

Eduardo Tadashi Pinto Emi

Caracterização das propriedades mecânicas de osso irradiado, utilizando ensaios destrutivos e não destrutivos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia
2014

Eduardo Tadashi Pinto Emi

Caracterização das propriedades mecânicas de osso irradiado, utilizando ensaios destrutivos e não destrutivos

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do Título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração Clínica Odontológica

Orientadora: Profa. Dra. Paula Dechichi

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos José Soares

Banca examinadora :

Profa. Dra. Paula Dechichi

Prof. Dr. Carlos José Soares

Prof. Dr. Luís Raposo

Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques

Uberlândia
2014



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado Acadêmico nº262 - COPOD

Data: 26/02/2014

Discente: Eduardo Tadashi Pinto Emi, Matrícula: (11212ODO005)

Título do Trabalho: Caracterização de propriedades mecânicas de osso irradiado, com emprego de ensaios destrutivos e não destrutivos.

Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Linha de pesquisa: Processo de reparo

Projeto de Pesquisa de vinculação: Processo de reparo

As **quatorze** horas do dia **vinte e seis de fevereiro do ano de 2014** no Anfiteatro Bloco 4L, Anexo A, Sala 23, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em janeiro 2014, assim composta: Professores Doutores: Luis Henrique Araújo Raposo(UFU); Marcelo Rocha Marques (UNICAMP); e Paula Dechichi (UFU) orientador(a) do(a) candidato(a) **Eduardo Tadashi Pinto Emi**.

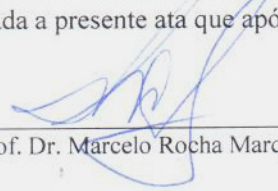
Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa Dra. Paula Dechichi apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

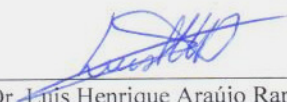
A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(a)s, que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

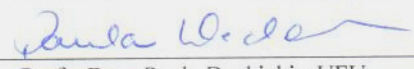
Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o(a) candidato(a) **A** provado(a).

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às **17** horas e **45** minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques - UNICAMP


Prof. Dr. Luis Henrique Araújo Raposo - UFU


Profa. Dra. Paula Dechichi - UFU
Orientador(a)



DEDICATÓRIA

A Deus, o pai celestial soberano em todas as decisões que nos confiou tamanha responsabilidade para exercermos de forma plena e digna nossa profissão e nosso papel na sociedade, trilhando o caminho da paz.

Aos meus avós que sempre estiveram presentes me incentivando, e oferecendo o alicerce necessário para construirmos uma base sólida para que eu possa colher os louros no futuro. É imensurável o carinho e admiração que tenho por vocês, buscando sempre a melhora tanto profissional quanto espiritual, sempre em constante evolução.

Ao meu pai, cidadão de caráter ímpar, exemplo de profissional e pessoa ao qual eu sempre me inspirei. Não é sempre que tenho a oportunidade agradecer nem exaltar tamanha admiração e respeito pela pessoa que sempre me carregou nos braços. Sinta-se fortemente abraçado e beijado pelo seu filho que se orgulha muito de ter um pai inquestionável em todos os aspectos.

À minha mãe querida que é a personificação do amor, tendo paciência e compreensão em todos os momentos da minha vida. Obrigado por tudo mãezinha querida.

Ao meu irmão que foi e sempre será meu grande companheiro das horas boas e ruins, com quem eu sei que posso contar a qualquer momento.

À minha amada Fabiana que me transmite paz de espírito, muito amor e carinho. É no final desta etapa que lhe agradeço por estar presente em todas as renúncias para colhermos juntos as recompensas. Durante os desafios você é a minha energia, minha motivação, a força que eu preciso ter e ser para que eu me torne inabalável.

À todos os meus amigos, que foram irmãos que escolhi para a minha vida e que sempre estiveram presentes no meu dia-a-dia.

À minha segunda família, Denise, Carlos e Marcelo que sempre me recebem de portas abertas e com muito carinho, durante grande parte dos meus dias.

À todas pessoas que fazem parte do meu cotidiano me proporcionando momentos de alegria, necessários para encarar as tarefas árduas e obstáculos impostos pela vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof. Dra. Paula Dechichi só tenho a agradecer pela oportunidade e pela confiança que depositou em mim. Sou extremamente grato e tenho enorme respeito e admiração, não só, pelo seu trabalho, mas também, por todas suas qualidades pessoais. Obrigado pela paciência, disposição e pelos conhecimentos que me transmitiu de forma aberta e tranqüila durante essa nossa jornada. Fiquei muito contente e orgulhoso de ter sido seu orientado, carregarei esse carinho para o resto da vida, só restaram boas lembranças. Foi excelente trabalhar e aprender com a senhora e sua equipe, buscarei o aprendizado contínuo em busca de novos trabalhos e desafios ao seu lado.

Ao Prof. Dr. Carlos, que me acolheu no mundo científico. Obrigado pela ajuda e pela co-orientação no trabalho. É maravilhoso o trabalho que o senhor tem feito pela nossa pós graduação. Tamanha capacidade de produção científica o coloca entre os maiores pesquisadores do país e sou extremamente grato por ter absorvido de ti bastante conhecimento. Sua motivação e determinação “contagia” quem ingressa no mundo acadêmico, que a vida lhe retribua em dobro tudo o que tem feito por nós.

Ao Prof. Dr. Darceny, professor que tenho enorme apreço. Obrigado pela contribuição nos conhecimentos e pela disposição ao ajudar sempre que precisei.

Ao Dr. Bruno, profissional e amigo com quem dividi horas e horas nos laboratórios e tanto me ajudou nessa etapa de pós graduação. Com certeza sem a sua ajuda e suas dicas o trabalho não teria sido o mesmo. Obrigado pela força de vontade, batalha e pela amizade que construímos nesse período.

À Prof. Ms. Flaviana, com que sempre compartilhei minhas dúvidas e tanto me auxiliou no andamento do trabalho, sempre com um sorriso no rosto. Obrigado por tudo e conte comigo para o que precisar.

À Ms. Aline, que me auxiliou nos trabalhos e disponibilizou grande parte do seu concorrido tempo realizando testes e mais testes. Muito obrigado!

Aos Professores Doutores Jonas, Letícia e Veridiana que tanto contribuíram e agregaram ao trabalho em minha qualificação. Fica registrado aqui os meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (FOUFU).

À Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Uberlândia (FEMEC/UFU).

Ao Laboratório Integrado de Pesquisa Odontológica (LIPO).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Aos professores, Luís Raposo, Paulo César Simamoto, Célio Prado, Denildo Magalhães, João Carlos Biffi, Paulo Quagliato, Priscila Soares, Sérgio Vitorino, Flávio Neves, Marcelo Caetano, Cláudia Jordão, Lair Mambrini, Alfredo Júlio e demais professores da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

À todos os companheiros de pós graduação que estiveram presentes nesta etapa.

Ao Prof. Dr. Roberto e ao INPES amigo e professor que tanto me ensinou e estimulou na área clínica e acadêmica, obrigado pelo auxílio e o carinho de sempre.

Ao Prof. Dr. Gojko Cvijic, nos ensinando a importância da dedicação, disciplina e foco em busca da perfeição, oferecendo o que há de melhor para nossos pacientes.

Agradecemos ao Laboratório de Tribologia e Atrito da Faculdade de Engenharia pela viabilização dos ensaios mecânicos, à FAPEMIG pelo apoio financeiro (APQ 565) e pela CAPES por apoiar na forma de bolsa de mestrado

“Querem que vos ensine o modo de chegar à ciência verdadeira? Aquilo que se sabe, saber que se sabe; aquilo que não se sabe, saber que não se sabe; na verdade é este o saber.”

Confúcio

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO LITERATURA	15
2.1 Tecido ósseo	15
2.2 Radioterapia	18
2.3 Propriedades biomecânicas do osso	20
2.4 Testes biomecânicos	21
3. PROPOSIÇÃO	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
5. RESULTADOS	35
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45

A radioterapia provoca alterações metabólicas no osso comprometendo suas propriedades biomecânicas. Este estudo avaliou as propriedades mecânicas de osso irradiado submetido a quatro diferentes ensaios. Utilizou-se 16 ratos divididos em dois grupos de acordo com período de sacrifício: 30D, sacrifício após 30 dias da radioterapia; 60D, sacrifício após 60 dias da radioterapia. O fêmur esquerdo recebeu dose única de radiação de 30 Gy, por meio de Acelerador Linear de Elétrons. O fêmur direito não foi irradiado e serviu como controle. Após o sacrifício dos animais, os fêmures foram submetidos à ensaios de tração associado a extensometria para obtenção do coeficiente de Poisson (ν) e ensaio de flexão de 3 pontos para obter o módulo de flexão (MF), resistência flexural (RF) e ainda ao ensaio de nanoindentação para obtenção de módulo de elasticidade (E) e dureza Vickers (VHN). Os dados foram analisados estatisticamente por meio de análise de variância fatorial (2x2) seguido do teste de Tukey ($P < 0.05$). Houve redução significativa no CP, MF, E e VHN dos fêmures irradiados testados nos períodos de 30 e 60 dias comparados aos respectivos controles. Contudo não houve diferença na RF entre osso não irradiado e irradiado, independente do período de avaliação. A radiação reduz significativamente os valores do coeficiente de Poisson, do módulo de elasticidade e da dureza Vickers do tecido ósseo. A associação de metodologias, especialmente extensometria e nanoindentação, possibilita mapeamento mais preciso da alteração biomecânica de osso submetido à radioterapia.

Palavras-Chave: Osso, Irradiado, Biomecânica.

Radiotherapy causes metabolic changes in bone compromising its biomechanical properties. This study evaluated the mechanical properties of irradiated bone subjected to four different tests . Sixteen rats were divided into two groups according to period of sacrifice: 30D, sacrifice after 30 days of radiotherapy; 60D, sacrifice after 60 days of radiotherapy. The left femoral received 30 Gy radiations in a single dose using linear accelerator of electrons. The right femur was not irradiated and served as control. The femurs were subjected to tensile test associated with strain gauge test for obtaining Poisson's ratio (ν) and three-point bending for obtaining the flexural modulus (FM), flexural strength (FS). And nanoindentation test was used to obtain the modulus of elasticity (E) and Vickers hardness (VHN) . Data were statistically analyzed by factorial analysis of variance (2x2) followed by Tukey test ($P < 0.05$). There was a significant reduction in CP, MF, E and VHN of femurs tested in periods of 30 and 60 days compared to their respective controls. However there was no difference in FS between non- irradiated and irradiated bone , regardless of the evaluation period . The radiation greatly reduces the values of Poisson ratio, elastic modulus and Vickers hardness of bone tissue. The combination of methodologies, especially strain gauge test and nanoindentation enables more accurate mapping of the biomechanical changes in bone subjected to radiotherapy.

