

Luiz Henrique Ferreira Júnior

**Efeito da oxigenação hiperbárica no osso
submetido e não submetido à radiação ionizante:
análise macroscópica e mecânica em tíbias de
rato.**

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

Uberlândia, 2017

Luiz Henrique Ferreira Júnior

**Efeito da oxigenação hiperbárica no osso
submetido à radiação ionizante: análise
macroscópica e mecânica em tíbias de rato.**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Quagliatto

Co-orientador(a): Prof.^a Dr.^a Flaviana Soares Rocha

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Sérgio Quagliatto

Prof.^a Dr.^a Flaviana Soares Rocha

Prof^a. Dr.^a Paula Dechichi

Prof.^a Dr.^a Carla Silva Siqueira

Uberlândia, 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F383e
2017

Ferreira Júnior, Luiz Henrique, 1991
Efeito da oxigenação hiperbárica no osso submetido e não submetido
à radiação ionizante: análise macroscópica e mecânica em tíbias de rato /

Luiz Henrique Ferreira Júnior. - 2017.

36 p. : il.

Orientador: Paulo Sérgio Quagliatto.

Coorientadora: Flaviana Soares Rocha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui bibliografia.

1. Odontologia - Teses. 2. Ossos - Teses. 3. Radioterapia - Teses. 4.
Oxigenação Hiperbárica - Teses. I. Quagliatto, Paulo Sérgio. II. Rocha,
Flaviana Soares, 1986. III. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família
que tanto amo: minha mãe Sidimaia, meu pai
Luiz Henrique, e meus irmãos Lara e Luciano,
por todo amor, carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

Se você está lendo esta página é porque eu consegui. E não foi fácil chegar até aqui. Do processo seletivo, passando pela aprovação até a conclusão do Mestrado, foi um longo caminho percorrido. Nada foi fácil, nem tampouco tranquilo. “A sola do pé conhece toda a sujeira da estrada” – (provérbio Africano).

Agradeço à Deus e aos meus guias por terem me dado forças, paz e serenidade para realização deste sonho, e me ajudado a superar um período difícil, mas de intenso aprendizado.

Aos meus pais, exemplos de luta e determinação, que me fizeram enxergar na educação uma alternativa para mudar minha história social e cultural. Se há algo que faz a diferença na formação da personalidade e na vida de uma pessoa é o amor que ela recebe. Vocês me educaram com amor, se dedicaram à minha educação como ser humano, me deram paz. Com paciência e compreensão, me apoiaram sempre em cada decisão sem nenhuma cobrança. A vocês, que muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, partilho a alegria desse momento.

Aos meus avós maternos Euclênia (*in memoriam*) e Mozart (*in memoriam*), amor incondicionalmente eterno. Que falta vocês fazem. Vó Kena pela garra, perseverança e otimismo contagiantes até hoje. Vô Mozar pelas brincadeiras, músicas, por tudo.

Aos meus irmãos Lara e Luciano, que são e sempre serão meus grandes companheiros de horas boas e ruins, aos quais amo imensamente.

À minha namorada Isabella, que esteve ao meu lado nas horas que chorei e que sorri. Por me transmitir paz de espirito, muito amor e carinho. Pelos sorrisos diários, e por ser minha energia e motivação durante as batalhas diárias. Você faz e fará sempre parte da minha história.

À minha cadelinha Brigitte, pela companhia em todas as madrugadas de estudo e por ter me feito enxergar a vida de uma maneira diferente.

Aos meus amigos RSL, por serem mais que amigos de festas, e sim, amigos de vida.

À Professora Dr.^a Flaviana Soares Rocha agradeço por acreditar que eu era capaz e pela orientação. Há 4 anos, mesmo sem me conhecer direito, abriu as portas, como uma mãe que abre os braços para receber um filho. Nesse mundo, repleto de pessoas ruins, você me faz acreditar que os bons são a maioria. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e dedicação. Você é uma pessoa ímpar, onde busco inspirações e exemplo para me tornar melhor em tudo que faço e irei fazer daqui para frente. Terei orgulho em dizer que um dia fui seu orientado.

Ao professor Dr. Paulo Sérgio Quagliatto, por me mostrar os encantos da dentística. Obrigado pelos ensinamentos, orientações e contribuições. Um exemplo para mim durante os meus primeiros passos na vida acadêmica.

À Professora Dr.^a Priscilla Barbosa Ferreira Soares, pelos ensinamentos, orientações, incentivo, amizade e dedicação. Você esteve ao meu lado durante esses dois anos, e não mediu esforços para me ajudar, sempre com uma solução simples para os meus problemas que pareciam ser gigantes. Muito Obrigado!

À Prof^a. Dr^a. Paula Dechichi, pelos ensinamentos, apoio na execução da parte experimental e condução do projeto original de onde veio essa dissertação, e convívio no laboratório.

Ao médico Dr. Vitor Carvalho Lara e os físicos médicos Dr. Mizael Carlos de Alencar, Dr.^a Adriana Rosa de Oliveira e Dr. Luiz Fernando Pirani, pela ajuda durante os experimentos e radioterapia da pesquisa.

Aos Prof. Dr. Lair Mambrini Furtado e Dr.^a Leticia de Souza Castro Filice, pelas contribuições realizadas a esse trabalho durante o exame de

qualificação, e ao Prof. Dr. Jonas Dantas Batista por gentilmente ter cedido algumas imagens utilizadas nesse trabalho.

A todos os professores da FOUFU, funcionários, e todas as pessoas que fizeram parte do meu cotidiano me proporcionando momentos de alegria, necessários para encarar os obstáculos da vida.

À 70^a turma de Odontologia e 79^a turma de Odontologia. A primeira por ter sido minha família durante cinco anos. A segunda, pelo acolhimento e respeito a minha pessoa. Meu muito obrigado!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

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

Ao Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro pelo apoio durante a parte experimental deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio financeiro e financiamento desta pesquisa.

Aos funcionários do CPBIO e do Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia, pelo apoio durante a parte experimental deste trabalho.

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

A todos os companheiros de Pós-Graduação que estiveram presentes nessa etapa.

EPÍGRAFE

“Sempre há uma solução. Não existe dor, sofrimento ou mal que não tragam seu ensinamento. Não há problema que não tenha a resposta certa da vida, meu filho”

Pai João de Aruanda

“Trarei a ti também, tudo que desejas ao teu próximo.”

Exu Tranca Rua das Almas

“Em cada passo que você der, cada estrada que trilhar, todo caminho que escolher minha mão lhe guiará.”

Caboclo Tupiniquim

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	01
RESUMO	02
ABSTRACT	03
1- INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO	04
2- PROPOSIÇÃO	13
3- MATERIAIS E MÉTODOS	14
4- RESULTADOS	21
5- DISCUSSÃO	25
6- CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXO 1	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATA - Pressão Atmosférica Absoluta

OH - Oxigenação Hiperbárica

C - Controle

N - Newtons

Gy - Gray

Kgf - Quilograma Força

mm - Milímetros

LM - Látero-Medial

N/mm - Newtons por milímetro

cm - Centímetros

Kg - Quilograma

g - Gramas

AP - Ântero-Posterior

RXT - Radioterapia

F_{max} - Força Máxima

Mg - Miligramas

Min - Minutos

mmHg - Milímetros de Mercúrio

RESUMO

A radioterapia (RXT) é amplamente indicada para o tratamento do câncer, entretanto, essa terapia provoca efeitos indesejáveis. A oxigenação hiperbárica (OH) tem sido utilizada para minimizar as alterações decorrentes da radiação. O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações macroscópicas e mecânicas do osso previamente submetido à radiação ionizante, e tratado com oxigenação hiperbárica. Foram utilizadas as tíbias de 20 ratos machos da linhagem *Wistar*, com peso entre 300 a 400g, distribuídas aleatoriamente em grupos: Controle (Tíbia direita: n=5), Radioterapia (Tíbia esquerda: n=5), Oxigenação Hiperbárica (Tíbia direita: n=5) e Radioterapia + Oxigenação Hiperbárica (Tíbia esquerda: n=5). A radioterapia foi realizada na tíbia esquerda em todos os animais e, após 30 dias, em 10 animais foi realizada oxigenação hiperbárica diariamente até o sacrifício. Após 3 ou 7 dias da OH, todos os animais foram sacrificados e as tíbias removidas para análise macroscópica e biomecânica. Os valores de comprimento e espessura foram maiores nas amostras não irradiadas quando comparados às irradiadas. Observou-se aumento significativo nos valores de comprimento no grupo Radioterapia quando comparados os períodos de 3 e 7 dias. Também houve aumento da espessura AP ao longo do tempo nos grupos Radioterapia e Radioterapia + Oxigenação Hiperbárica. No osso irradiado, houve uma tendência à redução da força, da energia de trabalho para falha e da rigidez em comparação com o osso não irradiado, mesmo após a oxigenação hiperbárica. Houve diferença significativa para a Força Máxima (Fmax) apenas entre o grupo Controle quando comparado a Radioterapia no dia 7. Os resultados indicam que a radiação ionizante alterou o crescimento e a resistência do osso. Embora houvesse uma tendência para melhora das condições ósseas após OH, ela não foi suficiente para compensar os prejuízos causados pela radiação ionizante no osso.

