



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



DANYELLA CAROLYNA SOARES DOS REIS

**EFEITO DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA NO
REPARO ÓSSEO EM FÊMURES DE RATOS
SUBMETIDOS À RADIAÇÃO IONIZANTE.**

UBERLÂNDIA
2018

DANYELLA CAROLYNA SOARES DOS REIS

**EFEITO DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA NO
REPARO ÓSSEO EM FÊMURES DE RATOS
SUBMETIDOS À RADIAÇÃO IONIZANTE.**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flaviana
Soares Rocha

Co-orientador: Ms. Luiz Henrique
Ferreira Júnior

UBERLÂNDIA
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por tudo que conquistei até aqui, e peço sabedoria para conquistar mais. Em segundo lugar agradeço aos meus pais e minhas irmãs que tornaram essa caminhada mais fácil, sendo meu apoio e sustento.

Ao meu amor Everton, obrigada pelos sermões, pelas palavras fortes e coisas ditas quando eu precisava ouvir. Obrigada pela paciência, pelo companheirismo, pelo incentivo e ainda por me ensinar que às vezes é necessário abdicar algumas coisas, mas que isso não é desistir.

Aos amigos e colegas que conquistei nesses anos de faculdade, obrigada pelos momentos compartilhados, pelos risos e pelas boas lembranças que levarei pra sempre na memória!

Aos professores que participaram da minha formação, agradeço por todo conhecimento transmitido, e tempo dedicado a minha construção profissional.

Por fim, muito obrigada à minha orientadora Prof. Dr^a Flaviana Soares Rocha, pela oportunidade de participar deste trabalho, pelo carinho e apoio, e pela atenção, paciência e confiança depositada em mim. E ao meu co-orientador, Luiz Henrique Ferreira Junior obrigado pela amizade, pelos conselhos e pelo apoio.

Obrigada!

RESUMO

A oxigenação hiperbárica (OH) tem mostrado efeitos positivos no reparo ósseo com aumento da osteogênese e angiogênese. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da oxigenação hiperbárica no reparo de osso submetido à radiação ionizante, por meio de parâmetros histológicos, histomorfométricos e microscopia de polarização. Neste estudo foram utilizados 20 ratos machos, e os fêmures dos animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: Controle, Radioterapia, Oxigenação Hiperbárica e Radioterapia com Oxigenação Hiperbárica. Inicialmente, em todos os animais foi realizada radioterapia no fêmur esquerdo e, após 30 dias, foram criados defeitos ósseos em ambos os fêmures. Posteriormente, em 10 animais, foram realizadas sessões de oxigenação hiperbárica logo após o procedimento cirúrgico. O período de sacrifício foi de 5 ou 7 dias após a confecção do defeito ósseo e início da terapia. Após a remoção os fêmures foram processados para inclusão em parafina. Para a análise histomorfométrica, as lâminas histológicas coradas em HE foram escaneadas e, com o programa Image-Pro Plus Version 4.5, foi realizada a contagem das estruturas de interesse em uma grade de 220 pontos. A neoformação óssea foi quantificada nas lâminas coradas em Tricrômio de Mallory, na região do defeito ósseo, utilizando o programa HL Image 2005. Para avaliação das fibras colágenas, nas lâminas coradas em Picrosirius Red foi realizada uma análise qualitativa, mensurada por scores (em porcentagens), analisando intensidade do brilho, predominância de marcação e organização lamelar. Os dados foram analisados com os testes Kolmogorov-Smirnov, teste t não pareado e ANOVA com correção de Bonferroni. De modo geral, as maiores diferenças ocorreram na região do defeito ósseo, em detrimento da cortical óssea. Os resultados encontrados indicaram que a OH favorece o reparo ósseo. Entretanto, neste modelo experimental, a OH não foi suficiente para compensar os prejuízos causados por altas doses de radiação ionizante no osso.

PALAVRAS-CHAVE: reparo ósseo, radioterapia, oxigenação hiperbárica.

ABSTRACT

Hyperbaric oxygenation (OH) has shown positive effects on bone repair with increased osteogenesis and angiogenesis. The present study aimed to evaluate the effect of hyperbaric oxygenation on the repair of bone submitted to ionizing radiation, through histological and histomorphometric parameters and polarization microscopy. In this study 20 male rats were used, and the femurs of the animals were randomly assigned to four groups: Control, Radiotherapy, Hyperbaric Oxygenation and Radiotherapy with Hyperbaric Oxygenation. Initially, all the animals had radiotherapy in the left femur and, after 30 days, bone defects were created in both femurs. Subsequently, in 10 animals, hyperbaric oxygenation sessions were performed soon after the surgical procedure. The sacrifice period was 5 or 7 days after confection of the bone defect and initiation of therapy. After removal, the femurs were processed for inclusion in paraffin. For the histomorphometric analysis, the histological slides stained in HE were scanned and, with the Image-Pro Plus Version 4.5 program, the structures of interest were counted in a grid of 220 points. Bone neoformation was quantified in the Mallory trichrome slides in the region of the bone defect using the HL Image 2005 program. A qualitative analysis was performed for the evaluation of the collagen fibers in the slides stained in Picosirius Red, analyzing the brightness intensity, marking predominance and lamellar organization. Data were analyzed with the Kolmogorov-Smirnov tests, unpaired t-test and ANOVA with Bonferroni correction. In general, the greatest differences occurred in the region of the bone defect, in detriment of the cortical bone. The results indicated that OH favors bone repair. However, in this experimental model OH was not sufficient to compensate for the damages caused by high doses of ionizing radiation in the bone.

KEY-WORDS: bone repair, radiotherapy, hyperbaric oxygen therapy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATA - Pressão Atmosférica Absoluta

OH - Oxigenação Hiperbárica

C - Controle

RXT - Radioterapia

Gy - Gray

mm - Milímetros

cm - Centímetros

g - Gramas

Mg- Miligramas

Min - Minutos

Rpm- Rotações por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	PROPOSIÇÃO	12
3	METODOLOGIA.....	13
	3.1. <i>Caracterização da amostra</i>	13
	3.2. <i>Radioterapia</i>	14
	3.3. <i>Procedimento cirúrgico</i>	15
	3.4. <i>Oxigenação Hiperbárica</i>	16
	3.5. <i>Obtenção das amostras</i>	17
	3.7. <i>Análise histológica e histomorfométrica</i>	18
	3.8. <i>Análise das fibras colágenas - Microscopia de Polarização</i>	21
	3.9. <i>Análise estatística</i>	22
4	RESULTADOS.....	23
	4.2. <i>Análise histológica e histomorfométrica</i>	23
	4.3. <i>Análise das fibras colágenas</i>	29
5	DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO.....	39
	REFERÊNCIAS	40
	ANEXOS	45

1 – INTRODUÇÃO

Classificado como um tipo especializado de tecido conjuntivo, por possuir matriz extracelular mineralizada, o tecido ósseo desempenha funções de sustentação, proteção, auxílio na locomoção, além de participar do metabolismo, funcionando como depósito de íons cálcio e fosfato. Suas células são representadas pelos osteoblastos, responsáveis por sintetizar a matriz orgânica e controlar seu processo de mineralização, pelos osteócitos, responsáveis pela manutenção e renovação da matriz, e pelos osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea no processo de remodelação; juntas elas desempenham funções de manutenção, renovação, formação, reabsorção e reparo ósseo frente a injúrias, o que confere ao tecido ósseo um dinamismo capaz de atender as demandas funcionais do organismo.

Quando o tecido ósseo é injuriado, e seu arranjo é desestruturado, ocorre extravasamento de sangue para os tecidos no local da lesão, e a formação de um coágulo (Junqueira e Carneiro, 2008; Schindeler et al., 2008), um espaço hipóxico ($PO_2 = 5$ a 10 mm Hg) e acidótico (pH 4 a 6) constituído de eritrócitos, fibrina e plaquetas (Lynch et al., 1999). A partir disto inicia-se uma cascata de eventos celulares e extracelulares que culminarão no reparo ósseo, e no restabelecimento da homeostasia local.

Para que se inicie o reparo, é necessária a limpeza da área lesada. Para tanto, ocorre indução de uma resposta imune provocada por citocinas e fatores de crescimento (PDGF, TGF- β , IL-1, IL-6, TNF- α) secretados pelas plaquetas presentes no coágulo e células inflamatórias do local, promovendo migração, proliferação, quimiotaxia e ativação de células inflamatórias agudas, principalmente macrófagos que irão remover os restos de células e de matriz do local (Dimitriou et al, 2005; Junqueira & Carneiro, 2008; Schindeler et al, 2008). Continuamente, há uma resposta proliferativa intensa do periósteo e do endósteo, promovendo a neoformação de tecido conjuntivo rico em células osteogênicas, que migram em direção ao coágulo. Ocorre também formação de novos capilares sanguíneos originados de células endoteliais, que suprimirão a deficiência de oxigênio devido à hipóxia local (Vieira, 2013), uma vez que o fluxo sanguíneo adequado com o aumento das tensões de oxigênio para a área da lesão é crítico para o reparo, e

necessário para a diferenciação dos osteoblastos (Dimitriou et al, 2005; Schindeler et al., 2008). O calo macio formado primariamente por tecido conjuntivo sofre maturação com o aumento de fibras colágenas, diminuição de células e vasos sanguíneos. Paralelamente, há um aumento gradativo de osteoblastos e matriz óssea com formação de tecido ósseo imaturo, caracterizando o calo duro, seguido pelo surgimento dos osteoclastos. (Vieira, 2013; Junqueira & Carneiro, 2008). O processo de reparo continua e com a remodelação óssea as trabéculas são formadas e se tornam funcionais, levando a formação de um osso maduro (Amadei et al., 2006).

O reparo ósseo é influenciado por vários fatores tais como o tipo de osso (cortical ou trabecular), local e severidade da lesão, presença de infecção, tipo de fixação durante o reparo, idade, estado de saúde geral e nutricional dos indivíduos levando em consideração fatores de crescimento, hormônios e nutrientes, pH, tensão de oxigênio, ambiente elétrico e estabilidade mecânica obtida na fratura. Alguns tratamentos, como a radioterapia, também podem comprometer o tecido ósseo, limitando as possibilidades futuras de reparo (Batista et al., 2014).

A radioterapia objetiva destruir células tumorais a partir da aplicação de uma dose de radiação ionizante a um volume de tecido que engloba um tumor, com o menor prejuízo às células sadias circunvizinhas (Rabelo et al., 2010); é uma modalidade de tratamento amplamente utilizada para malignidades de cabeça e pescoço, e estima-se que metade dos pacientes diagnosticados com câncer é submetida a este tipo de terapia, seja de forma isolada ou associada a outras (Da Cunha et al., 2007a).

O comportamento dos tecidos frente à radiação está relacionado à capacidade das próprias células em reparar as lesões radioinduzidas. No osso irradiado pode ser observado precocemente o desequilíbrio da atividade osteoblástica e osteoclástica, com favorecimento à reabsorção óssea (Maeda et al., 1988; Da Cunha et al., 2007; Peliesser et al., 2014), além de aumento da lise celular (Da Cunha et al., 2007) e redução da resistência biomecânica do osso (Maeda et al., 1988). No entanto, alterações significativas na matriz óssea após a irradiação são desenvolvidas lentamente, após dano celular. Com isso, o processo de formação da matriz óssea é paralisado, o que pode, com o tempo, levar a fraturas ósseas espontâneas e à osteorradionecrose.