Keywords: Bone, Irradiated, Biomechanical

O osso apresenta propriedades elásticas e plásticas que lhe permitem desempenhar funções de proteção e sustentação. No organismo as propriedades mecânicas são conferidas pela matriz colágena mineralizada do tecido ósseo, a qual apresenta arranjo trabeculado ou compacto característicos. (Fratzl et al. 2004; Currey, 2002) Essa arquitetura permite ao osso absorver as tensões geradas pelas forças incidentes, por meio de deformação elástica reversível, adaptando-se às alterações mecânicas do meio, (Currey 2002). O desempenho biomecânico do tecido ósseo depende de fatores intrínsecos, relacionados à matriz óssea, como qualidade da porção orgânica e do conteúdo inorgânico (Dunlop et al, 2010), bem como da atividade das células ósseas.

A radioterapia interfere significativamente com o microambiente tecidual provocando redução de osteócitos e osteoblastos, aumento da atividade de osteoclastos, reduzindo matriz extracelular, inclusive o conteúdo mineral (Da Cunha et al, 2007; Pelisser et al., 2007). Essa interferência no metabolismo ósseo desequilibra a remodelação, favorecendo a reabsorção óssea, o que compromete as propriedades biomecânicas do osso e seu processo de regeneração (Maeda, 1988).

Testes laboratoriais aplicados em modelos biológicos têm sido utilizados para avaliar as propriedades mecânicas e estimar o comportamento clínico do osso (Vanderhyden et al, 2013; Ha et al, 2013). Dentre as propriedades mecânicas que caracterizam tecidos humanos destaca-se o módulo de elasticidade, que é a relação linear entre tensão e deformação indicando a matriz de rigidez dos materiais (Plotino et al. 2007). Diferentes ensaios mecânicos podem ser utilizados para medir o módulo de elasticidade do osso, como dureza e ensaios de flexão em 3 ou 4 pontos. O ensaio de flexão em 3 pontos é o mais utilizado, porém os parâmetros do teste para ensaios biológicos não estão bem definidos, ocorrendo variações de dimensões, geometria, espaço de comprimento, na razão entre extensão e altura. (ISO 178,2010; ISO4049, 2009) Tais padrões quando mal interpretados podem gerar

problemas se utilizados para alimentar métodos computacionais, como elementos finitos (Alander, 2005). Nanoindentação é um método dinâmico que permite a determinação do módulo de elasticidade e a dureza do osso, tendo em conta a estrutura anisotrópica dos tecidos (Baldassarri, et al 2012; Bake et al, 2010). Os indentadores podem ser posicionados no material a uma distância muito pequena permitindo mapear a distribuição espacial das propriedades mecânicas da superfície com boa resolução. (Diez-Perez et al, 2010; Oliver et al, 2004) Basicamente, a indentação emprega um atuador de alta resolução para forçar o indentador piramidal característico da Dureza Vickers sobre a superfície de ensaio e um sensor de alta resolução para medir continuamente a penetração resultante. (Diez-Perez et al, 2010; Oliver et al, 2004).

Aparentemente, a aplicação de testes não destrutivos, como método de extensometria parece mais adequada para a verificação da interferência de fatores internos sobre o processo de deformação estrutural (Sakaguchi et al, 1991). O método de extensometria é capaz de avaliar as estirpes na superfície do material, convertendo sinais elétricos em unidades métricas como microdeformação (mS) (Nishioka et al, 2010). Este ensaio é capaz de detectar as variações interatômicas para apontar quando a amostra se move do regime elástico ao plástico, permitindo ignorar a última fase e o limite de falha. Outra propriedade mecânica do osso que pode ser mensurada pela associação de ensaios de tração convencional associado à extensometria é o coeficiente de Poisson. O coeficiente de Poisson é um dos parâmetros mecânicos necessários para descrever completamente o desempenho biomecânico do osso no regime elástico do material. Esta propriedade é definida como a razão da tensão transversal (contração) sobre a tensão axial (alongamento), a ser obtida em um teste uniaxial. Esta caracteriza ainda a medida de relativa resistência à dilatação e cisalhamento, possuindo valor ente 0 e 0,5 variando de acordo com a compressibilidade do material (Chabrier et al, 1999; Wei et al, 2002).

Buscar a associação de métodos experimentais biomecânicos que caracterizem propriedades dos tecidos ósseos submetidos a radioterapia podem contribuir de forma substancial para definição de protocolos

terapêuticos menos deletérios. Estes conhecimentos podem ainda favorecer a análise computacional individualizada por meio do cálculo de propriedades específicas a serem utilizadas em modelos de elementos finitos individualizados. Dentro da escassez de informações a cerca do efeito deletério da radiação nos tecidos ósseos, representados por diferentes propriedades mecânicas, este estudo tem por objetivo avaliar o comprometimento das propriedades biomecânicas de fêmures de rato submetidos à radioterapia verificados após diferentes intervalos de tempo. A hipótese nula é que a radioterapia e o período de avaliação não alteram as propriedades mecânicas do tecido ósseo.

2.1 *Tecido ósseo:*

O tecido ósseo é classificado como um tecido conjuntivo especializado que possui as seguintes células: osteócitos, células que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; osteoblastos, que sintetizam a parte orgânica da matriz e localizam-se na periferia; e osteoclastos, células gigantes e multinucleadas que reabsorvem a matriz óssea, participando diretamente do processo de remodelação do osso. Além das células, o tecido ósseo também possui uma matriz óssea que é dividida em orgânica e inorgânica. A parte orgânica contém 95% de fibras colágenas e aproximadamente 5% de substância fundamental amorfa contendo agregados de proteoglicanas e glicoproteínas, determinando a resistência do tecido e fatores sinalizadores solúveis (fatores de crescimento). A parte inorgânica é responsável pela dureza do osso, sendo composta principalmente por fosfato de cálcio (58% do peso do osso), carbonato de cálcio (7% do peso), fluoreto de cálcio e fosfato de magnésio (1 a 2%) e cloreto de sódio (menos de 1% do peso), (Junqueira e Carneiro, 2008; Ross, 1989).

Histologicamente, o tecido ósseo é classificado em primário ou imaturo e secundário ou lamelar. Entre eles não há diferença de população celular e constituintes da matriz extracelular. A diferença está na disposição das fibrilas colágenas. No tecido primário ou imaturo, as fibrilas colágenas se dispõem sem orientação definida, com menor deposição mineral e maior número de osteócitos. O primeiro tecido ósseo que se forma é o tecido ósseo primário, sendo substituído gradativamente por tecido ósseo lamelar. No adulto, o tecido primário é encontrado em poucas regiões como: suturas dos ossos do crânio, alvéolos dentários e em alguns pontos de inserção de tendões. Já no tecido ósseo secundário, as fibrilas colágenas se dispõem em lamelas, em camadas concêntricas, em torno de canais e vasos, formando os sistemas de Harvers ou em lamelas paralelas. O tecido ósseo secundário é a porção frequentemente mais encontrada no adulto, (Junqueira e Carneiro, 2008).

Macroscopicamente, o tecido ósseo pode apresentar-se sem cavidades visíveis, sendo denominado osso compacto, ou organizar-se em

trabéculas ósseas que delimitam pequenos espaços, esse denominado de osso esponjoso. Esta classificação é apenas macroscópica, uma vez que histologicamente ambos apresentam os mesmos componentes.

Anatomicamente, os ossos longos apresentam regiões distintas: região da diáfise (porção central), regiões das epífises (porção das extremidades) e regiões das metáfises (porção que conecta a diáfise com as epífises). As regiões de epífise e metáfise apresentam constituição óssea trabecular internamente, e uma camada de osso cortical externamente. Já a região de diáfise possui apenas o osso cortical, (Junqueira e Carneiro, 2008; Bento, 2003).

O tecido ósseo é o componente dos ossos diretamente relacionado à função de suporte e resistência, além de constituir um importante reservatório dos íons (Junqueira e Carneiro, 2008). Membranas conjuntivas contendo células osteogênicas revestem o osso externamente (periósteo) e internamente (endósteo). O periósteo é formado por tecido conjuntivo denso em sua parte externa e tecido altamente celularizado e vascularizado junto ao osso. O endósteo é formado por uma camada de células achatadas osteoprogenitoras, osteoblastos (formadores de osso) e osteoclastos (reabsorção óssea) e com potencial osteogênico, se adequadamente estimulado pelo processo inflamatório. As duas principais funções do endósteo e do periósteo são nutrição do tecido ósseo e fornecimento de novos osteoblastos, fundamentais para o desenvolvimento e reparo ósseo.

Ainda que apresente rigidez e aparente inatividade, o tecido ósseo é dinâmico passando constantemente por processo de formação e reabsorção, denominado remodelação óssea. Os estímulos externos induzem o tecido ósseo estar se renovando constantemente de maneira contínua e fisiológica. (Buchman e Ozaki, 1999). O tecido ósseo está em constante remodelação, e sua massa total depende da relação de equilíbrio existente entre a formação e a reabsorção óssea (Silva et al, 2005). O ciclo de remodelação óssea consiste em três fases sucessivas: a reabsorção, a reversão e a formação. A reabsorção começa com a migração de pré-osteoclastos à superfície do osso onde formam osteoclastos multinucleados que reabsorvem o osso. Os

osteoclastos secretam ácido clorídrico que dissolve a matriz mineral do osso, enquanto proteases degradam a porção orgânica (Ross, 1989). A reabsorção ocorre principalmente por ação dos osteoclastos, mas os osteócitos também podem reabsorver localizadamente matriz óssea.

Após a conclusão da reabsorção osteoclástica, há uma inversão de fase, quando os osteoblastos e pré-osteoblastos ocupam a superfície do osso. Estas células preparam a superfície para começarem a formação óssea e enviam sinais para migração e diferenciação dos osteoblastos. A fase de formação ocorre com a participação dos osteoblastos até que o osso reabsorvido seja completamente substituído por novo (Junqueira e Carneiro, 2008). Há a atração de osteoblastos para cavidade de reabsorção e, sob influência de vários hormônios e fatores de crescimento, diferenciam-se em osteoblastos ativos para preenchê-la com o novo osso. Quando esta fase for concluída, a superfície é coberta por células de revestimento achatadas e um período de repouso prolongado começa até que um novo ciclo de remodelação óssea seja iniciado (Hadjidakis et al, 2006; Sikavitsas et al, 2001).

