



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**



**MATEUS CHERULLI NOVAES**

**ANÁLISE TRIDIMENSIONAL DO OSSO  
SUBMETIDO À RADIOTERAPIA  
ONCOLÓGICA**

UBERLÂNDIA  
2018

MATEUS CHERULLI NOVAES

**ANÁLISE TRIDIMENSIONAL DO OSSO  
SUBMETIDO À RADIOTERAPIA  
ONCOLÓGICA**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado a Faculdade de  
Odontologia da UFU, como requisito  
parcial para obtenção do título de  
Graduado em Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Jonas Dantas  
Batista

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr. Paula  
Dechichi

UBERLÂNDIA  
2018

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus que me concedeu discernimento para concluir esse trabalho.

Agradeço aos meus pais que me incentivaram e apoiaram todos os anos em que estive na faculdade.

Agradeço ao Prof. Dr. Jonas Dantas que me concedeu o convite de participar desse projeto e a Prof<sup>a</sup>. Dra. Paula Dechichi, por todo o auxílio durante a pesquisa.

Agradeço ao Prof. Dr. Bruno Travençolo e ao mestrando Pedro Gondim que foram imprescindíveis para a investigação com programas computacionais.

Agradeço ao Douglas Resende que ajudou em grande parte do trabalho e esteve sempre disposto a resolver possíveis dificuldades.

Agradeço a agência de fomento CNPq/UFU que financiou com bolsa integral todo o projeto, também sou grato à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, que me concedeu a oportunidade de graduação em curso superior.

## Sumário

Resumo .....	5
Abstract .....	6
1. Introdução.....	7
2. Objetivo Geral .....	9
3. Metodologia .....	9
3.1 - Caracterização da amostra .....	9
3.2 - Radioterapia .....	9
3.3 - Análise histológica.....	10
3.4 - Análise da lacunaridade .....	11
3.5 - Análise da rede de canais ósseos.....	11
3.6 - Esqueletonização.....	12
4.Resultados .....	13
5.Discussão.....	16
6.Conclusão .....	18
7.Cronograma de execução .....	19
8.Referências Bibliográficas .....	20
9.Aprovação do comitê de ética.....	22

## Resumo

Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em evidente problema de saúde pública mundial. Associado a este aumento de casos de câncer, estão sendo pesquisadas várias formas de tratamento para essa doença. Entre elas está a radioterapia, que é utilizada por quase metade dos pacientes com câncer em algum momento do seu tratamento. Na região de cabeça e pescoço, doses elevadas de radiação podem provocar alguns efeitos adversos na cavidade bucal e trato gastrointestinal. Entre eles estão a osteorradionecrose, diminuição da vascularização, necrose e conseqüentemente infecção. Os ossos são compostos por uma rede de canais internos, que são de extrema importância para a nutrição e conseqüente regeneração óssea das regiões afetadas pela radioterapia. Os efeitos da radiação no tecido ósseo, estão bem descritos, porém ainda não se sabe completamente quais alterações metabólicas ocorrem no osso pós-irradiação. Nesse trabalho foram obtidos cortes histológicos a partir do fêmur de rato *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar. O animal teve sua perna esquerda irradiada com uma taxa de 30Gy e sacrificado após 30 dias. Sua perna direita foi protegida com chumbo para que não sofresse influência da radiação. A próxima etapa realizou a coleta dos fêmures direito (controle) e esquerdo (teste), estes foram fixados em formol PBS (tampão fosfato-salino), realizou-se sua desmineralização com ácido-fórmico e seu processamento para inclusão em parafina. Os cortes histológicos obtidos foram corados com HE, em seguida escaneados. Com programas de computador foi realizada a segmentação das imagens, removendo o tecido mole presente, em seguida foi reconstruída a microestrutura de canais intraósseos de forma tridimensional. Esse trabalho conclui que foram perceptíveis grandes mudanças na microarquitetura da rede de canais ósseos, tanto em quantidade quanto em comunicação entre eles, demonstrando ser necessário a busca por formas de tratamento menos agressivas aos ossos.

Palavras-Chave: Osso, Radioterapia, Câncer.

## Abstract

In the last decades, cancer has gained a larger dimension, becoming an evident public health problem worldwide. Associated with this increase in cancer cases, several treatments for this disease are being researched. Among them is radiation therapy, which is used in almost half of cancer patients at some point in their treatment. In the head and neck region, high radiation doses can cause some adverse effects on the oral cavity and gastrointestinal tract, like osteoradionecrosis, decreased vascularization, necrosis and consequently infection. Bones are composed of an internal channels network, which are extremely important for nutrition and consequent bone regeneration in the regions affected by radiotherapy. The radiation effects on bone tissue are well described, but it is not yet fully known which metabolic changes occur in the post-radiation bone. In this work, histological sections were obtained from the Rat *Rattus norvegicus* femur, from the Wistar line. The animal had its left leg irradiated with a 30Gy rate and sacrificed after 30 days. His right leg was protected with lead so he would not suffer from radiation influence. The next step was to collect the right (control) and left (test) femurs, these were fixed in PBS formaldehyde (phosphate-saline buffer), they were demineralized with formic acid and processed for inclusion in paraffin. The histological sections obtained were stained with HE, then scanned. With computer programs, the images segmentation was performed, removing the present soft tissue, then the microstructure of intraosseous canals was reconstructed in three-dimensional form. This work concludes that great changes in the bone channels network microarchitecture were perceived, both in quantity as in communication between them, demonstrating that it is necessary the search for bones less aggressive forms of treatment.

Key words: Bone, Radiotherapy, Cancer.

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que no ano 2030 pode-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer (INCA 2017).

A radioterapia é parte integrante da abordagem multidisciplinar do tratamento de carcinomas (Matos, 2013). Representa um recurso bem estabelecido para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço como terapia primária (Charbonneau et al., 2006), adjuvante ao tratamento cirúrgico (Hicks et al., 1998), combinado com a quimioterapia (Salama & Vokes, 2008), ou ainda como tratamento paliativo (Dobbs, 1999). Aproximadamente, metade dos pacientes com câncer utiliza a radioterapia em alguma fase do tratamento da doença, seja de maneira isolada ou associada a outras terapias oncológicas (Hyderley, 1996).

Realizada desde 1895, a radioterapia caracteriza-se pela utilização de radiação ionizante no tratamento de neoplasias malignas. Este procedimento, por deslocamento de elétrons, forma átomos instáveis com cargas negativas aumentadas, comprometendo o DNA celular e impedindo a replicação da célula neoplásica (Rice, 1997). Esse tratamento ionizante não é seletivo, pois, não distingue as células sadias das células tumorais. Desse modo, a destruição do tecido saudável limita a ampla utilização da radioterapia. (Kashima I., et al. 2003; Costa, et al. 2007).