Alguns estudos relataram o aumento de lacunas de osteócito vazias (Peliesser et al., 2014), redução da quantidade de osteócitos (Maeda et al., 1988), diminuição dos vasos sanguíneos (Handschel et al., 2001), redução da quantidade de matriz óssea e alteração da microestrutura da rede de canais ósseos, tornando-a mais heterogênea e menos organizada (Rabelo et al, 2010). Dessa forma, a osteogênese e a neovascularização (Muhonen et al, 2004; Schultze-Mosgau et al., 2005) também ficam reduzidos após radioterapia.

A complexidade das mudanças no metabolismo ósseo pós-irradiação ainda é amplamente estudada (Rabelo et al, 2010), bem como formas de minimizar esses efeitos e otimizar o reparo pós-radioterapia. Algumas terapias podem ser associadas para favorecer o sucesso do reparo ósseo, tais como: utilização de enxertos ósseos (Rocha et al., 2011; Betoni-Junior et al., 2013), concentrado de plaquetas (Neves et al, 2013), laserterapia (Merli et al., 2005), terapia genética com o fornecimento de fatores de crescimento capazes de estimular osteogênese e angiogênese (Dimitriou et al, 2005), oxigenação hiperbárica (Neves et al, 2013), entre outros.

A oxigenação hiperbárica (OH) é um tratamento que tem mostrado efeitos positivos no processo de reparo ósseo, bem como na prevenção ou tratamento de necrose tecidual (Kurklu et al, 2012; Kawada et al, 2013; Neves et al, 2013), sendo uma terapia segura. Esse tratamento consiste na inalação de 100% de oxigênio a uma pressão elevada que varia de 1,5 a 3 atmosferas absolutas. Acredita-se que o aumento da quantidade de oxigênio no sangue, forneceria um maior aporte de oxigênio para o local da ferida, estimulando a angiogênese (Jan, 2006; Fok, 2008). Assim, a oxigenação hiperbárica também aumentaria a tolerância do tecido às condições isquêmicas (Salgado, 2009). A alta tensão de oxigênio também tem efeitos bactericida e bacteriostático, além de potencializar a capacidade fagocitária de leucócitos, favorecer a diferenciação de fibroblastos e a síntese de colágeno.

O tecido ósseo particularmente pode se beneficiar da OH, a hiperóxia como ocorre na terapia hiperbárica, aumenta a quantidade de oxigênio dissolvido no plasma sanguíneo e esta condição interfere positivamente no metabolismo tecidual. Estudos experimentais têm relatado que a oxigenoterapia aumenta a formação óssea e a taxa de deposição mineral, favorecendo o reparo de fraturas, provavelmente, devido ao aumento do anabolismo ósseo (Hsieh et al, 2010; Kawada et al, 2013). Além disso, a literatura tem indicado que a OH aumenta a osteogênese

e angiogênese (Salgado, 2009; Muhonen, 2004), melhora a formação e maturação óssea (Johnsson et al., 1999), sendo também um potente coadjuvante no tratamento da osteomielite (Mader, 1978; Mader, 1990; Yildiz, 2004). A OH também tem sido proposta para minimizar os riscos de osteorradionecrose em procedimentos cirúrgicos que envolvam manipulação de osso submetido à radioterapia.

2 – PROPOSIÇÃO

Avaliar, em modelo experimental em ratos, por meio de parâmetros histológicos, histomorfométricos e microscopia de polarização, as alterações do osso previamente submetido à radiação ionizante, e tratado com oxigenação hiperbárica.

3 – METODOLOGIA

3.1. Caracterização da amostra

Neste estudo foram utilizados 20 ratos machos *Rattus norvegicus*, da linhagem *Wistar*, clinicamente sadios com peso entre 250 a 350g. 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 da Lei nº 11.794, decreto nº 6.899 e demais legislações complementares do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), com aprovação prévia do Comitê de ética da UFU (CEUA-UFU) com Parecer nº028/12.

Os fêmures dos animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos distintos (Controle: C, Radioterapia: RXT, Oxigenação Hiperbárica: OH e Radioterapia com Oxigenação Hiperbárica: RXT+OH) de acordo com o Quadro 1. Inicialmente, em todos os animais, foi realizada radioterapia no fêmur esquerdo e após 30 dias, foram criados defeitos ósseos em ambos os fêmures. Posteriormente foram realizadas diariamente sessões de oxigenação hiperbárica e o período de sacrifício foi de 5 ou 7 dias após a confecção do defeito ósseo e início da terapia.

Quadro 1: Distribuição dos animais nos grupos avaliados.

Grupos	CONTROLE	RADIOTERAPIA	OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA	RADIOTERAPIA COM OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA
PERÍODO DE SACRIFÍCIO				
5 DIAS	Fêmur Direito (n=5)	Fêmur esquerdo (n=5)	Fêmur Direito (n=5)	Fêmur esquerdo (n=5)
7 DIAS	Fêmur Direito (n=5)	Fêmur esquerdo (n=5)	Fêmur Direito (n=5)	Fêmur esquerdo (n=5)
TOTAL	n=10		N=10	

3.2. Radioterapia

O protocolo de radioterapia de Da Cunha et al. (2007) e Lerouxel et al. / (2009) foi realizado conforme descrito a seguir. Previamente à radioterapia, os animais foram submetidos à anestesia geral por injeção intraperitoneal de 0,025 ml/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). Em cada animal, a perna esquerda foi estendida lateralmente e fixada em uma posição pré-determinada com espátula de madeira e fita adesiva (*Scotch*®, 3M do Brasil, São Paulo-SP/Brasil); sobre ela foi colocada uma camada de 1,5cm de cera utilidade (bolus de cera). Uma área de aproximadamente 4 centímetros de extensão da perna esquerda do animal recebeu dose única de 30Gray de radiação ionizante, utilizando o aparelho Acelerador Linear de Elétrons de 6MeV (Varian 600-C®, Varian Medical Systems Inc. Palo Alto, Califórnia/EUA) (Figura 1). Todas as medidas de segurança foram adotadas e o feixe de radiação foi colimado, limitando a área irradiada.

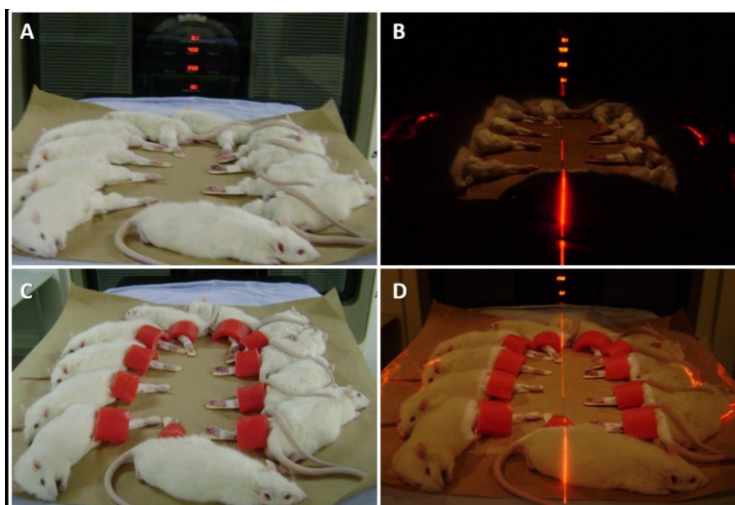


Figura 1: A- Imagem representativa do posicionamento dos animais para radioterapia após estabilização da perna esquerda com espátula de madeira e fita adesiva; B- Determinação do campo de radiação (corresponde à área iluminada); C- Cera posicionada sobre a perna esquerda do animal; D- Posicionamento final para realização da radioterapia. * Imagens gentilmente cedidas por Jonas Dantas Batista (2014).

3.3. Procedimento cirúrgico

Os animais foram submetidos à cirurgia para confecção das lesões em osso, 30 dias após a radioterapia, de maneira similar ao estudo de Batista et al. (2014). Previamente ao ato cirúrgico, os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal, contendo 0,025 ml/100g de peso corpóreo do animal de cloridrato de xilazina 2% e 0,1 ml/100g de peso corpóreo do animal de cloridrato de quetamina 10%. Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia da região coxofemoral. Logo após, foi realizada a antisepsia da região com solução de álcool iodado 0,5% (Rioquímica®, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil). A área operatória foi limitada com campo cirúrgico fenestrado de tecido esterilizado, adaptado para o procedimento.

Com o animal posicionado em decúbito lateral, o acesso cirúrgico à região do fêmur foi obtido por meio de uma incisão contínua longitudinal com 2 cm de extensão, na pele e tecido subcutâneo, utilizando-se lâmina nº 15 montada em cabo para bisturi nº3. Após a incisão da fáscia muscular, a musculatura da região foi divulsionada, até a exposição do perióstio, que foi incisado e descolado ao longo da área óssea a ser exposta, permitindo, assim, acesso à diáfise do fêmur. O fêmur foi então delimitado em três porções (superior, mediana e inferior), com o objetivo de padronizar a área a ser manipulada, sendo a região mediana, o local de eleição para a realização do experimento. Na porção superior da face lateral do fêmur, próximo à junção coxofemoral, foi realizada uma marca no osso com broca 702 em baixa rotação sob irrigação abundante com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9%. Nesta marca foi colocada uma amarilha com fio cirúrgico monofilamento de nylon 4-0 para auxiliar posteriormente a localização do defeito ósseo no momento do sacrifício e coleta das amostras. A uma distância de 5 mm desta marca, foi realizado o defeito ósseo com uma broca esférica nº 08 em baixa rotação sob irrigação abundante com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9%. Foi utilizado como parâmetro da profundidade da perfuração o rompimento da cortical óssea. A sutura foi realizada por planos com fio cirúrgico monofilamento de nylon 4-0 (Figura 2).

No período pós-operatório foi administrado paracetamol em gotas para analgesia (10 gotas em 20 ml de água), durante quatro dias. Imediatamente após o procedimento cirúrgico, foram iniciadas as sessões de oxigenação hiperbárica nos grupos Oxigenação Hiperbárica e Radioterapia com Oxigenação Hiperbárica.

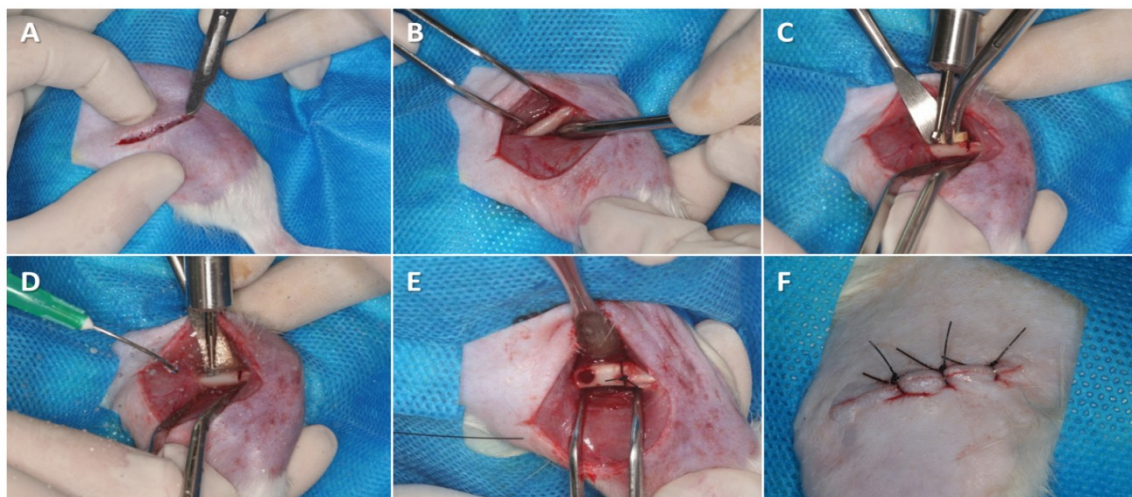


Figura 2: Etapas cirúrgicas para confecção do defeito ósseo; A- Incisão em pele; B- Exposição da área do fêmur; C- Demarcação da distância de 5mm entre a marca feita com broca 702 e o defeito ósseo; D- Perfuração do defeito ósseo com broca esférica; E- Defeito ósseo e amarelinha de referência; F- Sutura. * Imagens gentilmente cedidas por Jonas Dantas Batista (2014).