O tecido ósseo, quando lesado, é capaz de regeneração, fenômeno que demonstra sua permanente vitalidade (Katchburian et al, 2004; Lynch et al, 1999). É necessário compreender que a consolidação do reparo no tecido ósseo é condicionada por fatores como o suprimento sanguíneo, a estabilidade mecânica, a presença de um arcabouço tridimensional que oriente a proliferação celular (Gondim, 2007; Salgado, 2002) e o tamanho do sítio lesionado, pois em regiões em que a morfologia e dimensão do defeito são extensas e críticas ao reparo, o mecanismo de reparo torna-se limitado. A angiogênese é um fator importante no processo de reparo ósseo, pois possibilita a oxigenação local e o afluxo de nutrientes, além da liberação de fatores de crescimento. Em defeito ósseo com dimensão crítica, a vascularização insuficiente pode resultar na formação de tecido fibroso (Filvaroff, 2003; Klenke et al, 2008)

Diversas situações clínicas requererem estimulação para neoformação óssea e reparo como ressecções de tumores, fraturas não consolidadas, as

más-formações congênitas e ossos irradiados (Giannoudis et al, 2005; Da Cunha et al, 2007; Pelisser et al, 2007).

2.2 Radioterapia

A radioterapia é um tratamento loco regional que possui resultados eficazes no combate à replicação das células tumorais. A radiação provoca uma ionização do meio onde atua, tornando-o eletricamente instável que consequentemente lesa o ácido desoxirribonucleico (DNA), impossibilitando a replicação de células neoplásicas. Porém juntamente com o combate às células neoplásicas a radiação destrói o material nuclear celular de células saudáveis na região da radiação e em tecidos adjacentes. (Antônio et al, 2001;).

A radioterapia é realizada de acordo com o grau de malignidade e o nível de metástase da neoplasia, podendo ser tratamento primário, pré-operatória ou pós-operatória sendo associada ao tratamento cirúrgico ou então associada à quimioterapia. Desta forma, a prevenção e o diagnóstico precoce de tumores e lesões ainda é a melhor forma de tratamento.

A radioterapia possui duas formas principais de aplicação: braquiterapia e teleterapia. O que determina a escolha da radioterapia é o tipo do câncer e a profundidade do tumor. Na braquiterapia, o isótopo radioativo é direcionado em íntimo contato com o tumor, inclusive em alguns casos sendo colocado intracavitário ou intersticial. Na teleterapia, a radiação é emitida pelo equipamento em uma posição aproximada de 100 cm da pele do paciente, sendo direcionada ao tumor (Grimaldi et al, 2005).

Na odontologia, a radioterapia como tratamento de pacientes vítimas de neoplasias malignas de cabeça e pescoço, apresenta efeitos adversos consideráveis como, aumento na incidência de cárie, xerostomia, mucosite, disfagia, periodontites, trismo e osteoradionecrose (Antônio et al, 2001; Soares et al, 2011).

A quantidade de radiação aplicada em cabeça e pescoço é variável e expressa em Gy, sendo que a unidade padrão é Gray, que equivale a 100 rad. Dependendo da malignidade do tumor e em casos de destruição tecidual severa, os tratamentos podem atingir até 70 Gy, embora a partir de 60 Gy, o

tratamento pode resultar em efeito colateral indesejado, como osteoradionecrose (Grimaldi et al, 2005).

A dose total da radioterapia, tamanho do campo irradiado, suscetibilidade individual, idade, tabagismo, etilismo, condições sistêmicas, número e intervalo de sessões, fracionamento das doses de radiação, agressão cirúrgica ou traumática no tecido irradiado são os principais fatores relacionados à efeitos adversos da radioterapia.

A radioterapia tem efeito benéfico e eficiente na destruição de células tumorais sendo muito utilizada no tratamento de doenças neoplásicas (Bekelman et al, 2013). No entanto, o comprometimento dos tecidos adjacentes é inevitável (Da Cunha, 2007). O osso submetido à altas doses de radiação, pode apresentar desequilíbrio da atividade osteoblástica e osteoclástica, com favorecimento à reabsorção óssea (Maeda et al, 1988; Da Cunha et al, 2007; Pelisser et al, 2007), aumento da lise celular (Da Cunha et al, 2007) e redução da resistência biomecânica (Maeda et al, 1988). A osteogênese e a vascularização também ficam prejudicadas após radioterapia (Muhonen et al, 2004)

As aplicações de raios ionizantes nos ossos os tornam hipóxicos, hipocelulares e hipovasculares (Keller et al, 1997; Wagner et al, 1998). As alterações mais significativas do tecido ósseo pós-radiação ionizante são de desenvolvimento lento. Inicialmente, ocorrem danos ao sistema de remodelamento (osteócitos, osteoblastos e osteoclastos), de forma que a radiosensibilidade dos osteoblastos perante os osteoclastos facilitam a atividade lítica. Concomitantemente, os raios ionizantes danificam a vascularização dos ossos e tecidos adjacentes, causando hiperemia, endoarterite, trombose, oclusão e obliteração dos vasos de pequenos calibres. Posteriormente, a medula óssea exhibe quadros de acelularidade acentuada e hipo ou avascularidade, além de degeneração adiposa. O endóstio atrofia, o perióstio apresenta sinais de fibrose e perda similar de elementos remodeladores. (Vissinky et al, 2003).

Altas dosagens de raios ionizantes, causam diminuição de osteócitos, osteoblastos e osteóides, combinado com fibrose dos vasos sanguíneos locais,

substituição da medula óssea por tecido conjuntivo, redução na celularidade do periósteo e no seu suprimento sanguíneo e diminuição do número e calibre dos vasos sanguíneos do osso, fatores que tornam o osso mais susceptível à infecção e necrose (Vissinky et al, 2003, Maxymiw et al, 1989).

2.3 Propriedades biomecânicas do osso:

Duas propriedades marcantes do osso são sua força e dureza, conferida principalmente pelo tecido ósseo. Porém, o osso também é elástico, ou seja, quando submetido a uma carga, sofre deformação elástica, mas cessando a carga, o osso volta ao seu estado inicial. Diferentemente, os materiais com propriedades plásticas, quando recebem uma carga, mesmo quando o estímulo da força aplicada é removido não conseguem voltar ao seu estado original (Bala et al, 2011). Devido à propriedade elástica, o osso suporta certa quantidade de compressão e tração sem sofrer fratura. Quando um corpo elástico recebe uma força de tração, ele sofre alongamento e quanto maior esta força, maior é o alongamento. Entretanto, a resistência à tração do osso é menor que sua resistência à compressão (Reilly et al, 1975). O tecido ósseo apresenta disposição biológica que permite atender os vários tipos de forças as quais está este sujeito. O material do qual o tecido ósseo é constituído é suficientemente duro para resistir a forças de compressão e elástico para suportar as forças de tração. Dois tipos de materiais unem-se para dar ao tecido ósseo estas características: um material inorgânico e um orgânico. O material inorgânico é representado principalmente por sais de cálcio (fosfato e carbonato de cálcio) que lhe confere dureza. Já o material orgânico é predominantemente constituído por colágeno que lhe dá elasticidade. O colágeno compõe aproximadamente 95% da matriz extracelular, e calcula-se 25% a 30% do peso seco do osso. O material orgânico confere ao osso a elasticidade e assim, capacidade para suportar forças de tração (Roelser, 1987; Currey, 2005).

O osso pode ser definido como um material poroso multifásico, preenchido com fluido, a matriz óssea, que fornece ao osso sua rigidez e tenacidade. O comportamento material apresentado pelo tecido ósseo pode ser

classificado como viscoelástico, não linear, anisotrópico e não homogêneo em termos de densidades, resistência mecânica e rigidez (Carter et al, 1998)

2.4 Testes biomecânicos:

Biomecânica é a aplicação da mecânica aos tecidos biológicos, estudando as respostas dos mesmos às forças sobre eles aplicadas. Em odontologia é utilizada para prever o comportamento clínico de técnicas e materiais e suas interações com os tecidos orais. (Rho et al, 1998)

A associação dos estudos do campo biológico da medicina e da odontologia com os da engenharia mecânica permite o aprofundamento científico relativo às respostas teciduais à aplicação de forças, relacionando diretamente estrutura e função. A evolução em conjunto da engenharia de materiais e de infra-estruturas tem tido um papel fundamental também nesta construção que se enriquece a cada dia no mundo odontológico, trazendo uma série de novos conceitos. (Groch, 2010).

Os ensaios mecânicos comumente mais utilizados para determinação das propriedades mecânicas dos materiais são: ensaio de tração, compressão, flexão em 3 ou 4 pontos, torção e nanoindentação (Kruzic et al, 2007).

Este estudo objetivou avaliar a influência da radioterapia nas propriedades mecânicas do osso irradiado em diferentes períodos por meio da utilização de diferentes testes mecânicos.

Além disso, foi avaliada a precisão dos diferentes testes mecânicos para obtenção das propriedades do osso.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizados 16 ratos Wistar com peso entre 250 e 350 gramas (Figura1). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA-UFU- Protocolo 060/09). Os animais foram separados em grupos: Grupo I – sacrifício após 30 dias da radioterapia e Grupo II – sacrifício após 60 dias da radioterapia. Em todos os animais, o fêmur esquerdo (teste) recebeu dose única de 30 Gy, por meio de Acelerador Linear de Elétrons 6MeV (Varian 600-C® Varian Medical Systems Inc. Palo Alto, Califórnia/EUA). Os fêmures direitos dos animais não receberam tratamento (controle); (Figuras. 2, 3 e 4).

A radioterapia foi realizada conforme protocolo de irradiação de Lehner *et al.* (2004) como brevemente descrito a seguir. Antes das sessões de radioterapia, os animais foram submetidos à anestesia geral por meio de injeção intraperitoneal de 0,025 ml/100g. de cloridrato de xilazina 2% e 0,05 ml/100g de cloridrato de quetamina 10%. Em cada animal, a perna esquerda foi estendida lateralmente e fixada em posição pré-determinada com fita adesiva. Uma área de 4 centímetros de comprimento do fêmur esquerdo recebeu dose de 30 Gy em campo anterior único. A área irradiada foi marcada com caneta dermatográfica para cirurgias. Todas as medidas de segurança foram adotadas e o feixe de radiação foi individualmente colimado e limitado à área irradiada.



