



**Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Odontologia
Unidade de Investigação Científica 3**



Efeito da oxigenação hiperbárica no reparo ósseo em fêmures de ratos submetidos à radiação ionizante.



**Aluna: Danyella Carolyna Soares dos Reis
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Flaviana Soares Rocha
Co-orientador: Ms. Luiz Henrique Ferreira Júnior**

INTRODUÇÃO

O **tecido ósseo** é o principal constituinte do **esqueleto**, e possui papel essencial para o bom funcionamento do organismo.

Junqueira & Carneiro, 2013.

1 **Suporte** para as partes moles;

2 **Proteção** aos órgãos internos;

3 **Proteção** da medula óssea;

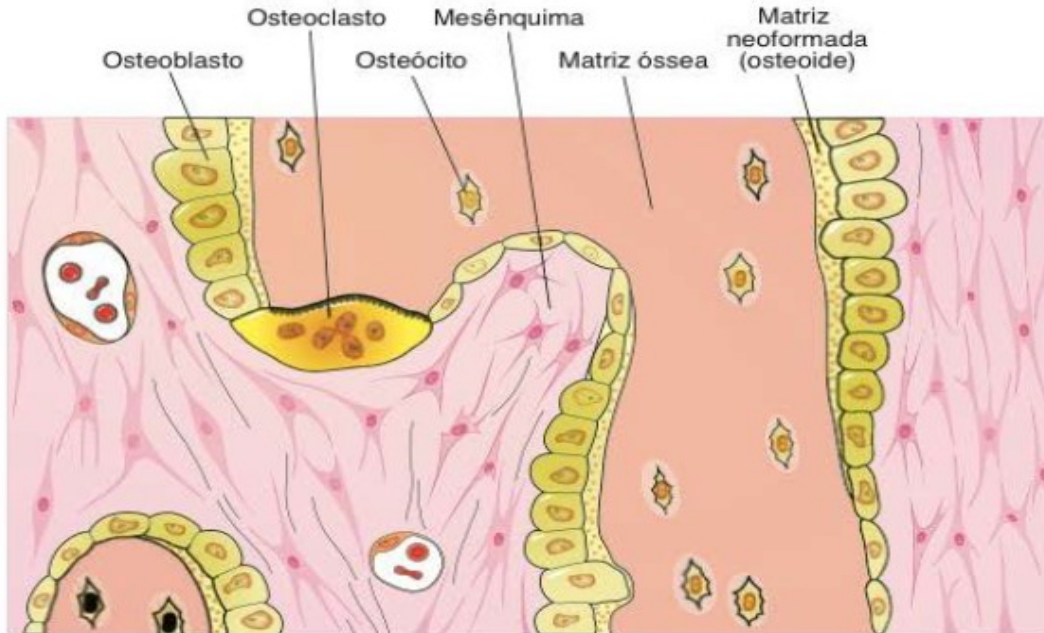
4 **Apoio** aos músculos esqueléticos;

5 **Armazenamento de cálcio e outros íons**, liberando-os de maneira controlada e mantendo seu **equilíbrio** nos líquidos corporais.



Tecido ósseo

Tipo especializado de **tecido conjuntivo**, composto por **células** e uma **matriz extracelular calcificada**, a **matriz óssea**



Osteoblastos

Osteócitos

Osteoclastos

Reparo e remodelação óssea

Local e severidade da lesão

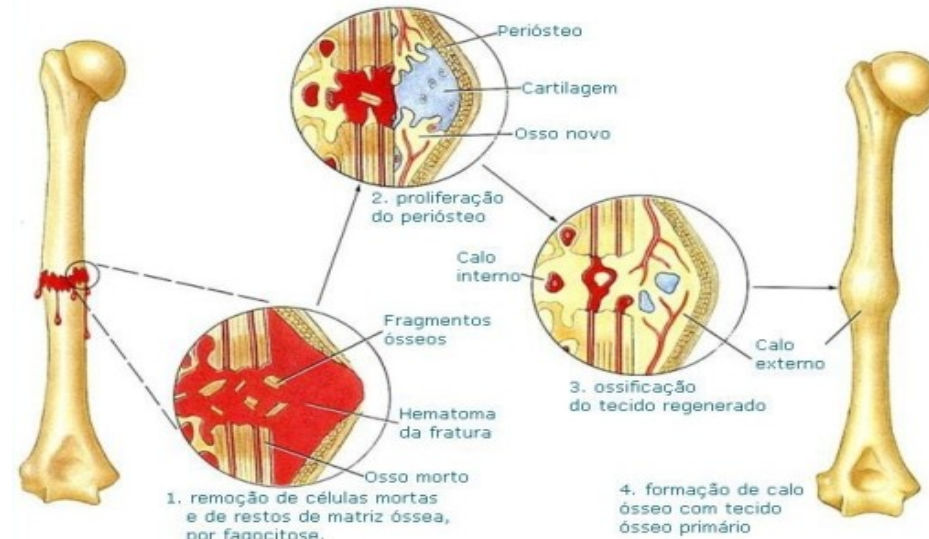
Presença de infecção

Idade e condição sistêmica

Uso de fixação rígida

Vascularização

Estresse fisiológico sofrido pelo tecido



http://www.sobiologia.com.br/figuras/Histologia/remodelacao_ossea.jpg

Latrenta et al., 1989; Lin et al., 1990; Phillips & Rahn, 1990.

A radioterapia baseia-se na aplicação de Radiação Ionizante para o tratamento de câncer, destruindo as células tumorais.

Da Cunha et al., 2007.

A radiação é aplicada à área do tumor durante um período determinado, procurando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circundantes.

Da Damrom et al., 2003.

RADIAÇÃO NO TECIDO ÓSSEO

Desequilíbrio da atividade osteoblástica e osteoclástica;

Peliesser et al, 2014

Redução da resistência biomecânica do osso;

Maeda et al, 1988.

Redução da população de osteócitos e osteoblastos;

Maeda et al, 1988.

Diminuição dos vasos sanguíneos;

Handschel et al, 2001.

Redução da matriz óssea e quantidade de íons.

Rabelo et al, 2010.

Modificação da rede de canais ósseos.

Rabelo et al, 2010.

Redução da osteogênese e neovascularização;

Muhonen et al, 2004.

Recursos utilizados para otimizar o reparo ósseo pós-radioterapia:

- ✓ Utilização de enxertos ósseos; Rocha et. al, 2011.
- ✓ Concentrado de plaquetas; Neves et. al, 2013
- ✓ Laserterapia de baixa potência; Liu et al., 2007; da Cunha et al., 2007.
- ✓ Terapia genética; Aghaloo et al., 2006.
- ✓ Oxigenação Hiperbárica; Feldmeier, 2004; Shaw e Butterworth, 2011.



A oxigenação hiperbárica é uma modalidade de tratamento na qual o paciente é exposto à inalação de **oxigênio puro** (100%) sob uma **pressão superior** à pressão atmosférica à nível do mar.

Rocha et al. 2015

OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA

Bactericida e bacteriostático;

SBMH, 2010

Estímulo à síntese de colágeno;

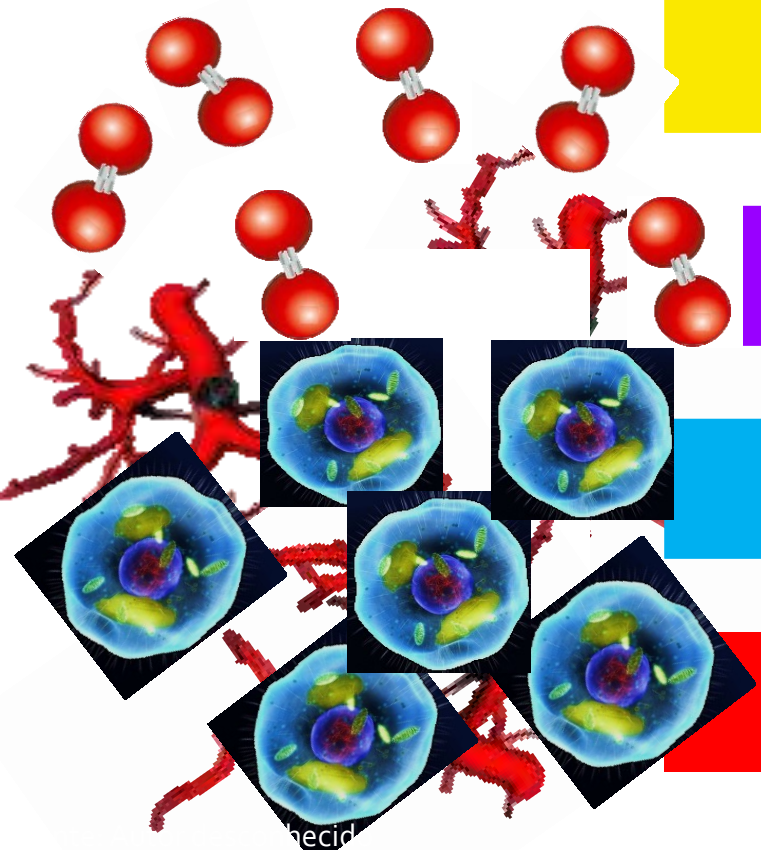
Feldmeier, 2004; SBMH, 2010

Angiogênese e osteogênese;

Feldmeier, 2004; Jacobson, 2010

Estímulo à atividade leucocitária;

SBMH, 2010



OBJETIVO



Avaliar o efeito da oxigenação hiperbárica no reparo do osso, submetido ou não à radiação ionizante, por meio de parâmetros histológicos e histomorfométricos, e microscopia de polarização.

