

Gustavo Davi Rabelo

**Efeitos da Radioterapia na Microestrutura do Osso Cortical.
Avaliação histológica em coelhos.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia: Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia

2009

Gustavo Davi Rabelo

**Efeitos da Radioterapia na Microestrutura do Osso Cortical.
Avaliação histológica em coelhos.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia: Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Dechichi

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Paula Dechichi

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Prof. Dr. Bruno Augusto Nassif Travençolo

Uberlândia

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R114e Rabelo, Gustavo Davi, 1983-
Efeitos da radioterapia na microestrutura do osso cortical : avaliação
histológica em coelhos / Gustavo Davi Rabelo. - 2009.
31 f. : il.

Orientadora: Paula Dechichi.

Co-orientador: Marcelo Emílio Beletti.

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

Inclui bibliografia.

.. Radioterapia - Teses. I. Dechichi, Paula. II. Beletti, Marcelo Emílio. III.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Odontologia. IV. Título.

CDU: 615.849

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

A comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, em sessão pública realizada em 19 de Junho de 2009, considerou o candidato Gustavo Davi Rabelo aprovado.

Prof^a. Dr^a. Paula Dechichi
Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti
Prof. Dr. Bruno Augusto Nassif Travençolo

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à Deus, meus pais João e Lindalva, meus avôs e avós, meus irmãos Raphael e Thiago, minha sobrinha e afilhada Carolina, minhas cunhadas Andreia e Roberta, meus parentes, amigos, e todos aqueles que me apoiaram em minhas escolhas e estiveram comigo em todos momentos.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Paula Dechichi, minha orientadora deste trabalho, que contribuiu muito para que eu pudesse crescer profissionalmente. Levo comigo seu exemplo de dedicação, ética e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, co-orientador deste trabalho, pela contribuição em todas as etapas da pesquisa e por estar sempre disposto a solucionar os mais diversos problemas, sempre dispondo de tempo em meio a tantos compromissos.

Ao Prof. Dr. Antônio Francisco Durighetto Júnior, que me acompanhou na longa jornada de aprendizado durante a graduação e pós-graduação, agradeço pelos conselhos e orientações nos mais diversos trabalhos que realizamos juntos.

À minha amiga Profa. Ms. Andreia Espindola Vieira, agradeço pelo companheirismo e pela ajuda em todos os momentos, e por ter me orientado em muitas tarefas. Hoje muito do que sei devo a você.

À minha amiga Profa. Dra. Karen Renata Nakamura Hiraki, agradeço pelo companheirismo, pela orientação e pela disposição em colaborar comigo nas mais diversas ocasiões, ainda, por me possibilitar seguir novos caminhos.

Aos professores da Patologia, Prof. Dr. Adriano Mota Loyola e Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso, pela oportunidade de aprender muito com seus ensinamentos.

Aos professores da Histologia, Profa. Dra. Neide Maria, Profa. Dra. Eloísa Ferro, Prof. Dr. Paulo Rogério, Prof. Dr. Alberto e Profa. Ms. Zenaide pelas orientações e conselhos.

Aos funcionários e colegas da Histologia, agradeço pelo aprendizado e pelos momentos diários de descontração.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Odontologia da UFU.

Aos funcionários da Radioterapia e à Equipe de Física Médica do Hospital do Câncer de Uberlândia.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio pecuniário.

À colega Rafaela Guidi, que iniciou o trabalho e foi fundamental na aquisição dos animais e na parte experimental da radioterapia.

À todos colegas do mestrado e da graduação, em especial, Bárbara, Flaviana, Poliane, Germana, Lara, Mirna, Cizelene, Sérgio, Jonas, Guilherme, Luciana Zaramela, Thaís, Natália e Ana Cristina.

Enfim, a todos que contribuíram na execução deste trabalho.

“A questão fundamental é que temos de nos dar ao trabalho de descobrir o que as pessoas mais valiosas da nossa vida valorizam.”

John C. Maxwell e Les Parrott

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	01
RESUMO	02
ABSTRACT	03
1.INTRODUÇÃO	04
2.REVISÃO DE LITERATURA	06
2.1. RADIAÇÃO IONIZANTE	06
2.2. RADIOTERAPIA	07
2.3. TECIDO ÓSSEO	09
2.4. OSSO IRRADIADO	11
3. PROPOSIÇÃO	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 HISTOMORFOMETRIA	16
4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
5. RESULTADOS	21
6. DISCUSSÃO	23
7. CONCLUSÃO	26
REFERENCIAS	27
ANEXO	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

mm	Milímetros
%	Porcentagem
PBS	Tampão fosfato salina
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
µm	Micrômetros
α	Alfa
x	Vezes
µL	Microlitros
mL	Mililitros
Gy	Gray
cGy	Centigray
INCA	Instituto Nacional de Câncer