Figura 1- Ratos Wistar



Figura 2- Ratos posicionados para receberem a dosagem de radiação ionizante

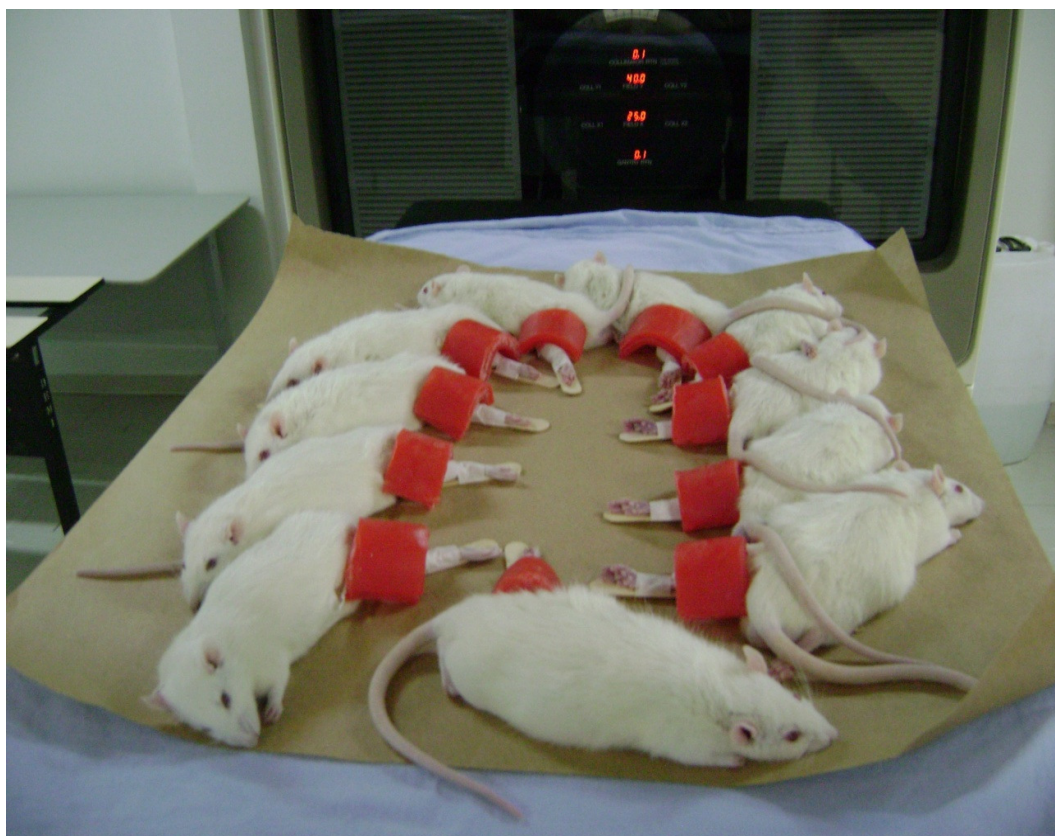


Figura 3 – Pata esquerda posicionada e estendida para receber a radiação e dispositivo de cera colocado para favorecer a incidência dos raios ionizantes na área desejada.

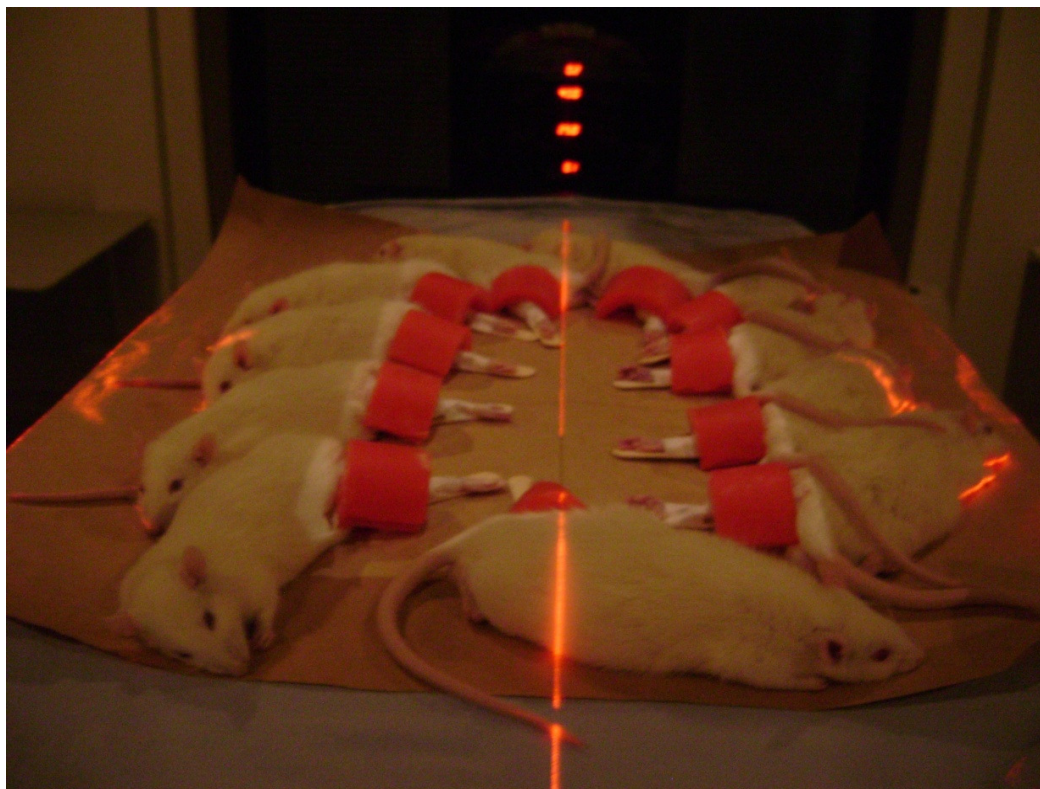


Figura 4- Ratos recebendo radioterapia.

Após o tempo experimental de 30 e 60 dias, os animais foram sacrificados, os fêmures removidos e submetidos aos ensaios biomecânicos.

Ensaios mecânicos:

Para a realização dos ensaios, foram adotados quatro testes mecânicos: Teste de tração associado à extensometria para obtenção do coeficiente de Poisson (ν) ; ensaio de flexão em 3 pontos associado à extensometria para obtenção do módulo de elasticidade (E) ,ensaio de flexão em 3 pontos para obtenção de resistência flexural (RF) ; e nanoindentação para mensuração do módulo de elasticidade (NE) e dureza Vickers (VHN).

Teste de Tração associado à Extensometria - Coeficiente de Poisson (ν)

Para a obtenção do coeficiente de Poisson, os fêmures foram perfurados na região de epífises com broca diamantada em alta rotação com irrigação, para a fixação de dois dispositivos em forma de argola, confeccionados com fio

ortodôntico (Morest CrNi, São Paulo, Brasil). Na região mediana da diáfise foram fixados dois extensômetros, um no sentido axial e outro no sentido transversal dos fêmures. Extensômetros (PA -06- 038AA -120- LEN , Excel Sensores , São Paulo, Brasil) foram fixados utilizando adesivo à base de cianoacrilato (Super Bonder Loctite, São Paulo – Brasil); (Figura 5). As variações elétricas foram matematicamente transformadas para unidades de micro deformação (μs) pelo *software* de aquisição de dados (Aq analysis), responsável pelo registro das informações, instalado em um microcomputador. A grelha de mensuração de tensão possuía área de 1 mm^2 , resistência elétrica de 120Ω , e um gauge-factor de 2,12 (Soares et al, 2008). Os sensores foram conectados a um sistema de aquisição de dados (ADS0500IP; Lynx, São Paulo, SP, Brasil) em $\frac{1}{4}$ de ponte de Wheatstone. O espécime foi então posicionado em máquina de ensaio mecânico (EMIC DL500, São José dos Pinhais, PR, Brasil) de maneira que o mesmo fosse tracionado até seu limite de 30N (Figura 6), parâmetro que está dentro do regime elástico da estrutura. Durante o carregamento aplicado a velocidade de 0,5 mm/min as deformações axial e transversal foram mensuradas. O cálculo do Coeficiente de Poisson (ν) foi feito pela fórmula:

$$\nu = \frac{\epsilon_x}{\epsilon_y}$$

onde ϵ_x é a deformação transversal e ϵ_y é a deformação longitudinal.

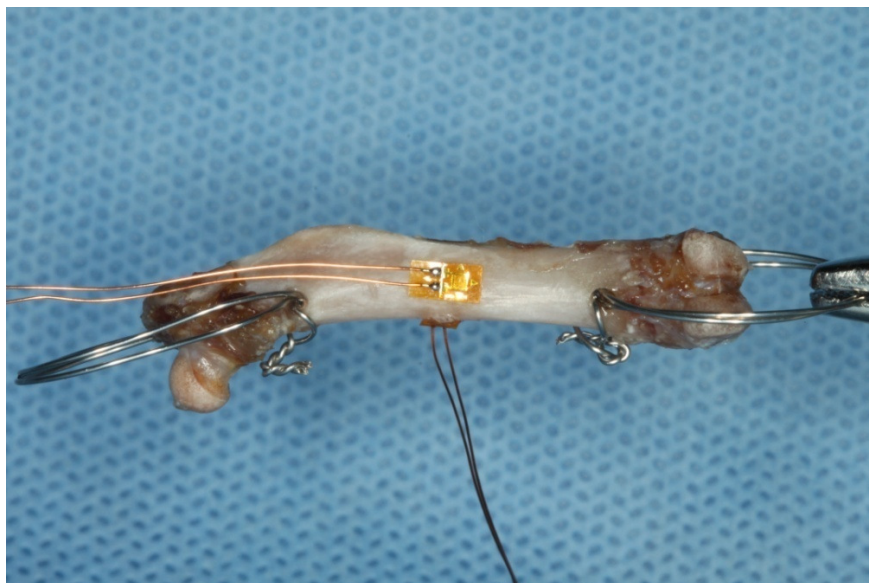


Figura 5 – Fêmur com 2 extensômetros na região de diáfise e 2 dispositivos na região de epífise

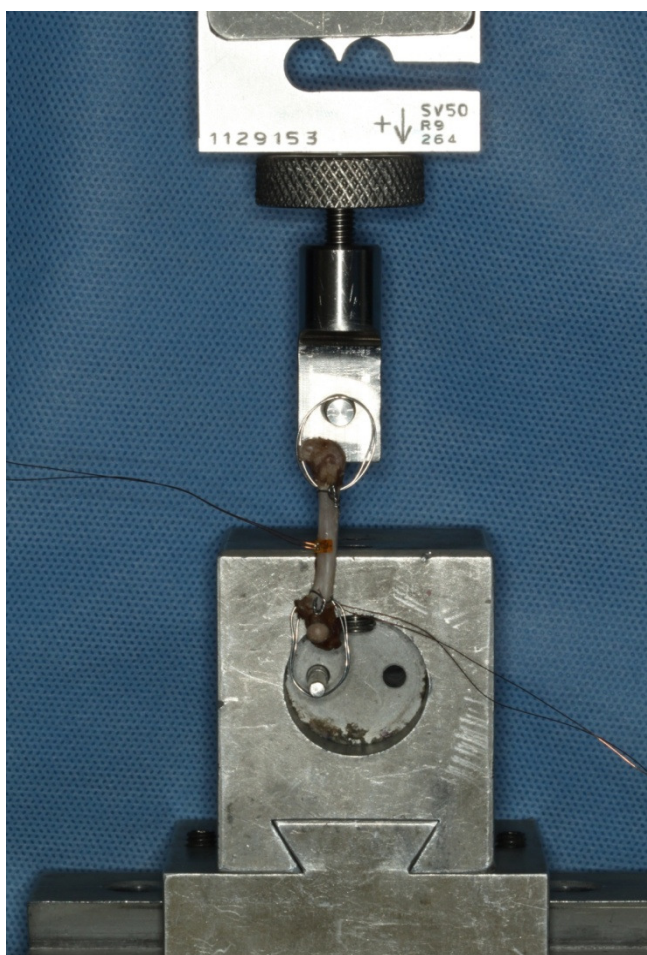


Figura 6- Fêmur posicionado para ensaio de tração associado à extensometria.