3.4. Oxigenação Hiperbárica

Os animais receberam sessões de OH no interior de câmaras “monoplaces” experimentais Ecobar 400 (Ecotec Equipamentos e Sistemas Ltda®, Mogi das Cruzes, SP, Brasil). Em cada sessão, inicialmente houve um período de compressão à uma velocidade de 0,3ATA/min até atingir a pressão necessária para OH. A sessão teve duração de 90 minutos sob pressão de 2,5 ATA (ATA = 1 atmosfera absoluta = 760mmHg). Após, há um período de descompressão a uma velocidade de 0,3ATA/min até o retorno à pressão ambiente. As sessões foram iniciadas logo após finalização do procedimento cirúrgico e realizadas diariamente durante 5 ou 7 dias, conforme o subgrupo ao qual pertence o animal.

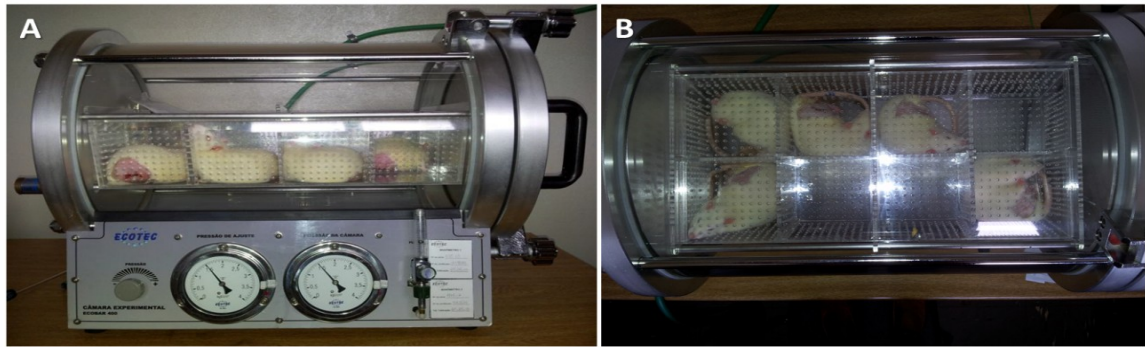


Figura 3: Animais posicionados no interior da câmara hiperbárica para sessões de OH. A- Vista frontal; B- Vista superior. * Imagens gentilmente cedidas por Flaviana Soares Rocha (2015).

3.5. Obtenção das amostras

Os animais foram submetidos à eutanásia 5 ou 7 dias após a cirurgia/OH, por aprofundamento anestésico seguido por 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. Foi realizada uma incisão longitudinal acompanhando a cicatriz cutânea existente, ao longo dos fêmures operados. Os fêmures foram removidos por desarticulação e seccionados utilizando brocas 702 em alta rotação, sob irrigação abundante com solução fisiológica estéril de cloreto de sódio a 0,9% (Figura 4).

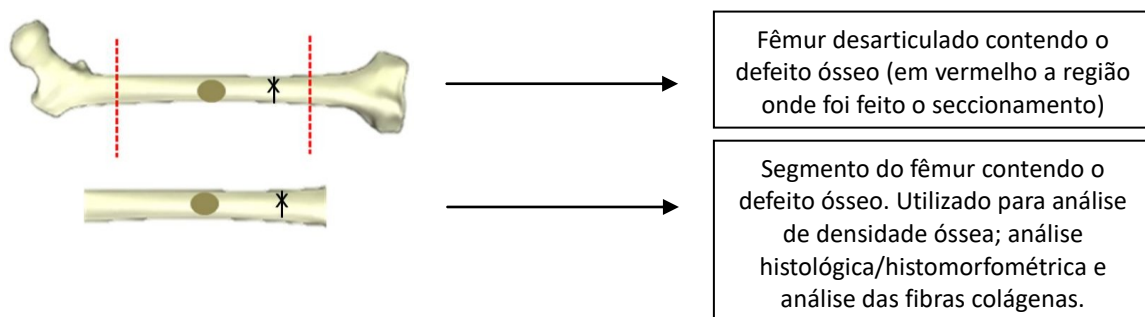


Figura 4: Esquema demonstrando a posição do seccionamento do fêmur.

Os fragmentos ósseos contendo o defeito ósseo foram fixados em paraformaldeído 4% em Tampão Fosfato 0,1M por 48 horas.

3.7. Análise histológica e histomorfométrica

Os fragmentos ósseos foram desmineralizados com solução de Ácido Etildiaminotetracético (EDTA) a 10% pH 7,4, e então processados para inclusão em parafina pela técnica convencional. O estudo morfológico das lâminas foi realizado com o emprego da microscopia óptica (Microscópio óptico modelo *BX50 Olympus®*, Olympus Imaging America Inc. Shinjuku-ku, Tóquio/Japão), visando análise qualitativa descritiva das lâminas histológicas. Para isso foram selecionadas 3 lâminas de cada fêmur coradas em Hematoxilina e Eosina (HE).

Para a análise histomorfométrica, as lâminas histológicas coradas em HE foram escaneadas utilizando o scanner digital Aperio AT Turbo (Copyright© 2013 Leica Biosystems Imaging, Inc All Rights Reserved) no aumento de 20x. As imagens histológicas digitalizadas foram visualizadas utilizando o programa de leitura de imagens Aperio ImageScope (Copyright© Aperio Technologiches, Inc 2003-2014. All rights reserved). Ainda no software Aperio ImageScope, foram delimitadas duas áreas em cada lâmina, sendo uma da região do defeito ósseo e outra da cortical óssea (a uma distância de 3 milímetros a partir da margem do defeito), com a ferramenta “Rectangle Tool”. Em seguida, extraiu-se de cada região delimitada uma imagem em formato TIFF com a ferramenta “Extract Image Region”, de forma a possibilitar a análise em outros softwares (Figura 6).

Cada imagem foi analisada no programa Image-Pro Plus Version 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) de maneira similar ao estudo de Vieira et al. (2016) adaptado. Antes de iniciar a análise propriamente dita, foi realizada a calibração da Régua Image Pro, da seguinte maneira:

- a) Abriu-se a imagem da régua salva em 2,5mm;
- b) Measure;
- c) Calibration;
- d) Spatial;
- e) New (dar um nome à régua);
- f) Unidade: milimeters
- g) Pixels/unit: Image
- h) Medir a régua (régua inteira igual a 1mm)
- i) Unidade: 1 (se for a régua inteira)

Após a calibração, foi gerada uma grade de pontos (Figura 6) da seguinte maneira:

- a) Abriu-se a imagem na mesma objetiva da régua selecionada;
- b) Process;
- c) Grid Mask;
- d) New;
- e) Grid: selecionar Lines, Orthogonal e Spacing 0.122 x 0.122;
- f) Settings: escolher cor do grid (preta);
- g) Save as (abrir pasta dentro de C: IpWiN4/Grid e dar o nome para o grid criado).

Assim, obteve-se uma imagem gradeada com 220 pontos de interseção entre as linhas de grade. A sobreposição das linhas de grade sobre a imagem histológica permite a contagem de pontos presentes que coincidem com as estruturas a serem analisadas. A contagem dos pontos (Figura 6) foi realizada da seguinte maneira:

- a) Measure;
- b) Manual Tag;

a) Classes (nomear as estruturas a serem analisadas). São elas: CORTICAL: Áreas basofílicas/amorfias; Vasos sanguíneos; Matriz óssea; Osteócitos; Lacunas; DEFEITO ÓSSEO: Matriz óssea/Osteócitos; Tecido Medular entre as trabéculas; Vasos sanguíneos; Coágulo; Tecido de granulação; Rede de Fibrina; Células inflamatórias; Fibroblastos/Fibras colágenas; Tecido Adiposo; Osteoblastos; Osteoclastos.

- c) View: desmarcar label;
- d) Tag points.

Foi utilizado o valor bruto obtido pela contagem de pontos coincidentes sobre as estruturas consideradas, dentro do número total de pontos existentes na grade.

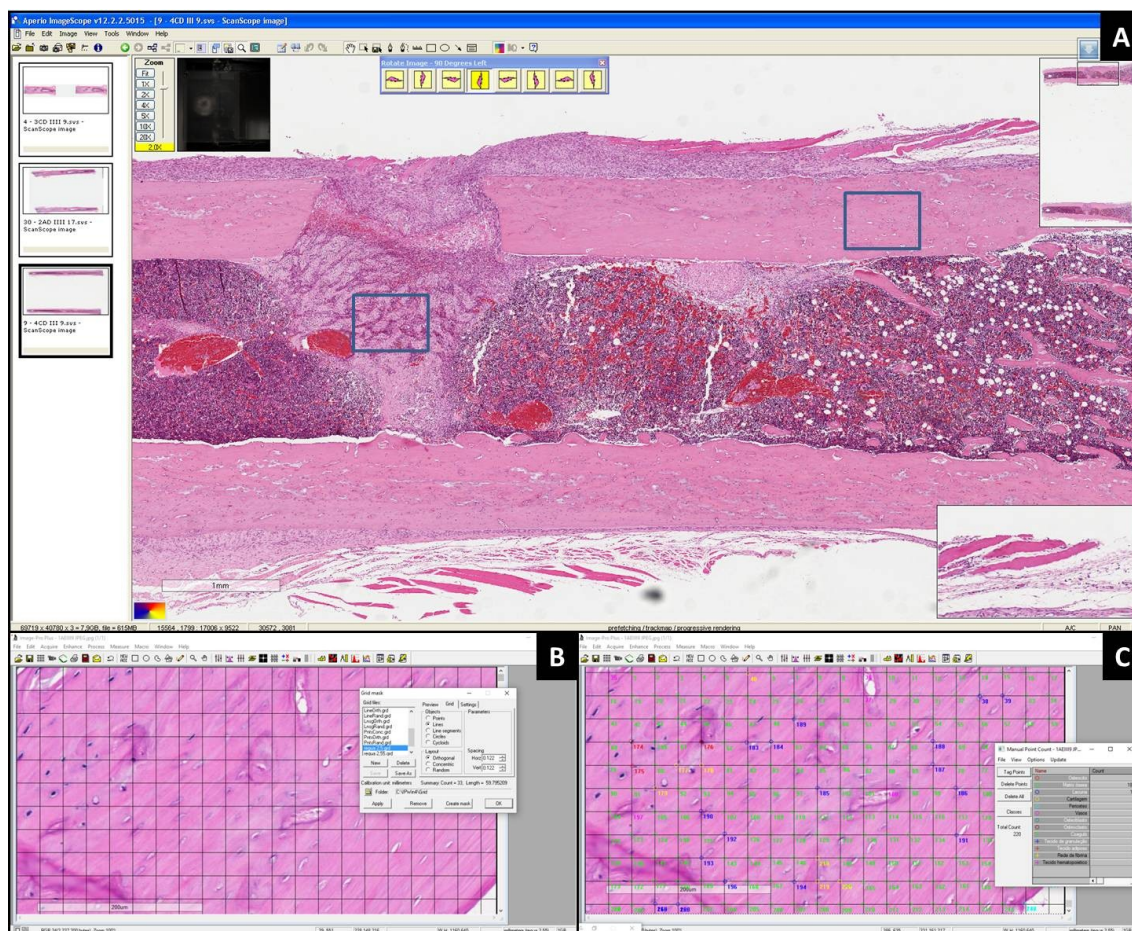


Figura 6: Análise histomorfométrica (Contagem de estruturas). A- Fotomicrografia digitalizada de uma secção longitudinal de fêmur contendo a delimitação das duas áreas de análise (retângulo azul), sendo uma da região do defeito ósseo e outra da cortical óssea; B- Grade de 220 pontos gerada para a contagem; C- Contagem de pontos presentes que coincidem com as estruturas a serem analisadas. Ampliação 4X. Hematoxilina e Eosina.