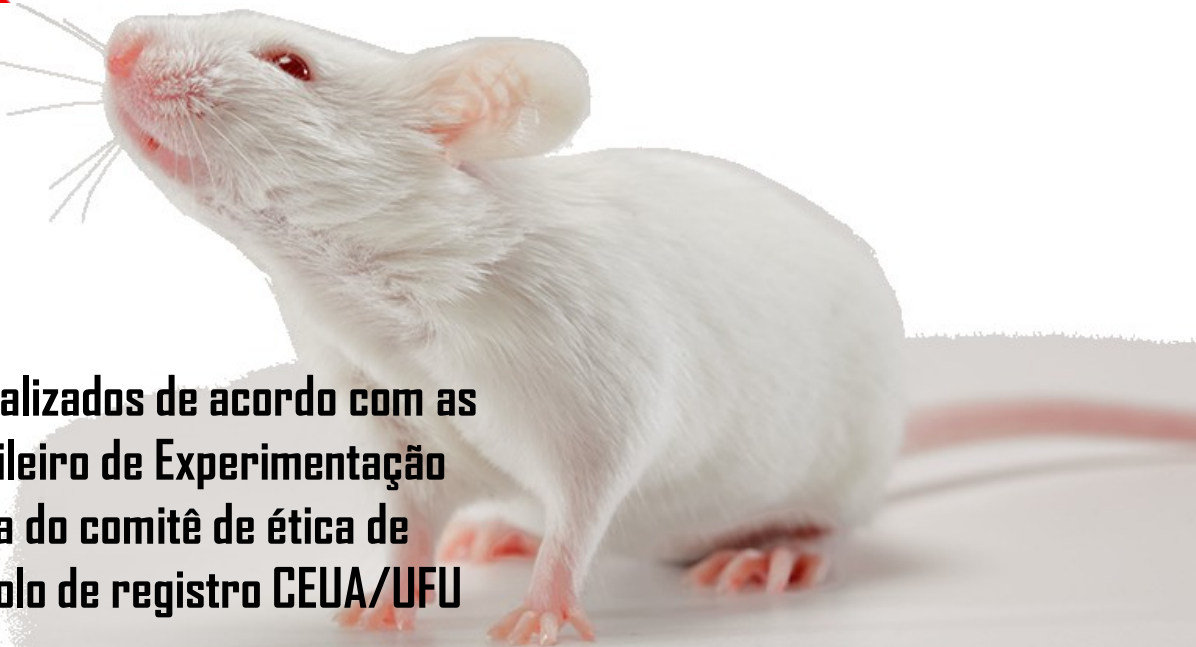
MATERIAIS E MÉTODOS

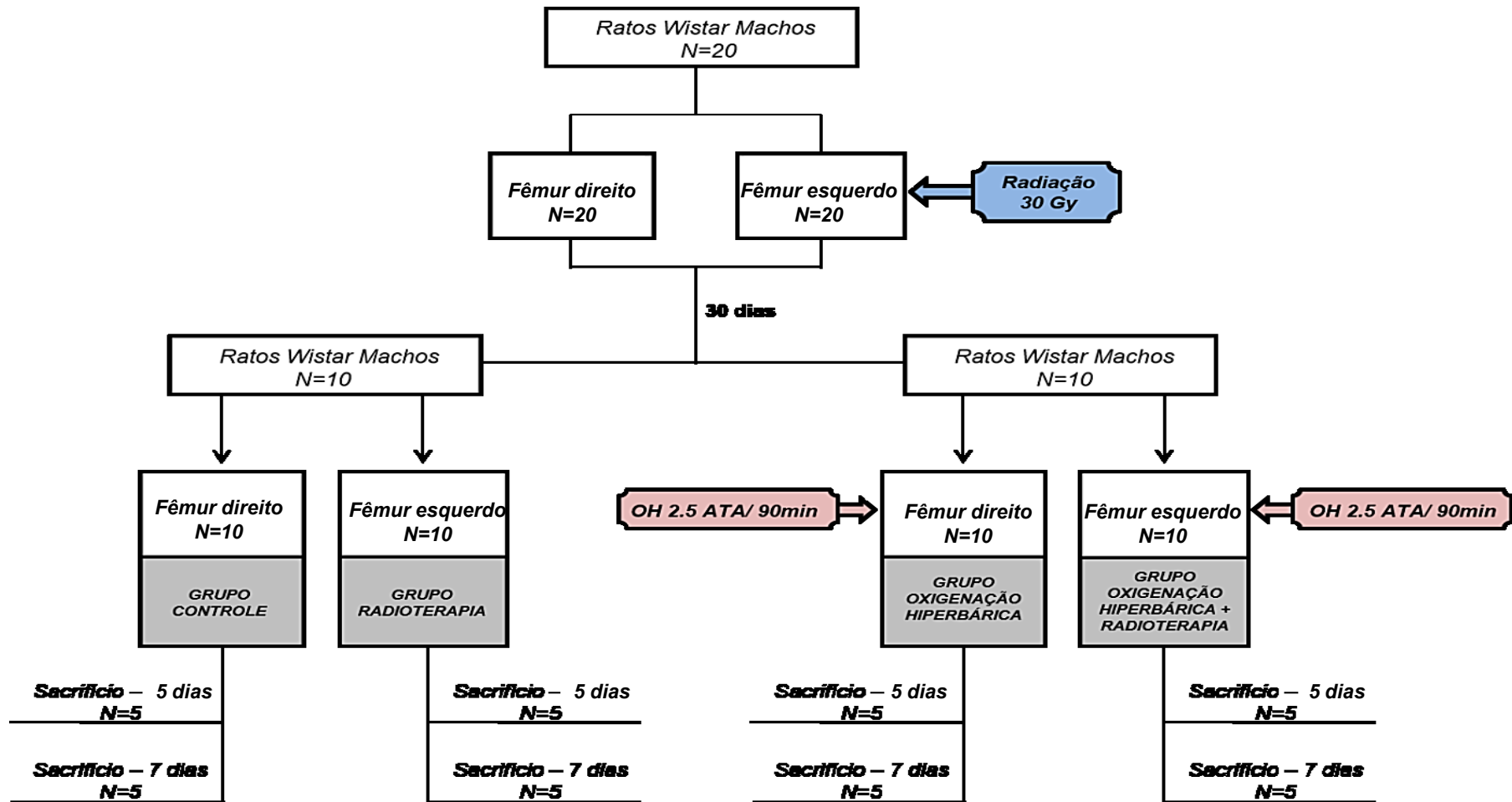
20 ANIMAIS MACHOS

Rattus norvegicus

LINHAGEM – Wistar

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), com aprovação prévia do comitê de ética de utilização de animais com protocolo de registro CEUA/UFU 028/12.







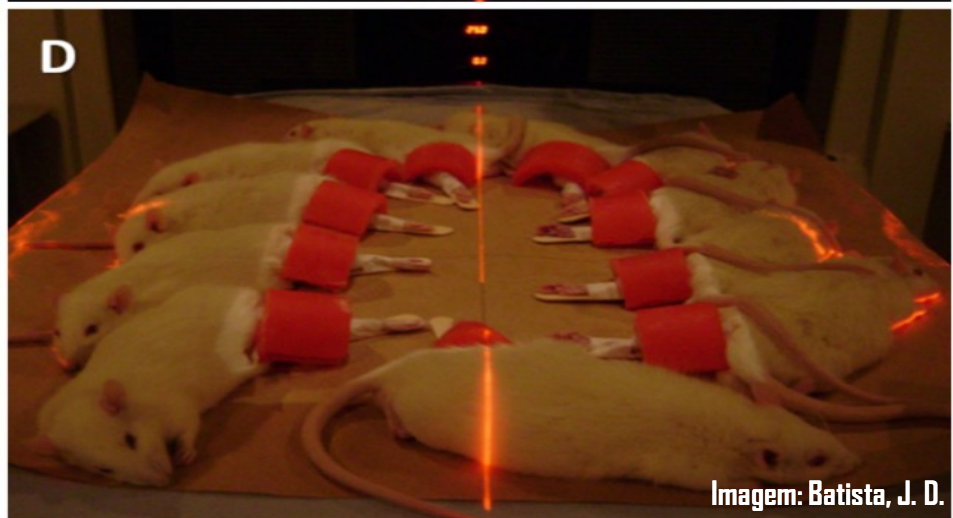
O protocolo de Radioterapia foi realizado de acordo com Batista et al., 2014.