Teste de flexão em 3 pontos associado à extensometria

Para o cálculo da resistência flexural (RF) e ainda do módulo de elasticidade (E), o extensômetro transversal foi cuidadosamente removido e o axial mantido. Os fêmures foram posicionados com o extensômetro axial na região oposta a aplicação da carga e submetidos ao teste de flexão de três pontos, com a distância de 16 mm entre os apoios. Foi utilizada célula de carga de 50 Kgf estruturados para a máquina de ensaios mecânicos e para o sistema aferidor de tensão. O carregamento de compressão no centro do osso foi aplicada (Figura 7) à velocidade de 0,5 mm/min, e a deformação foi aferida (μ s). Os dados foram registrados com frequência de 0,4 Hertz e transferidos para um computador utilizando a transformação do sinal de aquisição específico e software de análise de dados (AqDados 7,02 e AqAnalisys ; Lynx, São Paulo, SP , Brasil). Quando a curva de tensão/deformação sofria variação, caracterizando a transição do regime elástico para o regime plástico do tecido ósseo o carregamento era interrompido e a deformação era captada, e os valores obtidos aplicados na fórmula :

$$E = \frac{1}{48} * \frac{FL^3}{fJ}$$

Onde, E é o módulo de elasticidade por flexão (GPa) , F é a carga máxima em N, L é a distância entre os apoios em mm , f é a flexão máxima e J é o momento de inércia.

Teste de flexão em 3 pontos

O teste de resistência flexural de três pontos foi realizado (semelhante ao anterior utilizando carga de 50Kgf, a velocidade 0.5mm/min. Cada fêmur foi colocado entre 2 suportes distantes 16mm, em seguida, foi aplicada carregamento no ponto central da diáfise entre os 2 suportes de forma contínua até o momento da fratura A curva da carga de deslocamento e a carga máxima até o momento de fratura foram obtidos. A falha foi definida e observada pela propagação de fratura quase perpendicular ao longo eixo do osso.

Característica típica de ensaios de flexão de materiais frágeis, devido a resistência a tração relativamente mais baixa em comparação à resistência à compressão na região do carregamento (Korres et al 2013; Raposo et al 2013.). A fórmula utilizada para calcular resistência flexural foi:

$$RF = \frac{3FL}{2bd^2}$$

Onde F é a força no momento de fratura, L é a distância do suporte, b é largura e d é a espessura.

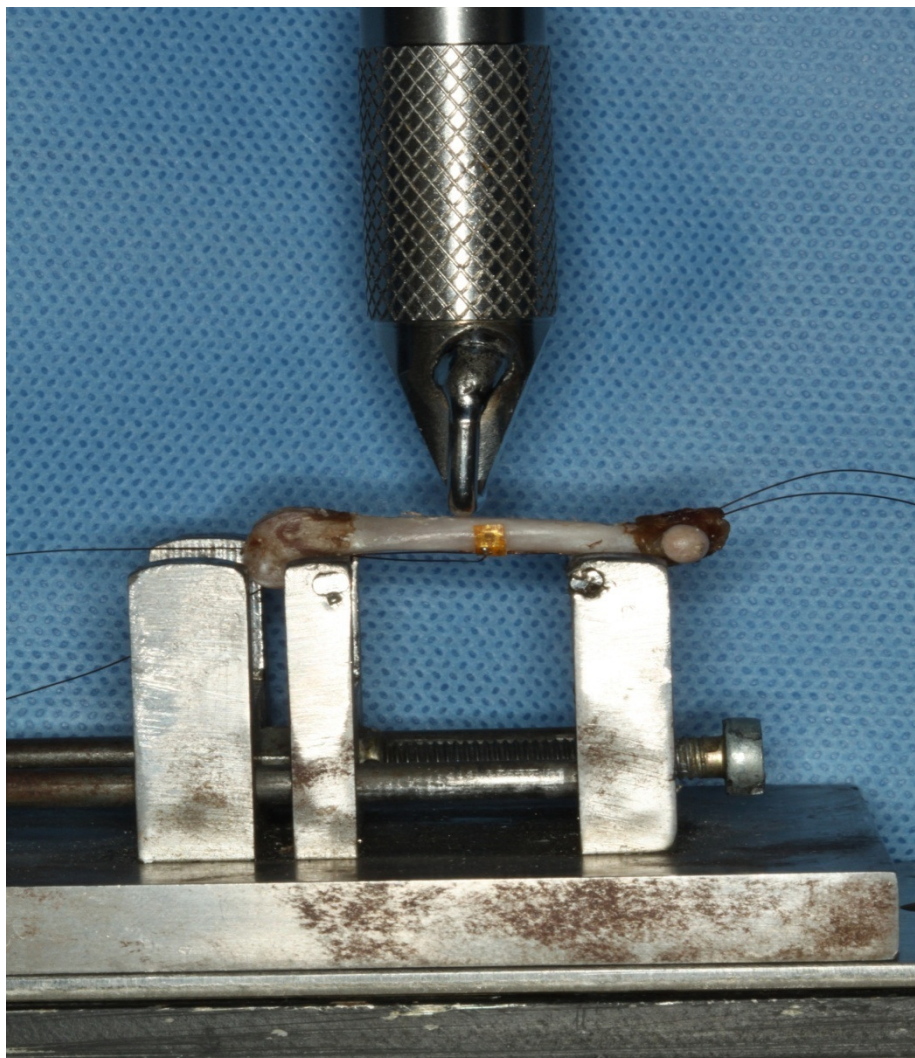


Figura 7 – Fêmur posicionado em dispositivo com distância de 16 mm recebendo carga no centro da diáfise

Nanoindentação:

Para o ensaio de nanoindentação, foram confeccionadas matrizes retangulares de aço para fixação dos fragmentos dos fêmures dos diferentes grupos (Figura 8). Em cada matriz retangular, os fragmentos foram incluídos em resina acrílica (Cristal, Piracicaba, SP, Brasil). O conjunto foi desgastado com lixas de papel de carboneto de silício (#600, 800, 1200, 2000, Norton, Campinas, SP, Brasil) e polido com pastas diamantadas metalográficas 6, 3, 1, e 1/4µm (Figura 9), (AROTEC, São Paulo, SP, Brasil). Esse procedimento permitiu a exposição das regiões cortical e medular dos fêmures, para posteriormente serem submetidas ao teste de microindentação dinâmica (CSM Micro- Hardness Tester; CSM Instruments, Peseux, Switzerland). Foram realizadas 5 indentações por espécimes, linearmente, com uma distância mínima de 0.05 µm entre as indentações em um tempo de penetração de 15 segundos.

A força aumentou de 0 mN à 200 mN em intervalos de 60 segundos até que fosse atingida a força máxima de 200 mN, que foi aplicado constantemente por 15 segundos. Em seguida, a força foi gradualmente retirada a partir de 500 mN a 0 mN em intervalos de 60 segundos (Bicalho et al, 2013). A carga e a profundidade de penetração do penetrador foram medidas continuamente durante o descarregamento de carga, caracterizando a histerese da estrutura. A dureza universal é definida como a força de ensaio dividida pela área aparente da reentrância na força máxima. A partir da multiplicidade de medições armazenados num banco de dados fornecido pelo fabricante, um fator de conversão entre a dureza universal e VHN foi calculada e implementada no software, de modo que as medições foram expressos em unidades de dureza Vickers.

$$VHN = P / A$$

onde P é a carga máxima, A é o instrumento de profundidade de detecção.

O módulo de recuo foi calculado a partir do declive da tangente da curva de profundidade de indentação na força máxima e é comparável com o módulo de elasticidade do material de (E) e expresso utilizando a seguinte fórmula :

$$E = \frac{1 - v_s^2}{\frac{1}{E_r} - \frac{1 - v_i^2}{E_i}}$$

onde E_i é o módulo de elasticidade do penetrador de diamante (1141 GPa), v_i é o coeficiente de Poisson do penetrador de diamante (0,07), E_r é o módulo reduzido do contato da indentação, e v_s é o Coeficiente de Poisson do osso.



Figura 8 – Matriz de metalon utilizada para inclusão de fêmures de rato em resina.