Na região de cabeça e pescoço, doses elevadas de radiação podem provocar alguns efeitos adversos na cavidade bucal e trato gastrointestinal. Entre eles estão a mucosite, xerostomia, osteorradionecrose, trismo, disfagia, diminuição da vascularização, necrose e conseqüentemente infecção (Sarrión-Pérez, 2014). A rede vascular óssea tem um papel importante na capacidade de regeneração dos ossos, pois fornece oxigênio e os nutrientes essenciais (Travençolo, 2014). O osso submetido à radioterapia apresenta alterações no equilíbrio das atividades osteoblásticas e osteoclásticas, a favor de um processo destrutivo. Também é observada diminuição do número de osteócitos e de osteoblastos após a irradiação do tecido. Os osteoblastos tendem a ser mais radiosensíveis que os osteoclastos, portanto, pode ocorrer um aumento da lise celular (Vissink, et al. 2003). Com isso, a formação de matriz óssea é paralisada, impedindo a mineralização, levando a fraturas ósseas espontâneas e à osteorradionecrose (Würzler, 1998).

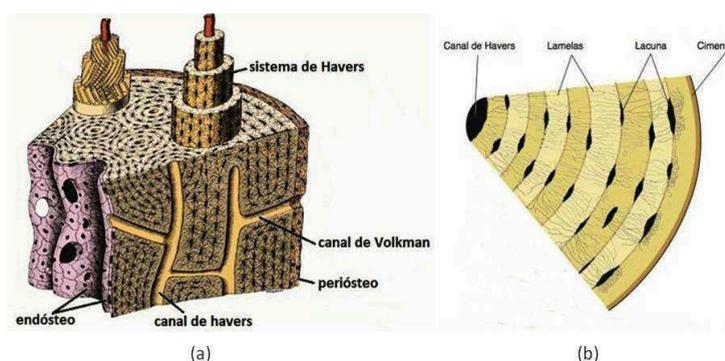
As células endoteliais também são atingidas e a fibrose vascular resulta numa hipovascularização, afetando a vitalidade do osso e das células medulares, tornando a área suscetível a uma infecção e necrose, mesmo após um pequeno trauma (Würzler, 1998).

Vários recursos têm sido testados a fim de tentar minimizar os riscos de osteorradionecrose e obter sucesso no pós-operatório de pacientes irradiados, tais como: o uso de oxigenação hiperbárica (Feldmeier, 2004, Clark et al., 2006), retalhos microcirúrgicos vascularizados (Lehner et al., 2004), fatores de crescimento associados aos enxertos ósseos (Aghaloo et al., 2006). Esses tratamentos não têm provido resultados positivos em todos os casos.

Efeitos colaterais no tecido ósseo pós-radioterapia já foram demonstrados por meio de análises histológicas, histomorfométricas, bioquímicas e biomecânicas, no entanto, a complexidade das mudanças no metabolismo ósseo pós radiação ainda não está totalmente esclarecida. Rabelo et al (2010) observou redução na quantidade de matriz óssea e alteração na distribuição dos canais ósseos em tíbia de coelho submetida a radioterapia.

Os efeitos da radiação no tecido ósseo, apesar de bem descritos, ainda não esclarecem completamente a complexidade das mudanças no metabolismo ósseo pós-radiação. Também não estão estabelecidos os efeitos da radioterapia na estrutura da rede de canais ósseos, o que poderia comprometer as propriedades biomecânicas do osso.

Dessa forma, pretende-se por meio de reconstrução tridimensional de imagens histológicas contribuir com o entendimento das alterações na microarquitetura do osso submetido à radioterapia.



**Figura 1-** Representado na figura (a) a disposição dos canais de Havers em relação aos canais de Volkmann. Também representados o endósteo, periósteo e sistema de Havers. Na figura (b), esquema representando parte de um sistema de Havers. Note os numerosos canalículos que estabelecem comunicação entre as lacunas, onde estão os osteócitos, e com o canal de Havers. Figura adaptada de (Pava, 2013).

A reabsorção e deposição de matriz óssea são processos simultâneos, harmoniosos e que nunca param, promovendo uma constante remodelação do osso. (Katchburian & Arana, 2004). Esse processo resulta em mudanças estruturais e até mesmo na forma do osso, seja para seu crescimento, para seu amadurecimento, para transformação de um osso esponjoso em compacto ou para situações fisiológicas e patológicas.

## **2. OBJETIVO GERAL**

Avaliar alterações na rede de canais, de osso submetido à radioterapia oncológica, por meio de reconstrução tridimensional de imagens histológicas, análise da lacunaridade e esqueletonização.

## **3. METODOLOGIA**

### 3.1 - Caracterização da amostra:

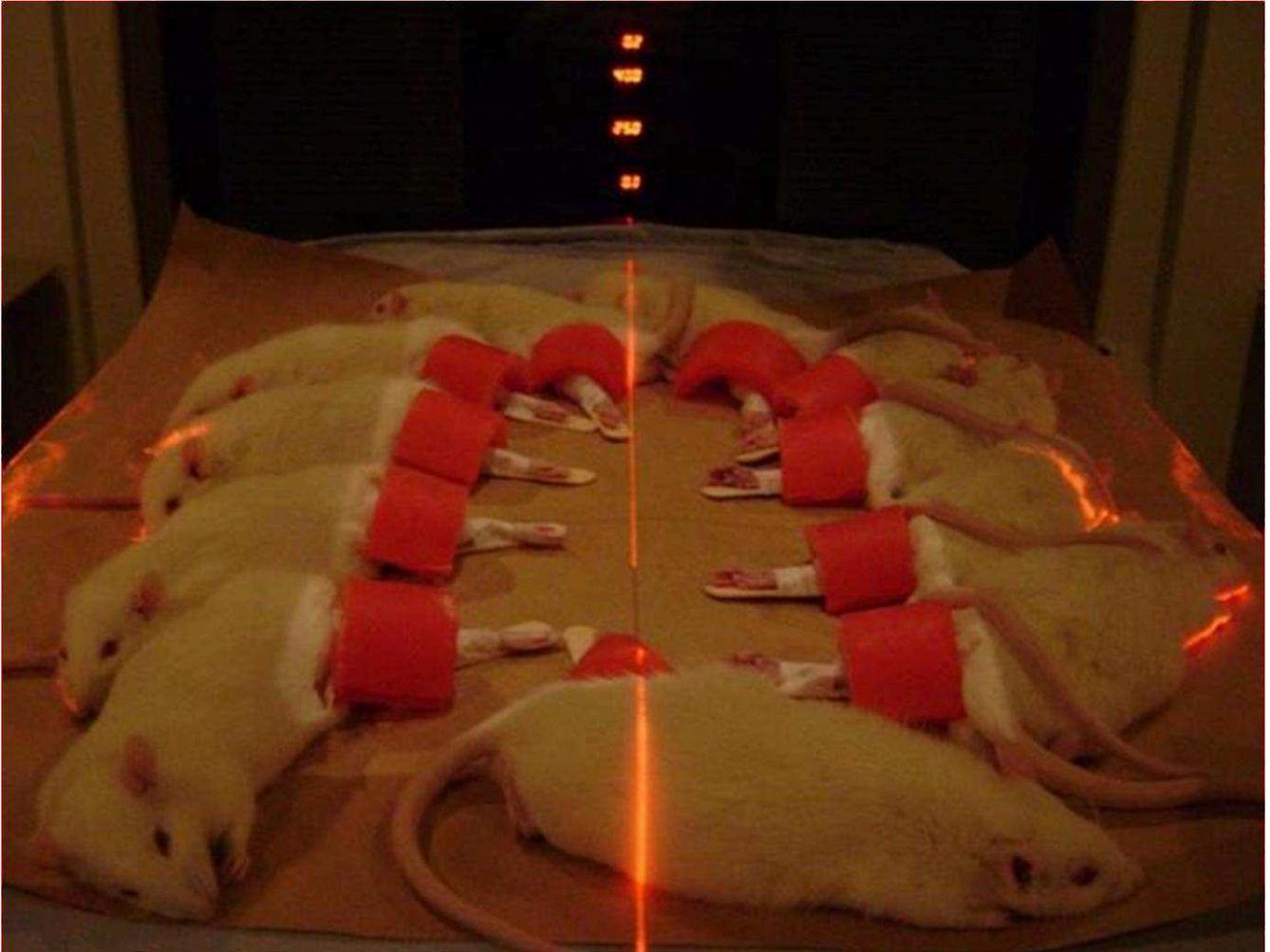
Neste estudo serão analisadas lâminas histológicas obtidas do fêmur de 10 ratos *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar. Ao todo serão estudadas 267 lâminas, totalizando 800 (oitocentos) cortes histológicos. Todos os procedimentos para a obtenção destes cortes foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA-UFU) - Protocolo 060/09.