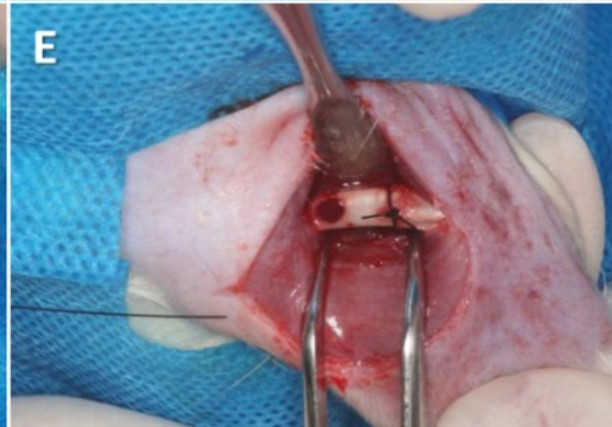
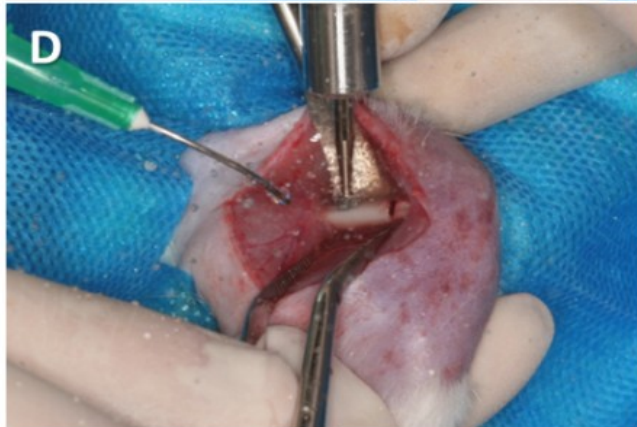
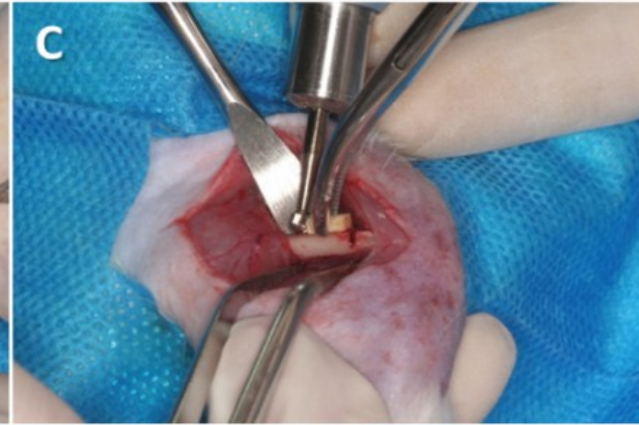
APARELHO: Acelerador Linear de Elétrons de 6MeV.

Dose: única de 30 Gy.

Imagem: Batista, J. D.

A**B****C****D**

PROCEDIMIENTO CIRÚRGICO



OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA

O protocolo de Oxigenação Hiperbárica foi realizado de acordo com Rocha et al., 2015.

Aparelho: Ecobar 400
(Ecotec Equipamentos e Sistemas Ltda®).

Compressão/Descompressão: 0,3ATA/min.

Duração: 90 minutos a 2,5 ATA.

Intervalo entre sessões: 24h.



Imagem: Rocha, F. S.

As sessões foram iniciadas 30 dias após a radioterapia e realizadas diariamente durante 5 ou 7 dias.

OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foi realizada a eutanásia dos animais e os fêmures removidos e processados para inclusão em parafina.



Fêmur desarticulado contendo o defeito ósseo (em vermelho a região onde foi feito o seccionamento)



Segmento do fêmur contendo o defeito ósseo. Utilizado para análise histológica/histomorfométrica e análise das fibras colágenas.

ANÁLISE HISTOLÓGICA

A close-up photograph of several microscope objective lenses. The lenses are metallic and cylindrical, with some having colored rings (blue, red, yellow). They are arranged in a cluster, with one lens in the foreground being the most prominent and in focus.

Análise qualitativa descritiva das lâminas ao microscópio óptico .

3 Lâminas de cada fêmur coradas com hematoxilina e eosina (HE).

ANÁLISE HISTOMORFOMETRICA

Digitalização das lâminas coradas em HE no aumento de 20X, por meio do scanner Aperio AT Turbo.



No software Aperio ImageScope, duas áreas em cada lâmina foram delimitadas, sendo uma da região do defeito ósseo e uma da cortical óssea (à 3mm do defeito)

Análise das imagens das áreas de interesse foi realizada através do programa Image-Pro Plus

CORTICAL ÓSSEA

Áreas basofílicas/amorfas

Vasos sanguíneos

Matriz óssea

Ósteocitos

Lacunas

DEFEITO ÓSSEO

Matriz óssea/ósteocito

Tecido medular

Vasos sanguíneos

Coágulo

Tecido de granulação

Rede de fibrina

Células inflamatórias

Fibroblastos/fibras colágenas

Tecido Adiposo

Osteoblastos

Osteoclastos

ANÁLISE HISTOMORFOMETRICA

**NEOFORMAÇÃO
ÓSSEA**

**3 LÂMINAS DE FÊMUR
CORADAS EM TRICÔMIO
DE MALLORY**

**IMAGENS CAPTURADAS PELO
PROGRAMA MOTIC LIVE IMAGING
MODULE E MICROSCOPIO
BINOCULAR ACOPLADO A CAMERA
MOTICAM PRO LIGADA AO
COMPUTADOR (AUMENTO DE 4X)**

**AS IMAGENS FORAM
REUNIDAS NO SOFTWARE
ADOBE PHOTOSHOP CS2 E
ANALISADAS NO PROGRAMA
HL IMAGE 2005++**

**QUANTIFICAÇÃO DA
MATRIZ OSSEA DA REGIÃO
DO DEFEITO EM
PORCENTAGEM**

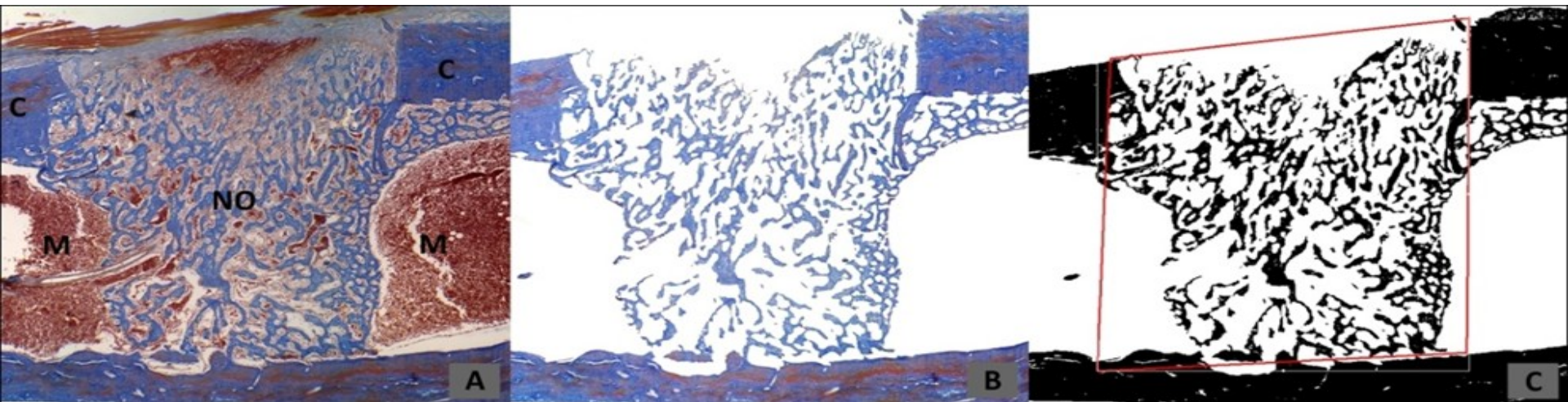


Figura 8: Análise histomorfométrica (Neoformação óssea). A - Fotomicrografia digitalizada de uma secção longitudinal de fêmur mostrando cortical óssea (C), medula óssea (M) e neoformação óssea (NO). B - Imagem após a remoção do tecido mole. C - Imagem binária da mesma fotomicrografia com a delimitação da área total do defeito ósseo (linha vermelha). Ampliação 4X. Tricrômico de Mallory. * Imagens retiradas do artigo de Batista et al., (2014).