Em seguida, ainda na análise histomorfométrica foi também quantificada a neoformação óssea na região do defeito ósseo como um todo. Para essa finalidade foram selecionadas 3 lâminas de cada fêmur coradas em Tricrômico de Mallory. As imagens histológicas foram capturadas com objetiva de 4X utilizando o programa de captura de imagens Motic Live Imaging Module (Motic®, British Columbia, Canada) e microscópio binocular Nikon Eclipse E2000 (Nikon®, Nikon do Brasil, São Paulo, Brasil) acoplado à câmera Moticam Pro 252B (Motic®, British Columbia, Canada) ligada a um computador. Em seguida, as imagens de cada defeito ósseo foram unidas no software editor de imagens Adobe Photoshop CS2 (Adobe®, Adobe System Inc., San Jose, CA/EUA) e analisadas utilizando o programa HL Image

2005++. A região do defeito ósseo (ROI: região de interesse) foi delimitada com a ferramenta “Drawn” e a porcentagem de matriz óssea dentro desta área foi quantificada com a ferramenta “Measurement” conforme descrito por Batista et al., 2014 (Figura 7).

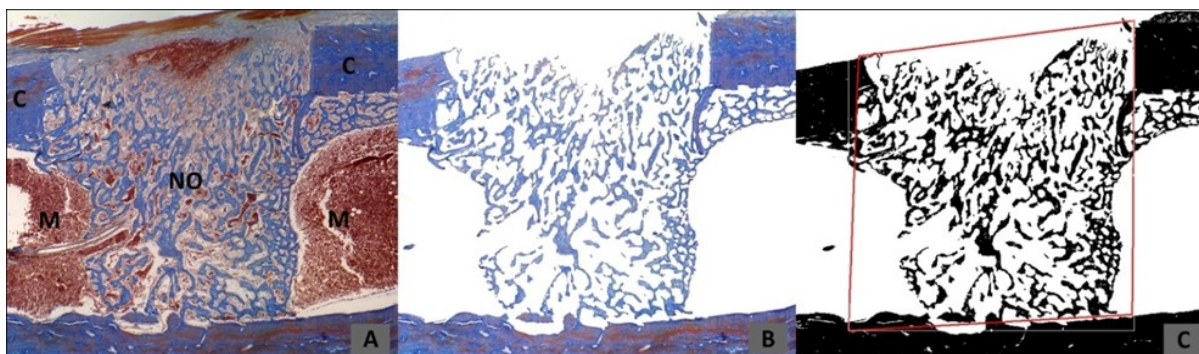


Figura 7: Análise histomorfométrica (Neof ormação óssea). A - Fotomicrografia digitalizada de uma secção longitudinal de fêmur mostrando cortical óssea (C), medula óssea (M) e neof ormação óssea (NO). B – Imagem após a remoção do tecido mole. C – Imagem binária da mesma fotomicrografia com a delimitação da área total do defeito ósseo (linha vermelha). Ampliação 4X. Tricrômico de Mallory. *
Imagens retiradas do artigo de Batista et al., (2014).

3.8. Análise das fibras colágenas - Microscopia de Polarização

Para avaliação das fibras colágenas, foram utilizadas 3 lâminas histológicas coradas em Picosirius Red. As imagens histológicas foram capturadas com lente objetiva de 20X utilizando o programa de captura de imagens OPTHD/Opticam e microscópio binocular Nikon Eclipse Ti-S (Nikon®, Nikon Corporation, Tóquio, Japão), acoplado a câmera de alta resolução Opticam (Opticam Microscopy Technology®, São José dos Campos, São Paulo, Brasil), por meio da luz polarizada. Foram obtidas duas imagens digitalizadas de cada lâmina, sendo uma da região do defeito ósseo e outra da cortical óssea (a uma distância de 3 milímetros a partir da margem do defeito) em formato TIFF de forma a possibilitar a análise em outros softwares.

Em cada imagem foi realizada uma análise qualitativa, e a mesma foi mensurada por scores (em porcentagens, considerando a proporção da área analisada para cada parâmetro), sendo avaliados os seguintes critérios:

a) predominância de marcação, em porcentagem (%), se verde ou amarelo/laranja/vermelho: Nesta análise, o colágeno tipo I é marcado com coloração amarelo/laranja/vermelho, enquanto o colágeno tipo III é marcado em verde (Cury et al. 2016).

b) intensidade do brilho, em porcentagem (%), se fraco/ausente, moderado ou intenso: Materiais birrefringentes apresentam anisotropia ótica quando avaliados por polarização. A anisotropia é expressa como variação no brilho, determinada pela diferença na refração da luz no material analisado. O colágeno é um material anisotrópico, sendo assim, quando as fibras colágenas estão alinhadas transversalmente à direção da propagação da luz há máximo brilho. Quando as fibras colágenas estão alinhadas ao longo do eixo de propagação da luz, a região analisada apresenta-se escura (mínimo brilho). Fibras colágenas orientadas em outras direções apresentam valores intermediários de brilho (Bromage et al., 2003).

c) organização lamelar, em porcentagem (%), se presente ou ausente;

3.9. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados com o programa GraphPad Prism (GraphPad Prism® version 5.0 for Windows, San Diego, CA, USA). Inicialmente 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 (para comparação de cada grupo ao longo do tempo) e ANOVA com correção de Bonferroni (para comparação entre os grupos em cada período). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4 – RESULTADOS

4.2. *Análise histológica e histomorfométrica*

A análise histológica mostrou, em 5 dias, nos grupos Controle e OH, calo fibroso no defeito ósseo substituindo o coágulo sanguíneo, que aparece também no interior do canal medular, além de evidente maturação do tecido de granulação. No grupo Controle, ainda foram observadas células inflamatórias e a formação de tecido ósseo primário ocorreu apenas na periferia do defeito ósseo. No grupo OH, a neoformação óssea foi mais evidente tanto na periferia do defeito ósseo e quanto em seu interior (Figura 9).

Em 7 dias, nos grupos Controle e OH, foi observada na área do defeito, predominância de tecido ósseo do tipo primário com disposição não lamelar e grande número de osteócitos incluídos na matriz óssea preenchendo a área da lesão e estendendo-se para o canal medular dos fêmures. Revestindo a matriz óssea foram observados osteoblastos, cúbicos com acentuada basofilia citoplasmática, indicando intensa atividade de síntese proteica. Nos campos estudados, não foram observadas áreas de necrose, reabsorção óssea inflamatória ou invaginação de tecido conjuntivo para o interior do defeito ósseo. No grupo Controle, havia presença de novos vasos sanguíneos e áreas com tecido de granulação ainda presente. No grupo OH, havia tecido ósseo preenchendo toda a área do defeito ósseo, com trabéculas já bem organizadas e definidas evidenciando avanço no processo de remodelação (Figura 9).

Foram observadas alterações morfológicas nos grupos que sofreram radioterapia. A área do defeito ósseo, nos grupos RXT e RXT+OH, tanto em 5 quanto em 7 dias, apresentou predomínio de coágulo sanguíneo, com áreas de rede de fibrina na periferia. Também foi observado presença de intenso infiltrado inflamatório, tecido adiposo e focos isolados de tecido de granulação. Não foram observadas áreas de neoformação óssea nas lâminas analisadas. No grupo RXT+OH, foram observadas algumas fibras colágenas esparsas (Figura 9).

A análise histológica da região cortical em 5 e 7 dias mostrou, tanto nos grupos Controle e OH, quanto no RXT e RXT+OH, presença de osso cortical lamelar com vasos sanguíneos em seu interior. Também foram observados osteócitos e lacunas vazias, incluídas na matriz óssea. Em todos os grupos foram observadas

linhas basofílicas que indicam processo de remodelação, porém, elas estavam mais desorganizadas nos animais que sofreram radioterapia. Áreas basofílicas/amorfas, sugestivas de cartilagem entremeando a matriz óssea também foram observadas, porém em maior quantidade nos animais irradiados, mesmo após OH (Figura 9).

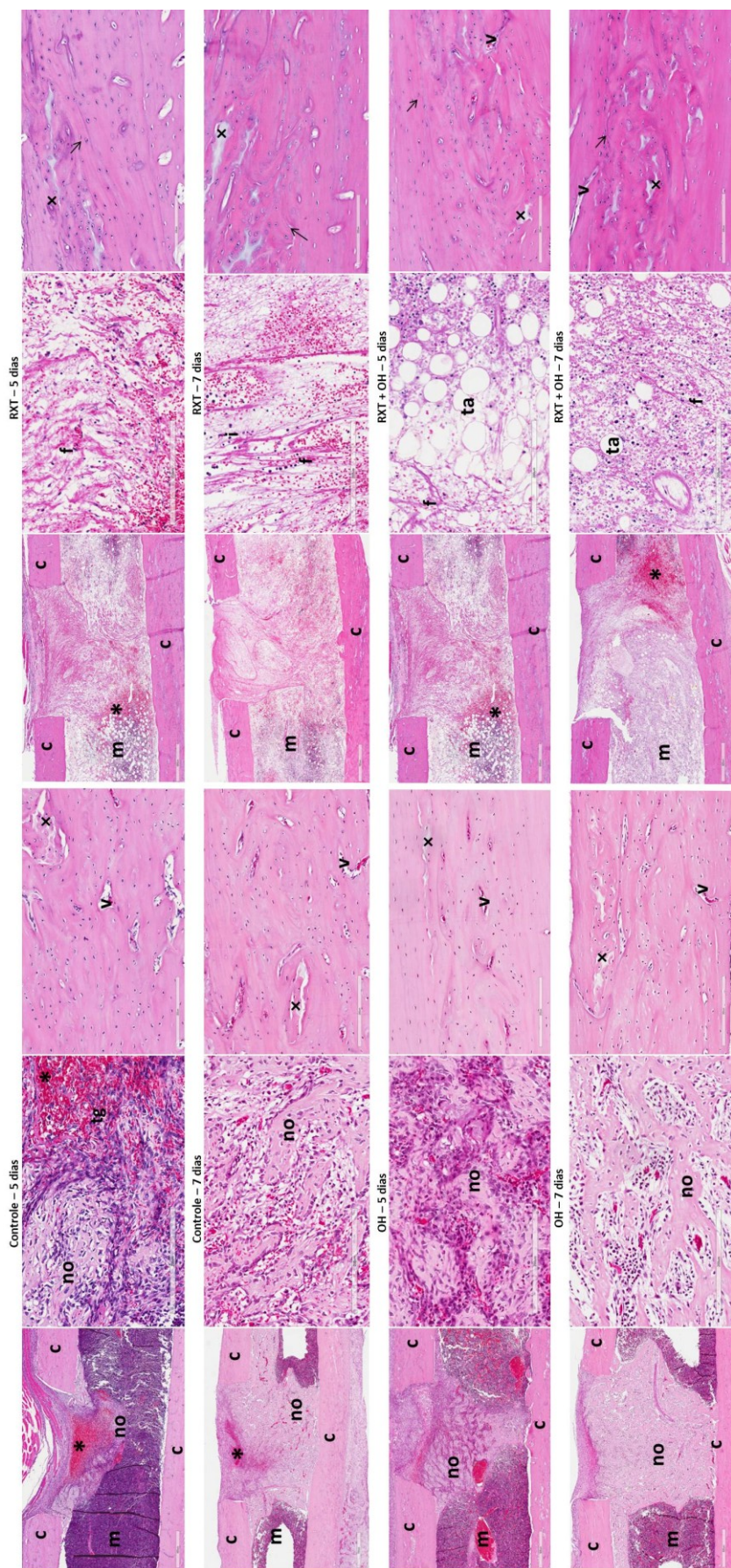


Figura 9: Fotomicrografia digitalizada do defeito ósseo entre os grupos avaliados, nos períodos de 5 e 7 dias. Cortical óssea (c); Medula óssea (m); Neoformação óssea (no); Coágulo (*); Tecido de granulação (tg); Rede de fibrina (f); Infiltrado inflamatório (i); Áreas basofílicas/amorfas (x); Linhas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

A análise histomorfométrica confirmou, por meio da contagem das estruturas, alguns dados observados na análise histológica. Na região cortical, embora também tenha sido observada presença de áreas basofílicas/amorfas nos grupos Controle e OH, foi observada maior contagem da mesma nos grupos RXT (5 dias: $2,75 \pm 4,98$ / 7 dias: $6,00 \pm 3,60$) e RXT+OH (5 dias: $2,50 \pm 2,88$ / 7 dias: $11,00 \pm 11,00$), especialmente no período de 7 dias. Houve uma redução na contagem de vasos sanguíneos e osteócitos nos grupos irradiados quando comparamos os períodos de 5 e 7 dias. A contagem de lacunas vazias e de matriz óssea foi semelhante entre os grupos avaliados (Figura 10).