Os animais foram submetidos à radioterapia apenas nas pernas esquerdas, sendo estas o grupo teste (n=1), e as pernas direitas, que não foram irradiadas, pertencem ao grupo controle (n=5). Os animais foram sacrificados 30 dias após a radioterapia, quando foi feita a coleta dos fêmures para reconstrução da rede de canais e análise da lacunaridade.

### 3.2 - Radioterapia:

O protocolo de irradiação foi realizado de acordo com Lehner et al. (2004). Antes das sessões de radioterapia, os animais foram submetidos à anestesia geral por meio de injeção intraperitoneal, contendo 0,025 ml/100g de peso corpóreo do animal, do relaxante muscular cloridrato de xilazina 2% e 0,05 ml/100g de peso corpóreo do animal do anestésico e analgésico cloridrato de quetamina 10%. Em cada animal, a perna direita foi estendida lateralmente e fixada em uma posição pré-determinada com fita adesiva. A área irradiada foi previamente marcada com caneta dermatográfica para cirurgias na cor azul. Todas as medidas de segurança foram adotadas e o feixe de radiação individualmente colimado, limitando a área irradiada.

A radioterapia foi realizada utilizando o Acelerador Linear de Elétrons de 6MeV (Varian 600-C® Varian Medical Systems Inc. Palo Alto, Califórnia/EUA - Localizado na UFTM). A dose total de 30 Gy é considerada adequada por produzir alterações ósseas, simulando em roedores a situação clínica observada em humanos (Lehner et al., 2004).



**Figura 2** Animais anestesiados e posicionados para receber a radiação nas patas esquerdas. Note a proteção púmblica nas patas direitas.

### 3.3 - Análise histológica:

Os animais foram sacrificados, 30 dias após a radioterapia, em uma câmara hermética de dióxido de carbono (70 a 80%), até que a morte dos animais fosse constatada pela ausência dos sinais vitais, seguindo os princípios da Declaração dos Direitos dos Animais. Foi realizada uma incisão longitudinal na região femural esquerda. Os fêmures foram removidos, utilizando brocas nº 702 em alta rotação, sob irrigação com soro fisiológico e fixados por imersão em formaldeído 4% em Tampão Fosfato 0,1M por 48 horas. Os espécimes foram descalcificados em solução de EDTA a 10% pH 7,4 e então processados para inclusão em parafina pela técnica convencional. Dos blocos, foram obtidos cortes histológicos seriados, que foram corados em hematoxilina e eosina.

As lâminas foram escaneadas (Scanner modelo ScanScope AT Turbo®, Leica Biosystems Nussloch, Shinjuku-ku, Nußloch/Alemanha - Localizado no Bloco 4L- A/UFU), segmentadas e analisadas.

#### 3.4 - Análise da lacunaridade:

As imagens dos cortes histológicos foram escaneadas, utilizando programa de análise de imagens. As imagens digitalizadas foram submetidas ao processo de segmentação interativa (Oliveira et al., 2006). Utilizando o Programa Adobe Photoshop CS6, foram selecionadas e subtraídas as regiões de interesse (ROIs), que correspondem às regiões de canais. As imagens segmentadas serão transferidas para escala de cinza e utilizando ambiente de programação SCILAB serão obtidas imagens binárias. Por meio de algoritmos desenvolvidos em ambiente de programação SCILAB, será quantificada a lacunaridade em cada imagem. A lacunaridade expressa a geometria da microestrutura do tecido ósseo, de acordo com o tamanho, forma e distribuição das ROIs (Waldemarin, Beletti e Da Fontoura Costa, 2004; Rabelo et al., 2010).

#### 3.5 - Análise da rede de canais ósseos:

As imagens histológicas serão utilizadas para reconstrução tridimensional da rede de canais ósseos utilizando o Visualization Toolkit - VTK, que permite trabalhar com computação gráfica 3D e processamento de imagens (Viana et al., 2009).

Todas as regiões do corte histológico serão analisadas.

Nas Figuras 3 e 4 é demonstrado um corte escaneado e outro segmentado.



Figura 3 – Corte (202) escaneado



Figura 4 – Corte (202) Segmentado

### 3.6 - Esqueletonização

As técnicas de esqueletonização surgiram no início da evolução dos computadores devido ao baixo poder computacional das máquinas daquela época, pois para os dados serem processados em tempo hábil, era necessário que eles fossem simplificados e reduzidos utilizando esses algoritmos (Plotze; Bruno 2004, Lam et al. 1992).

O objetivo da técnica é reduzir um objeto para uma versão mais simplificada, mantendo todas as suas características essenciais, com isso, os esqueletos são representações compactas dos objetos originais.

A extração do esqueleto em estruturas vasculares é um procedimento importante, pois provê informações topológicas e morfológicas como o tamanho dos vasos e a relação de hierarquia e conectividade entre eles, auxiliando assim, a análise dos mesmos (Jiang; Alperin 2004, Yu; Eajap 2006, Liu et al. 2008). Ferramentas que permitam avaliar a rede vascular óssea são essenciais para a prática clínica (Paiva 2013).