ANÁLISE DAS FIBRAS COLÁGENAS

**MICROSCOPIA DE
POLARIZAÇÃO**

**3 LÂMINAS CORADAS EM
PICROSIRIUS RED**

**AS IMAGENS FORAM CAPTURADAS
COM OBJETIVA DE 20X COM O
PROGRAMA OPTICAM E
MICROSCÓPIO BINOCULAR NIKON
ECLIPSE Ti-S ACOPLADO A CÂMERA
OPTICAM POR MEIO DA LUZ
POLARIZADA.**

**FORAM OBTIDAS 2 IMAGENS
DIGITALIZADAS DE CADA
LÂMINA (UMA DO DEFEITO E
UMA DA CORTICAL).**

**ANALISE QUALITATIVA E
MENSURAÇÃO POR
SCORES**

**AVALIAÇÃO DOS
SEGUINTE CRITÉRIOS**


```
graph TD; A[AVALIAÇÃO DOS SEGUINTE CRITÉRIOS] --> B[Predominância de marcação, em porcentagem (%), se verde ou amarelo/laranja/vermelho.]; A --> C[Organização lamelar, em porcentagem (%), se presente ou ausente.]; A --> D[Intensidade do brilho, em porcentagem (%), se fraco/ausente, moderado ou intenso.]; A -.-> D;
```

Predominância de marcação, em porcentagem (%), se verde ou amarelo/laranja/vermelho.

Organização lamelar, em porcentagem (%), se presente ou ausente.

Intensidade do brilho, em porcentagem (%), se fraco/ausente, moderado ou intenso.

ANÁLISE ESTATÍSTICA



OS DADOS OBTIDOS FORAM ANALISADOS COM O PROGRAMA GRAPHPAD PRISM.

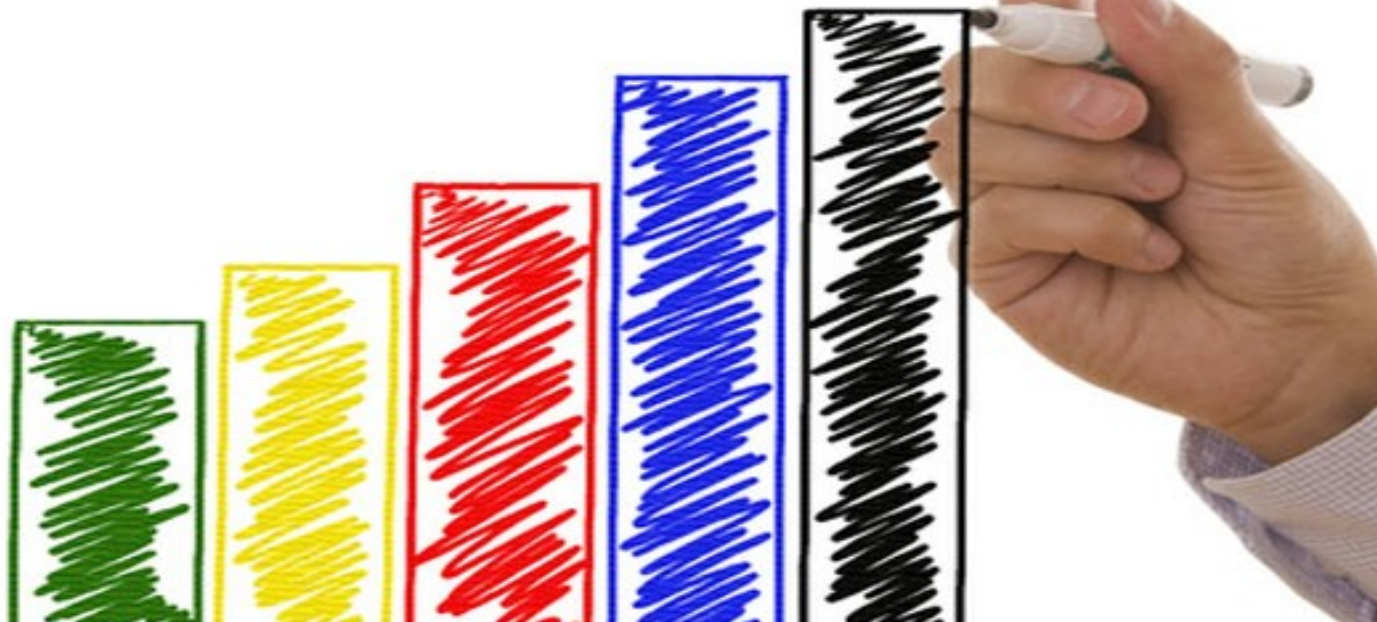
OS VALORES OBTIDOS FORAM SUBMETIDOS AO TESTE DE NORMALIDADE KOLMOGOROV-SMIRNOV.

DEPOIS DE VERIFICADA A DISTRIBUIÇÃO NORMAL, OS PARÂMETROS FORAM ANALISADOS UTILIZANDO OS TESTES T NÃO PAREADO E ANOVA COM CORREÇÃO DE BONFERRONI.

AS DIFERENÇAS FORAM CONSIDERADAS ESTATISTICAMENTE SIGNIFICANTES QUANDO $P < 0,05$.



RESULTADOS



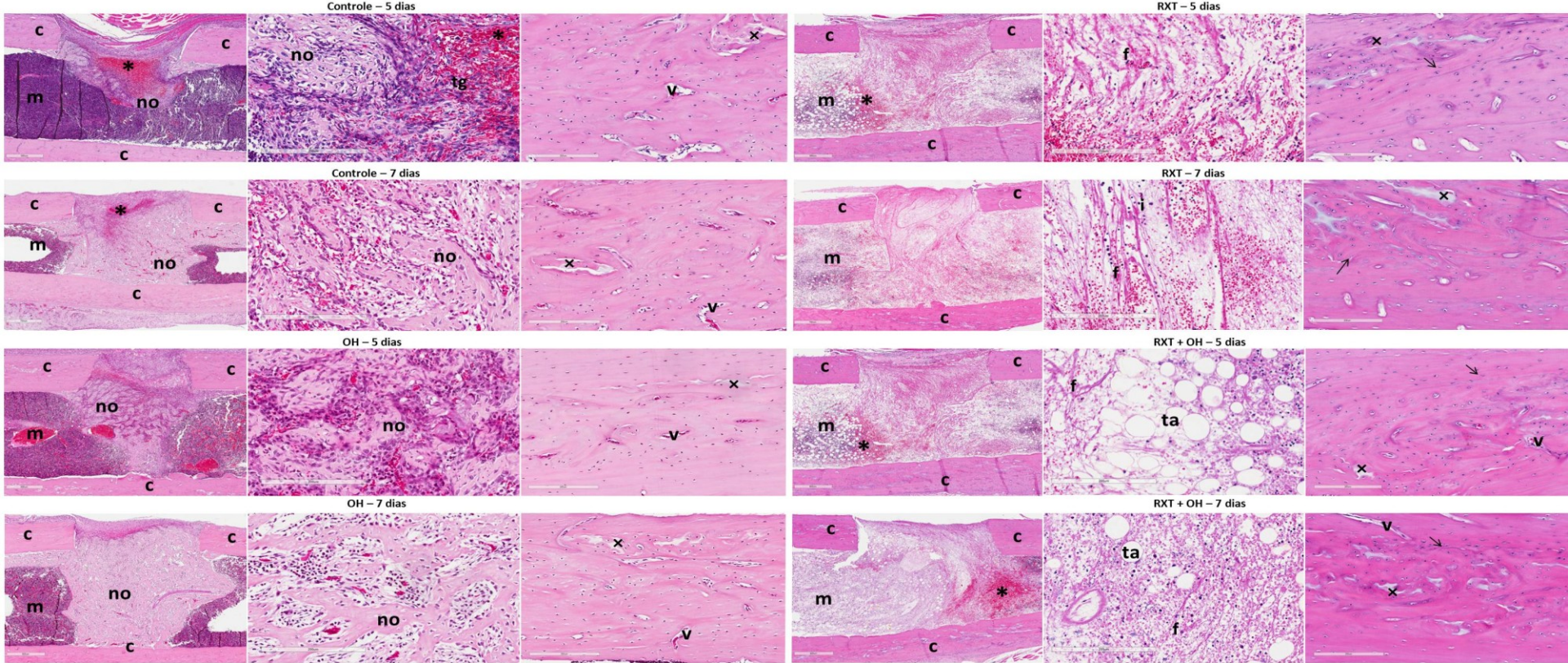


Figura 9: Fotomicrografia digitalizada do defeito ósseo entre os grupos avaliados, nos períodos de 5 e 7 dias. Cortical óssea (c); Medula óssea (m); Neoformação óssea (no); Coágulo (*); Tecido de granulação (tg); Rede de fibrina (f); Infiltrado inflamatório (i); Áreas basofílicas/amorfas (x); Linhas basofílicas (seta preta); Vasos sanguíneos (v); Tecido adiposo (ta). HE, X4 and X20.