Palavras-chave: Tecido ósseo – Radioterapia – Oxigenação Hiperbárica.

ABSTRACT

Radiation therapy is widely indicated for cancer treatment. Hyperbaric oxygen has been used to assist wound healing in the treatment of complications associated with the effects of radiation. The tibiae of twenty male healthy *Wistar* rats, weighing 300 to 400g were randomly divided into Control (Right tibiae: n=5), Radiotherapy (Left tibia: n=5), Hyperbaric Oxygen Therapy (Right tibiae: n=5) and Radiotherapy + Hyperbaric Oxygen Therapy (Left tibiae: n=5) groups. Radiotherapy was made on the left tibiae in all animals. Treatment with HBO started 30 days after radiotherapy and was conducted daily in 10 animals until euthanasia. After 3 or 7 days, all the animals were euthanized and tibiae removed for Macroscopic and Biomechanical analysis. Length and thickness values were greater in non-irradiated specimens when compared to irradiated. A significant increase in length values was observed in the Radiotherapy group when compared day 3 and day 7. There was also an increase in AP thickness over time in the groups Radiotherapy and Radiotherapy + Hyperbaric Oxygen Therapy. Irradiated bone tended to reduce the force, work to failure and stiffness compared with non-irradiated bone, even with HBO treatment, with significant difference observed for Fmax between Control group when compared to Radiotherapy at day 7. The results indicate that ionizing radiation has altered bone growth and strength. Although there was a tendency for improvement of the bone conditions after HBO, this therapy was not enough to compensate for the damages caused by the ionizing radiation in the bone.

Keywords: Bone tissue – Ionizing Radiation - Hyperbaric oxygen therapy.

1- INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

O osso (como um orgão) e o esqueleto (como um todo) apresentam funções essenciais para o funcionamento do corpo humano. Sua arquitetura, em conjunto com os músculos esqueléticos, propicia dinamismo mecânico, sustentação e proteção de órgãos internos. Os ossos também contribuem para o armazenamento e equilíbrio de minerais e triglicerídeos (Junqueira & Carneiro, 2013), bem como para a produção de células mesenquimais, eritrócitos, leucócitos e plaquetas por meio da medula óssea, que é um tecido conjuntivo especializado presente no interior dos ossos longos (Junqueira & Carneiro, 2013).

O tecido ósseo é uma forma especializada de tecido conjuntivo constituído por uma fase mineral ou inorgânica que se assenta sobre uma matriz colágena ou orgânica. A fase inorgânica é composta essencialmente por cristais de fosfato de cálcio sob a forma de hidroxiapatita, enquanto a fase orgânica é composta por colágeno tipo I, proteoglicanas e proteínas não colágenas. A combinação entre os componentes minerais e os componentes orgânicos confere ao tecido ósseo rigidez com boa maleabilidade, tornando-o resistente às demandas funcionais (Katchburian & Arana, 2012; Junqueira & Carneiro, 2013).

Quatro diferentes tipos de células compõem o osso: osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células osteoprogenitoras. As células responsáveis pela síntese e deposição da matriz orgânica são os osteoblastos que também participam do processo de mineralização dessa matriz. Adjacente aos osteoblastos existem células osteogênicas ou osteoprogenitoras que se diferenciam em osteoblastos quando necessário. Durante a formação óssea alguns osteoblastos ficam aprisionados na matriz, sendo então denominados osteócitos. Estas células se comunicam entre si formando uma rede que permite a passagem de nutrientes e outras substâncias essenciais para a sobrevivência do osso. Além disso, os osteócitos participam da monitoração e manutenção da matriz óssea (Chen et al., 2009). Os osteoclastos, por sua vez, são células multinucleadas localizadas na superfície da matriz óssea e

responsáveis pela reabsorção da mesma, sendo ativos no processo de remodelação óssea (Katchburian & Arana, 2012; Junqueira & Carneiro, 2013; Florencio-Silva et al., 2015).

Microscopicamente, o tecido ósseo pode ser classificado em primário (imaturo) ou secundário (maduro ou lamelar). O tecido ósseo imaturo apresenta fibrilas colágenas sem organização definida, maior número de osteócitos incluídos na matriz óssea e menor conteúdo mineral. No adulto ele está presente nas suturas dos ossos do crânio, nos alvéolos dentários e em alguns pontos de inserção de tendões. Além disso, ele é depositado em situações que exijam uma rápida formação óssea, como acontece na região de reparação de fraturas. Por sua vez, o osso maduro possui uma arquitetura organizada em ósteons, que contém um canal de Harvers central, envolvido por lamelas concêntricas de matriz óssea. No interior desses canais transitam nervos e vasos sanguíneos. Entre as lamelas concêntricas se encontram pequenas cavidades onde estão alojados os osteócitos, interconectados pelos canalículos. Em um indivíduo adulto e saudável, o osso maduro adquire estrutura lamelar, com menor número de osteócitos incluídos na matriz e maior conteúdo mineral, o que lhe garante maior resistência à demanda mecânica (Katchburian & Arana, 2012; Junqueira & Carneiro, 2013; Florencio-Silva et al., 2015).

Macroscopicamente, o tecido ósseo apresenta importantes diferenças na organização estrutural. O osso cortical ou compacto se apresenta na forma de um sólido denso e é localizado nas superfícies ósseas. Por sua vez, o osso esponjoso ou trabecular, possui um arranjo em trabéculas delimitando pequenas cavidades, preenchidas por medula óssea. Embora macroscopicamente diferentes, o osso cortical e o osso esponjoso possuem a mesma constituição histológica (Katchburian & Arana, 2012; Junqueira & Carneiro, 2013).

As superfícies internas e externas dos ossos são revestidas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, que constituem o endósteo e o periôsteo, respectivamente. Ambos possuem a função de nutrir o tecido ósseo e fornecer

osteoblastos para o seu crescimento e reparação (Junqueira & Carneiro, 2013). O endósteo é rico em células, especialmente precursoras ósseas, e suprimento vascular, enquanto o periôsteo é um tecido conjuntivo fibroso (Katchburian & Arana, 2012; Ten Cate, 2013; Florencio-Silva et al., 2015).

Apesar do seu aspecto aparentemente inerte e estático, os ossos são estruturas dinâmicas, apresentando um processo combinado de formação e reabsorção, denominado de remodelação óssea. Este processo é contínuo e fisiológico, permitindo que o tecido ósseo se renove constantemente, responda aos estímulos externos e também sofra reparação para manutenção da sua arquitetura (Katchburian & Arana, 2012).

Em condições fisiológicas, os ossos são formados por duas maneiras distintas: ossificação intramembranosa e/ou ossificação endocondral. A ossificação intramembranosa ocorre durante o desenvolvimento dos ossos chatos ou laminados, especialmente aqueles que se encontram no crânio. Por sua vez, a ossificação endocondral acontece quando as células mesodérmicas se transformam em células produtoras de cartilagem, antes do início da formação do osso. É um processo mais lento que a ossificação intramembranosa e ocorre na maioria das partes do esqueleto, principalmente nos ossos longos (Abrahamsohn, 2008).

A ossificação endocondral em ossos longos ocorre utilizando uma matriz de cartilagem como molde. Inicialmente, a mineralização ocorre na periferia da matriz cartilaginosa, o que impede que os vasos sanguíneos penetrem a região interna e central da cartilagem. Devido à condição de hipoxia da região central, a matriz de cartilagem sofre alterações, com hipertrófia dos condrócitos; redução e mineralização da matriz cartilaginosa, e apoptose dos mesmos. (Junqueira & Carneiro, 2013). As cavidades deixadas pela morte destas células são invadidas por capilares sanguíneos, que levam células mesenquimais indiferenciadas do tecido conjuntivo adjacente para o interior das cavidades. Essa penetração por vasos sanguíneos irá formar um centro de ossificação chamada centro primário. Ele ocupa o centro da diáfise e irá se expandir

longitudinalmente rapidamente, acompanhado por um crescimento também longitudinal do periósteo (Junqueira & Carneiro, 2013).

Este processo origina a formação de espículas ósseas constituídas por matriz óssea e por matriz cartilaginosa que se mineraliza. Sendo assim, gradualmente, depois de um processo de reabsorção e remodelação, o tecido cartilaginoso é substituído por tecido ósseo. Desde o início da formação do centro primário de ossificação surgem osteoclastos, trazidos pelo suprimento sanguíneo, que irão reabsorver matriz óssea no interior do osso para a formação do canal medular. Mais tarde, ocorre o surgimento de centros secundários de ossificação, nas epífises (extremidades) do molde cartilaginoso com mecanismos de ossificação semelhante. Conforme o crescimento evolui, restará tecido cartilaginoso apenas em dois locais: na superfície articular e no disco epifisário (Junqueira & Carneiro, 2013).

