, critérios de aceitação ou exclusão de doadores de tecido específicos, registros completos desde a entrevista até a distribuição dos tecidos, manuais de procedimentos, propostas de monitoramento ambiental, das temperaturas de ultra-congeladores e refrigeradores, da manutenção de equipamentos, dos insumos utilizados, efeitos adversos, sistemas de recebimento e descarte de materiais impróprios para uso.

7.1.1. Todo tecido musculoesquelético transplantado deve ter registro lógico que possibilite seu rastreamento a qualquer momento.

7.1.2. Deve existir sistema de notificação à CNCD/SNT para ocorrência de efeitos adversos após o transplante.

8. DESCARTES DE RESÍDUOS:

8.1. Os resíduos de processamento e os tecidos com prazo de validade vencido ou impróprios para uso por exames laboratoriais devem ser descartados de acordo com a legislação vigente para descarte de resíduos de serviços de saúde.

8.2. O Banco de Tecido Musculoesquelético deve ter um Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (PGRSS), de acordo com a legislação vigente.

8.3. Os tecidos musculoesqueléticos invalidados por exames laboratoriais e radiológicos com prazo de validade vencido devem ser descartados de acordo com as normas vigentes referentes ao lixo hospitalar.

9. REGISTROS:

9.1. Prontuário do Doador:

O Banco deve manter disponíveis na forma de Prontuário do Doador todos os registros de dados de identificação e técnicos do doador, dos tecidos e do receptor por um período mínimo de 20 (vinte) anos, gerando assim sua rastreabilidade, com arquivos dos registros relativos a:

9.1.1. Dados do (a) doador(a).

9.1.2. Ficha de consentimento livre e esclarecido assinado pelo (a) doador (a) ou seu responsável legal.

9.1.3. Dados da retirada dos tecidos e transporte dos tecidos ao Banco.

9.1.4. Registros do processamento, incluindo a identificação numérica ou alfa-numérica dos lotes e itens gerados.

9.1.5. Resultados de testes laboratoriais referentes ao doador e à microbiologia dos tecidos.

9.2. Motivo e data de descarte de tecidos pré-distribuição, quando houver.

9.3. Dados da distribuição para transplante clínico ou pesquisa, incluindo:

9.3.1. Data(s) da distribuição.

9.3.2. Nome completo do receptor e identificação dos lote(s) / item(s) a ele enviados.

9.3.3. Nome completo do médico transplantador responsável.

9.3.4. Local e data do transplante.

9.3.5. Indicação médica para utilização e procedimento realizado.

9.3.6. Nome completo do pesquisador (quando aplicável).

9.3.7. Local e data da utilização em pesquisa (quando aplicável).

9.3.8. Cópia do Projeto e de sua aprovação em Comitê de Ética e Pesquisa (quando aplicável).

9.3.9. Data e motivo do descarte do lote/itens de tecidos, quando ocorrer.

9.3.10. Os dados podem ser mantidos por meio de meio eletrônico e armazenados com cópias de segurança, em sistemas com proteção contra fraudes ou alterações de dados e garantia de inviolabilidade, conforme resolução do ICP-Brasil.

9.4. Livro de registro de entrada de tecidos:

9.4.1. Deve haver livro de Registro de Entrada de Doadores, contendo no mínimo:

9.4.2. Identificação do doador (nome completo, sexo, idade e RG).

9.4.3. Identificação numérica ou alfa-numérica do doador, conferida pelo Banco e pela CNCD.

9.4.4. Data da retirada.

9.4.5. Instituição local onde foi feita a retirada.

9.5. Livro de registro de saída de tecidos para transplantes clínicos:

9.5.1. Deve haver livro de registro de saída para transplantes clínicos contendo:

9.5.1.1. Data da distribuição.

9.5.1.2. Identificação numérica ou alfa-numérica da unidade de tecido distribuído;

9.5.1.3. Identificação do receptor (nome completo, sexo, idade e RG).

9.5.1.4. Nome do profissional transplantador.

9.5.1.5. Instituição onde será realizado o transplante.

9.5.1.6. Indicação terapêutica e procedimento a ser realizado.

9.5.1.7. Data prevista para utilização do tecido.

9.5.1.8. Descarte do tecido e justificativa.

9.6. Livro de registro de saída de tecidos para pesquisa ou ensino:

9.6.1. Deve haver livro de registro de distribuição para pesquisa e ensino, contendo:

9.6.1.1. Data da distribuição.

9.6.1.2. Identificação numérica ou alfa-numérica da(s) unidade(s) de tecido distribuído.

9.6.1.3. Nome do pesquisador responsável.

9.6.1.4. Instituição onde será realizada a pesquisa ou projeto de ensino.

9.6.1.5. Nome do Projeto.

9.6.1.6. Data prevista para utilização do tecido.

9.6.1.7. Descarte do tecido e justificativa.

9.6.2. A comunicação do descarte dos tecidos distribuídos para transplante clínico ou para pesquisa deve ser registrada nos respectivos prontuários do doador, juntamente com a sua justificativa.