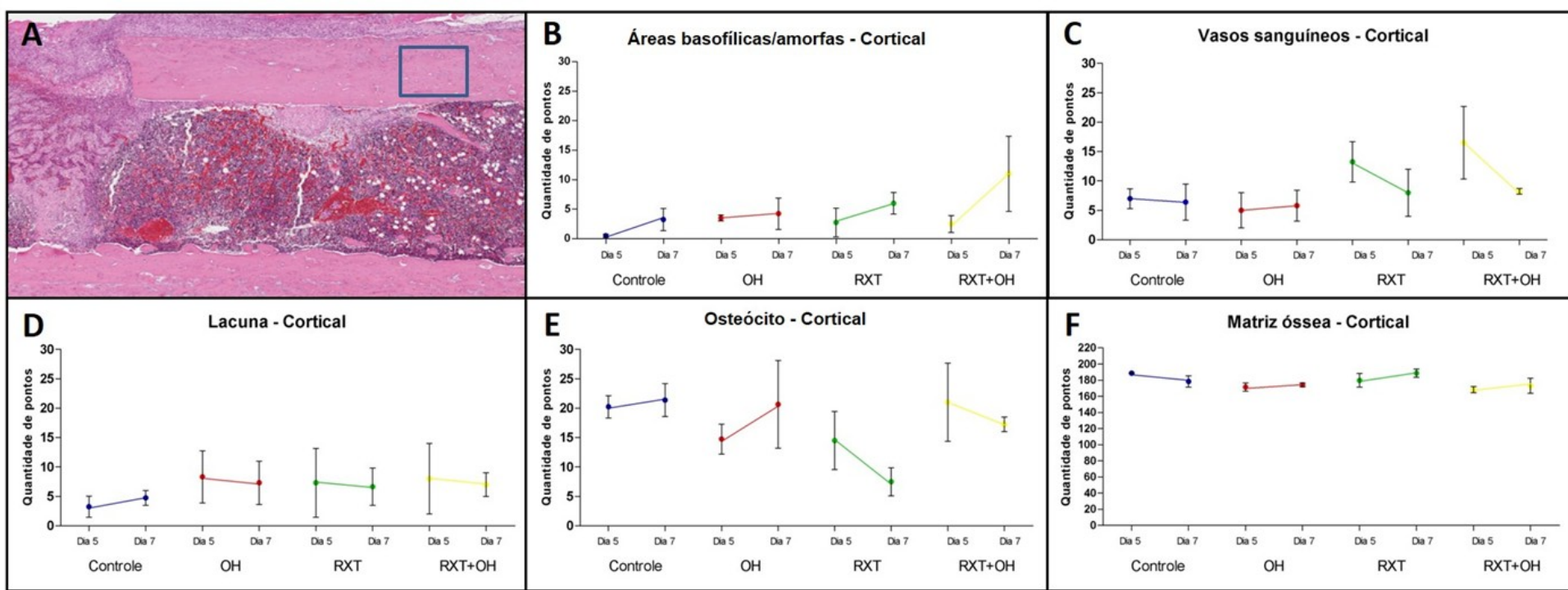


Figura 10: Contagem das estruturas de interesse para a análise histomorfométrica da região cortical entre os grupos avaliados, nos períodos de 5 e 7 dias. A- Fotomicrografia digitalizada evidenciando a área cortical analisada (retângulo azul); B- Análise da presença de Áreas basofílicas/amorfas; C- Análise da presença de vasos sanguíneos; D- Análise da presença de Lacunas; E- Análise da presença de Osteócitos; F- Análise da presença de matriz óssea.

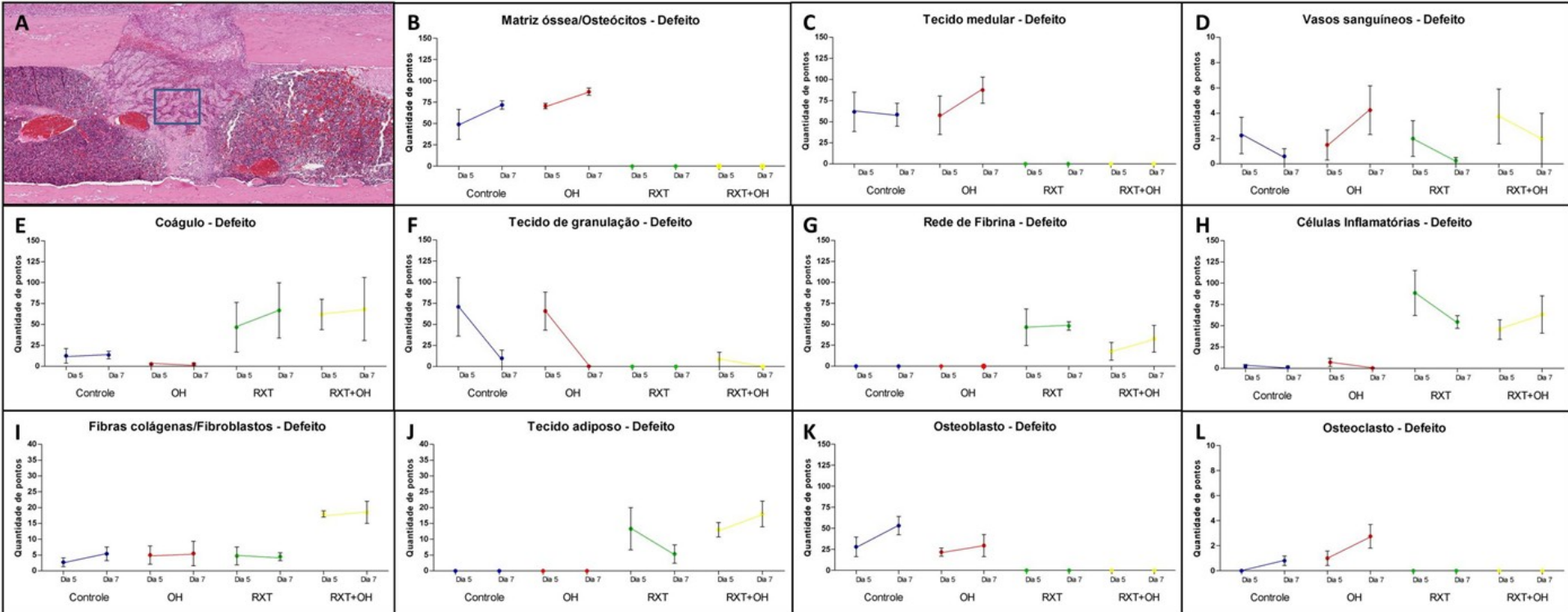


Figura 11: Contagem das estruturas de interesse para a análise histomorfométrica da região do defeito entre os grupos avaliados, nos períodos de 5 e 7 dias. A- Fotomicrografia digitalizada evidenciando a área do defeito ósseo analisada (retângulo azul); B- Análise da presença de Matriz óssea/Osteócitos; C- Tecido Medular entre as trabéculas; D- Vasos sanguíneos; E- Coágulo; F- Tecido de granulação; G- Rede de Fibrina; H- Células inflamatórias; I- Fibroblastos/Fibras colágenas; J- Tecido Adiposo; K- Osteoblastos; L- Osteoclastos.

Defeito Ósseo

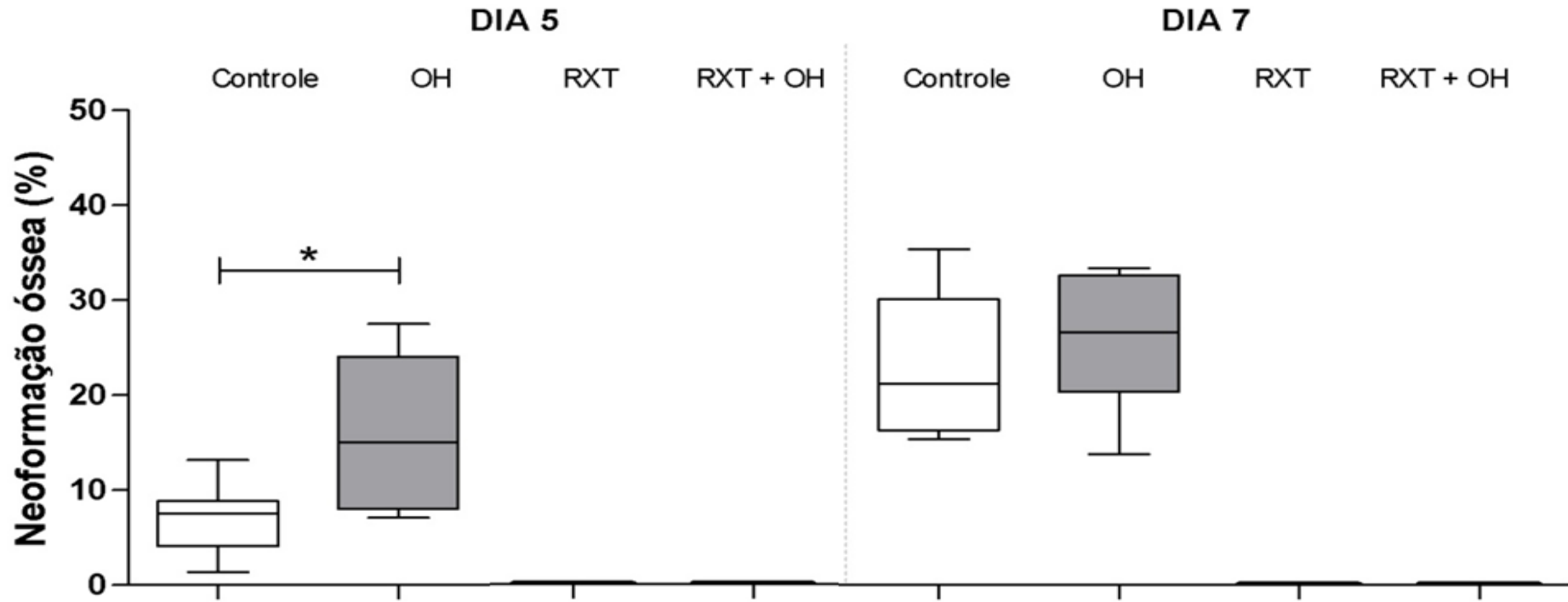


Figura 12: Porcentagem de neoformação óssea na região de interesse (defeito ósseo) grupos avaliados, nos períodos de 5 e 7 dias. (* $p < 0,05$)