Resumo

A radioterapia representa um recurso bem estabelecido para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço, no entanto, nessa região, afeta diretamente o osso, que é submetido a altas doses de radiação durante o tratamento. O tecido ósseo quando irradiado apresenta alterações importantes em sua morfologia e constituição. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da radioterapia no tecido ósseo cortical de tíbia, quantificando matriz óssea e lacunas de osteócitos vazias, além de analisar a microestrutura da rede de canais ósseos. No estudo, foram utilizados 14 coelhos fêmeas, separados em dois grupos iguais: Controle e Teste. O grupo teste recebeu dose única de 15 Gy de radiação cobalto-60 na região da tíbia, bilateralmente. Após 75 dias, os animais foram sacrificados e segmentos de 1 cm da tíbia foram removidos, fixados em formol 10%, desmineralizados em EDTA e processados para inclusão em parafina. Os cortes foram corados em HE e as imagens histológicas foram digitalizadas. As imagens foram analisadas por algoritmos desenvolvidos em ambiente de programação SCILAB. Utilizando o método de segmentação interativa obteve-se a porcentagem de matriz óssea, área e perímetro dos canais ósseos e lacunaridade. Para obtenção da porcentagem de osteócitos e lacunas vazias utilizou-se o método de contagem de elementos. Os resultados mostraram diferença estatística significativa na porcentagem de matriz óssea ($p=0.0003$) entre o grupo não irradiado (96.71%) e irradiado (94.25%). Também, houve diferença significativa nas médias da área ($p=0.0173$) e perímetro ($p=0.0437$) dos canais, e seus respectivos desvios-padrão (Área $p=0.0072$ e Perímetro $p=0.0039$). A lacunaridade também apresentou diferença significativa ($p=0.014$), entre os grupos não irradiado (16.48) e irradiado (13.80). Não houve diferença estatística significativa na porcentagem de lacunas vazias ($p=0.3177$). De acordo com os resultados pode-se concluir que a radioterapia provoca redução da matriz óssea e altera a arquitetura da rede de canais ósseos, tornando-a mais heterogênea e menos organizada.

Palavras-Chave: Osso, Radioterapia, Lacunaridade.

Abstract

Radiotherapy is a well established treatment resource for head and neck cancer, however, can directly affect the bone, which receive high doses of radiation during treatment. The bone tissue when irradiated shows important alterations in their morphology and constitution. The aim of this study was evaluate the effects of radiotherapy in cortical bone of tibia, with quantification of bone matrix and empty osteocytes lacunae, also, with analysis of bone micro-structure. Fourteen female rabbits were used, divided into two equal groups: Control and Test. The test group received single dose of 15 Gy cobalt-60 radiation in tibia, bilaterally. After 75 days the animals were sacrificed and 1 cm segment of the tibia were removed, fixed in 10% formalin, decalcified in EDTA and processed for embedding in paraffin. The sections were stained with HE and histologic images were digitized. Images were analyzed through developed algorithms, using SCILAB mathematical environment. Using interactive segmentation was obtained the percentage of bone matrix, area and perimeter of the bone channels and lacunarity. For the percentage of osteocytes and empty lacunae, we used the method of elements counting. The results showed significant difference in percentage of bone by area ($p = 0.0003$) between the control (96.71%) and irradiated (94.25%) groups. Also, there was significant difference in area ($p = 0.0173$) and perimeter ($p = 0.0437$) of the channels and their respective standard deviations (area and perimeter $p = 0.0072$ $p = 0.0039$). The lacunarity also showed significant difference ($p = 0.014$) among the control (16.48) and irradiated (13.80) groups. There was no significant difference in percentage of empty osteocyte lacunae ($p = 0.3177$). According to results of this study, the radiotherapy causes reduction of bone matrix and modifies the architecture of bone channels network, making it more heterogeneous and less organized.

Key-words: Bone, Radiotherapy, Lacunarity.

1. Introdução

Dentre as doenças que acometem o ser humano as neoplasias malignas são alvo de frequentes estudos pois apresentam prognóstico ruim e têm como formas de tratamento terapias que apresentam efeitos colaterais e sequelas indesejáveis (Frank, 2007).

A radioterapia é uma das terapias de escolha para tratamento do câncer de cabeça e pescoço, sendo que aproximadamente metade dos pacientes com câncer é submetida ao tratamento radioterápico, seja isolado ou associado a outras terapias (Da Cunha *et al.*, 2007a). Este método é capaz de destruir células tumorais, empregando feixe de radiações ionizantes. Uma dose pré-calculada de radiação é aplicada em tempo determinado, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circunvizinhas, à custa das quais se fará a regeneração da área irradiada (INCA).