Em suma, a extração do esqueleto de volumes tridimensionais é uma tarefa muito importante para análise dos dados, pois ela diminui a quantidade de informações presentes no objeto e com isso, simplifica a análise dos mesmos. Já a análise de dados referentes à rede vascular óssea é de grande interesse à comunidade científica, pois ela está diretamente ligada à capacidade de regeneração do reparo ósseo (Paiva 2013).

Neste trabalho os cortes histológicos obtidos foram submetidos a diferentes tipos de preparação computacional, visando diferenciar ao máximo as diferentes microestruturas ósseas, para isso as imagens foram transformadas tons de cinza, cada uma evidenciando um tipo de coloração. Quatro colorações diferentes foram evidenciadas em cada imagem, uma realça os tons de hematoxilina, outra de eosina, outra a parte branca, e para finalizar a parte avermelhada.

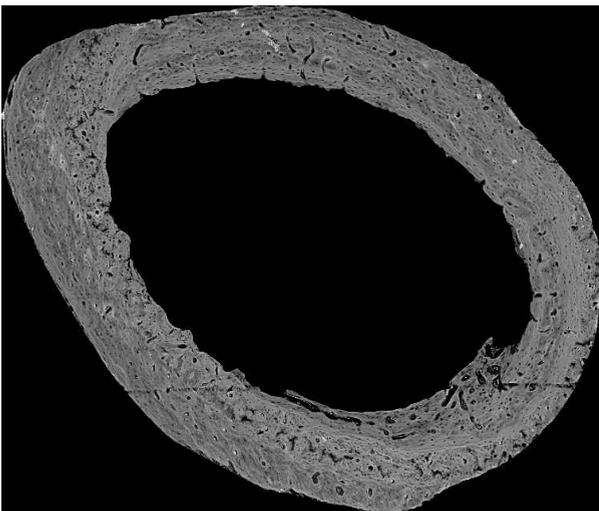


Figura 5  
Imagem evidenciando a coloração por eosina.

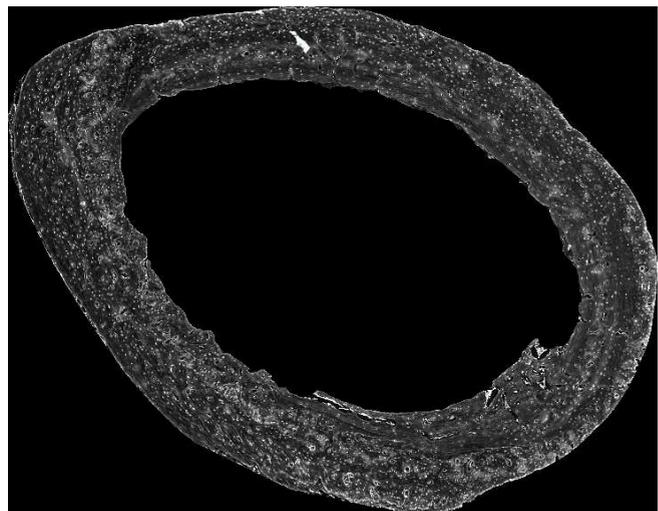


Figura 6  
Imagem evidenciando a coloração por hematoxilina.

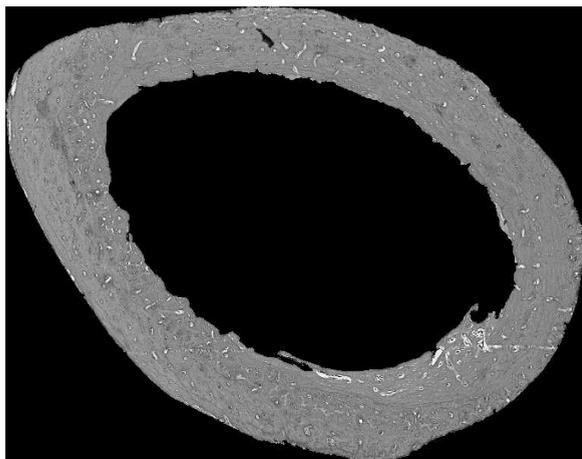


Figura 7  
Imagem evidenciando as partes brancas da lâmina.

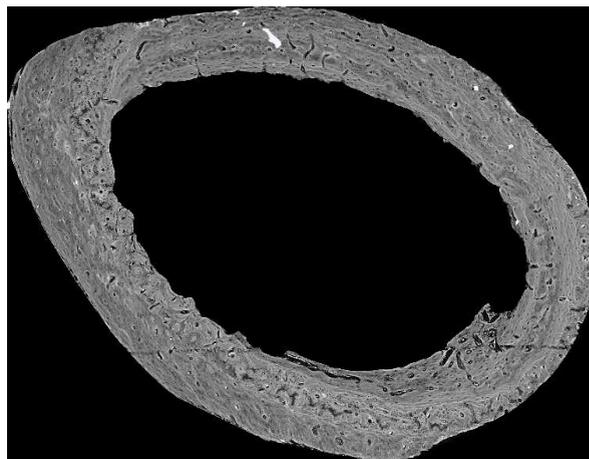


Figura 8  
Imagem evidenciando as partes avermelhadas da lâmina.

#### 4. Resultados

Como resultado foram obtidos de forma tridimensional a rede de canais ósseos, por se tratar de uma imagem de formato especial apenas programas específicos conseguem abri-las em 3 dimensões, no entanto é possível salva-las para se ter uma ideia do esqueleto que foi reconstruído.