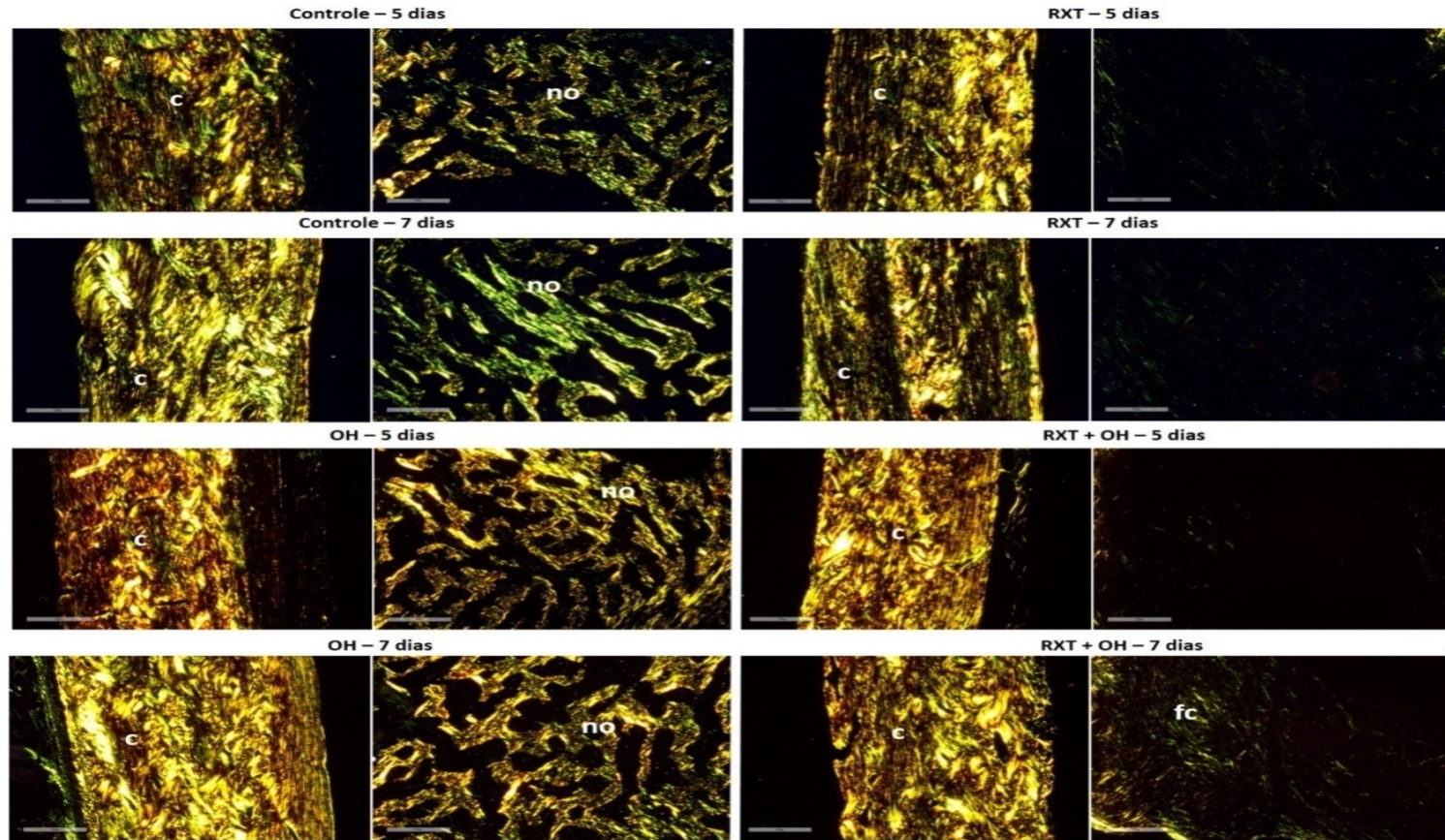


Figura 13: Fotomicrografia digitalizada da região cortical óssea e do defeito ósseo entre os grupos avaliados, nos períodos de 5 e 7 dias, visualizado por microscopia de polarização. Cortical óssea (c); Neoformação óssea (no); Fibras colágenas (fc). Picosirius Red, X20.

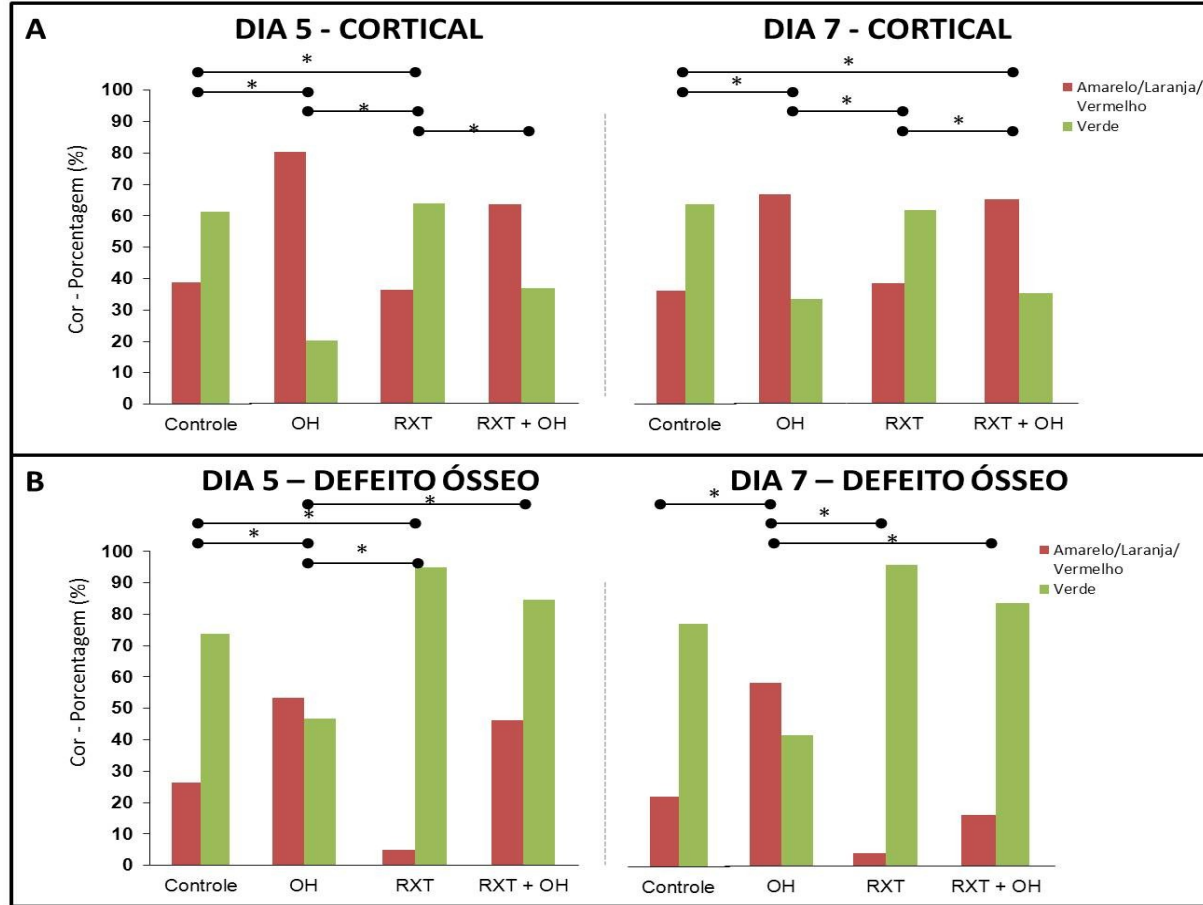


Figura 14: Predominância de marcação, em porcentagem (%), se verde ou amarelo/laranja/vermelho na região cortical (A) e no defeito ósseo (B) entre os grupos avaliados, nos períodos de 5 e 7 dias. (* $p < 0,05$)