A resposta dos tecidos à radiação está relacionada à capacidade das próprias células em reparar lesões radioinduzidas. O tecido ósseo, assim como os tecidos muscular e nervoso, são caracterizados como tecidos de resposta lenta à radiação, pois apresentam alterações tardias (Pelisser *et al.*, 2007).

O osso é frequentemente sujeito a altas doses de radiação, seja pela proximidade a um tumor de tecido mole ou pelo fato do paciente apresentar lesões ósseas primárias ou secundárias (Maeda *et al.*, 1988). Como consequência, pode ocorrer desequilíbrio na atividade osteoblástica e osteoclástica, favorecendo a reabsorção óssea (Maeda *et al.*, 1988; Da Cunha *et al.*, 2007a; Pelisser *et al.*, 2007), aumento da lise celular, paralisando a formação de matriz óssea (Da Cunha *et al.*, 2007a) e redução da resistência biomecânica do osso (Maeda *et al.*, 1988).

Alguns estudos relataram aumento de lacunas de osteócito vazias (Pelisser *et al.*, 2007) e redução da quantidade de osteócitos (Maeda *et al.*, 1988). Aghaloo *et al.* (2006) observaram redução na expressão de PDGF, β FGF e TGF β em osso irradiado. A osteogênese e a neovascularização (Muhonen *et al.* 2004), bem como a cicatrização (Schultze-Mosgau *et al.*

2005), também ficam reduzidos após radioterapia. Assim, o tratamento radioterápico traz efeitos colaterais importantes, e dentre esses efeitos a osteorradionecrose definida como necrose isquêmica do osso, que se manifesta de forma precoce ou tardia, é a principal delas (Grimaldi *et al.*, 2005).

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.

2. Revisão da Literatura

O presente estudo investiga os efeitos da radiação no tecido ósseo, assim a revisão da literatura aborda alguns fundamentos relacionados ao objetivo deste trabalho.

2.1 Radiação Ionizante

As radiações ionizantes são eletromagnéticas ou corpusculares e carregam energia, ao interagirem com os tecidos, dão origem à elétrons rápidos que ionizam o meio e criam efeitos químicos como a hidrólise da água e a ruptura das cadeias de DNA (Ácido Desoxirribonucléico). São várias as fontes de energia utilizadas na radioterapia. Há aparelhos que geram radiação a partir de energia elétrica, liberando raios X e elétrons, ou a partir de fontes de isótopo radioativo, como, por exemplo, pastilhas de cobalto, as quais geram raios gama (INCA).

A radiação beta e radiação gama são exemplos de radiação que ocorrem por um processo de ajuste do núcleo; raios X característico, que ocorre por um processo de ajuste na estrutura eletrônica; raios X de freamento, que ocorrem por processo de interação de partículas carregadas com o núcleo; raios delta.

Dentre os mais importantes tipos de geradores de radiação ionizante destacam-se os tubos de raios X, os aceleradores de partícula, os irradiadores com radioisótopos e as fontes de nêutrons. Os dispositivos de irradiadores com radioisótopos mais utilizados na medicina são as bombas de cobalto-60 para teleterapia, as fontes de radiação gama para braquiterapia e os aplicadores oftalmológicos e dermatológicos com emissores beta. Os raios X, raios γ , β^+ e β^- são radiações consideradas de baixo LET (Transferência Linear de Energia) e são também denominadas de indiretamente ionizantes (Tauhata *et al.*, 2003).

As unidades internacionalmente utilizadas para medir a quantidade de radiação são o röntgen (R) e o gray (Gy). O Röntgen é a unidade que mede o número de ionizações desencadeadas no ar ambiental pela passagem de

uma certa quantidade de radiação. Já o Gray expressa a dose de radiação absorvida por qualquer material ou tecido humano. Um Gray corresponde a 100 centigrays (cGy) (INCA).

O processo de ionização, ao alterar os átomos, pode alterar as estruturas das moléculas que os contêm. Se a energia de excitação ultrapassar a energia de ligação entre os átomos pode ocorrer quebra das ligações químicas e conseqüentes mudanças moleculares. Da energia transferida pela radiação ao tecido, metade dela induz excitações, cujas conseqüências são menores que as de ionização. Se as moléculas alteradas compõem uma célula, esta pode sofrer conseqüências de suas alterações, direta ou indiretamente, com a produção de radicais livres, íons e elétrons. Os mais importantes danos celulares são os relacionados à molécula do DNA. Quando a dose de radiação é elevada (vários Gy), muitas células dos tecidos atingidos podem não suportar as transformações e morrem, após tentativas de se dividir. O fato de radiações penetrantes do tipo raios X e gama induzirem danos em profundidades diversas no organismo humano e, com isso, causar a morte de células, pode ser utilizado para a terapia do câncer. Assim, tumores podem ser destruídos ou regredidos sob a ação dos feixes de radiação gama adequadamente aplicados, caracterizando a radioterapia (Tauhata *et al.*, 2003).