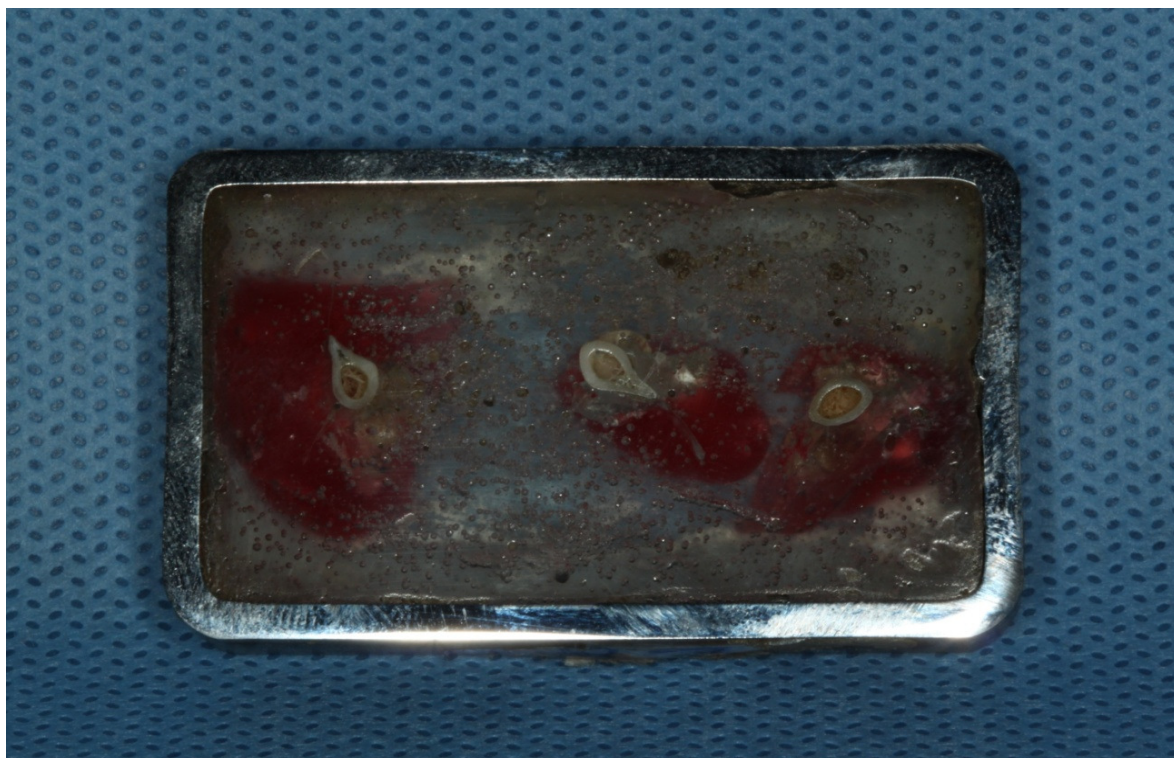


Figura 9 – Fêmures inclusos em resina autopolimerizável desgastados e polidos prontos para serem levados a máquina de nanoindentação.

Análise estatística

Os dados de resistência flexural, módulo de elasticidade por flexão, coeficiente de Poisson, módulo de elasticidade e dureza Vickers foram testados para análise da distribuição normal (Shapiro-Wilk, $p < 0.05$) e equivalência das variâncias (Levene's test, $p < 0.05$). Análise de variância fatorial em 2 fatores de estudo seguido pelo teste de Tukey foram empregados para análise das diferenças entre os grupos: condição do tecido ósseo (2 níveis: irradiado e não irradiado) e período de avaliação (2 níveis: 30 dias e 60 dias). Todos os testes empregaram nível de significância de 0,05, e todas as análises foram realizadas no softwares de estatística Sigma Plot versão 13.1 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

5. RESULTADOS

Houve redução significativa no coeficiente de Poisson (Tabela 1) dos fêmures dos grupos irradiados 30 ($0,16 \pm 0,07$) e 60 ($0,23 \pm 0,05$), comparados aos respectivos fêmures controles ($0,41 \pm 0,06$; $0,35 \pm 0,09$), sendo que o fator tempo não influenciou as propriedades. Houve redução significativa no módulo de elasticidade (E) (Tabela 2) dos fêmures dos grupos irradiados 30 ($9,8 \pm 1,2$) e 60 ($11,0 \pm 1,2$), comparados aos respectivos controles ($12,9 \pm 0,3$; $12,5 \pm 1,0$). Entretanto, o fator tempo não influenciou esta propriedade para todos os grupos avaliados. Não houve diferença na resistência flexural entre os grupos (Tabela 3) teste e controle, entretanto, o fator tempo influenciou positivamente os resultados de resistência flexural para ambos os grupos. Houve redução significativa no módulo de elasticidade por indentação (Tabela 4) dos fêmures dos grupos irradiados 30 ($8,18 \pm 2,74$) e 60 ($10,86 \pm 3,96$), comparados aos respectivos controles ($14,27 \pm 2,82$; $10,86 \pm 3,96$), o fator tempo influenciou esta propriedade para os grupos irradiados. Houve redução significativa na dureza (Tabela 5) dos fêmures dos grupos irradiados 30 ($58,26 \pm 72,34$) e 60 ($51,99 \pm 23,46$), comparados aos respectivos fêmures controles ($84,84 \pm 35,05$; $147,6 \pm 84,50$), sendo que o fator tempo influenciou positivamente a dureza do grupo controle.

Tabela 1. Média e desvio padrão do Coeficiente de Poisson do osso irradiado e não irradiado avaliado em 30 e 60 dias.

Condição tecido ósseo	Período de Avaliação	
	30 dias	60 dias
Controle	$0,41 \pm 0,06^{Aa}$	$0,35 \pm 0,09^{Aa}$
Irradiado	$0,16 \pm 0,07^{Ba}$	$0,23 \pm 0,05^{Ba}$

Letras diferentes representa diferença estatisticamente significante ($P < 0,05$). Letras maiúsculas representa análise para o fator condição do tecido ósseo (Colunas); Letras minúsculas representa análise para o fator tempo de avaliação (linhas).

Tabela 2. Média e desvio padrão do Módulo de Flexão (MPa) do osso irradiado e não irradiado avaliado em 30 e 60 dias.

Condição tecido ósseo	Período de Avaliação	
	30 dias	60 dias
Controle	12,9 ± 0,3 ^{Aa}	12,5 ± 1,0 ^{Aa}
Irradiado	9,8 ± 1,2 ^{Ba}	11,0 ± 1,2 ^{Ba}

Letras diferentes representa diferença estatisticamente significativa (P<0,05). Letras maiúsculas representa análise para o fator condição do tecido ósseo (Colunas); Letras minúsculas representa análise para o fator tempo de avaliação (linhas).

Tabela 3. Média e desvio padrão da Resistência Flexural (N) do osso irradiado e não irradiado avaliado em 30 e 60 dias.

Condição tecido ósseo	Período de Avaliação	
	30 dias	60 dias
Controle	53,7 ± 14,8 ^{Ab}	86,6 ± 34,6 ^{Aa}
Irradiado	65,5 ± 15,6 ^{Ab}	95,0 ± 25,8 ^{Aa}

Letras diferentes representa diferença estatisticamente significativa (P<0,05). Letras maiúsculas representa análise para o fator condição do tecido ósseo (Colunas); Letras minúsculas representa análise para o fator tempo de avaliação (linhas).

Tabela 4. Média e desvio padrão do módulo de elasticidade por indentação do osso irradiado e não irradiado avaliado em 30 e 60 dias.

Condição tecido ósseo	Período de Avaliação	
	30 dias	60 dias
Controle	14,3 ± 2,8 ^{Aa}	15,8 ± 3,1 ^{Aa}
Irradiado	8,2 ± 2,7 ^{Ba}	10,9 ± 4,0 ^{Bb}

Letras diferentes representa diferença estatisticamente significativa (P<0,05). Letras maiúsculas representa análise para o fator condição do tecido ósseo (Colunas); Letras minúsculas representa análise para o fator tempo de avaliação (linhas).

Tabela 5. Média e desvio padrão da dureza Vickers por indentação do osso irradiado e não irradiado avaliado em 30 e 60 dias.

Condição tecido ósseo	Período de Avaliação	
	30 dias	60 dias
Controle	84, ± 35,1 ^{Ab}	147,6 ± 84,5 ^{Aa}
Irradiado	58,3 ± 72,3 ^{Ba}	52,0 ± 23,5 ^{Ba}

Letras diferentes representa diferença estatisticamente significativa (P<0,05). Letras maiúsculas representa análise para o fator condição do tecido ósseo (Colunas); Letras minúsculas representa análise para o fator tempo de avaliação (linhas).

Ensaio biomecânicos são comumente empregados para simular e prever o comportamento biomecânico do osso humano (Dunlop et al, 2010). No presente estudo, foram empregados diferentes testes para avaliar as alterações produzidas pela radiação ionizante no tecido ósseo. A caracterização das propriedades do tecido ósseo proporciona o mapeamento dos efeitos de procedimentos terapêuticos e alterações patológicas no mesmo. Os resultados deste estudo demonstraram que a radioterapia e o processo maturação do tecido representado pelo momento da realização do teste influenciaram as propriedades mecânicas do tecido ósseo. Assim a hipótese nula foi rejeitada.

Na engenharia, os materiais são muito bem caracterizados quanto as suas propriedades mecânicas, com reprodutibilidade definida fundamentalmente pela escolha da metodologia utilizada nos ensaios. Isso torna-se uma rotina na caracterização de materiais homogêneos com dados mais precisos e constantes de módulo de elasticidade e coeficiente de Poisson dos materiais, que são essenciais para a alimentação dos modelos de elementos finitos. (Alander et al, 2005). O mesmo não ocorre com os materiais biológicos, nos quais estruturas heterogêneas e anisotrópicas são prevalentes e ainda frente a carência de caracterização de suas propriedades no estágio normal e destas estruturas modificadas por protocolos de tratamento ou por alterações fisiopatológicas. Os ossos apresentam característica anisotrópica, existindo muitas divergências quanto aos valores do módulo de elasticidade na literatura, o que pode estar relacionado à falta de caracterização do comportamento dos materiais e uso de metodologias inadequadas. (Cooper, 1977; Sanada et al, 2007)

Para melhor caracterizar as propriedades do osso no estágio normal e quando submetido a radiação optou-se pelo uso de associação de metodologias destrutivas e não destrutivas. O uso desta associação mostrou-se promissor, uma vez que a especificidade de cada teste pode melhor caracterizar pequenas alterações que o uso de apenas uma metodologia. O

teste de flexão em três pontos não foi capaz de detectar alteração na resistência flexural sob a radiação. Geralmente esta metodologia é utilizada para avaliar materiais frágeis, devido a resistência a tração relativamente mais baixa comparada à resistência a compressão na região do carregamento (Korres, et al, 2013; Raposo et al, 2013). O teste parece não ser suficientemente específico para detectar as alterações microestruturais que são geradas pela radiação, o que pode ser explicado pela geometria de análise do teste onde há concentração de tensões em área muito restrita da amostra.