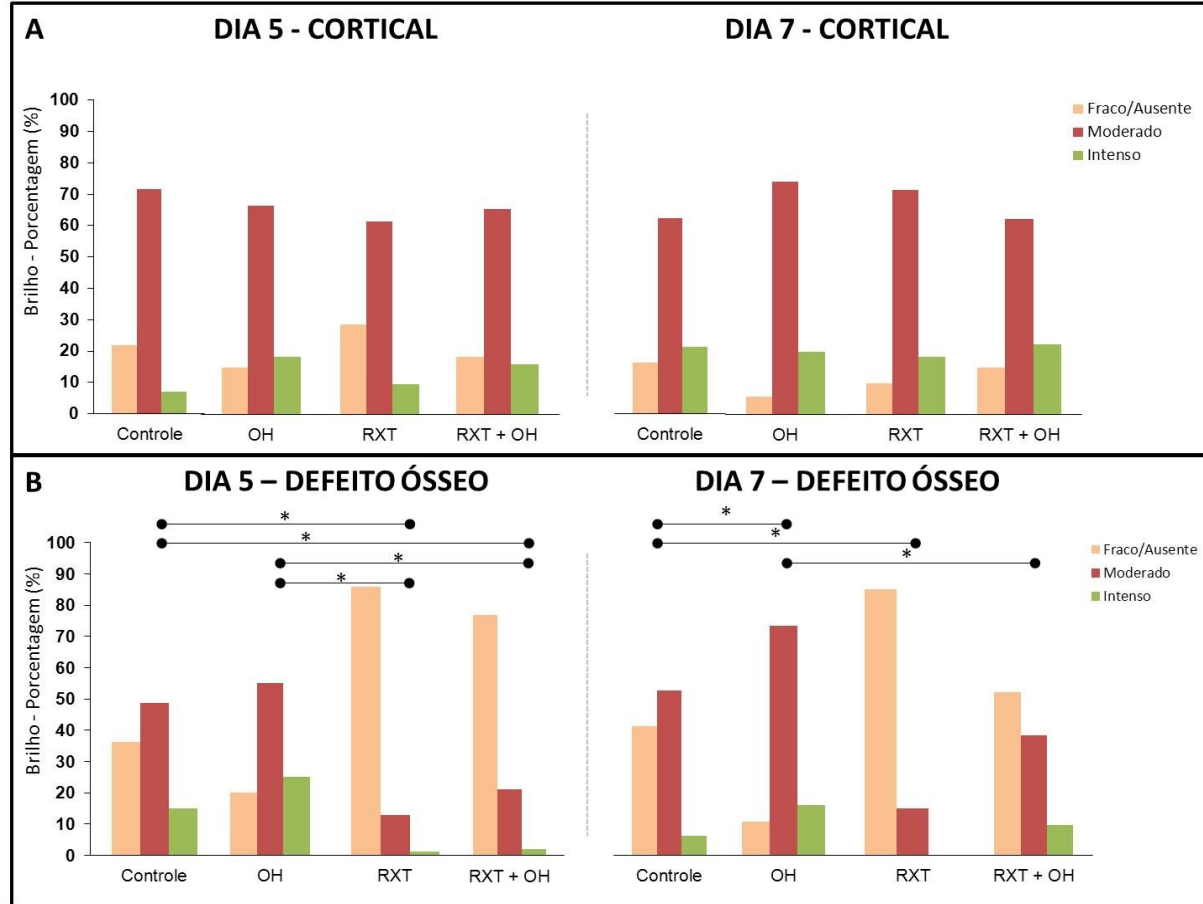


Figura 15: Intensidade do brilho, em porcentagem (%), se fraco/ausente, moderado ou intenso na região cortical (A) e no defeito ósseo (B) entre os grupos avaliados, nos períodos de 5 e 7 dias. (* $p < 0,05$)

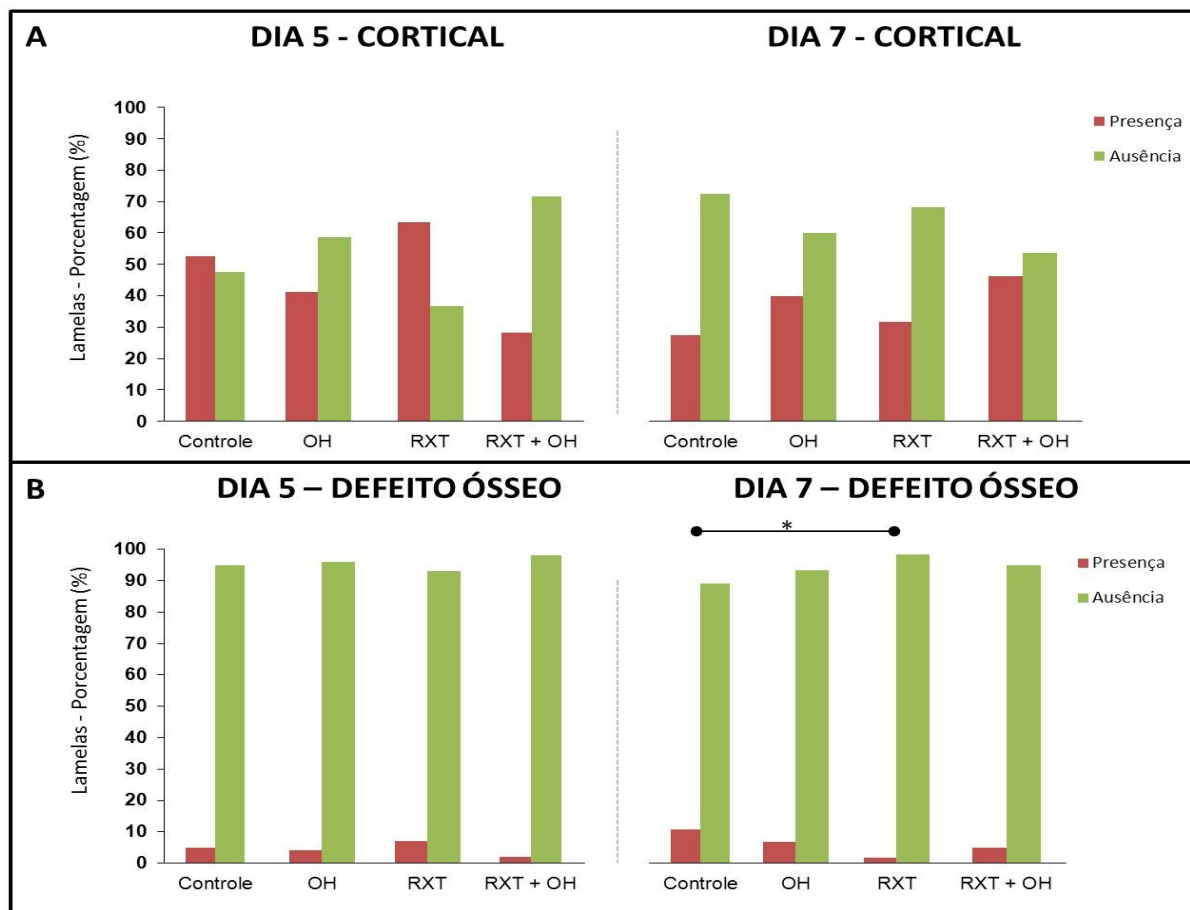


Figura 16: Organização lamelar, em porcentagem (%), se presente ou ausente na região cortical (A) e no defeito ósseo (B) entre os grupos avaliados, nos períodos de 5 e 7 dias. (* $p < 0,05$)

DISCUSSÃO



Uma terapia que aumente o aporte de oxigênio para o local da lesão é bastante interessante, pois aceleraria o reparo e o retorno à função tecidual normal, além de evitar possíveis problemas ao processo natural do reparo (Tandara, 2004).

DISCUSSÃO

NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

DOSE DE RADIAÇÃO

ANGIOGÊNESE

ESTRUTURA ÓSSEA

EXPRESSÃO DO COLÁGENO

MODELO EXPERIMENTAL

DISCUSSÃO

NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

DOSE DE RADIAÇÃO

ANGIOGÊNESE

ESTRUTURA ÓSSEA

EXPRESSÃO DO COLÁGENO

MODELO EXPERIMENTAL

DH **acelerou** os eventos iniciais da reparação óssea na região do defeito. (Rocha et al., 2015).

Maior porcentagem de neoformação óssea no grupo DH.

Benefícios da DH.

Ausência de neoformação óssea nos grupos irradiados.

Tentativa de deposição de colágeno no grupo RXT+DH

DISCUSSÃO

NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

DOSE DE RADIAÇÃO

ANGIOGÊNESE

ESTRUTURA ÓSSEA

EXPRESSÃO DO COLÁGENO

MODELO EXPERIMENTAL

Interferência **negativa** no micro ambiente tecidual.
(Da Cunha et al., 2007; Peliesser et al, 2014).

Dose alta única = **comprometimento** da
capacidade regenerativa, aumento da reabsorção
(Maeda et al, 1988).