2.2 Radioterapia

A radioterapia pode ser indicada, no tratamento anti-neoplásico, de forma exclusiva ou associada à outros métodos terapêuticos. Em combinação com a cirurgia, poderá ser pré-, per- ou pós-operatória. Também pode ser indicada antes, durante ou logo após a quimioterapia. A radioterapia pode ser radical (ou curativa), quando se busca a cura total do tumor; remissiva, quando o objetivo é apenas a redução tumoral; profilática, quando se trata a doença em fase subclínica, isto é, não há volume tumoral presente, mas possíveis células neoplásicas dispersas; paliativa, quando se busca a remissão dos sintomas tais como dor intensa, sangramento e compressão de órgãos; e ablativa, quando se

administra a radiação para suprimir a função de um órgão, como, por exemplo, o ovário, para se obter a castração actínica (INCA).

Contudo, o uso das altas doses de radiação, utilizadas na radioterapia, pode gerar efeitos colaterais indesejáveis, pois a radiação não distingue células tumorais de células saudáveis, por isso, a destruição do tecido saudável limita a ampla capacidade de utilização desta terapia (Da Cunha *et al.*, 2007a).

Existem duas formas básicas de aplicação de radioterapia: teleterapia e braquiterapia. A escolha da radioterapia depende do tipo de câncer e da profundidade em que se encontra o tumor. Na teleterapia, a fonte de radiação é emitida pelo equipamento a uma distância variável de 80 a 100 cm da pele do paciente e é dirigida ao tumor. Os principais aparelhos são os aceleradores lineares e os aparelhos de telecobaltoterapia. Na braquiterapia, o isótopo radioativo emissor de raios gama é colocado em contato direto com o tumor, sendo, muitas vezes, intracavitário ou intersticial (Grimaldi *et al.*, 2005).

Com importante enfoque para o cirurgião dentista, a radioterapia como tratamento para pacientes vítimas de tumores malignos de cabeça e pescoço exibe complicações orais importantes as quais incluem mucosite, xerostomia, cáries, perda do paladar, infecções secundárias, osteorradionecrose e trismo (Almeida *et al.*, 2004). Ainda, outros efeitos adversos já foram relatados, tais como disfagia, odinofagia, fibrose tecidual e doença periodontal. Sabe-se que a abordagem odontológica realizada antes do início da radioterapia resulta em redução dos efeitos colaterais indesejáveis, além de otimização do tratamento e melhora da qualidade de vida dos pacientes (Ghelardi *et al.*, 2008).

A exposição do homem ou parte de seus tecidos à radiação pode ter resultados variados dependendo se ela ocorreu uma única vez, de maneira fracionada ou se periodicamente. Para uma mesma quantidade de radiação, os efeitos biológicos resultantes podem ser muito diferentes. Assim, se ao invés de fracionada, a dose aplicada num paciente em tratamento do câncer, fosse dada uma única vez, a probabilidade de morte seria muito grande (Tauhata *et al.*, 2003).

A dose de radiação administrada em cabeça e pescoço é variada e expressa em cGy, sendo que a unidade de padronização internacional Gray

equivale a 100 rad, ainda, estas doses empregadas para tratamento dos tumores malignos de cabeça e pescoço podem chegar a 7.000 cGy. Casos severos de destruição tecidual, geralmente estão associados a doses maiores que 7.000 cGy, embora 6.000 cGy possam resultar em osteoradionecrose na mandíbula (Grimaldi *et al.*, 2005).

Em estudos experimentais, altas doses de radiação não fracionadas são utilizadas, pois sabe-se que estas desencadeariam mais alterações nos tecidos irradiados. Nos casos de estudos experimentais dos efeitos da radioterapia no tecido ósseo, doses únicas de 15 Gy foram utilizadas por autores como Kudo *et al* (2001), Johnsson *et al* (2000) e Schön *et al* (1996), dose única de 20 Gy por Springer *et al* (2008) e doses únicas que variaram de 10 Gy a 60 Gy usadas no estudo de Nyaruba *et al* (1998). Ainda, Muhonen *et al.* (2004) utilizaram de dose de 22.4 Gy em 4 sessões de 5.6 Gy, onde afirmaram ser biologicamente equivalente a 50 Gy em 25 sessões (frações).

2.3 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é o constituinte principal do esqueleto, fornece suporte a outros tecidos moles e protege órgãos e aloja a medula óssea, formadora de células do sangue. Além destas funções, os ossos funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons. Esse tecido é um tipo especializado de conjuntivo, formado por células que são os osteócitos, osteoblastos e osteoclastos, e também de material extracelular mineralizado, a matriz óssea (Junqueira e Carneiro, 2004).