Após a maturidade, há um decréscimo do percentual de crescimento longitudinal dos ossos longos. De uma maneira geral, depois que o osso atinge seu tamanho e forma adultos, o tecido ósseo antigo permanece em crescimento devido ao processo de remodelação óssea, resultando em um crescimento aposicional da superfície óssea, que se altera em decorrência de estímulos funcionais ou injúrias ao tecido (Junqueira & Carneiro, 2013).

O tecido ósseo possui uma estrutura hierárquica bastante complexa, que é essencial para o seu desempenho mecânico. A composição óssea, em conjunto com a geometria macroscópica, bem como a microarquitetura são responsáveis por determinar as propriedades mecânicas dos ossos (Currey et al., 2007; Cole et al., 2011; Chappard et al., 2011). Com relação à composição, acredita-se que a matriz colágena óssea contribui显著mente à resiliência óssea, ou seja, à capacidade de absorver certa quantidade de energia sem fraturar. Por sua vez, a rigidez óssea seria determinada principalmente pela fase mineral. Sendo assim, a porção orgânica estaria relacionada à resistência à fratura, compressão e tração, conferindo maleabilidade tecidual sem que osso perca clinicamente sua dureza. Já a

resistência à deformação, que garante a rigidez e a dureza, estaria relacionada aos componentes ósseos inorgânicos (Dalmolin et al., 2013; Cole et al., 2011).

As diferenças macroscópicas dos ossos também contribuem para suas propriedades mecânicas. Ossos corticais e esponjosos possuem composição similar com diferentes configurações estruturais como descrito anteriormente. Essa diferença estrutural, combinada ao pequeno tamanho das trabéculas, resulta em menor rigidez e resistência do osso esponjoso quando comparado ao osso cortical (Cole et al., 2011). Além disso, é importante observar que o osso apresenta anisotropia (Chappard et al., 2011; Cole et al., 2011), o que significa que suas propriedades mecânicas não são iguais em todas as direções e dependem da direção de aplicação de carga. Ossos longos, por exemplo, são mais resistentes na orientação longitudinal do que na tangencial ou radial; isso se deve principalmente ao fato dos ósteons serem orientados de acordo com o longo do eixo do osso e justapostos entre si.

As características estruturais ósseas também estão relacionadas à própria demanda funcional (Currey et al., 2007; Chappard et al., 2011; Cole et al., 2011), ou seja, todos os seus componentes se organizam de tal forma, que o osso seja capaz de responder adequadamente à demanda a que é submetido. O osso resiste e transmite cargas de forma eficaz devido ao equilíbrio das propriedades mecânicas, como rigidez e flexibilidade, além do seu arranjo anatômico. Dessa forma, em condições normais, ao receber um carregamento fisiológico de força com uma quantidade de energia, o osso pode absorver e dissipar essa força, sem alterações drásticas em sua composição inorgânica e orgânica, ou em sua organização estrutural, e, em seguida poderia receber novas cargas. Entretanto, quando as forças aplicadas excedem a resistência limite do osso, ou quando este é fragilizado, podem ocorrer fraturas (Currey et al., 2007; Cole et al., 2011).

A resposta óssea frente às cargas mecânicas torna-se ainda mais complexa, pois as características do tecido podem ser alteradas devido à fatores locais e sistêmicos (Roschger et al., 2007; Guadalupe-Grau et al., 2009). A radioterapia, frequentemente usada para o tratamento de câncer de cabeça e pescoço (Da Cunha et al., 2007), pode modificar a dinâmica de

crescimento e remodelação do tecido ósseo, e, consequentemente, resultar em alterações estruturais e mecânicas.

A radioterapia busca o máximo de erradicação das células tumorais com o mínimo efeito deletério aos tecidos saudáveis adjacentes ao tumor. Entretanto, a radiação não é capaz de atingir apenas as células tumorais (Da Cunha et al., 2007), sendo assim, as alterações nos tecidos circunvizinhos são inevitáveis (Da Damrom et al., 2003). Os efeitos da radiação atingem principalmente os tecidos com altas taxas de proliferação, que respondem com reações agudas à radioterapia (efeitos precoces). Entretanto, é importante lembrar que os efeitos da radiação podem perdurar durante meses ou anos após o tratamento (efeitos tardios) (Hall, 2000).

O osso, quando submetido à altas doses de radiação, pode apresentar desequilíbrio da atividade osteoblástica e osteoclástica, favorecendo a reabsorção óssea (Maeda et al., 1988). A radiação também reduz a população de osteócitos e osteoblastos, com um declínio no processo de mineralização óssea (Muhonen et al., 2004, Batista et al., 2014). Além disso, há um comprometimento da nutrição tecidual, devido à hipóxia, diminuição da vascularização e fibrose vascular (Muhonen et al., 2004, Michel et al., 2015). Além disso, a radiação reduz a matriz óssea, altera a morfologia dos canais ósseos (Rabelo et al., 2010) e aumenta a fragilidade óssea (Wernle et al., 2010, Michel et al., 2015). Sendo assim, a reparação e a resistência mecânica serão comprometidas no osso irradiado (Michel et al., 2015), o que pode, ao longo do tempo, gerar fraturas ósseas espontâneas ou osteorradiacionecrose (Michel et al., 2015).

Rabelo e colaboradores (2010) observaram diminuição na quantidade de matriz óssea e alteração na distribuição dos canais ósseos em tíbias de coelho submetidas à radioterapia. Em seu estudo, os autores observaram que os canais ósseos estavam distribuídos aleatoriamente, com formas e padrões heterogêneos, indicando desorganização da rede de canais. Os autores sugeriram que estas mudanças poderiam alterar as propriedades mecânicas do osso embora esse parâmetro não tenha sido avaliado pelos autores. Wernle e colaboradores (2010), após análise morfológica, avaliação biomecânica e

modelos em elementos finitos, acrescentam que a radiação local induz a alterações na morfologia e resistência ósseas com o passar do tempo.

Michel e colaboradores (2015), através da análise de micro tomografia computadorizada, analisaram vascularização, volume e espessura da região cortical do tecido ósseo. Em seu estudo, os autores observaram que a radiação resultou em uma redução da vascularização intraóssea, comprometendo o transporte de nutrientes e oxigênio. Como consequência, ocorre a degradação da morfologia óssea e das propriedades mecânicas do osso após radiação.

Vários recursos têm sido testados para minimizar os efeitos deletérios decorrentes da radioterapia, e, entre eles, está a Oxigenação Hiperbárica (Kawada et al., 2013). A OH é uma modalidade terapêutica que consiste na administração de oxigênio puro a 100 % numa pressão ambiente maior do que ao nível do mar, utilizando-se de equipamentos denominados câmaras hiperbáricas. As câmaras hiperbáricas podem ser individuais (com capacidade para apenas um paciente) ou múltiplas (com capacidade para vários pacientes) (Thom, 2011). Essa terapia promove uma elevação da quantidade de oxigênio dissolvido no sangue em decorrência da elevação do aporte de oxigênio inspirado e da pressão dentro da câmara, auxiliando a oxigenação tecidual.

Os princípios atribuídos à eficiência da OH estão relacionados à sua capacidade de estimular a vascularização, a angiogênese e a capacidade osteogênica devido à maior disponibilidade de oxigênio para as células. Além disso, ela estimula a proliferação celular, interferindo na síntese de colágeno (Al Hadi et al., 2015) com efeitos positivos no reparo tecidual (Rocha et al., 2015), especialmente no que se refere ao reparo de áreas irradiadas (Salgado et al., 2009, Jacobson et al., 2010; Kawada et al., 2013; Pedersen et al., 2013).

O estímulo à osteogênese pela OH já foi relatado em pesquisas com animais e casos clínicos. Em 1996, Sawai et al. realizaram um estudo para avaliar o efeito da terapia em enxertos ósseos autógenos livres transplantados de crista ilíaca para as mandíbulas de coelhos e os resultados indicaram que ela acelera a união de enxertos ósseos autógenos livres. Outros estudos

também demonstraram que a OH eleva a atividade da fosfatase alcalina, um marcador da formação óssea, em ratos após osteotomia (Nilson et al., 1989), aumenta a atividade dos osteoblastos e a angiogênese em mandíbulas submetidas à distração (Muhonen et al., 2004) e favorece a expressão do fator de crescimento endotelial vascular durante o reparo ósseo (Fok et al., 2008).