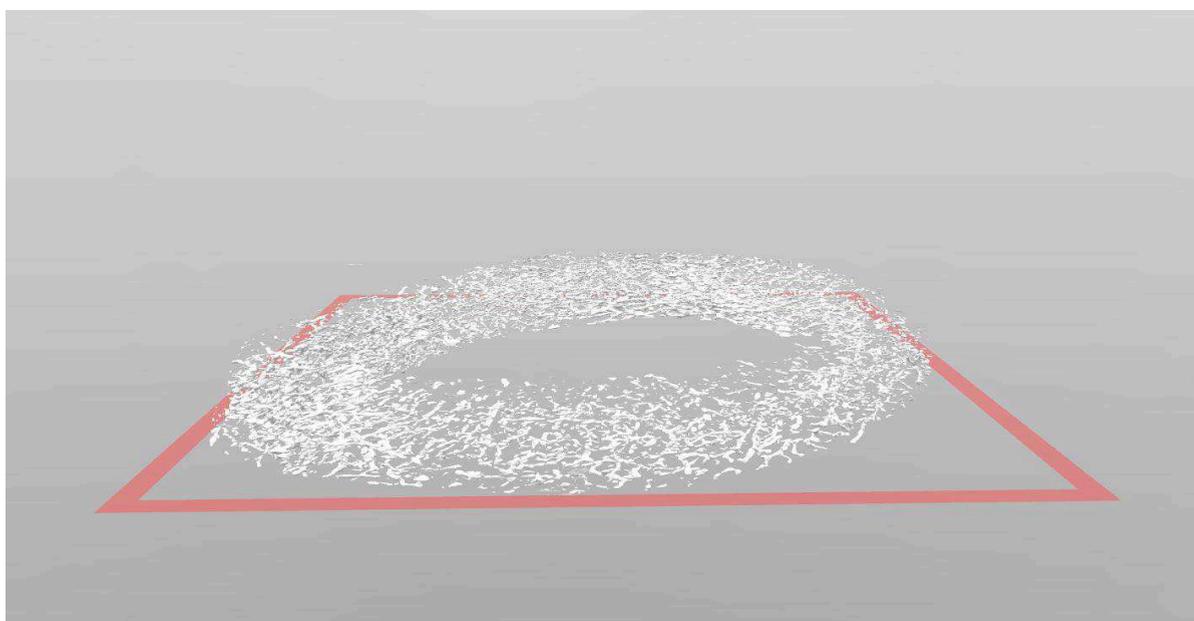


Figura 9 – Imagem 3D da Microestrutura de canais ósseos

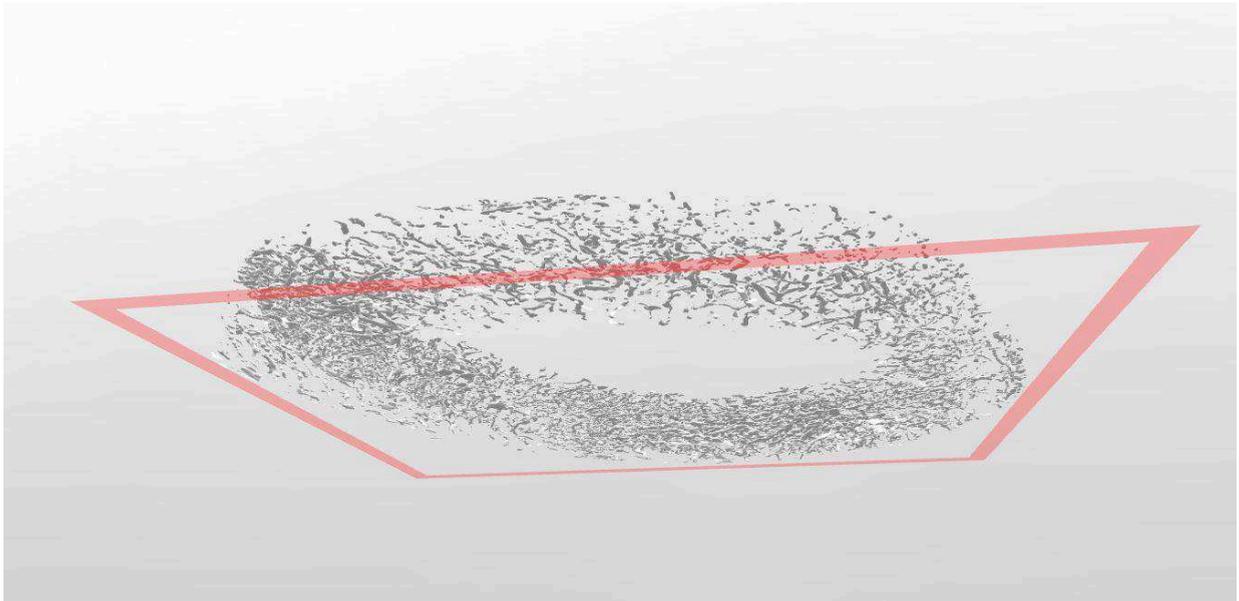


Figura 10 - Imagem 3D da Microestrutura de canais ósseos

Após a reconstrução tridimensional e posterior comparação entre o grupo controle e o grupo irradiado foi possível perceber algumas alterações na rede de canais ósseos presente no fêmur dos animais.

Nos animais do grupo irradiado foi possível detectar uma diminuição da concentração desses canais na região central da cortical óssea. Isso nos demonstra uma diminuição da irrigação da área, com conseqüente diminuição da nutrição local. Confirmando o fato que a radiação ionizante altera o arranjo dos canais ósseos.

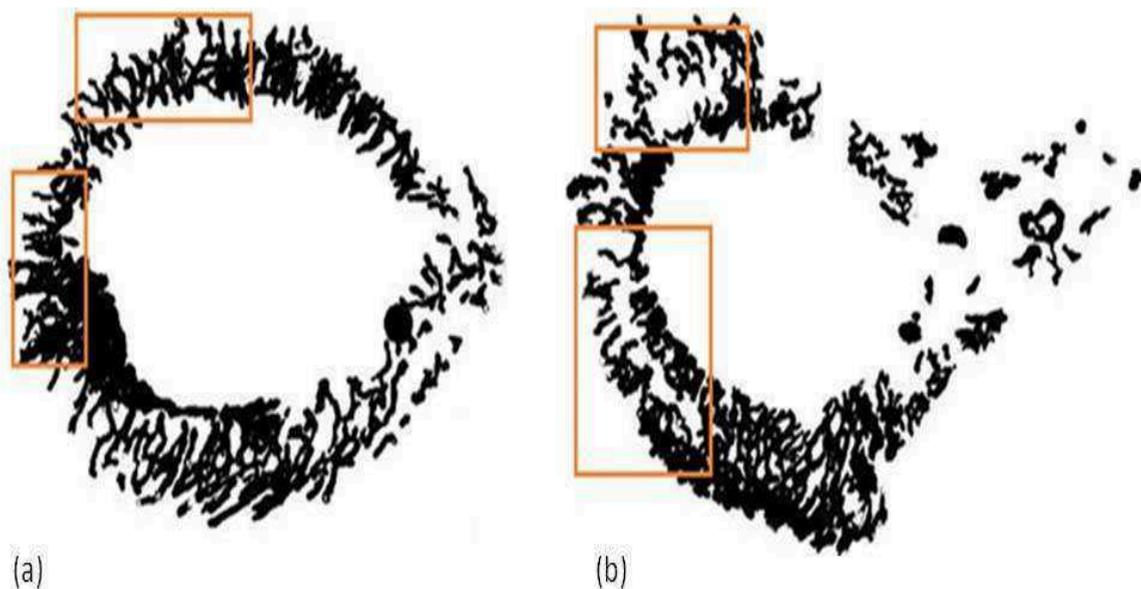


Figura 11- Reconstrução da rede de canais ósseos. A figura mostra um corte histológico do grupo controle (a), e outro corte histológico do grupo teste (b). As regiões em destaque demonstram que a região central cortical do grupo teste possui menor número de canais ósseos do que a mesma região do grupo controle.

Outra forma de análise é quando usamos outra angulação para visualizar as áreas de interesse, observando alterações presentes também nos canais de Volkmann. Onde podemos notar canais isolados presentes nos ossos do grupo teste, demonstrando alterações também nessa estrutura.