O tecido ósseo pode apresentar arranjo trabecular delimitando pequenas cavidades, preenchidas por medula óssea, caracterizando o osso esponjoso, ou ser organizado em lamelas paralelas ou concêntricas, formando os sistemas de Havers, e não apresentando cavidades, caracterizando o osso compacto. Estes, apresentam arquitetura macroscópica diferente mas possuem a mesma constituição histológica (Katchburian e Arana Chaves, 2004).

Nos ossos longos, as extremidades são chamadas de epífises, formadas por osso esponjoso e uma delgada camada superficial compacta. Já a parte

central é chamada de diáfise, quase totalmente compacta, com pequena quantidade de osso esponjoso na sua parte profunda. Principalmente nos ossos longos, o osso compacto é também chamado de osso cortical (Junqueira e Carneiro, 2004).

Os ossos são revestidos em suas superfícies por membranas conjuntivas que possuem células osteogênicas, que são o periósteo externamente e o endósteo internamente. A matriz óssea é formada pela parte inorgânica, constituída principalmente de íons cálcio e fosfato, formando cristais com estrutura semelhante à hidroxiapatita, e pela parte orgânica constituída principalmente por fibrilas colágenas tipo I (95%). Quanto às células, têm-se os osteócitos, que ocupam cavidades na matriz óssea, as lacunas, e se comunicam por seus prolongamentos localizados nos canalículos. Estas células são essenciais para manutenção da matriz óssea, e sua morte é seguida por reabsorção da matriz. Já os osteoblastos são as células que sintetizam a parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas) da matriz óssea. Dispõem-se sempre nas superfícies ósseas, lado a lado, num arranjo que lembra um epitélio simples. Ainda, a matriz óssea recém formada, adjacente aos osteoblastos, ainda não calcificada, recebe o nome de osteóide. Por fim, os osteoclastos são células móveis, gigantes, extensamente ramificadas e multinucleadas (contém 6 a 50 ou mais núcleos). A função destas células é destruir o tecido ósseo (Junqueira e Carneiro, 2004).

O sistema de canalículos conecta as lacunas dos osteócitos entre si e os espaços tissulares. O fluido tissular desses espaços se mistura com o dos canalículos, permitindo uma troca metabólica e bioquímica entre a corrente sanguínea e os osteócitos. Esse mecanismo permite que os osteócitos permaneçam vivos, independente da substância intercelular mineralizada que os circunda (Marx e Garg, 1998).

Novas evidências sugerem que os osteócitos, com sua morfologia e localização específica, desempenham importante papel na regulação da atividade das outras células ósseas, incluindo os osteoblastos, osteoclastos e suas células progenitoras (Huang, Chen e Chen, 2008).

Estas células traduzem o movimento do fluido intersticial induzido pela carga mecânica em sinais químicos, como a expressão de óxido nítrico (ON), que alteram o recrutamento de osteoblastos e osteoclastos (Da-Silva *et al.*, 2008).

A adaptação mecânica que acontece no osso é coordenada pelos osteócitos, que respondem a uma carga induzida pela movimentação do fluido intersticial pela rede complexa de canalículos-lacunas produzindo sinais químicos moleculares. A arquitetura e densidade ósseas ideais pode não ser determinada apenas pela intensidade e distribuição fluída pelos espaços causando estímulos, mas também pela mecânorresponsividade dos osteócitos. As células do osso são altamente sensíveis aos estímulos mecânicos, embora os componentes críticos destas cargas produzidas ainda continuam desconhecidos (Klein-Nulend, Bacabac e Mullender, 2005).

Da Fontoura Costa, Viana e Beletti (2006), utilizando de um método de reconstrução tridimensional, mostraram que a estrutura de canais do osso se caracteriza por uma rede complexa, dividida em subcomunidades com várias interligações. Viana *et al.* (2009), utilizando de análise desta rede complexa, mostraram que existe diferença nas comunidades de canais em diferentes lugares no osso, principalmente próximo às protrusões. Esta diferença está relacionada à uma necessidade de uma vascularização mais reforçada característica das áreas de maior stress mecânico.

2.4 Osso Irradiado

A irradiação retarda o crescimento ósseo, sendo a dose de tolerância para cartilagem em crescimento de 10 Gy e para crianças menores de 3 anos de 8 Gy. Dependendo da região irradiada, podem ocorrer alterações como encurtamento dos membros e escolioses. Para o osso maduro a dose de tolerância é de 60 Gy e se a mesma for ultrapassada pode ser observada a radionecrose (Segreto e Segreto, 2000).