Muitos autores utilizam o teste de flexão de 3 pontos para medir o módulo de flexão dos materiais que corresponderia ao módulo de elasticidade (Nyaruba, 1998; Albert et al, 2013). No entanto, este método realizado em máquinas de ensaios mecânicos afere a resistência dos materiais até o limite de ruptura dos mesmos. Estes valores são captados após o material ter percorrido os regimes elástico, plástico e ter chegado ao limite de ruptura. Sendo assim, este teste parece ser incapaz de avaliar com precisão o exato limite de elástico dos materiais, resultando em valores distorcidos que podem interferir no cálculo do módulo de elasticidade. Esta variabilidade de metodologias para cálculo destas propriedades acaba por trazer questionamento nos resultados dos estudos que utilizam estas propriedades para análise por elementos finitos em estruturas biológicas (Cooper, 1977; Alander, 2005). A medida do módulo de elasticidade determinada pelo ensaio de flexão tende a ser menor em relação a outros ensaios mecânicos (Rho et al, 1993). Isso ocorre devido ao deslocamento local do espécime dado pelo suporte de aplicação da carga causar excesso de deformação em flexão. Além disso, o osso é um material heterogêneo, descontínuo e anisotrópico. Assim, o módulo de elasticidade do tecido ósseo não possui um valor único, mas deve ser caracterizado por valores aproximados, pois varia com a direção e modo de carregamento, microestruturas e dimensões dos espécimes. (Leng, 2013; Rho et al, 1998). No entanto mesmo se tratando de obtenção do módulo de elasticidade pelo ensaio de flexão, a associação com a extensometria foi capaz de demonstrar redução nos valores do módulo de elasticidade dos fêmures irradiados. Estes achados comprovam que a radioterapia altera as

propriedades biomecânicas do tecido ósseo, visto que a redução de matriz óssea e da lacunaridade altera a microestrutura óssea e as características morfológicas do grupo irradiado, caracterizando uma remodelação óssea desorganizada, conforme analisado histologicamente no trabalho realizado por (Rabelo et al. 2010).

Aparentemente, a aplicação de testes não-destrutivos, como método de extensometria (Sakaguchi et al,1991) parece mais adequada para a verificação da interferência de fatores internos em estruturas e materiais. O método de extensometria é capaz de avaliar as deformações na superfície do material , convertendo sinais elétricos em unidades métricas como deformação (μs). Este ensaio é capaz de detectar as variações interatômicas inferiores e mostrar quando a amostra se move do regime elástico ao plástico. A associação do método de extensometria e flexão de 3 pontos é importante para avaliar o limite de elasticidade de uma maneira mais precisa (Franklyn et al, 2013), uma vez que a medição da deflexão da amostra de ensaio,somente, por máquinas mecânicas nem sempre é confiável. (Cooper, 1977).

Diversos autores consideram que a mudança estrutural e o processo de cicatrização do osso irradiado esteja relacionado à mudanças na composição e na substituição de componentes ósseos, além de se considerar a hipótese de que tais alterações biomecânicas estejam intimamente relacionadas à desorganização cortical da matriz óssea (Rabelo et al, 2010). Tal teoria da desorganização cortical da matriz óssea se sustenta na afirmativa de que osteócitos diminuem nas 2 primeiras semanas após radiação, porém 18 semanas depois, osteócitos foram encontrados em quase todas lacunas (Maeda et al, 1988).

A radioterapia afeta diretamente as fibras colágenas que devido a grande quantidade de moléculas de água se torna o principal alvo de ataque dos radicais livres. Estes radicais livres entram em contato com moléculas de colágeno e geram alterações irreversíveis na estrutura química do colágeno. (Akkus et al, 2005; Barth et al, 2010).

O coeficiente de Poisson mede a deformação transversal em relação à direção longitudinal de um material (Lu et al, 2012), ou seja, é a relação

estabelecida entre deformações ortogonais. No presente estudo foi observado redução significativa nos valores de ν para o osso normal e irradiado. Este fato pode ser também explicado pelas alterações microestruturais descritas anteriormente, onde o material torna-se menos resistente às tensões cisalhantes e com isso muito mais susceptível a fraturas. Adicionalmente, os dados deste estudo ressaltam a preocupação com estudos de elementos finitos que utilizam o mesmo valor para coeficiente de Poisson e alteram apenas o módulo de elasticidade em modelos que visam estudar alterações em estruturas biológicas. A variação dos valores de ν neste estudo foram consideráveis ressaltando a necessidade de melhor caracterizar espécimes de forma individualizada para a respectiva modelagem matemática.

O teste de nanoindentação caracterizou uma redução significativa tanto na dureza Vickers quanto do módulo de elasticidade do osso irradiado comparados aos respectivos controles. O que demonstra que esta metodologia é eficaz na caracterização localizada das propriedades mecânicas e pode ser muito útil no mapeamento das alterações fisiopatológicas do tecido ósseo em diferentes. A relação entre o módulo de elasticidade e a dureza Vickers que em muitos estudos de materiais odontológicos parece ser apenas discreta, neste estudo ficou evidente para a caracterização do tecido ósseo (Bala et al, 2011). Estudos mostraram que a deformação elástica está associada às propriedades elásticas do osso, enquanto que a parte orgânica está relacionada com as propriedades plásticas deste tecido (Bala et al, 2011; Follet, 2004). Foi notório que a radiação reduziu as propriedades do fêmur e conseqüentemente sua performance biomecânica, que acredita-se estar relacionado à desorganização da microarquitetura óssea. Os canais harvesianos são organizados hierarquicamente para assegurar certo grau de robustez ao osso. Quando irradiado, tal hierarquia se desconfigura levando uma diminuição na resistência mecânica, podendo até ocasionar uma osteorradionecrose (Rabelo et al, 2010; Costa et al, 2005; Jiang et al, 1999).

Diversos trabalhos utilizando a nanoindentação para obter o módulo de elasticidade do osso foram realizados. Observa-se enorme variabilidade nos

resultados que podem ser explicados pela decorrência de variáveis que podem interferir positivamente ou negativamente no estudo.

Em estudo utilizando o método de nanoindentação foram obtidos módulo de elasticidade $13,5 \pm 2,0$ GPa em vértebra humana, $22,5 \pm 1,3$ GPa em ostéons de osso cortical da tíbia e $25,8 \pm 0,7$ GPa em lamelas de osso cortical da tíbia (Maeda et al. 1988). Outro estudo utilizando esta mesma metodologia chegaram a valores de $18,14 \pm 1,7$ Gpa para o osso trabecular e $20,2 \pm 0,27$ Gpa em osso cortical. Estudo de nanoindentação em cortical bovina e observaram valores de módulo de elasticidade de $21,1 \pm 2,0$ ósteons úmidos, $25,1 \pm 1,6$ lamelas úmidas; $24,4 \pm 2,2$ ósteons secos e $27,5 \pm 1,2$ lamelas secas (Rho et al, 1999).

Por outro lado não foi encontrado na presente literatura caracterização do módulo de elasticidade e dureza por meio da nanoindentação ou outro método em ossos irradiados. Este fator ressalta a importância dos dados deste estudo que possibilitam assim a avaliação individualizada de protocolos terapêuticos e mesmo de alterações patológicas em tecidos ósseos. Mostra ainda uma alternativa importante de caracterização das reais propriedades de amostras biológicas alvo de modelagem computacional por meio de análise por elementos finitos. Uma vez que com a associação de geração de modelos por meio de microtomografia computadorizadas, que se caracteriza por ser uma análise não destrutiva, e a posterior preparo da amostra para a caracterização das propriedades possibilita a alimentação dos modelos com propriedades individualizadas. Com isso novos trabalhos devem ser realizados no intuito de buscar caracterizar o tecido ósseo de outros modelos experimentais animais como coelhos, cães e mesmo o tecido ósseo humano nas diversas condições experimentais para potencializar os resultados dos estudos computacionais.

A metodologia de extensometria conseguiu demonstrar similar nível de especificidade do método de nanoindentação que é um teste já consagrado na literatura para determinar a elasticidade de materiais e tecidos biológicos. Tais resultados sugerem que a associação de ensaios mecânicos com o método de extensometria em osso possa ser válido para ser utilizado com maior precisão na verificação das propriedades anisotrópicas do fêmur, em futuras análises.

Achados adicionais deste estudo motivam a realização de novos experimentos empregando estas e outras metodologias como o mapeamento não destrutivo de imagem das amostras como a microtomografia computadorizada e a análise histológica. Notou-se que os ossos que apresentavam somente corticais fraturavam como corpo frágil com uma linha oblíqua transversal. Já os ossos que apresentavam pequena quantidade de osso medular no interior fraturavam em fraturas tipo galho verde. Isto demonstra uma vez mais que o emprego de apenas uma metodologia pode muitas vezes levar a conclusões que causam interpretações errôneas pelo real fator de influência. Outro aspecto verificado durante o teste de resistência flexural de 3 pontos foi a nitidez observada macroscopicamente da diferença de espessura e comprimento dos fêmures quando da comparação entre os ossos irradiados e controles. Novos estudos que envolvam mensuração e imagens macroscópicas comparando estes fatores podem demonstrar o que inicialmente é sugerido de que a radiação interfere no processo de crescimento e maturação óssea.

De forma geral, o tempo de avaliação, favoreceu as propriedades mecânicas, uma vez que os animais utilizados eram jovens e estavam em desenvolvimento. Assim, independente da condição experimental (irradiado ou não), o crescimento do animal propiciou aumento de massa óssea com melhora das propriedades mecânicas dentro de cada condição (Maeda et al, 1988; Vogel et al, 1979). Isto ressalta a importância do cuidado na seleção de animais com idade e origem similares e ainda para a padronização do período de avaliação para que não haja efeito cruzado deste processo de crescimento que pode atenuar alterações importantes de outros fatores como a radioterapia testada neste estudo.

Futuramente, sugere-se avaliação das alterações microestruturais promovidas no osso pela radioterapia para realação com as alterações macroestruturais que culminaram em propriedades mecânicas alteradas no presente estudo. Necessita-se de alternativas que reduzam os efeitos deletérios causados pela radioterapia.

7. CONCLUSÃO

Considerando as limitações metodológicas deste estudo, foi possível concluir que a radioterapia diminui o coeficiente de Poisson, o módulo de elasticidade e a dureza do tecido ósseo, e que os testes de extensometria e nanoindentação são os testes mais indicados para mensurar as propriedades biomecânicas do osso.

Alander P, Lassila LV, Vallittu PK. The span length and cross-sectional design affect values of strength. **Dent Mater**. 2005;21(4):347-53.

Albert CI, Jameson J, Harris G. Design and validation of bending test method for characterization of miniature pediatric cortical bone specimens. **Proc Inst Mech Eng H**. 2013;227(2):105-13.

Baker MI, Eberhardt AW, Martin DM, McGwin G, Lemons JE. Bone properties surrounding hydroxyapatite-coated custom osseous integrated dental implants. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**. 2010;95:218-224.

Bala Y, Depalle B, Douillard T, Meille S, Clément P, Follet H, et al. Respective roles of organic and mineral components of human cortical bone matrix in micromechanical behavior: an instrumented indentation study. **J Mech Behav Biomed Mater**. 2011;4:1473-1482.