Ausência de células

Resposta tardia à radiação, demanda por mais
sessões de OH para recuperação significativa.

DISCUSSÃO

NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

DOSE DE RADIAÇÃO

ANGIOGÊNESE

ESTRUTURA ÓSSEA

EXPRESSÃO DO COLÁGENO

MODELO EXPERIMENTAL

Perturbação do suprimento vascular local leva a hipóxia, se prolongada inibe a proliferação fibroblástica e a síntese de colágeno.

OH provoca a liberação de mediadores que estimulam a síntese de colágeno, angiogênese e a osteogênese

Radiação reduziu o potencial de vascularização dos tecidos, comprometendo o reparo.

DISCUSSÃO

NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

DOSE DE RADIAÇÃO

ANGIOGÊNESE

ESTRUTURA ÓSSEA

EXPRESSÃO DO COLÁGENO

MODELO EXPERIMENTAL

A **angiogênese** é um fator condicionante para o processo de reparo ósseo, pois possibilita a oxigenação local e o transporte de nutrientes, além da liberação de fatores de crescimento (Sirin, 2011). Sendo assim, em defeito ósseo submetido a altas doses de radiação, o dano vascular pode ser tão grande que, **mesmo diante do estímulo da OH**, o organismo ainda não consiga depositar osso, o que pode resultar na formação de tecido fibroso ou mesmo na **ausência de reparo** (Jereczek-Fossa et al., 2002).

Tais informações podem explicar o fato de não terem sido observado nenhuma neoformação óssea nos grupos irradiados, mesmo após OH. Já no grupo OH, que recebeu apenas a terapia hiperbárica, foi observado aumento na contagem dos vasos sanguíneos, o que se refletiu em aceleração do reparo, com aumento da neoformação óssea.

DISCUSSÃO

NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

DOSE DE RADIAÇÃO

ANGIOGÊNESE

ESTRUTURA ÓSSEA

EXPRESSÃO DO COLÁGENO

MODELO EXPERIMENTAL

Alterações importantes, na região cortical, nos animais submetido à radiação: áreas basofílicas/amorfas e uma **desorganização** evidente das lamelas, mesmo após OH

Redução de matriz óssea e modificações na microarquitetura dos canais de Harvers após radioterapia, gerando um osso heterogêneo e menos organizado. (Rabelo et al., 2010).

DISCUSSÃO

NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

DOSE DE RADIAÇÃO

ANGIOGÊNESE

ESTRUTURA ÓSSEA

EXPRESSÃO DO COLÁGENO

MODELO EXPERIMENTAL

A maior quantidade de fibras colágenas tipo I, comum ao tecido ósseo, foi observada no grupo OH, nos períodos de 5 e 7 dias, na área do defeito ósseo e na cortical. Alguns autores afirmam que eventos como a **síntese e organização das fibras de colágeno** e a identificação precoce dos osteoblastos no perióstio, sejam processos **dependentes do aporte de oxigênio** sendo influenciados pelo aumento do transporte de oxigênio em tecidos submetidos à oxigenação hiperbárica. (Hunt, 1988; Sirin, 2011).

A OH altera a expressão do colágeno, bem como sua organização. (Gajendrareddy et al., 2017).

DISCUSSÃO

NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

DOSE DE RADIAÇÃO

ANGIOGÊNESE

ESTRUTURA ÓSSEA

EXPRESSÃO DO COLÁGENO

MODELO EXPERIMENTAL

De acordo com Formenti & Demaria, 2009, a radioterapia também recruta mediadores biológicos fora do campo de tratamento e **teria efeitos sistêmicos**.

Rocha et al., (2017) ao avaliarem se as alterações específicas do reparo ósseo após radioterapia também eram observadas a longa distância da área irradiada, **não observaram diferenças** no processo de reparo ósseo entre os grupos de animais com radiação local e sistêmica, além de animais distintos sem radiação

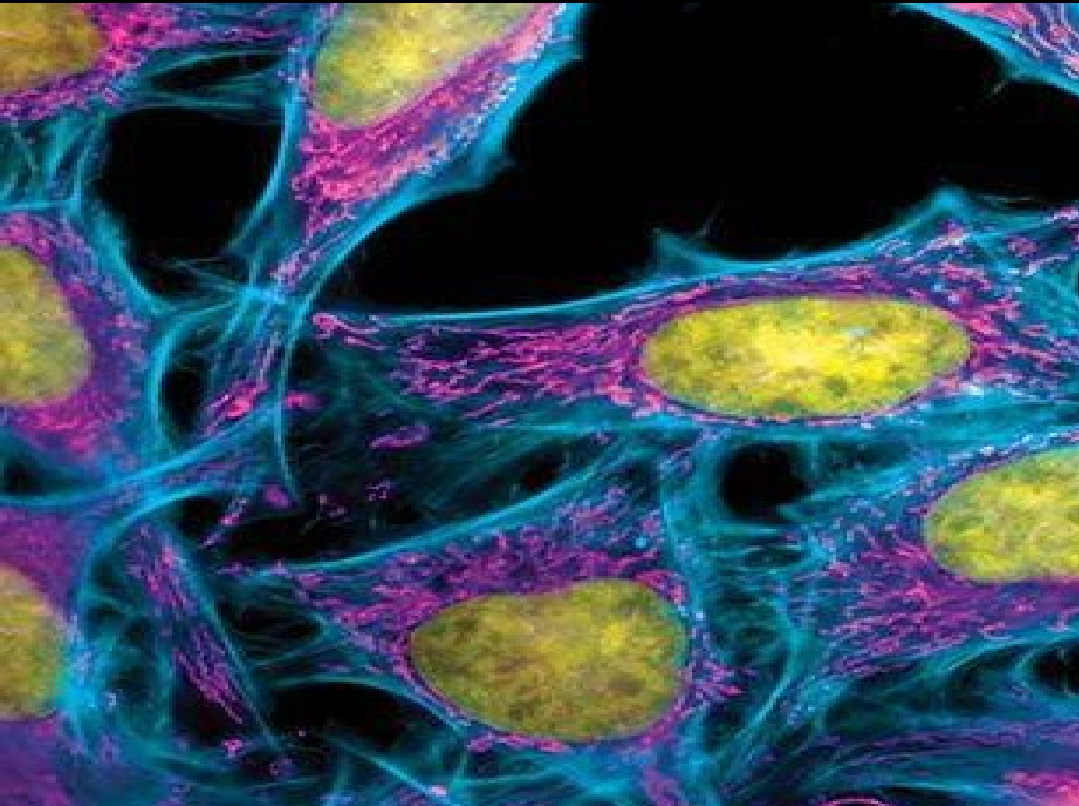
CONCLUSÃO



Os resultados encontrados no grupo OH, demonstram que a oxigenoterapia hiperbárica beneficia o reparo ósseo com o aumento da angiogênese e da neoformação óssea. No entanto, no grupo RXT+OH, a OH não foi capaz de reparar os danos causados pelas altas doses de radiação ionizante no tecido ósseo.

REFERÊNCIAS

- Aghaloo TL, Le AD, Freymiller EG, Avera S, Shimizu K, Nishimura RD. 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*. 2006;21(4):535-42.
- Batista JD. Efeitos da terapia laser de baixa potência sobre o reparo ósseo: avaliação do osso submetido à radioterapia e do efeito sistêmico. [Tese]. Brasil (RS): Pontifícia Universidade Católica – PUCRS; 2011.
- Da Cunha SS, Sarmento VA, Ramalho LMP, Almeida D, Veeck EB, da Costa NP, et al. Effects of laser therapy on bone tissue submitted to radiotherapy: experimental study in rats. *Photomed Laser Surg*. 2007;25(3):197-204 (b).
- 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 (a).
- Feldmeier JJ. Hyperbaric oxygen for delayed radiation injuries. *Undersea Hyperb Med*. 2004 Spring;31(1):133-45.
- Jacobson AS, Buchbinder D, Hu K, Urken ML. Paradigm shifts in the management of osteoradionecrosis of the mandible. *Oral Oncol*. 2010 Nov;46(11):795-801. Epub 2010 Sep 16. Review.
- Junqueira, LCU. & Carneiro J. *Histologia Básica*. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.
- Lehner B, Bauer J, Rödel F, Grabenbauer G, Neukam FW, 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*. 2004 Jul;33(5):486-92
- Liu X, Lyon R, Meier HT, Thometz J, Haworth ST. Effect of lower-level laser therapy on rabbit tibial fracture. *Photomed Laser Surg*. 2007 Dec;25(6):487-94.
- Rocha, FS et al. Influence of hyperbaric oxygen on the initial stages of bone healing. *Oral And Maxillofacial Surgery, Uberlândia*, v. 120, n. 5, p.581-587, nov. 2015.



Universidade Federal de Uberlândia
Faculdade de Odontologia
Unidade de Investigação Científica

Obrigada!



Danyella Carolyna Soares dos Reis
E-mail: danyellacsoares@gmail.com
Contato: (34) 9 9139-2654