O osso submetido à radiação apresenta características histológicas específicas. Da Cunha *et al.* (2007a) descreveram o tecido ósseo pós-

radioterapia com grande quantidade de tecido adiposo na porção medular, com conseqüente diminuição da quantidade de tecido medular. Também, baixo índice de atividade osteoblástica e áreas de reabsorção óssea moderada. Fibras colágenas estavam presentes em 50% dos espécimes avaliados e, após contagem de osteócitos e canais de Havers, observou-se redução em suas quantidades. No entanto, concluíram que a radioterapia determinou diminuição da remodelação óssea, que pôde ser detectada através de análise radiográfica, sobretudo, as diferenças de quantidade de tecido ósseo e diminuição do número de osteócitos e dos canais de Havers não foram estatisticamente significantes.

Pelisser *et al* (2007) utilizando radioterapia por telecobaltoterapia fracionada, com doses de 2 Gy/dia totalizando 60 Gy, observaram aumento no número de osteoplastos, ou seja, lacunas vazias de osteócitos, em tecido ósseo mandibular de ratos e Willey *et al* (2008) demonstraram que uma dose baixa, única, corporal, de 2 Gy, de radiação ionizante em ratos “*in vivo*” teria a capacidade de aumentar significativamente a quantidade de osteoclastos logo após a exposição, ou seja, três dias após a irradiação encontraram aumento na circulação de TRAP-5b, um indicador de reabsorção óssea produzido pelos osteoclastos.

Maeda *et al* (1988) encontraram aumento significativo na porosidade no osso irradiado de tibia de ratos, em estágios mais tardios pós radiação, além de diminuição no número de osteócitos. Seis a dez semanas pós radiação, o processo de “turnover” ósseo começou a normalizar, com atividade osteoclástica a nível da lamina intersticial. Os autores concluíram que, mesmo submetido a pequenas dosagens, a radiação pode causar efeitos variáveis em diferentes tempos pós-radiação, no osso cortical e medular, que afetariam o metabolismo ósseo de formas distintas.

Schön *et al.* (1996) relataram que o osso maduro tende a ser mais radioresistente, enquanto o osso imaturo é extremamente prejudicado pela irradiação. Em estudo experimental, após a instalação dos implantes, o grupo que foi irradiado mostrou, além de atraso na formação óssea, uma quantidade

menor de osso neoformado ao redor do implante quando comparado com grupo controle.

Estudos recentes têm também demonstrado alterações à nível bioquímico/molecular. Aghaloo *et al* (2006) encontraram diminuição da expressão de PDGF, bFGF e TGF- β no osso cortical e medular de tíbia irradiada. Na análise imunoistoquímica, o nível de PDGF foi menor nas células endoteliais que recobrem os canais vasculares do osso cortical e não houve expressão de bFGF nas células endoteliais no osso irradiado. A radiação, de 60 a 70 cGy na tíbia irradiada, revelou marcação reduzida de TGF- β na cortical e medular. Springer *et al* (2008) testaram a hipótese que a aplicação exógena de BMP-2 e -4 (proteína morfogenética do osso) poderia aprimorar o reparo ósseo do osso irradiado, mas observaram que, a aplicação de BMP-2 e bFGF isoladamente resultava em formação óssea previsível na mandíbula irradiada com aposição óssea equivalente ao lado não irradiado e a aplicação dos fatores em conjunto foi até menos eficaz, sendo as possíveis razões para esses achados não esclarecidas.

Nyaruba *et al* (1998), utilizando análise biomecânica em estudo experimental com dose única de radiação gama, relataram que os animais submetidos à radioterapia tiveram a resistência óssea máxima reduzida em 16% quando submetido à dose local de 40 Gy e em 19% quando submetido à dose local de 60 Gy. Ou seja, concluíram que apesar de ainda não ser esclarecido porque a resistência do osso diminui pós radioterapia, este fato pode estar relacionado com a diminuição do conteúdo mineral do osso cortical. Contudo, a dose única de radiação, nos limites do estudo, não foi relacionada com as mudanças do conteúdo mineral do osso cortical.

Da Cunha *et al* (2007a) observaram, através de análise histológica, que as alterações no osso irradiado estão diretamente relacionadas com a diminuição dos osteócitos, dos canais de Havers, da atividade osteoblástica e do aumento de células adiposas na porção medular. Ainda, que os resultados da análise histológica corroboram com os radiográficos, onde pode-se observar menor quantidade de tecido ósseo.

Muhonen *et al.* (2004), utilizando de análise histomorfométrica pós distração osteogênica em mandíbula, encontraram que a osteogênese e a neovascularização pós radioterapia estavam marcadamente diminuídas, quando comparados animais irradiados e não radiados.

Schultze-Mosgau *et al.* (2005), revelaram que pós procedimento de enxerto ósseo em leito receptor previamente irradiado a cicatrização óssea é significativamente diminuída, isto podendo ser devido a indução pela radiação da inibição da BMP2/4 e da expressão de osteocalcina. Observaram também indução de TGF- β e expressão de colágeno tipo I. Os autores relacionaram a inibição da BMP2/4 com a diminuição da cicatrização óssea, visto o importante papel destas proteínas na síntese da matriz óssea.