Na região do defeito ósseo, havia matriz óssea/osteócitos apenas nos grupos Controle (5 dias: $49,00 \pm 35,38$ / 7 dias: $71,80 \pm 10,96$) e OH (5 dias: $70,50 \pm 6,35$ / 7 dias: $87,33 \pm 7,50$), sendo que houve maior deposição da mesma no grupo OH. O tecido medular, representado pelo espaço entre as trabéculas de osso neoformado, também foi encontrado apenas nos grupos que não sofreram radioterapia, sendo em maior contagem no grupo OH em 7 dias ($87,50 \pm 30,91$). O tecido de granulação também foi encontrado apenas nos grupos Controle (5 dias: $70,75 \pm 69,29$ / 7 dias: $9,80 \pm 21,91$) e OH (5 dias: $65,75 \pm 45,11$ / 7 dias: $0,25 \pm 0,50$), sofrendo redução em quantidade quando comparamos os períodos de 5 e 7 dias (Figura 11).

Foi observada rede de fibrina, células inflamatórias e tecido adiposo em maior quantidade nos grupos RXT e RXT+OH. Osteoblastos foram encontrados apenas nos grupos Controle e OH em quantidade semelhante. Osteoclastos, raramente encontrados, foram vistos apenas nos grupos Controle e OH, sendo mais frequentes no grupo OH no período de 7 dias ($2,75 \pm 1,89$). A contagem de vasos sanguíneos foi semelhante entre os grupos nos períodos de 5 e 7 dias. A contagem de fibroblastos/fibras colágenas foi maior no grupo RXT+OH no período de 7 dias ($18,50 \pm 4,95$) (Figura 11).

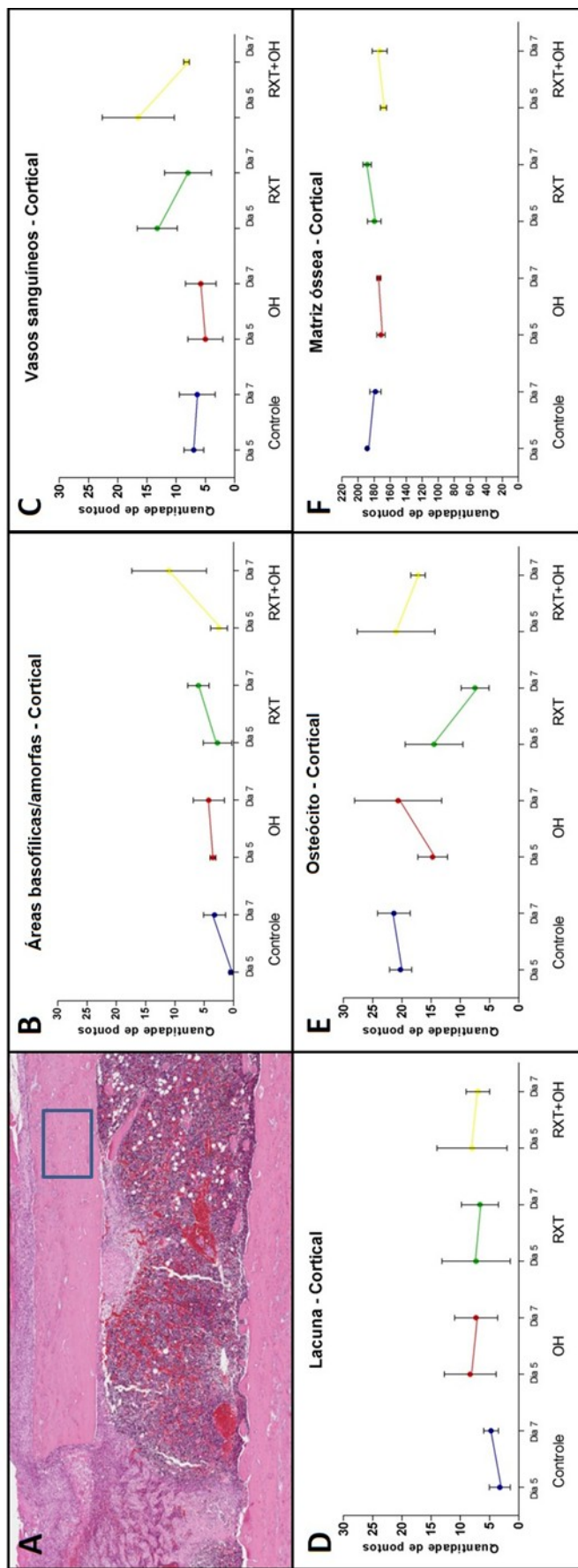


Figura 10: Contagem das estruturas de interesse para a análise histomorfométrica da região cortical entre os grupos avaliados, nos períodos de 5 e 7 dias. A- Fotomicrografia digitalizada evidenciando a área cortical analisada (retângulo azul); B- Análise da presença de Áreas basofílicas/amorfas; C- Análise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

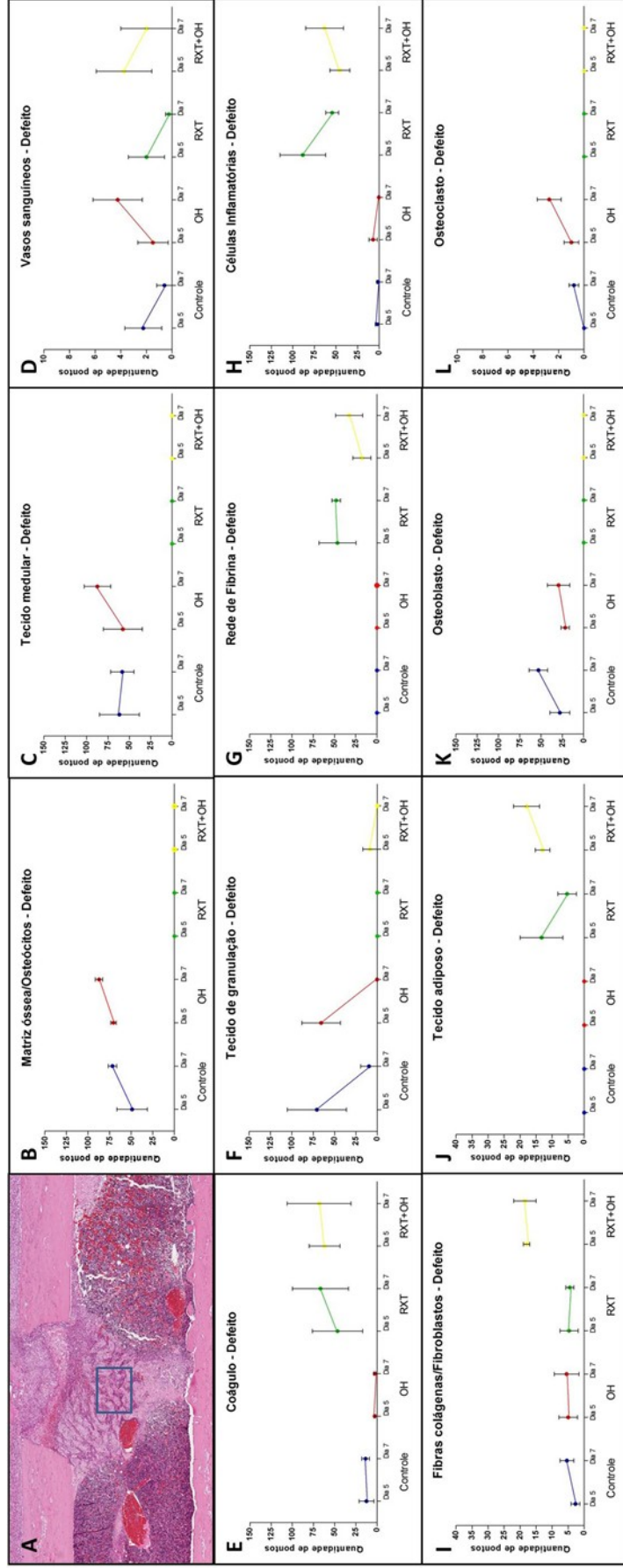


Figura 11: Contagem das estruturas de interesse para a análise histomorfométrica da região do defeito entre os grupos avaliados, nos períodos de 5 e 7 dias. A- Fotomicrografia digitalizada evidenciando a área do defeito ósseo analisada (retângulo azul); B- Análise da presença de Matriz óssea/Osteócitos; 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.

Para a avaliação histomorfométrica da neoformação óssea, a análise estatística mostrou um aumento significativo na porcentagem de neoformação óssea entre o grupo OH ($15,95 \pm 7,68$) quando comparado ao Controle ($7,06 \pm 3,71$), no período de 5 dias ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa na porcentagem de neoformação óssea entre o grupo Controle ($23,10 \pm 7,4$) e OH ($28,10 \pm 5,4$), no período de 7 dias. Não houve neoformação óssea nos grupos RXT e RXT+OH no período de 5 e 7 dias. (Figura 12)

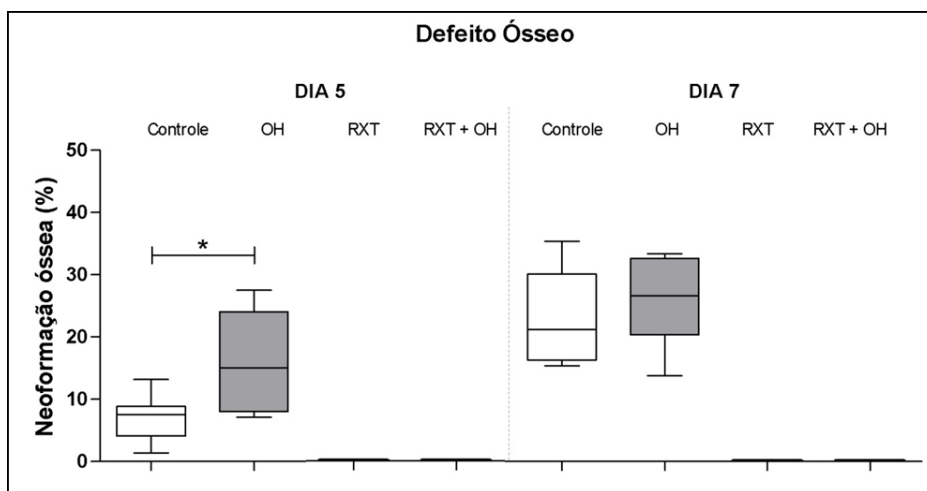


Figura 12: Porcentagem de neoformação óssea na região de interesse (defeito ósseo) entre os grupos avaliados, nos períodos de 5 e 7 dias. (* $p < 0,05$)

4.3. Análise das fibras colágenas

Através de microscopia de polarização foi observado maior quantidade de fibras colágenas que apresentavam birrefringência predominante de cores Amarelo/Laranja/Vermelho, sugerindo a presença de colágeno tipo I, no grupo OH, nos períodos de 5 e 7 dias, tanto na área do defeito, quanto na área cortical ($p < 0,05$). O Grupo RXT+OH, também apresentou fibras com esta coloração na região cortical. Na região do defeito ósseo, foi observada birrefringência predominante Verde, que indica presença de colágeno tipo III, nos grupos Controle, RXT e RXT+OH nos períodos de 5 e 7 dias. Apenas o grupo OH apresentou birrefringência predominante Amarelo/Laranja/Vermelho na região do defeito ósseo nos períodos de 5 e 7 dias ($p < 0,05$) (Figuras 13 e 14).