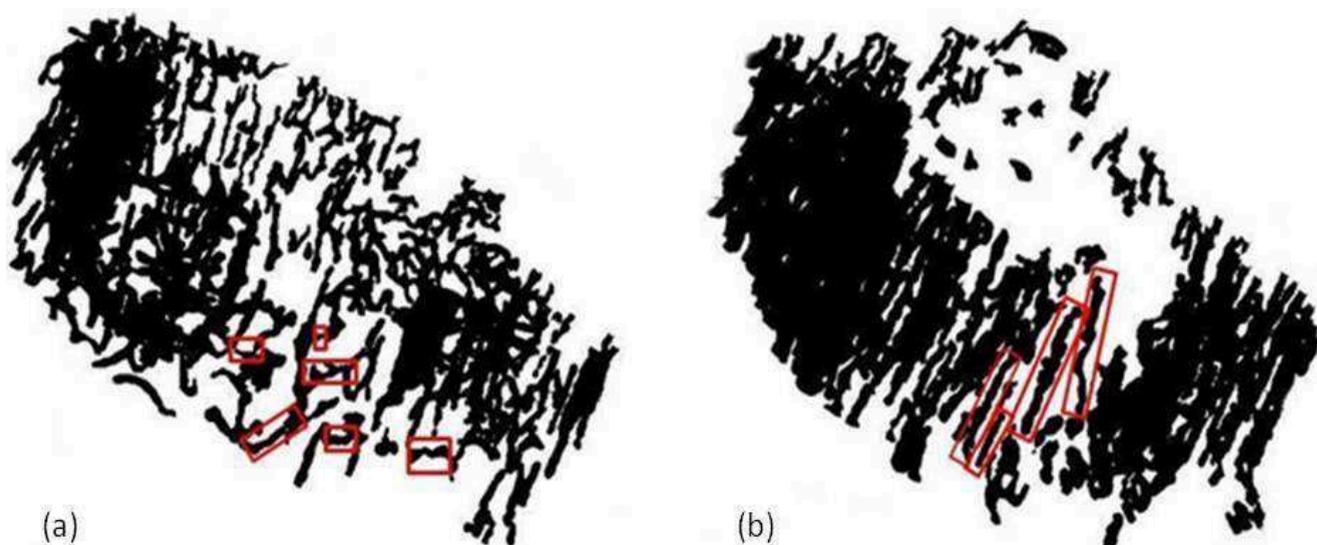


Figura 12- Redução dos canais de Volkmann. A figura (a) mostra a reconstrução do grupo controle, já na figura (b) em uma mesma perspectiva observamos o grupo teste. É possível perceber a presença de canais de Volkmann isolados, representando uma segmentação e diminuição da comunicação entre eles com consequente restrição de nutrição do osso.

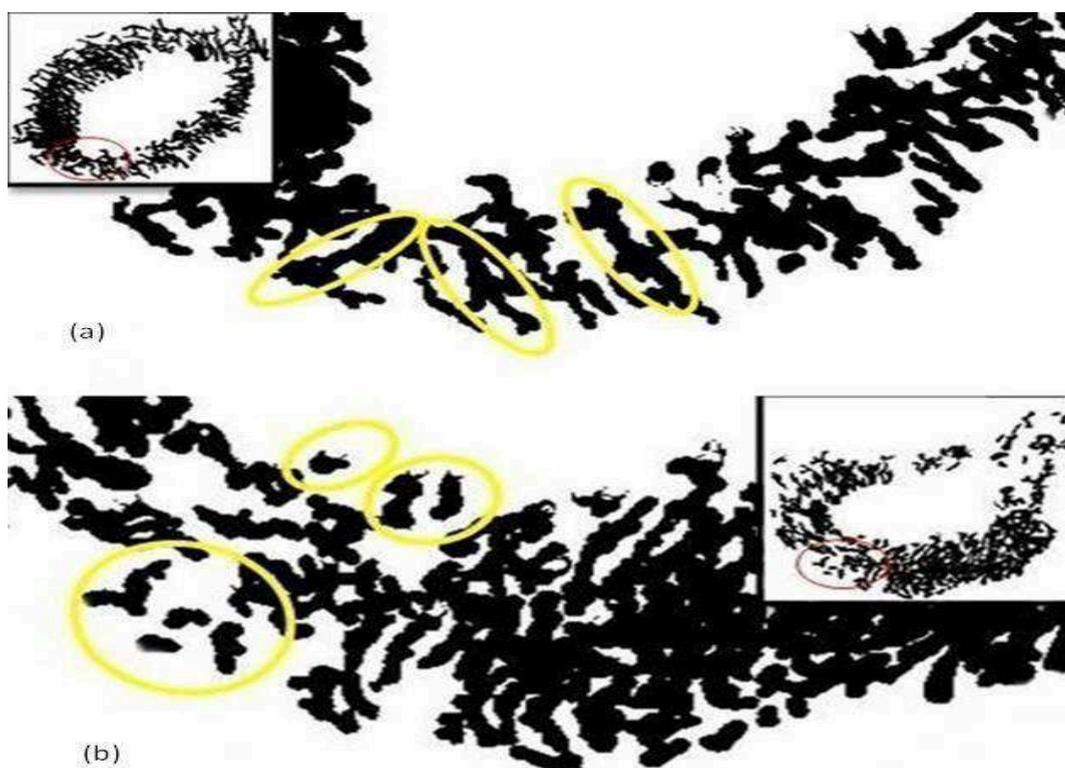


Figura 13. Redução dos canais de Volkmann. Na figura (a) está representado um segmento da reconstrução tridimensional do grupo controle, destacando uma rede bem extensa de canais de Volkmann. Na figura (b) está representado o mesmo segmento referente ao grupo irradiado, onde percebemos não somente uma menor concentração desses canais, como também a não comunicação entre eles.

## 5. Discussão

De acordo com Junkeira e Carneiro 2008, o conhecimento de métodos de investigação e ferramentas é importantíssimo para entendermos o comportamento e funcionamento de células, órgãos ou tecidos. Com o aumento dos números de casos de câncer conseqüentemente novas técnicas de tratamento estão sendo criadas e estudadas, no entanto a radioterapia ainda é um método dos mais utilizados. É importante entender não somente como ela atua no combate às células cancerosas como também seus efeitos colaterais às outras estruturas atingidas pela radiação ionizante. Investigar qual a sua influência na rede vascular óssea irá abrir caminhos não somente para entender por que ocorrer certos tipos de complicações com o paciente, mas também para o estudo de novas técnicas que não causem tantos danos as estruturas atingidas. Atualmente, muitos autores direcionam seus estudos para avaliação da microarquitetura óssea como método de diagnóstico de patologias ósseas (Nogueira, L.P. 2012) ou ainda como método de avaliação da eficácia de terapias para favorecer o reparo ósseo (Rabelo, G.D., 2012; Bedini, R., et al.; 2009).

A análise da microestrutura óssea pode ser sugerida para vários fins de pesquisa, já o modo como essa estrutura será analisado vai depender do que será o seu foco de estudo. As reconstruções tridimensionais dos ossos nos permitem uma vasta área de análise, como por exemplo: anisotropia, porosidade, conectividade, permeabilidade, densidade vascularização, etc.