Os efeitos da radiação no tecido ósseo, apesar de bem descritos, ainda não tem seu mecanismo totalmente esclarecido. Estes efeitos podem alterar propriedades ósseas importantes, como diminuição da vascularização e da resistência biomecânica. Além disso, a regeneração óssea é de grande importância no ramo da odontologia, visto o grande número de procedimentos quem envolvem este tecido.

3. Proposição

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da radioterapia no tecido ósseo cortical de tíbia, quantificando matriz óssea e lacunas de osteócitos vazias, além de analisar a microestrutura da rede de canais ósseos.

4. Material e Métodos

Neste estudo foram utilizados 14 coelhos albinos, fêmeas, da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*), com peso médio de 3,5 Kg e aproximadamente 5 meses de idade. Os animais foram mantidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, em gaiolas individuais para cunicultura e tratados com ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA-UFU) (Anexo).

Os animais foram separados em dois grupos: Controle e Teste. O grupo teste recebeu dose única de 15 Gy de radiação cobalto-60 na região da tíbia, bilateralmente. Para irradiação, a distância foco/pele foi de 80 cm com o rendimento do aparelho a 110,73 cGy/min, sendo todo o processo realizado em sala baritada do Hospital do Câncer (HC – UFU), com toda a estrutura para evitar a contaminação das pessoas envolvidas. O método utilizado foi a telecobaltoterapia (Co^{60} , AECL MEDICAL, Modelo Phoenix, Kanata, Ontario, Canada).

Após 75 dias, os animais foram sacrificados utilizando injeção intravenosa de aproximadamente 5 ml de thiopental seguido por infusão também intravenosa de 5 ml de solução de cloreto de potássio a 19,1%. Em cada animal, foi removido segmento de 1 cm de cada tíbia, utilizando brocas 702 em alta rotação, sob irrigação com soro fisiológico. Os fragmentos foram fixados em formol 10% por 72 horas, descalcificados com solução de EDTA à 4,13% pH 7,4 por 4 meses, e então processados para inclusão em parafina pela técnica convencional. De cada bloco, foram obtidos 3 cortes semi-seriados de 5 μm de espessura e estes foram corados em Hematoxilina e Eosina (HE) e posteriormente analisados ao Microscópio de Luz.

4.1 Histomorfometria

Os cortes histológicos foram capturados em microscópio binocular Olympus BX 40, acoplado a câmera Olympus OLY 200 ligada a computador PC através de placa Digitalizadora Data Translation 3153, utilizando o Programa HL Image 97++. Em cada corte, na região medial/lateral e cranial/caudal, foi capturada uma imagem com objetiva de 10X e quatro com objetiva de 40X, conforme esquema (Figura 1).

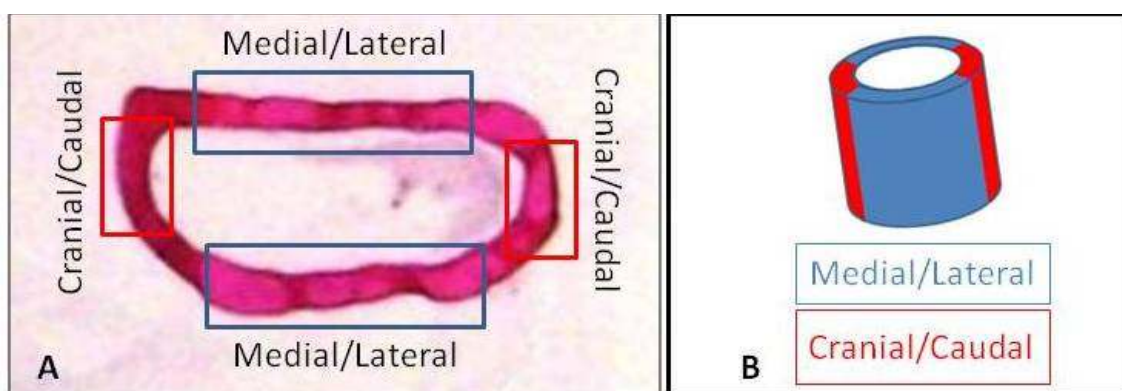


Figura 1 – Esquema para captura de imagens mostrando as áreas analisadas. A) Corte histológico transversal da tíbia em vista panorâmica. B) Desenho esquemático da tíbia: as áreas delimitadas em azul correspondem às faces medial e lateral e em vermelho às faces cranial e caudal da tíbia.