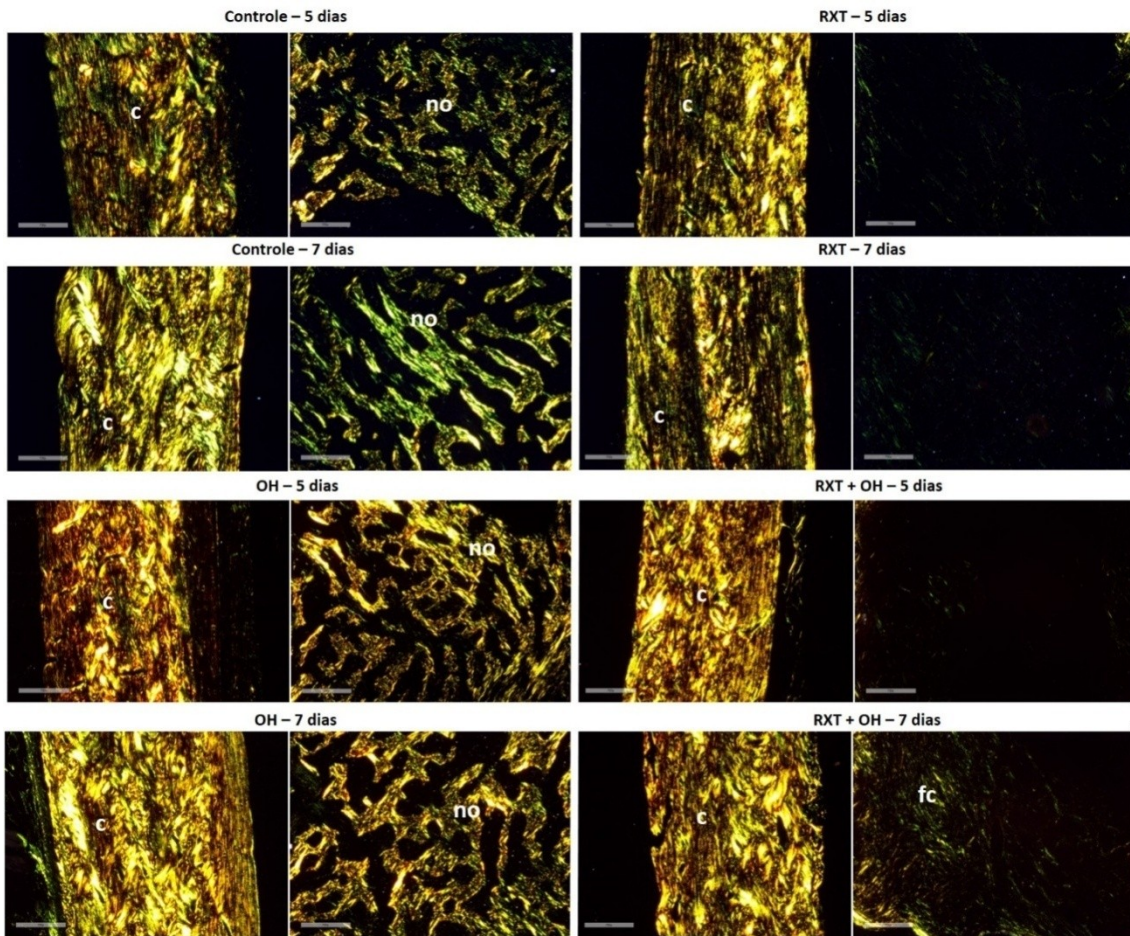


Figura 13: Fotomicrografia digitalizada da região cortical óssea e do defeito ósseo entre os grupos avaliados, nos períodos de 5 e 7 dias, visualizado por microscopia de polarização. Cortical óssea (c); Neoformação óssea (no); Fibras colágenas (fc). Picosirius Red, X20.

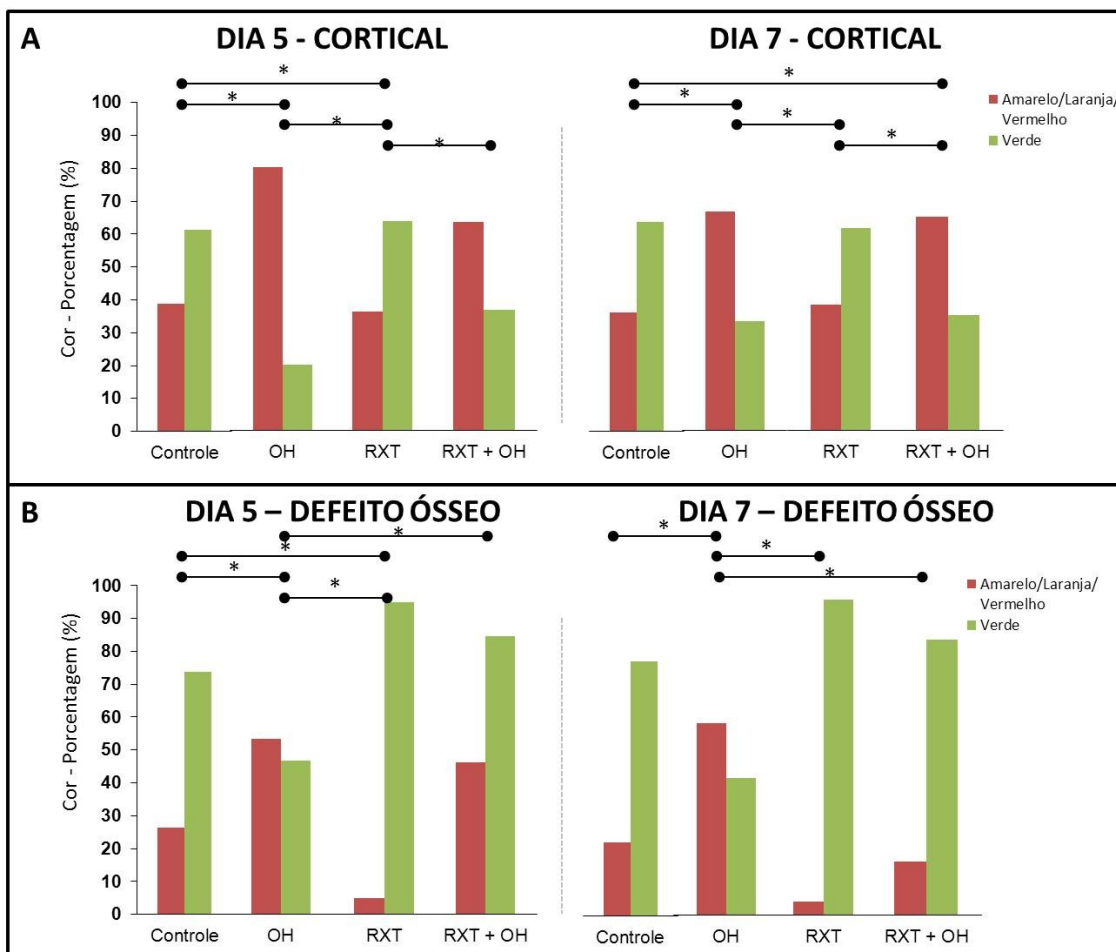


Figura 14: Predominância de marcação, em porcentagem (%), se verde ou amarelo/laranja/vermelho na região cortical (A) e no defeito ósseo (B) entre os grupos avaliados, nos períodos de 5 e 7 dias. (* $p < 0,05$)

A diferença na intensidade do brilho das fibras colágenas sugere diferenças na disposição e organização dessas fibras em relação ao eixo de luz polarizada. Na região cortical, em todos os grupos avaliados, foram visualizadas fibras colágenas com intensidades de brilho variando desde fraco/ausente, moderado ou intenso. Na região do defeito ósseo, os grupos Controle e OH, apresentaram intensidade de brilho predominantemente moderado, especialmente no período de 7 dias ($p < 0,05$). Na região do defeito ósseo dos grupos que sofreram radioterapia, poucas fibras colágenas foram visualizadas, sendo elas mais frequentemente encontradas com intensidade de brilho fraco ($p < 0,05$). Apenas no grupo RXT+OH, no período de 7 dias, houve uma intensidade de brilho mais equilibrado (Figuras 13 e 15).

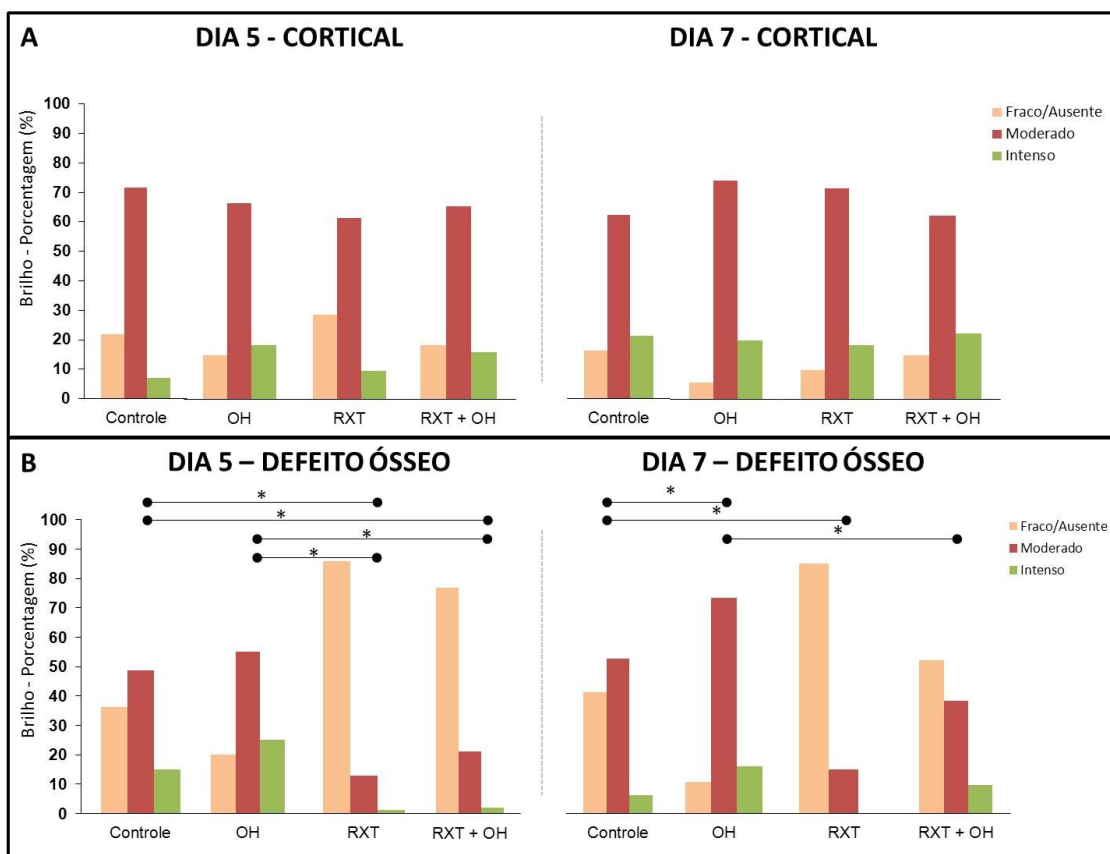


Figura 15: Intensidade do brilho, em porcentagem (%), se fraco/ausente, moderado ou intenso na região cortical (A) e no defeito ósseo (B) entre os grupos avaliados, nos períodos de 5 e 7 dias. (* $p < 0,05$)

Foram observados na região cortical feixes de colágeno com áreas de organização lamelar paralela na periferia, tanto nos grupos Controle e OH, quanto nos grupos RXT e RXT+OH. Na região do defeito ósseo, a disposição do tecido ósseo em lamelas foi pouco frequente, sendo observada diferença significativa apenas entre os grupos Controle e RXT no período de 7 dias ($p < 0,05$) (Figuras 13 e 16).