Kawada et al. (2013), por meio de experimentos realizados com animais, notaram que o aumento da tensão de oxigênio influencia também o metabolismo ósseo. Em seu estudo, a OH aumentou significativamente as taxas de deposição mineral e de formação óssea, acelerando o reparo de fraturas ósseas. Os autores acrescentam que essa melhora do reparo resultou em maior rigidez e Força Máxima até a falha das amostras analisadas. Pedersen et al. (2013), ao estudarem o reparo ósseo em defeitos críticos de calvária de ratos, também observaram resultados promissores. Os autores observaram melhora da vascularização e da neoformação óssea após oxigenação hiperbárica.:

Alguns autores também avaliaram os benefícios da OH em osso irradiado. Neovius e colaboradores (1997) afirmaram que a radioterapia provoca danos às células e à vascularização tecidual. Segundo os autores, qualquer cirurgia em tais tecidos tem uma maior possibilidade de complicações porque a reparação das feridas depende da angiogênese e da atividade dos fibroblastos, bem como da atividade leucocitária que estão prejudicados. Ainda de acordo com os autores, a OH aumenta os níveis de oxigênio no tecido hipóxico, estimula a angiogênese e fibroplasia, e tem efeito antibacteriano, atuando em sinergia com os antibióticos evitando infecções ósseas. De forma semelhante, Muñoz et al. (2005) e Jacobson et al. (2010) afirmam que, o aumento do transporte e disponibilidade de oxigênio plasmático na OH proporcionam um efeito terapêutico em todas as enfermidades em que ocorre hipoxia tecidual, com benefícios à micro vascularização e angiogênese.

A hipótese dos investigadores é que OH favoreça a macro arquitetura e as propriedades biomecânicas do osso submetido e não submetido a terapia de radiação. Embora existam muitos trabalhos a respeito dos benefícios da

oxigenação hiperbárica, ainda há um vasto campo a ser explorado sobre essa terapia e seus efeitos no tecido ósseo, especialmente o tecido ósseo irradiado, tanto em relação às propriedades biomecânicas, como em relação à arquitetura e reparo tecidual.

2- PROPOSIÇÃO

Avaliar, em modelo experimental em ratos, as alterações macroscópicas e mecânicas do osso previamente submetido à radiação ionizante, e tratado com oxigenação hiperbárica.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados 20 ratos machos *Rattus norvergicus*, da linhagem *Wistar*, clinicamente sadios com peso entre 300 a 400g. Os animais foram mantidos no Biotério da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em gaiolas apropriadas, climatizadas à temperatura de 22°C e ciclo claro-escuro de 12 horas, e tratados com ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) após aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA-UFU) com protocolo de registro CEUA/UFU-028/12. Para o experimento, foram utilizadas as tibias de todos os animais distribuídas em grupos, conforme apresentado na Figura 1.

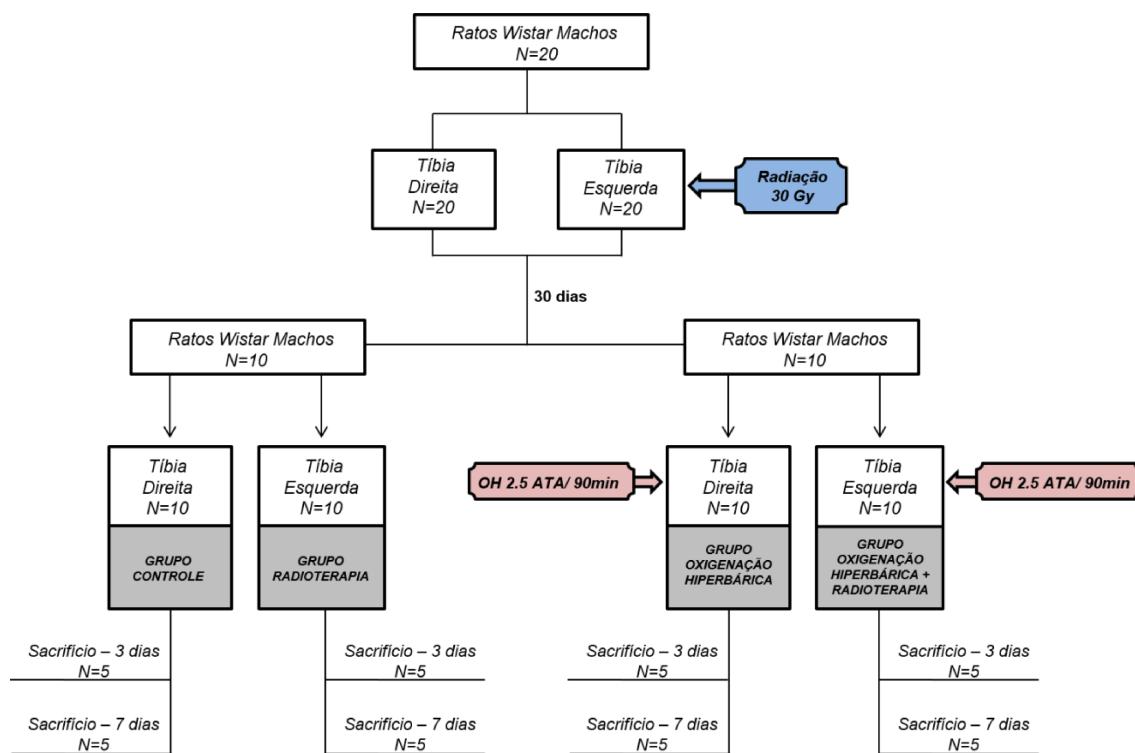


Figura 1: Delineamento experimental e distribuição dos grupos: Controle (C), Radioterapia (RXT), Oxigenação Hiperbárica (OH) e Radioterapia + Oxigenação Hiperbárica (RXT+OH).

RADIOTERAPIA

O protocolo de Radioterapia foi realizado conforme descrito por Batista et al. (2014). Antes da sessão de radioterapia os animais foram submetidos à anestesia geral através da injeção intraperitoneal, contendo 0,07ml/100g do relaxante muscular Cloridrato de Xilazina 2% (*Anasedan®* Divisão Vertbrands Saúde Animal – Jacareí – SP/Brasil) e 0,1ml/100g do anestésico e analgésico Cloridrato de Quetamina 10% (*Dopalen®* Divisão Vertbrands Saúde Animal – Jacareí – SP/Brasil).

A radioterapia foi realizada utilizando o Acelerador Linear de Elétrons de 6MeV (*Varian 600-C®* Varian Medical Systems Inc. Palo Alto, Califórnia/EUA) com dose única de 30 Gy. A perna esquerda de cada animal foi estendida e fixada lateralmente em posição pré-determinada com espátulas de madeira e fita adesiva (*Scotch®*, 3M do Brasil, São Paulo-SP/Brasil). Uma placa de cera com 1,5 cm de espessura foi colocada sobre a perna do animal. As tibias foram irradiadas em um campo único. Todas as medidas de segurança foram adotadas e o feixe de radiação foi colimado, limitando a área irradiada (Figura 2). Após a radioterapia, os animais foram monitorados e, em caso de danos à pele, feridas ou infecção, o animal foi excluído do experimento.

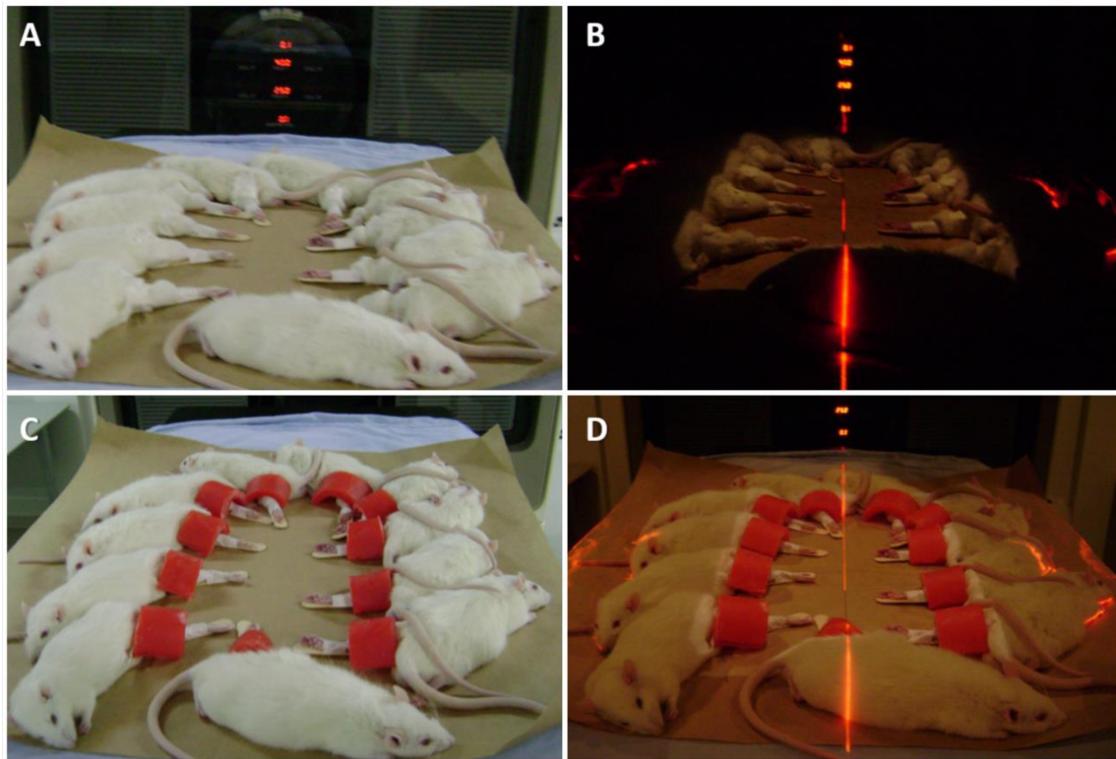


Figura 2: A- Posicionamento dos animais para radioterapia após estabilização da perna esquerda com espátulas de madeira e fita adesiva; B- Determinação do campo de radiação (corresponde à área iluminada); C- Cera posicionada sobre a perna esquerda do animal; D- Posicionamento final para realização da radioterapia. * Imagens gentilmente cedidas por Jonas Dantas Batista (2014).

OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA (OH)

As sessões de oxigenação hiperbárica foram realizadas nos animais dos grupos OH e RXT+OH, no interior de câmaras “monoplaces” experimentais Ecobar 400 (Ecotec Equipamentos e Sistemas Ltda®, Mogi das Cruzes, SP, Brasil) conforme descrito por Rocha et al. (2015) (Figura 3). Após serem colocados no interior da câmara, que é fechada hermeticamente, ocorre um período de compressão à uma velocidade de 0.3ATA/minuto até atingir a pressão preconizada. Cada sessão teve duração de 90 minutos sob pressão de 2,5 ATA (ATA = 1 atmosfera absoluta = 760mmHg), com intervalo de 24 horas entre cada sessão. Após esse tempo, segue o período de descompressão à

uma velocidade 0.3ATA/minuto até o retorno à pressão ambiente. As sessões de OH foram iniciadas 30 dias após a radioterapia e realizadas diariamente durante 3 ou 7 dias conforme o subgrupo ao qual pertence cada animal.

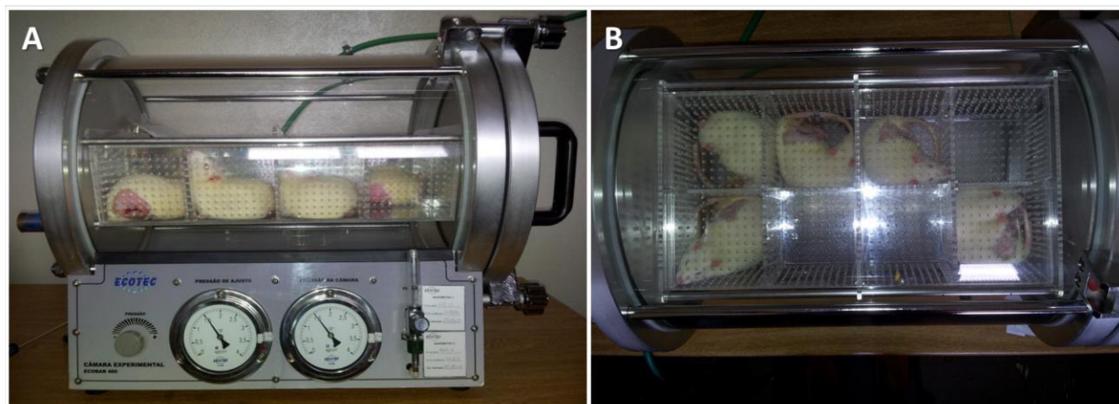


Figura 3: Animais posicionados no interior da câmara hiperbárica para sessões de OH. A- Vista frontal; B- Vista superior. * Imagens gentilmente cedidas por Flaviana Soares Rocha (2015).

OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os animais foram sacrificados 3 ou 7 dias após o início das sessões de oxigenação hiperbárica e 33 ou 37 dias após radioterapia, por aprofundamento anestésico seguido de deslocamento cervical, até que a morte dos animais pudesse ser constatada pela ausência dos sinais vitais, seguindo os princípios da Declaração dos Direitos dos Animais.

Após, foi realizada uma incisão longitudinal ao longo da perna de cada animal e as tibias foram removidas por desarticulação. O procedimento foi realizado de maneira cuidadosa seguida por remoção dos tecidos moles aderidos ao osso. As amostras foram envolvidas em gaze embebida em solução de tampão fosfato (PBS) 0,1M, colocadas em recipientes plásticos previamente identificados e imediatamente congeladas em freezer (-20°C) até o momento da realização das análises macroscópica e biomecânica.

MÉTODOS DE ANÁLISE

Descongelamento

Para o descongelamento, as tíbias foram transferidas para um recipiente contendo solução de tampão fosfato (PBS) 0,1M e mantidas em geladeira a 4°C por 24 horas e, em seguida, as tíbias foram mantidas em temperatura ambiente durante 4 horas antes das análises.

Análise Macroscópica

De cada tíbia foram obtidas as seguintes medidas: comprimento da epífise medial à epífise distal (em milímetros); espessura da região mediana no sentido látero-medial (LM) (em milímetros); e espessura da região mediana no sentido ântero-posterior (AP) (em milímetros). As medidas de espessura foram realizadas na região mediana da diáfise (Figura 4). Todas as medidas foram realizadas utilizando um paquímetro digital (Western @ Pro DC-6®, São Paulo, Brasil).



Figura 4: Posicionamento da tíbia para obtenção das medidas: comprimento, espessura látero-medial (LM) e espessura ântero-posterior (AP).

Análise Mecânica – Teste de flexão em 3 pontos

Cada tibia foi submetida ao Teste de Flexão de três pontos até a falha, utilizando uma máquina de ensaios de materiais (EMIC DL 2000, EMIC Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais, Brasil). Cada amostra foi posicionada horizontalmente em dispositivos de ensaio de flexão de três pontos, com a tuberosidade da tibia voltada para fora, com distância entre os apoios de 18 mm. As amostras foram submetidas à aplicação de carga de compressão na região mediana das mesmas por meio de célula de carga de 200 Kgf com velocidade de 1.0 mm/min (Figura 5). A curva da carga de deslocamento e a carga máxima até o momento de fratura foram obtidas (Figura 6) e, subsequentemente, os dados foram plotados em gráfico. Foi determinada a Força Máxima (F_{max}) até a falha (a força máxima sustentada pela amostra antes da fratura) em Newtons (N), Rígidez (R) (declive da porção linear da curva de carga-deslocamento) em Newtons por milímetro (N/mm) e a Energia de Trabalho (E_{trab}) até a falha (integração da curva de carga-deslocamento para o ponto de falha) em miliJoules (mJ).

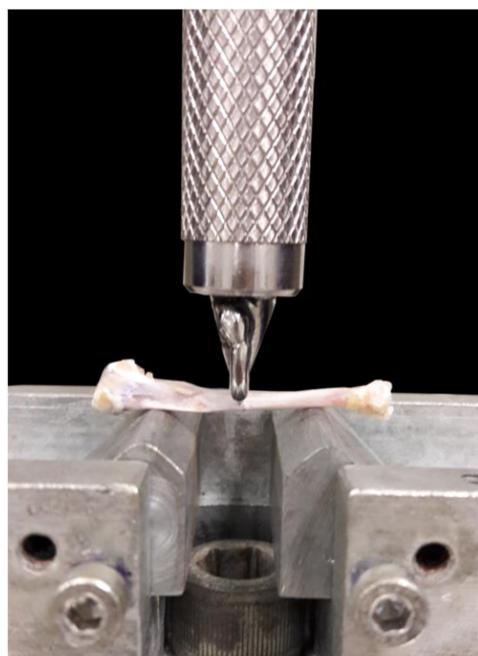


Figura 5: Posicionamento da tibia no dispositivo de ensaio de flexão de 3 pontos.

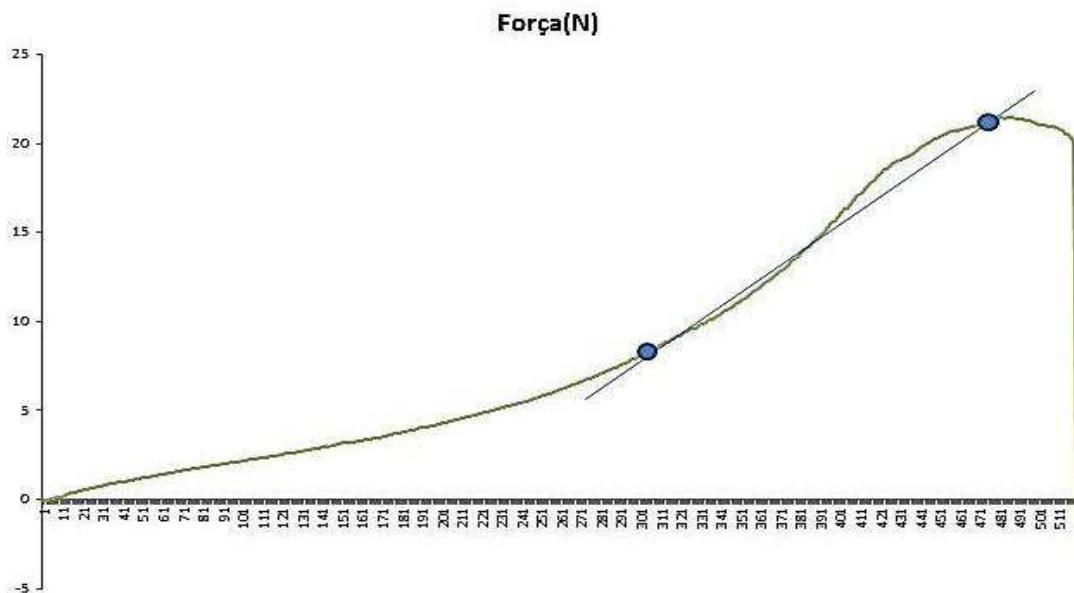


Figura 6: Linearização da curva da carga de deslocamento e a carga máxima até o momento de fratura da amostra.

ANALISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Prism Version 6.0 for Windows, San Diego, CA, USA). Inicialmente os valores obtidos foram submetidos ao teste de normalidade. Após verificada a distribuição normal, os parâmetros foram analisados utilizando os testes ANOVA com pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos e teste t não-pareado para comparação dos tempos experimentais em cada grupo, sendo consideradas diferenças significantes quando $p<0,05$.

4- RESULTADOS

Macroscopicamente foram observadas alterações anatômicas em tamanho e morfologia nas tibias irradiadas. As tibias irradiadas eram visivelmente menores em comprimento e, a região da diáfise apresentou aspecto mais cilíndrico nas tibias irradiadas, em comparação com as tibias não irradiadas, mesmo após oxigenação hiperbárica.

Com relação às mensurações macroscópicas, a análise estatística mostrou no período de 3 dias, valores de comprimento significativamente maiores nos grupos Controle e OH quando comparados com os grupos RXT e RXT+OH ($p<0,05$). No período de 7 dias, o grupo Controle apresentou maiores valores de comprimento quando comparado ao RXT+OH ($p<0,05$). Houve diferença significativa nos valores de comprimento ao longo do tempo apenas no grupo RXT ($p<0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de comprimento (milímetros) nos grupos avaliados nos períodos de 3 e 7 dias.

TEMPO GRUPO	CONTROLE	OH	RXT	RXT+OH
DIA 3	$37,10 \pm 0,38^a$	$36,88 \pm 0,55^b$	$34,35 \pm 0,89^c$	$34,27 \pm 0,63^d$
DIA 7	$38,24 \pm 2,18^e$	$37,11 \pm 1,29$	$36,26 \pm 1,05^f$	$35,33 \pm 1,49^g$

* As seguintes comparações foram estatisticamente significantes: a versus c; a versus d; b versus c; b versus d; e versus g; c versus f ($p<0,05$).

Com relação à espessura LM, foi observada diferença significante apenas no período de 3 dias, entre os grupos Controle e RXT+OH ($p<0,05$) (Tabela 2). Com relação à espessura AP, no período de 3 dias, foi observado maiores valores no grupo Controle quando comparado ao grupo RXT+OH ($p<0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas na espessura AP, entre os grupos avaliados, no período de 7 dias. Houve aumento significativo nos valores de espessura AP ao longo do tempo nos grupos RXT e RXT+OH ($p<0,05$) (Tabela 3).

Tabela 2: Valores de espessura LM (milímetros) nos grupos avaliados nos períodos de 3 e 7 dias.

TEMPO GRUPO	CONTROLE	OH	RXT	RXT+OH
DIA 3	$2,99 \pm 0,19^a$	$2,94 \pm 0,25$	$2,69 \pm 0,10$	$2,66 \pm 0,11^b$
DIA 7	$3,14 \pm 0,34$	$2,93 \pm 0,25$	$2,87 \pm 0,36$	$2,85 \pm 0,28$

* As seguintes comparações foram estatisticamente significantes: a versus b ($p < 0,05$).

Tabela 3: Valores de espessura AP (milímetros) nos grupos avaliados nos períodos de 3 e 7 dias.

TEMPO GRUPO	CONTROLE	OH	RXT	RXT+OH
DIA 3	$2,21 \pm 0,12^a$	$2,12 \pm 0,07$	$2,04 \pm 0,11^b$	$1,99 \pm 0,11^c$
DIA 7	$2,36 \pm 0,17$	$2,29 \pm 0,21$	$2,26 \pm 0,14^d$	$2,18 \pm 0,10^e$

* As seguintes comparações foram estatisticamente significantes: a versus c; b versus d; c versus e ($p < 0,05$).

De maneira geral, foram encontrados menores valores de F_{\max} nas amostras irradiadas quando comparadas às amostras não irradiadas. Embora as diferenças não tenham sido significantes, é importante observar que o grupo RXT+OH obteve maiores valores de F_{\max} do que o grupo RXT, o que não foi observado nas comparações entre os grupos Controle e OH, nos períodos avaliados. Apenas no período de 7 dias, houve diferença significativa na F_{\max} entre o grupo Controle quando comparado com o grupo RXT ($p < 0,05$). Houve aumento significativo nos valores de F_{\max} ao longo do tempo apenas no grupo Controle ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4: Valores de Força Máxima (Newtons) nos grupos avaliados nos períodos de 3 e 7 dias.

TEMPO \ GRUPO	CONTROLE	OH	RXT	RXT+OH
DIA 3	29,35 ± 8,87 ^a	34,08 ± 9,85	20,17 ± 9,72	23,42 ± 6,35
DIA 7	46,87 ± 8,63 ^b	42,46 ± 4,68	24,36 ± 10,51 ^c	29,80 ± 12,37

*As seguintes comparações foram estatisticamente significantes: a versus b; b versus c ($p < 0,05$).

A oxigenação hiperbárica resultou em aumento da Rigidez do osso irradiado ao longo do tempo, embora não houve significância. Esse favorecimento fez com que os valores de Rigidez do grupo RXT+OH – 7 dias ficassem maiores que o do osso normal do grupo Controle – 3 dias, ou seja, após OH, as amostras irradiadas conseguiram se aproximar da normalidade para o parâmetro rigidez. Houve aumento significativo nos valores de Rigidez ao longo do tempo apenas no grupo Controle ($p < 0,05$) (Tabela 5).

De maneira geral, foram encontrados maiores valores de E_{trab} nas amostras do grupo controle. A oxigenação hiperbárica resultou em melhora no osso irradiado (grupo RXT+OH), o que não foi observado no osso não irradiado (grupo OH). Entretanto, as diferenças encontradas não foram significantes entre os grupos nos períodos avaliados (Tabela 6).

Tabela 5: Valores de Rigidez (Newtons/milímetros) nos grupos avaliados nos períodos de 3 e 7 dias.

TEMPO \ GRUPO	CONTROLE	OH	RXT	RXT+OH
DIA 3	91,10 ± 39,38 ^a	117,8 ± 11,22	82,36 ± 13,23	79,65 ± 27,97
DIA 7	140,5 ± 12,29 ^b	135,2 ± 24,42	91,58 ± 29,99	96,62 ± 38,68

* As seguintes comparações foram estatisticamente significantes: a versus b ($p < 0,05$).

Tabela 6: Valores de Energia de Trabalho (miliJoule) nos grupos avaliados nos períodos de 3 e 7 dias.

TEMPO \\ GRUPO	CONTROLE	OH	RXT	RXT+OH
DIA 3	$10,87 \pm 3,75$	$9,33 \pm 7,51$	$4,44 \pm 2,67$	$7,36 \pm 4,68$
DIA 7	$12,50 \pm 5,20$	$8,88 \pm 1,93$	$7,26 \pm 5,06$	$7,72 \pm 4,31$

5- DISCUSSÃO

Este estudo investigou a influência da OH nas propriedades macroscópicas e mecânicas do tecido ósseo após a radioterapia. Alguns autores afirmam que, inicialmente, as alterações no osso irradiado *in vivo* são decorrentes das alterações no processo de reparo ósseo (Gal et al., 2000; Batista et al., 2014), como resultado da redução da quantidade células ósseas, hipóxia e fibrose vascular (Muhonen et al., 2004). Sendo assim, se a reparação óssea está alterada pela radioterapia (Batista et al., 2014), toda a estrutura óssea, bem como sua morfologia podem estar comprometidas. De fato, no presente estudo, a radioterapia claramente prejudicou o crescimento endocondral a partir do disco epifisário (crescimento em comprimento) e o crescimento aposicional a partir do periôsteo e endósteo (crescimento em diâmetro); resultando em valores mais baixos de comprimento e espessura nas tibias irradiadas quando comparadas com tibias não irradiadas, mesmo após OH.