9.6.3. A comunicação de efeitos colaterais indesejáveis com o uso dos transplantes deve ser registrada no prontuário do doador, juntamente com as medidas tomadas e notificadas às autoridades competentes.

9.6.4. O Banco deve manter registros dos processos de controle e garantia de qualidade dos procedimentos, equipamentos, reagentes e correlatos e controle de qualidade dos ambientes; e deve apresentar registros da validação dos recipientes térmicos usados no transporte.

9.6.5. Todas as etapas e insumos utilizados no processamento devem ser registrados em formulários identificados e anexados à documentação do doador.

9.6.6. O Banco deve dispor de sistema seguro de registro que permita a localização, de forma ágil, dos tecidos dentro dos ultracongeladores e dos refrigeradores.

9.6.7. Todos os registros do Banco devem ser de caráter confidencial, respeitando o sigilo da identidade do doador e do receptor.

SISTEMA NACIONAL DE TRANSPLANTES

REGULAMENTO TÉCNICO

ANEXO XIV

DOS BANCOS DE PELE - BP

Além das exigências gerais para autorização contidas no Anexo XI a este Regulamento, o Banco deve cumprir as seguintes exigências específicas:

1. EQUIPES TÉCNICAS

Para executar suas atividades, o BP deve contar com um responsável técnico, uma equipe técnica de captação dos tecidos e uma equipe técnica para atividades internas, ambas compostas por profissionais com capacitação comprovada para a execução de suas tarefas.

Deve ser formalizado um documento interno de constituição do BP, no qual conste sua composição, sua finalidade e seu regimento, sendo explicitadas sua subordinação técnico-científica e sua subordinação administrativa.

1.1. Responsável Técnico:

1.1.1. Este profissional deve ser capacitado para coordenar as atividades a serem executadas pelo Banco (seleção, captação, processamento, distribuição e controle de qualidade dos tecidos), sendo responsável por estabelecer e supervisionar a atuação do Banco, o treinamento de pessoal e por exercer a supervisão das equipes técnicas de atuação externa.

1.1.2. A responsabilidade técnica envolve ainda a avaliação do procedimento terapêutico proposto no que diz respeito à melhor indicação e ao uso clínico do tecido solicitado, bem como da necessidade de atendimento imediato e de considerações sobre as dimensões e tipo de processamento do tecido solicitado.

1.2. Composição Mínima:

1.2.1. 1 (um) médico cirurgião plástico de comprovada atuação na área de transplantes de pele e que se mostre qualificado para a execução das atividades decorrentes dessa função, conforme o descrito acima.

1.2.2. 1 (um) responsável técnico substituto que deve ser:

1.2.2.1 1 (um) médico cirurgião plástico com experiência na área de transplante de pele, que possa assessorar o responsável técnico no desenvolvimento das atividades inerentes ao Banco, bem como representá-lo ou substituí-lo, quando necessário.

1.3. Equipe Técnica de Retirada:

1.3.1. Esta equipe é responsável 24 (vinte e quatro) horas por dia e 7 (sete) dias por semana, pelas atividades relativas à etapa cirúrgica do processo, desde a captação até a entrega dos tecidos, segundo protocolos pré-estabelecidos pelo Banco.

1.3.2. Composição Mínima:

1.3.2.1. 1 (um) médico com treinamento específico, teórico e prático para a atividade de obtenção do consentimento para a doação, o processo de triagem clínica e sorológica do doador, a aceitação, o recebimento ou a coleta de material para exames laboratoriais, a retirada, a identificação, o acondicionamento, o transporte e a entrega dos tecidos e anotações no BP.

1.3.2.2. 1 (um) profissional da área de saúde, com treinamento específico, teórico e prático para todo o processo de retirada, coleta de material para exames laboratoriais, acondicionamento, transporte e entrega dos tecidos no BP.

1.3.3. A equipe de retirada de tecido ósseo pode não estar vinculada diretamente ao BP, porém deve estar autorizada pelo COISNT especificamente para a atividade de abortagens e triagem do doador, quando aplicável, e para a retirada de tecido. Esta equipe deve estar capacitada para o procedimento e atuar sob a responsabilidade do BP receptor dos tecidos, efetuando o procedimento em conformidade com os POP deste Banco e as normas vigentes. A aceitação ou recusa do material retirado e enviado para processamento é atribuição do responsável técnico do BP, de acordo com os POP do Banco e as normas vigentes.

1.4. Equipe Técnica de Atividades Internas:

1.4.1. Esta equipe é responsável pela execução das atividades desde o recebimento dos tecidos da equipe de retirada até sua disponibilização (para transplante, pesquisa ou ensino).

1.4.2. Composição Mínima:

1.4.2.1. 1 (um) médico com treinamento formal, teórico e prático em processamento, e indicações para uso clínico e dispensação do tecido, podendo esta profissional vir a substituir o responsável técnico em suas atividades.

1.4.2.2. 2 (dois) profissionais de nível superior da área de saúde ou biológica com treinamento para execução das atividades concernentes ao processamento, armazenamento e outras rotinas relacionadas ao BP.