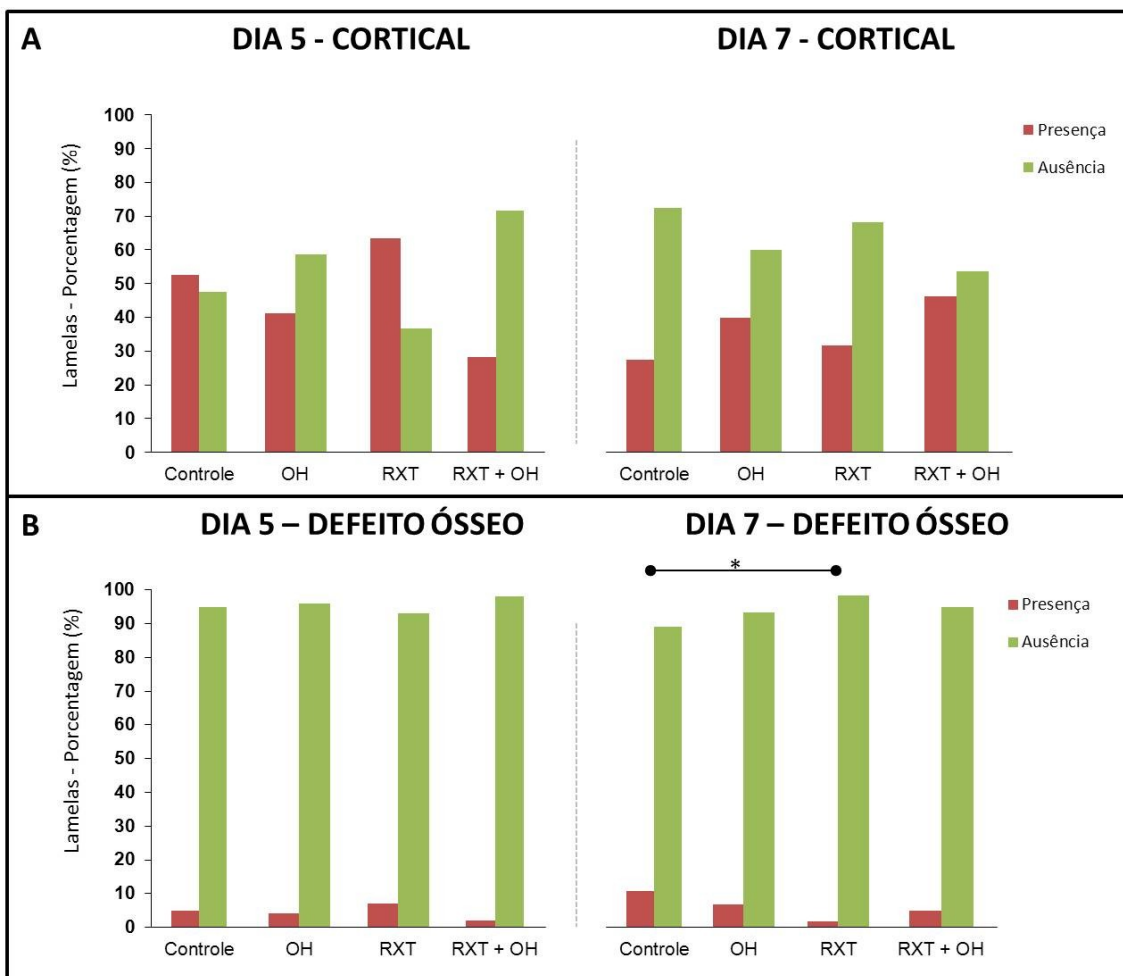


Figura 16: Organização lamelar, em porcentagem (%), se presente ou ausente na região cortical (A) e no defeito ósseo (B) entre os grupos avaliados, nos períodos de 5 e 7 dias. (*p<0,05)

5 – DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a influência da oxigenação hiperbárica no reparo inicial de tecido ósseo submetido à radioterapia, nos períodos de 5 e 7 dias. 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).

A análise morfológica mostrou que a OH acelerou os eventos iniciais da reparação óssea na região do defeito, com melhor arranjo do osso em neoformação como já observado por Rocha et al. (2015). Também se observou que os animais submetidos à OH mostraram maior porcentagem de neoformação óssea do que os animais do grupo controle, embora a diferença tenha sido significativa apenas em 5 dias. Os benefícios da oxigenação hiperbárica podem ser explicados pelos efeitos fisiológicos e farmacológicos do oxigênio em altas doses. Após qualquer trauma ao tecido ósseo, há perturbação do suprimento vascular local, formando uma área hipóxica, com pouco fornecimento de sangue e oxigênio. Essa hipóxia, se prolongada, inibe a proliferação fibroblástica e a síntese de colágeno, afetando diretamente o reparo tecidual, podendo levar à necrose do tecido (Tandara, 2004). Entretanto, durante as sessões no interior da câmara, ocorre um estado de hiperoxigenação, favorecendo o reparo. Logo após o término da sessão, a PO_2 retorna aos níveis normais e ocorre a liberação de mediadores químicos que estimulam a síntese de colágeno, angiogênese e osteogênese (Peliesser et al., 2014; Kawada et al., 2013).

Era esperado que os benefícios observados no grupo OH em comparação com o grupo Controle também ocorressem no grupo RXT+OH quando comparado ao grupo RXT. Entretanto, isso não ocorreu, pois no grupo RXT+OH, não foi observada nenhuma neoformação óssea. Pelo contrário, nos grupos que sofreram radioterapia, houve o predomínio de rede de fibrina, células inflamatórias e tecido adiposo em grande quantidade. Neste trabalho, a radioterapia interferiu negativamente no microambiente tecidual, provocando redução da contagem de células ósseas (osteócitos/osteoblastos) (Da Cunha et al., 2007; Peliesser et al., 2014). A radiação reduziu o potencial de vascularização dos tecidos (Perrier et al., 1994; Westermark et al., 1990) e, conseqüentemente, houve comprometimento da

atividade celular, da síntese de colágeno e da capacidade de regeneração do tecido ósseo (Perrier et al, 1994; Westermarck et al., 1990).

A dose de radiação de 30 Gy, utilizada neste estudo, foi suficiente para produzir efeitos no tecido ósseo, tais como os também observados por Kiyohara et al., (2003), da Cunha et al., (2007), Batista et al. (2014), Rocha et al., (2017), que encontraram uma inflamação avançada, fibrose, áreas de tecido adiposo e de reabsorção óssea, após radioterapia. Em nosso estudo utilizamos dose única, que é considerada alta. Esse fator é importante porque a resposta dos tecidos à radiação também está relacionada à capacidade das próprias células em reparar lesões radio induzidas (Pelisser et al., 2007). As complicações decorrentes da radioterapia dependem de fatores como quantidade total da dose, tipo e radio sensibilidade do tecido saudável envolvido pela radiação, fracionamento da dose, susceptibilidade individual, idade, condições sistêmicas, tratamentos associados, alcoolismo e tabagismo. Sendo assim, as diversas células responsáveis pelo reparo seriam diferentemente afetadas pela dose de radiação, o que resultaria em respostas distintas. De fato, no estudo realizado por Zhang et al. (2017), observou-se que os osteoclastos são mais radio sensíveis quando comparados aos osteoblastos. De acordo com os autores, a radiação em baixas doses já foi suficiente para induzir a ação osteoclástica, com maior reabsorção, o que não aconteceu com os osteoblastos, que são mais radio resistentes. Entretanto, após altas doses, como em nosso estudo, a desorganização celular e o aumento da apoptose celular pode ser potencializada, reduzindo a capacidade de reparo pela ausência de células ósseas. Essa interferência no metabolismo ósseo parece gerar um desequilíbrio da remodelação, favorecendo ainda mais a reabsorção óssea (Maeda, 1988).

É importante salientar que 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.

Na região do defeito ósseo, a contagem de fibroblastos e fibras colágenas foi maior no grupo RXT+OH no período de 7 dias em comparação com o grupo RXT. Esse evento foi interessante, pois embora não tenha sido possível a neoformação óssea propriamente dita, houve uma tentativa de deposição de colágeno nesse grupo. Este resultado está relacionado ao fato de que a OH aumenta o suprimento de oxigênio em tecido hipóxico, induzindo a proliferação fibroblástica (Jereczek-Fossa et al., 2002) e favorecendo a angiogênese e osteogênese também no tecido irradiado (Salgado, 2009; Muhonen, 2004). Considerando que o tecido ósseo apresenta resposta tardia à radiação, talvez, a recuperação significativa após radioterapia poderia demandar mais tempo ou ainda mais sessões de OH.

Seguindo essa ideia, na região cortical, também foram observadas alterações importantes nos animais submetidos à radiação. Áreas basofílicas/amorfas e uma desorganização evidente das lamelas foram frequentes, mesmo após OH. Nossos resultados corroboram com Rabelo et al. (2010), que encontrou uma redução de matriz óssea e modificações na microarquitetura dos canais de Harvers após radioterapia, gerando um osso heterogêneo e menos organizado. Considerando que o osso tem a capacidade de se adaptar continuamente às mudanças em seu ambiente e que o reparo ósseo é um processo complexo com eventos celulares e extracelulares, que sofre influência de diversos fatores (Da Cunha et al., 2007; Lerouxel et al., 2009; Rabelo et al., 2010; Kawada et al., 2013), seria esperado que a radioterapia também resultasse em mudanças em toda a estrutura óssea.

Através da microscopia de polarização foram observadas diferenças nas fibras colágenas principalmente do tipo I (amarelo/laranja/vermelho) e III (verde) (Cury et al. 2016). 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 periosteio, 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). Em um estudo que avaliou a influência da OH no reparo do ligamento periodontal, Gajendrareddy et al. (2017) verificaram que a

OH altera a expressão do colágeno, bem como sua organização. Em seu trabalho a expressão de colágeno tipo I foi maior após OH, como encontrado em nosso trabalho.