Alguns autores como Eifel et al. (1988) já relataram que o crescimento ósseo é reduzido após a radiação. Considerando que o crescimento dos ossos longos em comprimento e espessura ocorre de maneira distinta, seria sensato pensar que essas áreas também seriam distintamente afetadas pela radiação. Estas diferenças na suscetibilidade entre o crescimento longitudinal e aposicional para os efeitos nocivos da radiação, além do variado potencial de recuperação do tecido após o dano, podem explicar os resultados encontrados em nosso trabalho.

Um estudo prévio de Rocha et al. (2016) demonstrou que as alterações macroscópicas após a radiação, como a redução do crescimento e deformidades morfológicas são mais frequentes quando o campo de radiação inclui o disco epifisário nos ossos longos. Isso ocorre devido à desorganização da cartilagem no disco epifisário após a radioterapia e, também porque ele é o principal responsável pelo crescimento longitudinal dos ossos longos, o que está de acordo com nossos resultados. Existem evidências de que as células relacionadas ao crescimento a partir do disco epifisário como condroblastos, e condrócitos seriam mais sensíveis à radiação do que os osteoblastos (Brighton,

1987; Damrom et al., 2003). Além disso, a dificuldade de recuperação do tecido cartilaginoso devido à sua própria característica avascular faz com que ele seja extremamente sensível a qualquer variação na tensão de oxigênio como ocorre após a radioterapia. Outro fator importante é que as taxas de crescimento absoluto longitudinais costumam ser maiores em magnitude absoluta, do que as taxas de crescimento laterais dos ossos (Probert & Parker, 1975), especialmente entre intervalos curtos de análise como no presente trabalho. Esses fatores podem, em parte, explicar a tendência observada da tíbia de alterações longitudinais mais evidentes mesmo em períodos curtos como os analisados.

Seguindo essa ideia, é importante notar que, no presente estudo, mesmo em tíbias irradiadas, o crescimento ainda ocorreu quando comparado cada período de tempo (3 dias e 7 dias), especialmente o crescimento aposicional. Novamente, essas diferenças na susceptibilidade entre crescimento longitudinal e aposicional aos efeitos prejudiciais da radiação e potencial variável de recuperação podem refletir as diferentes sensibilidades das populações celulares responsáveis por essas duas formas de crescimento (Brighton, 1987; Damrom et al., 2003). Spadaro et al. (2003) observaram resultados semelhantes com a discrepância no crescimento longitudinal sendo persistente, enquanto que a discrepancia no crescimento aposicional decaiu com o passar do tempo. Ou seja, o crescimento decorrente a atividade do periôsteo e do endósteo pareceu se recuperar mais rapidamente dos efeitos da radiação, como observado no presente trabalho.

O osso tem a capacidade de se adaptar continuamente às mudanças em seu ambiente. Esta capacidade de resistir às cargas também depende da qualidade do tecido ósseo. Assim, para exercer satisfatoriamente suas funções, o osso precisa de rigidez e flexibilidade para resistir às deformações provocadas pelas forças que incidem sobre ele. Essas características mecânicas dependem de fatores intrínsecos, relacionados à matriz óssea (Cole et al., 2011), como qualidade da porção orgânica e do conteúdo inorgânico (Dunlop et al., 2010; Wernle et al., 2010), da disposição dos canais ósseos (Rabelo et al, 2010), bem como da atividade das células ósseas (Da Cunha et

al.2007; Lerouxel et al., 2009; Kawada et al., 2013). No presente trabalho houve uma diminuição na força máxima, rigidez e energia de trabalho para falha nas tíbias irradiadas quando comparadas com as não irradiadas. De acordo com Wernle e colaboradores (2010), após altas doses de radiação, o osso torna-se mais frágil e requer menos carga para fraturar, o que está de acordo com nossos resultados.

O prejuízo às propriedades mecânicas após a radioterapia também pode ser um reflexo das alterações do conteúdo mineral (Kiyohara et al., 2010) e mudanças na estrutura do colágeno (Michel et al., 2015), embora isso não tenha sido avaliado no presente estudo. Outro fator importante é que, as próprias alterações de crescimento observadas no presente trabalho, podem influenciar as propriedades mecânicas do osso. Isso ocorre porque as medidas das tíbias são utilizadas para definir a distância entre os pontos de apoio nos testes de flexão de 3 pontos. Ademais, amostras maiores ou mais espessas deveriam resistir mais à aplicação de carga de compressão, sendo difícil avaliar individualmente cada resultado. Além disso, o osso é um material heterogêneo, descontínuo e anisotrópico (Chappard et al., 2011) e, por isso, por mais precisos que tenham sidos os testes realizados, podem ocorrer pequenas variações de direção, modo de carregamento e dimensões dos espécimes, o que pode influenciar os resultados.

O uso da oxigenação hiperbárica no presente trabalho seria principalmente para recuperar o tecido que foi diretamente afetado pela radioterapia. Durante o tratamento com OH, as tensões de oxigênio arterial podem variar de 1000-1600mmHg enquanto nos tecidos em condições normais, esses valores ficam próximos a 400mmHg (Ambiru et al., 2008). O aumento da concentração de oxigênio estimula o reparo tecidual, a proliferação celular e a angiogênese (Salgado et al., 2009; Grassmann et al., 2015), importantes para o reestabelecimento da cartilagem do disco epifisário, além de melhorar a atividade do periósteo e demais células ósseas. Era esperado que isso resultasse em melhora do crescimento e da resistência, tanto em osso normal, mas especialmente no irradiado. Entretanto, com relação à análise macroscópica, não foram observadas alterações significativas em comprimento

ou em espessura sendo que, em alguns parâmetros, os grupos OH e RXT+OH obtiveram menores valores de comprimento e espessura do que os grupos Controle e RXT. Considerando que o tecido ósseo apresenta resposta tardia à radiação, sendo que, os primeiros eventos são usualmente celulares, podemos pensar que a recuperação significativa das taxas de crescimento após radioterapia poderia demandar mais tempo ou ainda mais sessões de OH.

Curiosamente, em nosso estudo, com relação às propriedades mecânicas, a OH resultou em uma tendência de melhora dos resultados quando compararmos as tíbias irradiadas dos grupos RXT e RXT+OH, o que não ocorreu nos grupos não irradiados. Esperávamos que esse benefício também fosse observado no osso normal como já reportado na literatura. Mesmo após poucas sessões de OH, Rocha e colaboradores (2015) encontraram benefícios como aceleração da resolução da resposta inflamatória e estímulo à deposição óssea durante os estágios iniciais do reparo em defeitos em osso não irradiado. Porém, o trabalho de Rocha et al. (2015) envolve um modelo experimental diferente, com a confecção de um defeito ósseo em fêmur de rato. Isso nos fez pensar que a OH, mesmo após poucas sessões, pode favorecer a resposta do tecido que demanda por auxílio em seu reparo, como observado em casos de defeito ósseo (Rocha et al., 2015) ou mesmo após radiação, como em nosso trabalho. Aparentemente, em situações críticas de injúrias ao tecido ósseo, como defeitos ósseos extensos, efeitos adversos de medicações e tratamentos, como a radioterapia, o estímulo gerado pela OH parece ser mais evidente.

Dessa maneira, considerando os resultados encontrados no presente trabalho, embora a oxigenação hiperbárica seja considerada benéfica aos tecidos, ainda há necessidade de outros estudos que avaliem seus efeitos sobre as propriedades macroscópicas e mecânicas do osso irradiado.

6- CONCLUSÃO

Este estudo revelou o impacto da radiação ionizante no crescimento e nas propriedades mecânicas de tíbias de rato. Os resultados não demonstraram alterações significativas após a aplicação da OH nos intervalos de 3 e 7 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamsohn P. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008.
- Al Hadi H, Smerdon GR, Fox SW. Hyperbaric oxygen therapy accelerates osteoblast differentiation and promotes bone formation. **J Dent.** 2015 Mar;43(3):382-8. doi: 10.1016/j.jdent.2014.10.006. Epub 2014 Oct 23.
- Ambiru S, Furuyama N, Aono M, Otsuka H, Suzuki T, Miyazaki M. Analysis of risk factors associated with complications of hyperbaric oxygen therapy. **J Crit Care.** 2008;23(3):295-300.
- Batista JD, Zanetta-Barbosa D, Cardoso SV, Dechichi P, Rocha FS, Pagnoncelli RM. Effect of low-level laser therapy on repair of the bone compromised by radiotherapy. **Lasers Med Sci.**: 2014 29:1913 – 1918.
- Brighton CT. Longitudinal bone growth: the growth plate and its dysfunctions. **Instr Course Lect.**; 1987 36:3-25. Review.
- Brighton CT. Morphology and biochemistry of the growth plate. **Rheum Dis Clin North Am.** 1987 Apr; 13(1):75-100. Review.
- Chappard D, Baslé MF, Legrand E, Audran M. New laboratory tools in the assessment of bone quality. **Osteoporos Int.** 2011 Aug;22(8):2225-40. doi: 10.1007/s00198-011-1573-6. Epub 2011 Feb 24.
- Chen JH, Liu C, You L, Simmons CA. Boning up on Wolff's Law: mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. **J Biomech.** 2010 Jan 5;43(1):108-18. doi: 10.1016/j.jbiomech.2009.09.016. Epub 2009 Oct 8.
- Cole JH, Van der Meulen MCH. Whole Bone Mechanics and Bone Quality. **Clin Orthop Relat Res** 2011 Res 469:2139–2149.
- Currey JD, Pitchford J.W, Baxter PD. Variability of the mechanical properties of bone, and its evolutionary consequences. **J. R. Soc. Interface** 2007 4, 127–135 doi:10.1098/rsif.2006.0166 Published online 17 October 2006.
- Da Cunha SS, Sarmento VA, Ramalho LMP, Freitas AC, Almeida D, Tavares ME, et al. Effects of radiotherapy on bone tissue. **Radiol Bras.** 2007 40(3):189-92.