Baldassarri M, Bonfante E, Suzuki M, Marin C, Granato R, Tovar N, et al. Mechanical properties of human bone surrounding plateau root form implants retrieved after 0.3-24 years of function. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**. 2012;100:2015-2021.

Bekelman JE, Epstein AJ, Emanuel EJ. Single- vs multiple-fraction radiotherapy for bone metastases from prostate cancer. **JAMA**. 2013;310(14):1501

Bento DA. Análise de resistência mecânica em implantes de osso: um enfoque numérico e experimental. 2003. 158 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

* De acordo com a Norma da FOUFU, baseado nas Normas de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos com conformidade com Medline (Pubmed).

Bicalho A, Pereira R, Zanatta R, Franco S, Tantbirojn D, Versluis A, et al. Incremental Filling Technique and Composite Material-Part I: Cuspal Deformation, Bond Strength, and Physical Properties. **Oper Dent**. 2013; Oct 22. [Epub ahead of print]

Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. Principles of bone biology 2ed. San Diego Academic Press; 2002. Giannoudis, PV.; Dinopoulos, H.; Tsiridis, E. Bone substitutes: An update. *Injury, Bristol*, v.36, n.3, p.S20-S27, nov. 2005.

Carter DR, Beaupré GS, Giori NJ, Helms JA. Mechanobiology of skeletal regeneration. **Clin Orthop Relat Res**. 1998 Oct;(355 Suppl):S41-55. Review..

Carter DR, Hayes WC. The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure. **J Bone Joint Surg Am**. 1977 Oct;59(7):954-62. PubMed PMID: 561786.

Chabrier F, Lloyd CH, Scrimgeour SN. Measurement at low strain rates of the elastic properties of dental polymeric materials. **Dent Mater**. 1999;15:33–8.

Cooper GA. Optimization of the three-point bend test for fracture energy measurement. **J Mater Sci**. 1977;12(2):277-89.

Currey JD. 2002. Bones. Structure and Mechanics. Princeton: Princeton Univ. Press

Currey JD. Bone architecture and fracture. **Curr Osteoporos Rep**. 2005 Jun;3(2):52-6. Review..

Da Cunha SS, Sarmiento VA, Ramalho LMP, Freitas AC, Almeida D, Tavares ME, Souza JC, Veeck EB, da Costa NP. Effects of radiotherapy on bone tissue. **Radiol Bras**. 2007;40(3):189-92.

Diez-Perez A, Güerri R, Nogues X, Cáceres E, Peña MJ, Mellibovsky L, et al. Microindentation for in vivo measurement of bone tissue mechanical properties in humans. **J Bone Miner Res.** 2010;25:1877-1885.

Dunlop, J.W. C.; Fratzl, P. Biological Composites. Annu. **Rev. Mater. Res.** 2010, 40:1–24

Ebenstein DM, Pruitt LA. Nanoindentation of biological materials. **Nano Today.** 2006; 1(3): 26–33.

Filvaroff, EH. VEGF and bone. J Musculoskel Neuron Interact, Athens, 2003,aug;3(4):304-307.

Follet H, Boivin G, Rumelhart C, Meunier PJ. The degree of mineralization is a determinant of bone strength: a study on human calcanei. **Bone.** 2004;34(5):783-9.

Franklyn M, Field B. Experimental and finite element analysis of tibial stress fractures using a rabbit model. World J Orthop. 2013; 4(4):267-78.

Fratzl P, Gupta HS, Paschalis EP, Roschger P. Structure and mechanical quality of the collagenmineral nano-composite in bone. **J Mater Chem.** 2004;14:2115–23

Fratzl P, Weinkamer R. Nature's hierarchical materials. **Prog. Mater. Sci.** 2007; 52:1263–334.

Gondim, ALM. **Efeito da laserterapia na biomodulação da osteogênese em defeitos críticos confeccionados em calota craniana de ratos.** 2007. 117f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Porto Alegre, 2007.

Ha CT, Li XH, Fu D, Xiao M, Landauer MR. Genistein nanoparticles protect mouse hematopoietic system and prevent proinflammatory factors after gamma irradiation. **Radiat Res**. 2013;180(3):316-25.

Hadjidakis, DJ.; Androulakis, II. Bone remodeling. **Ann NY Acad Sci**, Nova York, v.1092, p.385-396, dec. 2006.

ISO178 (2010). Plastics - Determination of flexural properties: International Organization for Standardization, pp. 19.

ISO4049 (2009). Dentistry - Polymer-based restorative materials: International Organization for Standardization, pp. 28.

JJ, Ritchie RO. Fatigue of mineralized tissues: cortical bone and dentin. **J Mech Behav Biomed Mater**. 2008 Jan;1(1):3-17.

Katchburian, E.; Arana, V. **Histologia e Embriologia Oral**. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

Keller EE, Tolman DE, Zuck SL, Eckert SE. Mandibular endosseous implants and autogenous bone grafting in irradiated tissue: a 10-year retrospective study. **Int J Oral Maxillofac Implants**. 1997 Nov-Dec;12(6):800-13.

Klenke, FM. et al. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. **J Biomed Mater Res A**, Hoboken 2008,jun; 85(3):777-786.

Korres N, Tsiridis E, Pavlou G, Mitsoudis A, Perrea DN, Zoumbos AB. Biomechanical characteristics of bone in streptozotocin-induced diabetic rats: A in-vivo randomized controlled experimental study. **World J Orthop**. 2013;4(3):124-9.

Leng H, Reyes MJ, Dong XN, Wang X. Effect of age on mechanical properties of the collagen phase in different orientations of human cortical bone. **Bone**. 2013;55:288-291.

Lu MH, Mao R, Lu Y, Liu Z, Wang TF, Chen SP. Quantitative imaging of young's modulus of soft tissues from ultrasound water jet indentation: a finite element study. **Comput Math Methods Med**. 2012;2012:979847.

Lynch, SE.; Genko, R.; Marx, R. Tissue engineering application in maxillofacial surgery and periodontics. Quintessence,1999,jan;5:93-112.

Maeda M, Bryant MH, Yamagata M, Li G, Earle JD, Chao EY. Effects of irradiation on cortical bone and their time-related changes. A biomechanical and histomorphological study. **J Bone Joint Surg Am**. 1988;70(3):392-9.

Marshall DB, Noma T, Evans AG. A Simple Method for Determining Elastic-Modulus-to-Hardness Ratios using Knoop Indentation Measurements. **J Am Ceram Soc**. 1982;65(10): 175-176.

Maxymiw WG, Wood RE. The role of dentistry in head and neck radiation therapy. **J Can Dent Assoc**. 1989 Mar;55(3):193-8. Review. PubMed PMID: 2647245.

Meredith N, Sherriff M, Setchell DJ, Swanson SA. Measurement of the microhardness and Young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. **Arch Oral Biol**. 1996;41(6):539-45.

Nishioka RS, Nishioka LNB, Abreu CW, et al. Machined and plastic copings in three-element prostheses with different types of implant abutment joints: a strain-gauge comparative analysis. **J Appl Oral Sci**. 2010;18:225-230

Nyaruba MM, Yamamoto I, Kimura H, Morita R. Bone fragility induced by X-ray irradiation in relation to cortical bone-mineral content. **Acta Radiol**. 1998;39(1):43-6.

Oliver WC, G.M. Pharr. Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. **J Mater Res**. 2004; 19(1): 3-20.

Pelisser A, Vier-Pelisser FV, Fontanella VRC, Figueiredo MAZ. Microscopical analysis of fractionated cobalt-60 radiotherapy effects on mandibles of rats. **Radiol Bras**. 2007;40(2):113-8.

Rabelo GD, Beletti ME, Dechichi P. Histological analysis of the alterations on cortical bone channels network after radiotherapy: A rabbit study. **Microsc Res Tech**. 2010 Oct;73(11):1015-8.

Raposo, LHB. Barreto, C, Sousa, SJ, Versluis, A, Correr-Sobrinho, LC. Soares, CJ. Three-point bending test parameters to obtain elastic modulus of composites. Epub process.

Reilly DT, Burstein AH. The elastic and ultimate properties of compact bone tissue. **J Biomech**. 1975;8(6):393-405.

Rho J, Aahman R, Turner C. Young's modulus of trabecular and cortical bone material: ultrasonic and microtensile measurements. **J Biomech**. 1993; 26(2):111-19.

Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. **Med Eng Phys**. 1998;20:92 –102.

Sakaguchi RL, Brust EW, Cross M, DeLong R, Douglas WH. Independent movement of cusps during occlusal loading. **Dent Mater**. 1991;7(3):186-90.

Salgado, JFM. **Avaliação da velocidade do processo de regeneração óssea primária, conjugando, a técnica de regeneração óssea guiada com membrana de colágeno aniônico e terapia laser baixa potência**. 2002. 117 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2002.

Sanada, JT **Avaliação da resistência e módulo de elasticidade de osso mineralizado e desmineralizado pelos testes de microtração.**

Bauru, 2007. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Sikavitsas, VI. Temenoff, JS. Mikos, AG. Biomaterials and Bone Mechanotransduction. **Biomaterials**, Guildford, v.22, n.19, p.2581-2593, oct. 2001.

Silva RV. et al. The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Filadelfia, v.34, n.2, p.78-184, mar. 2005.

Soares CJ, Neiva NA, Soares PB, Dechichi P, Novais VR, Naves LZ, Marques MR. Effects of chlorhexidine and fluoride on irradiated enamel and dentin. **J Dent Res**. 2011 May;90(5):659-64.

Soares CJ, Martins LR, Fonseca RB, Correr-Sobrinho L, Fernandes Neto AJ. Influence of cavity preparation design on fracture resistance of posterior Leucite-reinforced ceramic restorations. **J Prosthet Dent**. 2006; 95(6):421-29.

Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. **Crit Rev Oral Biol Med**. 2003;14(3):199-212. Review.PubMed

Vogel HG. Influence of maturation and aging on mechanical and biochemical parameters of rat bone. **Gerontology**. 1979; 25(1): 16-23.

Vulesevic B, McNeill B, Geoffrion M, Kuraitis D, McBane JE, Lochhead M, et al. Glyoxalase-1 over-expression in bone marrow cells reverses defective neovascularization in STZ-induced diabetic mice. **Cardiovasc Res**. 2013 Dec 16. [Epub ahead of print].

Wagner W, Esser E, Ostkamp K. Osseointegration of dental implants in patients with and without radiotherapy. **Acta Oncol.** 1998;37(7-8):693-6.

Wei W, Sadeghipour K, Boberick K, Baran G. Predictive modeling of elastic properties of particulate-reinforced composites. **Mater Sci Eng A.** 2002;332:362–70.