De acordo com Gajendrareddy et al. (2017), a coloração amarelo/laranja/vermelho também estaria relacionada ao grau de maturação dessas fibras colágenas. As fibras colágenas tipo I são inelásticas e mais resistentes que fios de aço de mesmo diâmetro e proporcionam ao tecido resistência à tração. Já as fibras reticulares, derivadas do colágeno tipo III, constituem o arcabouço dos órgãos, compõem a lâmina reticular da membrana basal e formam uma delicada rede em torno das células adiposas, dos vasos sanguíneos, das fibras nervosas e das células musculares. Sendo assim, elas são mais delgadas e delicadas (Ham & Cormarck, 1983).

Outro fator a ser discutido, é com relação ao modelo experimental de nosso estudo, que utilizou fêmures contralaterais para os diferentes grupos. De acordo com Formenti & Demaria, 2009, a radioterapia também recruta mediadores biológicos fora do campo de tratamento e teria efeitos sistêmicos. No estudo realizado por Oest et al, (2018) foram avaliados densidade, morfologia e resistência em fêmures com radiação local (irradiados diretamente) e sistêmica (fêmures contralaterais não irradiados diretamente), além de fêmures de animais distintos (sem radiação). De acordo com os autores, os fêmures contralaterais geralmente seguiram uma resposta intermediária em comparação com os fêmures irradiados. No trabalho de Maeda et al. (1988), que avaliou os efeitos da radioterapia em osso cortical, foram observadas redução do número de osteócitos e alterações em osso e medula após radioterapia tanto na perna irradiada quanto na perna contralateral dos ratos avaliados, o que justificaria a separação dos animais em dois grupos devido a um possível efeito sistêmico. Em nosso estudo, foram utilizados os fêmures contralaterais. Essa escolha foi baseada no trabalho de Rocha et al., (2017) que avaliaram se as alterações específicas do reparo ósseo após radioterapia também eram observadas a longa distância da área irradiada. Com um modelo experimental semelhante ao de nosso estudo, esses autores não observaram diferenças no processo de reparo ósseo entre os grupos de animais com radiação local e sistêmica, além de animais distintos sem radiação. Isso nos fez pensar que a área

irradiada (fêmur) é uma área relativamente pequena e seu comprometimento local não influenciou sistemicamente o processo de reparo.

6 – 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

1. Amadei SU. et al. Effect of estrogen deficiency on bone turnover and bone repair. **J Bras Patol. Med Lab.** v.42; n.1; p. 5-12, 2006.
2. 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.
3. Betoni-Junior W, Dechichi P, Esteves JC, Zanetta-Barbosa Magalhães AE. Evaluation of the bone healing process utilizing platelet-rich plasma activated by thrombin and calcium chloride: a histologic study in rabbit calvaria. **J Oral Implantol.** 2013 Feb;39(1):14-21
4. Cury DP, Dias FJ, Miglino MA, Watanabe IS. Structural and Ultrastructural Characteristics of Bone-Tendon Junction of the Calcaneal Tendon of Adult and Elderly Wistar Rats. **PLoS One.** 2016 Apr 14;11(4): e0153568
5. Da Cunha SS, Sarmiento VA, Ramalho LMP, Freitas AC, Almeida D, Tavares ME, et al. Effects of radiotherapy on bone tissue. **Radiol Bras.** 2007 40(3):189-92.
6. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Int. J. Care Injured**, Beckett Street, n. 36, p.1392-1404, jul. 2005.
7. 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;105(4):417-22.
8. Formenti SC, Demaria S. Systemic effects of local radiotherapy. **Lancet Oncol.** July; V. 10, n. 7, p. 718–726, 2009.
9. Gajendrareddy PK, Junges R, Cygan G, Zhao Y, Marucha PT, Engeland CG. Increased oxygen exposure alters collagen expression and tissue architecture during

ligature-induced periodontitis. **J Periodontal Res.** 2017 Jun;52(3):644-649. doi: 10.1111/jre.12408. Epub 2016 Aug 30.

10. Ham, AW. & Cormack, DH. **Histologia.** 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 197.

11. Handschel J, Sunderkötter C, Kruse-Lösler B, Prott FJ, Meyer U, Piffko J, et al. Late effects of radiotherapy on oral mucosa in humans. **Eur J Oral Sci.** Muènster, n. 109, p.95-102, 2001.

12. Hsieh CP, Chiou YL, Lin CY. Hyperbaric oxygen-stimulated proliferation and growth of osteoblasts may be mediated through the pathways. **Connect Tissue Res.** 2010 Dec;51(6):497-509

13. Hunt TK. The physiology of wound healing. **Ann Emerg Med.** 1988; 17: 1265-1273

14. Jan AM, Sándor GK, Iera D, Mhawi A, Peel S, Evans AW, et al. Hyperbaric oxygen results in an increase in rabbit calvarial critical sized defects. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2006;101(2):144-9.

15. Jereczek-Fossa B.A, Orecchia R. Radiotherapy-induced mandibular bone complications. **Cancer Treat Rev.** 2002 Feb;28(1):65-74. Review.

16. Johnsson et al. A histomorphometric study of bone reactions to titanium implants in irradiated bone and the effect of hyperbaric oxygen treatment. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, Sweden, v. 5, n. 14, p.699-706, out. 1999.

17. Junqueira, LCU. & Carneiro J. **Histologia Básica.** 11^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

18. 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.
19. Lerouxel E, Moreau A, Bouler JM, Giumelli B, Daculsi G, Weiss P, et al. Effects of high 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.
20. Lynch MJ, Slocombe RF, Harrigan KE, Laing CJ. Fibrous osteodystrophy in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). **J Zoo Wildl Med.** 1999 Dec;30(4):577-83.
21. Mader JT, Adams KR, Wallace WR, et al. Hyperbaric oxygen as adjunctive therapy for osteomyelitis. **Infect Dis Clin North Am.** 1990; 4:433.
22. Mader JT, Guckian JC, Glass DL, et al. Therapy with hyperbaric oxygen for experimental osteomyelitis due to *Staphylococcus aureus* in rabbits. **J Infect Dis** 1978; 138:312.
23. 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.
24. Merli LA, Santos MT, Genovese WJ, Faloppa F. Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair. **Photomed Laser Surg.** 2005 Apr;23(2):212-5.
25. Muhonen A, Haaparanta M, Grönroos T, Bergman J, Knuuti J, Hinkka S, et al. Osteoblastic activity and neoangiogenesis in distracted bone of irradiated rabbit mandible with or without hyperbaric oxygen treatment. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 2004 33(2):173-8.

26. Neves PC, Abib Sde C, Neves RF, Pircchio O, Saad KR, Saad PF, Simões RS, Moreira MB, Laurino CF. Effect of hyperbaric oxygen therapy combined with autologous platelet concentrate applied in rabbit fibula fracture healing. **Clinics (Sao Paulo)**. 2013 Sep;68(9):1239-46.
27. Oest ME, Policastro CG, Mann KA, Zimmerman ND, Damron TA. Longitudinal Effects of Single Hindlimb Radiation Therapy on Bone Strength and Morphology at Local and Contralateral Sites. **J Bone Miner Res**. 2018 Jan;33(1):99-112.
28. Peliesser A, Vier-Peliesser FV, Fontanella VRC, Figueredo MAZ. Microscopical analysis of fractionated cobalt-60 radiotherapy effects on mandibles of rats. **Radiol. Bras.**; v. 40, n. 2, p. 113-118, 2007.
29. Perrier M., Moeller P. Osteoradionecrosis. A review of the literature. **Schweiz Monatsschr Zahnmed**. 1994; 104: 271±277.
30. 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.
31. 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**. 2017 Mar;48(3):671-673.
32. Rocha FS, Gomes Moura CC, Rocha Rodrigues DB, Zanetta-Barbosa D, Nakamura Hiraki KR, Dechichi P. Influence of hyperbaric oxygen on the initial stages of bone healing. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. 2015 Nov;120(5):581-7.
33. Rocha FS, Ramos LM, Batista JD, Zanetta-Barbosa D, Ferro EA, Dechichi P. Bovine anorganic bone graft associated with platelet-rich plasma: histologic analysis in rabbit calvaria. **J Oral Implantol**. 2011 Oct;37(5):511-8, Epub 2010 Jun 16.

34. Salgado CJ, Raju A, Licata L, Patel M, Rojavin Y, Wasielewski S, Diarra C, Gordon A, Norcross A, Kent KA.. Effects of hyperbáric oxygen therapy on an accelerated rate of mandibular distraction osteogenesis. **J Plast Reconstr Aesthet Surg.** 2009 Dec;62(12):1568-72.
35. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. **Semin Cell Dev Biol.** 2008 Oct;19(5):459-66.
36. Schultze-Mosgau S, Lehner B, Rödel F, Wehrhan F, Amann K, Kopp J et al. Expression of bone morphogenic protein 2/4, transforming growth factor-beta1, and bone matrix protein expression in healing area between vascular tibia grafts and irradiated bone-experimental model of osteonecrosis. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 2005 Mar 15;61(4):1189-96.
37. Sirin Y, Olgac V, Dogru-Abbasoglu S, Tapul L, Aktas S, Soley S. The influence of hyperbaric oxygen treatment on the healing of experimental defects filled with different bone graft substitutes. **Int J Med Sci.** 2011 Feb 8;8(2):114-25.
38. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing more than a nutrient. **World J Surg.** 2004; 28(3):294-300.
39. Vieira, AE. **Caracterização morfométrica e molecular do papel de citocinas pró e anti-inflamatórias no processo de reparo ósseo alveolar em condições homeostáticas e infecciosas.** 2013. 211 f. Tese (Doutorado) - Curso de Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, 2013.
40. Zhang J, Wang Z, Wu A, Nie J, Pei H, Hu W et al. Differences in responses to X-ray exposure between osteoclast and osteoblast cells. **J Radiat Res.** 2017 Nov 1;58(6):791-802.
41. Westermarck A, Sindet-Pederson S, Jensen J. Osteoradionecrosis: pathogenesis, treatment and prevention. **Tandlaegebladet.** 1990; 94: 669±673.
42. Yıldız S, Pehlivan O, Ay H, et al. Hyperbaric oxygen therapy in chronic osteomyelitis. **Gulhane Med J.** 2004; 46:189.

ANEXOS



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




SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ATA DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DO (A) DISCENTE **Danyella Carolyna Soares dos Reis** DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

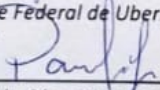
No dia **06 de novembro de 2018**, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado de Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado pelo(a) aluno(a) **Danyella Carolyna Soares dos Reis**, COM O TÍTULO: **"EFEITO DA OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA NO REPARO ÓSSEO EM FÊMURES DE RATOS SUBMETIDOS À RADIAÇÃO IONIZANTE"**. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo se encontra em condições de ser incorporado ao banco de Trabalhos de Conclusão de Curso desta Faculdade. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas da Graduação, legislação e regulamentação da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos e lavrada a presente ata, que após lida e achada conforme, foi assinada pela Banca Examinadora.

Uberlândia, 06 de novembro de 2018.



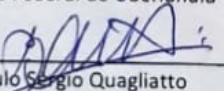
Prof.ª. Dr.ª. Flávia Soares Rocha
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Aprovada
Aprovado/Reprovado



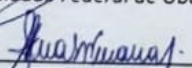
Prof. Dr. Paulo César Simamoto Júnior
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Aprovado
Aprovado/Reprovado



Prof. Dr. Paulo Sérgio Quagliatto
Universidade Federal de Uberlândia – UFU

Aprovado
Aprovado/Reprovado



Ana Lulza Serralha de Velloso Vianna
Aluna(a) de doutorado – PPGO/UFU

Aprovada
Aprovado/Reprovado