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

Damrom TA, Margulies BS, Strauss JA, O'Hara K, Spadaro JA, Farnum CE. Sequential histomorphometric analysis of the growth plate following irradiation with and without radioprotection. **J Bone Joint Surg Am**, 2003 Jul; 85 (7): 1302 -1313.

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

Eifel PJ. Decreased bone growth arrest in weanling rats with multiple radiation fractions per day. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.** 1988 Vol. 15, pp. 141-145.

Fabíola Dalmolin, Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho, Andrieli Machado Cortes, Maurício Veloso Brun, Carlos Roberto Caudurol, João Eduardo Wallau Schosslerl. Biomecânica óssea e ensaios biomecânicos - fundamentos teóricos. **Ciência Rural**, set, 2013. v.43, n.9, set, 2013.

Fok TC, Jan A, Peel SA, Evans AW, Clokie CM, Sándor GK. Hyperbaric oxygen results in increased vascular endothelial growth factor (VEGF) protein expression in rabbit calvarial critical-sized defects. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2008 Apr;105(4):417-22.

Gal TJ, Munoz-Antonia T, Muro-Cacho CA, Klotch DW. Radiation effects on osteoblasts in vitro: a potential role in osteoradionecrosis. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** 2000 Sep;126(9):1124-8.

Grassmann JP, Schneppendahl J, Hakimi AR, Herten M, Betsch M, Logters TT, et al. Hyperbaric oxygen therapy improves angiogenesis and bone formation in critical sized diaphyseal defects. **J. Orthop. Res.** 2015;33(4):513-20.

Guadalupe –Grau A, Fuentes T, Guerra B, Calbet JA. Exercise and bone mass in adults. **Sports Med.** 2009;39(6):439-68. doi: 10.2165/00007256-200939060-00002.

Hall EJ. Radiobiology for the radiobiologist. 6th ed. Philadelphia(PA):

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

Jacobson AS, Buchbinder D, Hu K, Urken ML. Paradigm shifts in the management of osteoradionecrosis of the mandible. **Oral Oncol.** Nov; 2010 46(11):795-801. Epub 2010 Sep 16. Review.

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2013. 136-53 p.

Katchburian E, Arana-Chaves V. **Histologia e Embriologia Oral**. 3nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.

Kawada S, Wada Eiji, Matsuda R, Ishii N. Hyperbaric Hyperoxia Accelerates Fracture Healing in Mice. **Plos ONE** 8(8): 2013 e72603. doi: 10.1371/journal.pone.0072603.

Kiyohara S, Sakurai T, Kashima I. Early detection of radiation-induced structural changes in rat trabecular bone. **Dentomaxillofac Radiol.**; 2003 32(1):30-8.

Lerouxel E, Moreau A, Bouler JM, Giumelli B, Daculsi G, Weiss P, et al. Effects of hight doses of ionizing radiation on bone in rats: A new model for evaluation of bone engineering. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** 2009 47 602–607.

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.

Michel G, Blery P, Pilet P, Guicheux J, Weiss P, Malard O, et al. Micro-CT. Analysis of Radiation-Induced Osteopenia and Bone Hypovascularization in Rat. **Calcif Tissue Int.** 2015 Jul;97(1):62-8. doi: 10.1007/s00223-015-0010-9. Epub 2015 May 8.

Muhonen A, Haaparanta M, Grönroos T, Bergman J, Knuuti J, Hinkka S, et al. Osteoblastic activity and neoangiogenesis in distracted bone of irradiated rabbit

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

Muñoz MC, González AC, Ojea AM, Louzára MLL, Bernárdez JRF, Alonso IA, et al. Papel de la oxigenoterapia hiperbárica en el tratamiento de las complicaciones crónicas derivadas del tratamiento con radioterapia en pacientes con cáncer: bases físicas, técnicas y clínicas. **Oncología (Barc.)**. 2005; v.28, n.1, p.26-35.

Nilsson LP. Effects of hyperbaric oxygen treatment on bone healing. An experimental study in the rat mandible and the rabbit tibia. **Swed Dent J** 1989;64(1):1-33.

Neovius EB, Lind MG, Lind FG. A oxigenoterapia hiperbárica para complicações da ferida após a cirurgia na cabeça e pescoço irradiado: uma revisão da literatura e um relatório de 15 pacientes consecutivos. **Cabeça e Pescoço**. 1997 Jul; 19 (4): 315-22.

Roschger P, Dempster DW, Zhou H, Paschalis EP, Silverberg SJ, Shane E, et al. New observations on bone quality in mild primary hyperparathyroidism as determined by quantitative backscattered electron imaging. **J Bone Miner Res.** 2007 May;22(5):717-23.

Pedersen TO, Xing Z, Finne-Wistrand A, Hellem S, Mustafa K. Hyperbaric oxygen stimulates vascularization and bone formation in rat calvarial defects. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 2013 Jul;42(7):907-14.

Probert JC, Parker BR. The effects of radiation therapy on bone growth. **Radiology**. 1975 Jan;114(1):155-62.

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.

Rinaldo Florencio-Silva, Gisela Rodrigues da Silva Sasso, Estela Sasso-Cerri, Manuel Jesus Simões, Paulo Sérgio Cerri. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **Biomed Res Int.** 2015:

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

Rocha FS, Moura CCG, Rodrigues DBR, Zanetta-Barbosa D, Hiraki KRN, Dechichi P. Influence of hyperbaric oxygen on the initial stages of bone healing. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol** 2015 March;:1-7.

Rocha FS, Limirio PH, Zanetta-Barbosa D, Batista JD, Dechichi P. The effects of ionizing radiation on the growth plate in rat tibiae **Microsc Res Tech**. 2016 Dec;79(12):1147-1151.

Rocha FS, Dias PC, Limirio PH, Lara VC, Batista JD, Dechichi P. High doses of ionizing radiation on bone repair: is there effect outside the irradiated site? **Injury**. 2016 Nov 29.

Salgado CJ, Raju A, Licata L, Patel M, Rojavin Y, Wasielewski S, et al. Effects of hyperbaric oxygen therapy on an accelerated rate of mandibular distraction osteogenesis. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**. 2009 Dec;62(12):1568-72.

Spadaro JA, Baesl MT, Conta AC, Margulies BM, Damron TA. Effects of irradiation on the appositional and longitudinal growth of the tibia and fibula of the rat with and without radioprotectant. **J Pediatr Orthop**. 2003 Jan-Feb;23(1):35-40.

Sawai T, Niimi A, Takahashi H, Ueda M. Histologic study of the effect of hyperbaric oxygen therapy on autogenous free bone grafts. **J Oral Maxillofac Surg**. 1996 Aug;54(8):975-81.

Ten Cate AR. **Histologia Bucal - Desenvolvimento, Estrutura e Função**. 8th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2013.

Thom SR. Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy. **Plast Reconstr Surg** 2011;127(Suppl. 1):131S–41S.

Wernle JD, Damron TA, Allen MJ, Mann KA. (2010) Local irradiation alters bone morphology and increases bone fragility in a mouse model. **J Biomech**. 2010 Oct 19;43(14):2738-46. Epub Jul 23.

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

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 028/12, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Efeito da laserterapia e oxigenoterapia hiperbárica no reparo, microestrutura e resistência biomecânica do osso submetido à radiação ionizante.", sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Paula Dechichi**, está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal conforme regulamentações do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) – UFU em reunião de **29 de Maio de 2012**.

(We certify that the protocol nº 028/12, about "Effect of lasertherapy and hyperbaric oxygenotherapy in bone repair, microstructure and resistance after ionizing radiation", agrees with the ETHICAL PRINCIPLES ON ANIMAL RESEARCH as regulations of National Advice of Control and Animal Experimentation (CONCEA) and approved by Ethics Commission on Use of Animals (CEUA) – Federal University of Uberlândia in 29/05/2012).

Uberlândia, 04 de Junho de 2012.

Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Dra. Ana Elizabeth Iannini Custódio
Vice Coordenadora Pro Tempore da Comissão de Ética
Na utilização de animais