Bedini, R., et al.; 2009 confirmou que a microtomografia é um método que utiliza algoritmos de processamento digital, que a partir de uma série de imagens bidimensionais alinhadas formará uma imagem tridimensional. Sendo ótimo para avaliar o osso trabecular e o cortical, permitindo uma significativa distinção entre eles. Porém a sua desvantagem é a incapacidade de identificar tecidos moles. Esse recurso também é criticado pela alta dose de radiação necessária e pelo alto custo do processo. Por não ser possível analisar alterações em tecidos moles e em células essa técnica pode ser descartada (Chappard, D. et. al., 2008).

Com o uso da radioterapia para o tratamento do câncer, entender como ela pode influenciar os tecidos da região é de extrema importância. Uma vez que, ela não atinge somente as células doentes, mas afeta também células sadias que estão no local irradiado. Neste estudo buscamos identificar quais as alterações nas células ósseas e conseqüentemente no osso como um todo. Para essa análise queríamos descobrir qual a influência do processo na nutrição deste osso. Esta que é realizada por um sistema de canais presente no interior da microestrutura óssea, os canais de Havers e os Canais de Volkmann. Os canais Haversianos estão em sua maioria direcionados e posicionados em um sentido longitudinal do osso, enquanto os canais de Volkmann possuem sua posição em sentido transversal, estabelecendo uma linha de comunicação dos canais de Havers entre si e com o exterior do osso.

Analisar a rede vascular e sua interação com a remodelação óssea ainda é um desafio quando usamos métodos computacionais, uma vez que a pesquisa e literatura nessa área ainda é bem escassa.

Rabelo et al. 2012, diz que quando utilizamos técnicas que permitam uma visualização tridimensional do osso, conseguimos a chance de realizar não somente uma análise qualitativa da organização da microestrutura óssea como também uma análise quantitativa em relação ao nível organizacional celular. Por exemplo conseguimos identificar a forma como os osteócitos estão dispostos na matriz óssea, sendo importante para o desenvolvimento de terapias de reparo ósseo baseadas na localização destas células, estas que estão diretamente envolvidas com a arquitetura óssea. A metodologia deste trabalho teve enfoque exatamente nessa microarquitetura, obtendo os resultados sobre as atividades celulares e parâmetros vasculares intraósseos.

Para o sucesso de trabalhos como este, é imprescindível que a técnica de obtenção dos cortes seja realizada da melhor maneira possível, sendo necessário um operador experiente para o processo. Isso é importante uma vez que a qualidade dos cortes influencia diretamente na obtenção das lâminas e consequentemente obtenção tridimensional da microestrutura óssea. É importante salientar também que o resultado das lâminas não depende somente da técnica de corte, mais de uma série de procedimentos como os processos aplicados ao tecido, que se iniciam com a fixação e terminam com a coloração do corte (Junqueira & Carneiro, 2008).

O processo de obtenção dos cortes não é simples, estando ele sujeito a erros e imperfeições, como dilacerações e dobras no tecido. Dependendo da forma como ocorrem esses defeitos nos cortes, as lâminas devem ser descartadas, pois elas ficam inviabilizadas de serem entrarem na comparação. Neste estudo os cortes eram subsequentes, portanto se várias lâminas fossem comprometidas, o estudo seria inviabilizado. A quantidade de lâminas afetadas foi pequena e em muitos casos foi possível adiciona-las ao projeto, pois as áreas afetadas foram pequenas, sendo reconstruídas em computador, baseando-se na quantidade e disposição de canais em uma média realizada entre o corte anterior e ao posterior a lâmina em questão.

Mesmo frente as várias variáveis presentes no processamento do corte histológico, a realização desse estudo se tornou relativamente simples, uma vez que áreas de interesse podem ser facilmente identificadas e comparadas. Sendo a coloração mais uma forma de auxílio na identificação destas áreas em questão.

Entender como a remodelação pode influenciar sobre a disposição da rede de canais ósseos e consequentemente sobre a distribuição de nutrientes por toda a estrutura óssea ainda é um desafio, existem poucas informações concretas sobre esse sistema. Através do programa VTK conseguimos realizar a caracterização 3D dessa rede de canais, abrindo espaço para inúmeras possibilidades de análise. Esse programa é de fácil manipulação e baixo custo. Permite uma visualização tridimensional microscópica e fornece informações importantes sobre a microarquitetura do osso, como a quantidade, volume, fluxo perímetro, disposição e conectividade da rede de canais (Viana, et. al. 2006).

Essa análise foi realizada usando toda a estrutura do corte, além de usar um número significativo de imagens para realizar a comparação. Isso permite que no futuro sejam realizadas novas análises, uma vez que esse programa não apenas reconstrói o modelo, mas permite também uma análise tridimensional do mesmo.

Segundo um estudo realizado por Keaveny TM, 1999, os ossos submetidos a radiação ionizante tiveram uma redução da massa óssea, devido a nutrição diminuída da região. Isso foi perceptível também no nosso trabalho, uma vez que ao analisar tridimensionalmente os modelos criados, foi possível perceber uma predominância da circulação periférica em relação ao centro da cortical óssea, o que nos sugere uma diminuição dos canais nessa cortical óssea central. Bowman LC, 2008 afirmou que a radiação ionizante pode levar à esclerose vascular e fibrose, portanto isso levaria a uma hipóxia regional acarretando a morte dos osteócitos na região, o que explicaria a maior concentração próxima ao periosteio e à medula.

De acordo com Costantino, Friedman e Steinberg (1995) a endoarterite progressiva é um quadro acarretado pela radiação ionizante em que se tem a diminuição do suprimento sanguíneo através dos canais de Volkman, isso se confirmou no nosso trabalho com uma grande diminuição no número desses canais. Fato confirmando também por (Abreu et al., 2014).

Este trabalho nos permitiu uma noção objetiva das mudanças que ocorrem nos canais da microarquitetura óssea, nos demonstrado uma necessidade da busca por novos tratamentos por radioterapia ou busca por melhoras nos meios atuais. A amostra, no entanto, não é cem por cento confiável, sendo necessário mais estudos a respeito deste tema.

## **6. Conclusão**

Foi possível concluir que a forma escolhida para análise da microarquitetura óssea utilizada neste trabalho é sim eficaz, permitindo uma boa reprodução tridimensional dessa rede de canais intraósseos, confirmando dados já existentes de análises bidimensionais e com a literatura já existente. Portanto, são necessários novos investimentos nas pesquisas para as formas de tratamento do câncer que utilizam a radiação ionizante, pois foi perceptível grandes mudanças na microarquitetura da rede de canais ósseos, tanto em quantidade quanto em comunicação entre eles, demonstrando ser necessário a busca por formas de tratamento menos agressivas aos ossos.

## 7. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO COM DETALHAMENTO DAS ATIVIDADES A SEREM DESENVOLVIDAS

ANO	PROGRAMAÇÃO	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
2016	Atualização e complementação da revisão bibliográfica								X				
2016	Análise das lâminas histológicas e interpretação dos resultados									X	X	X	X
2017	Análise da Lacunaridade	X	X										
2017	Análise da rede de canais vasculares			X	X	X							
2017	Esqueletonização				X	X							
2017	Tabulação e interpretação dos resultados						X						
2017	Redação do relatório final							X					
2017	Redação de artigo científico							X					

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGHALOO, T. L.; LE, A. D.; FREYMILLER, E.G.; AVERA, S.; SHIMIZU, K.; NISHIMURA, R. D. Immunohistochemical analyses of cortical and cancellous bone after radiation and the effect of platelet-rich plasma of autogenous bone grafting. **Int J Oral Maxillofac Implants**.v.21, n.4, p. 535-542, 2006.
2. CHARBONNEAU, N.; GÉLINAS, M.; DEL VECCHIO, P.; GUERTIN, L.; LAROCHELLE, D.; TABET, J. C.; SOULIÈRES, D.; CHARPENTIER, D.; NGUYEN-TÂN, P. F. Primary radiotherapy for tonsillar carcinoma: a good alternative to a surgical approach. **J Otolaryngol**. V.35, n.4, p.227-234, Aug. 2006.
3. CLARK, C. L.; STRIDER, J.; HALL, C.; FERGUSON, H. W.; ARMSTRONG, K. L.; RUNNER, R. R.; BAUR, D. A. Distraction osteogenesis in irradiated rabbit mandibles with adjunctive hyperbaric oxygen therapy. **J Oral Maxillofac Surg**. v.64, n.4, p.589-593, apr. 2006.
4. DOBBS, J.; BARRETT, A.; ASH, D. Practical radiotherapy planning. 3rd ed. London: **Arnold**; 1999.
5. ALVARIÑO-MARTÍN, C.; SARRIÓN-PÉREZ, M. G. Prevention and treatment of oral mucositis in patients receiving chemotherapy. **J Clin Exp Dent**. v.6, n.1, p.74-80, 2014.
6. FELDMEIER, J. J. Hyperbaric oxygen for delayed radiation injuries. **Undersea Hyperb Med**. V.31, n.1, p.133-145, 2004.
7. HYDERLEY, L. J., MADDOCK, P. G. Noções gerais da radioterapia. **Manual de enfermagem oncológica**. São Paulo. Fundação Oncocentro de São Paulo, p.91-97, 1996.
8. **INCA**, disponível em < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>> Acesso em: 17 de julho, de 2017.
9. KIYOHARA, S.; SAKURAI, T.; KASHIMA, I. Early detection of radiation-induced structural changes in rat trabecular bone. **Dentomaxillofac. Radiol**. V.32, p.30-38, 2003.
10. LEHNER, B.; BAUER, J.; RÖDEL, F.; GRABENBAUER, G.; NEUKAM, F. W.; SCHULTZE-MOSGAU, S. Radiation- induced impairment of osseous healing with vascularized bone transfer: experimental model using a pedicled tibia flap in rat. **Int J Oral Maxillofac Surg**. v.33, n.5, p.486-492, jul. 2004.
11. RABELO, G.D.; BELETTI, M. E.; DECHICHI, P. Histological analysis of the alterations on cortical bone channels network after radiotherapy: A rabbit study. **Microsc Res Tech**. v.73, n.11, p. 1015-1018. Oct. 2010.
12. RICE, A. M. An Introduction to Radiotherapy. **RCN**. p. 49-56, 1997.
13. VIANA, M.P; TANCK, E.; BELETTI, M.E.; COSTA, L. D.A. F.; Modularity and robustness of bone networks, **Mol Biosyst**.v.5, n.3, p.255-256, 2009.

14. VISSINK, A.; JANSMA, J.; SPIJKERVET, F. K. L.; BURLAGE, F. R.; COPPES, R. P. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. **Crit Rev Oral Biol Med**. v.14, p.199-212, 2003.
15. WÜRZLER, K. K.; DEWESE, T. L.; SEBALD, W.; REDDI, A. H. Radiation-induced impairment of bone healing can be overcome by recombinant human bone morphogenetic protein-2. **J. Craniofac Surg**. v.9, p.131-137, 1998.
16. SILVA, L.; BARBOSA B.; MATOS M. Acute effects of Radiotherapy in patients with Head and Neck Cancer: IMRT vs RapidArc. **Biomed Biopharm** , v.10, n.2, p.197-208, 2013.
17. COSTA N.P.; VEECK E.B.; SOUZA J.C.; TAVARES M.E.; ALMEIDA D.; FREITAS A.C.; RAMALHO L.M.P.; SARMENTO V.A.; CUNHA S.S.D. Effects of radiotherapy on bone tissues. **Radiol Bras**. v.40, n.3, p.189-197, 2007.
18. PLOTZE, R. O. AND BRUNO, O. M. Estudo e comparação de algoritmos de esqueletonização para imagens binárias. **IV Congresso Brasileiro de Computação**. p. 59 – 64, 2004;.
19. JIANG, H. AND ALPERIN, N.. A NEW AUTOMATIC SKELETONIZATION ALGORITHM FOR 3D VASCULAR VOLUMES. **In Engineering in Medicine and Biology Society, 2004. IEMBS '04. 26th Annual International Conference of the IEEE**. v.1, p. 1565-1568, 2004.
20. LAM, L.; LEE, S. W., AND SUEN, C. Thinning methodologies - a comprehensive survey. **Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on**, v.14, n.9, p.869-885, 1992.
21. YU, Z. AND, E. A. J. A. P.; C.. A structure tensor approach for 3D image skeletonization: Applications in protein secondary structure analysis. **In Image Processing, IEEE International Conference on**, p. 2513 – 2516, 2006.
22. LIU, J., ZHANG, Z., SONG, P., SONG, E., HU, D., AND XIE, Q. Automatic skeletonization for 3D hepatic portal vein in CT angiography. **In Nuclear Science Symposium Conference Record**. p. 5396 – 5399, 2008.
23. PAIVA, B. V. Reconstrução tridimensional da rede vascular - uma nova ferramenta para análise do tecido ósseo. **Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia**, 2013.

## 9. Aprovação do comitê de ética



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -  
Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceuafu@yahoo.com.br;  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

### ANÁLISE FINAL Nº 045/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 028/12

Projeto Pesquisa: "Efeito da laserterapia e oxigenoterapia hiperbárica no reparo, microestrutura e resistência biomecânica do osso submetido à radiação ionizante ."

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Paula Dechichi

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO. O MODELO DESTES ESTÁ NO SITE.

Uberlândia, 04 de Junho de 2012

Profa. Dra. Ana Elizabeth Iannini Custódio  
Vice-Coordenadora *Pro tempore* da CEUA/UFU  
Universidade Federal de Uberlândia