As imagens digitalizadas, capturadas com lente objetiva de 10X, totalizaram 168 figuras e foram submetidas ao processo de segmentação interativa (Oliveira *et al.* 2006) (Figura 2). Utilizando o Programa JASC Paint Shop Pro 8, foram selecionadas e subtraídas as áreas de interesse (ROIs), que correspondiam às regiões de canais vasculares e possíveis áreas de reabsorção. As imagens segmentadas foram transferidas para escala de cinza e utilizando ambiente de programação SCILAB foram obtidas imagens binárias. Nestas imagens as regiões de matriz óssea mostravam-se negras e as regiões de canais ósseos e áreas de reabsorção mostravam-se brancas e foram denominadas Regiões de Interesse (ROI). Por meio de algoritmos desenvolvidos em ambiente de programação SCILAB, obteve-se: porcentagem

de matriz óssea por área, área e perímetro das ROIs e seus respectivos desvios-padrão e 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).

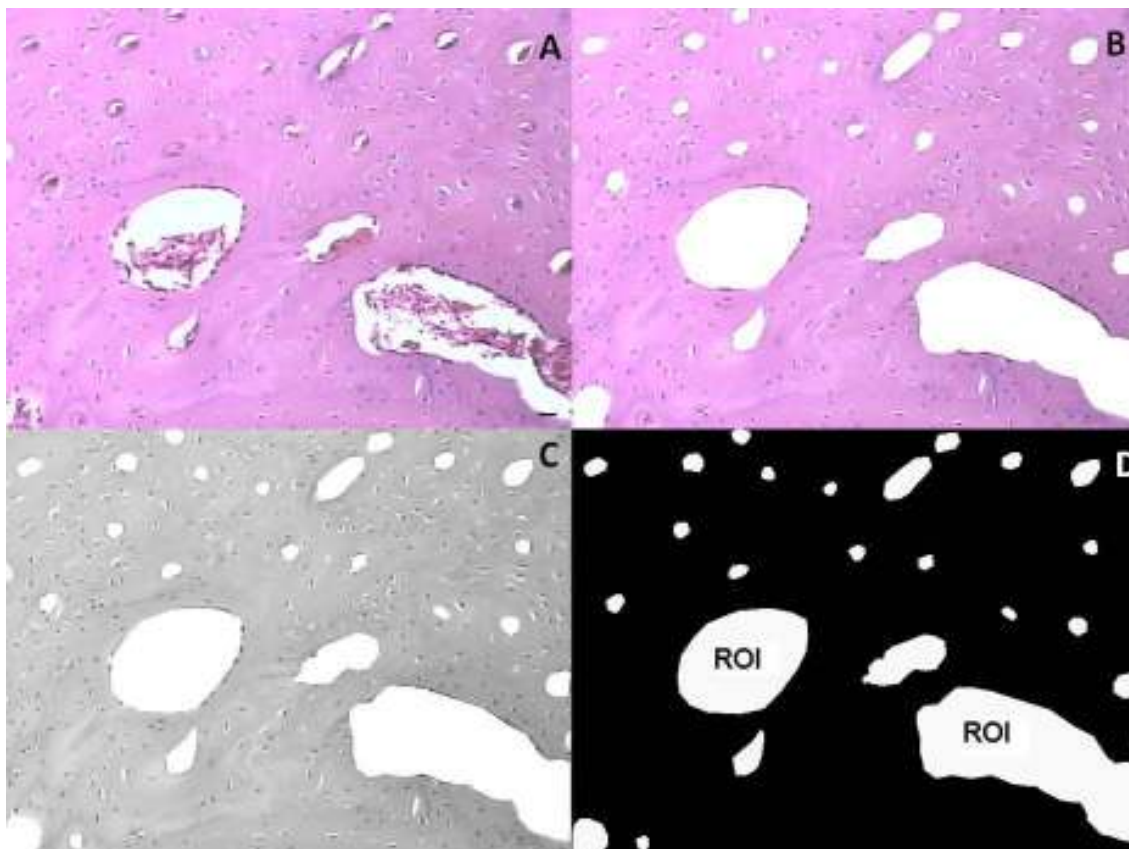


Figura 2 - A) Imagem capturada utilizando o Programa HL Image. Hematoxilina e Eosina (Barra = 50 μ m - Ampliação Original 10X). B) Delimitação e subtração das áreas selecionadas. C) Imagem segmentada e convertida para escala de cinza. D) Imagem binária obtida utilizando ambiente de programação SCILAB.

As imagens digitalizadas, capturadas com a lente objetiva de 40X (Figura 3), totalizaram 672 e foram utilizadas para contagem dos osteócitos e lacunas vazias. As imagens foram inseridas no *software* ImageJ (ImageJ 1.40g, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) e a ferramenta *cell counter* foi selecionada para marcação (Figura 4). Os valores numéricos obtidos foram anotados em tabelas e depois foi feita a comparação entre os grupos considerando a porcentagem frente ao valor total de elementos.

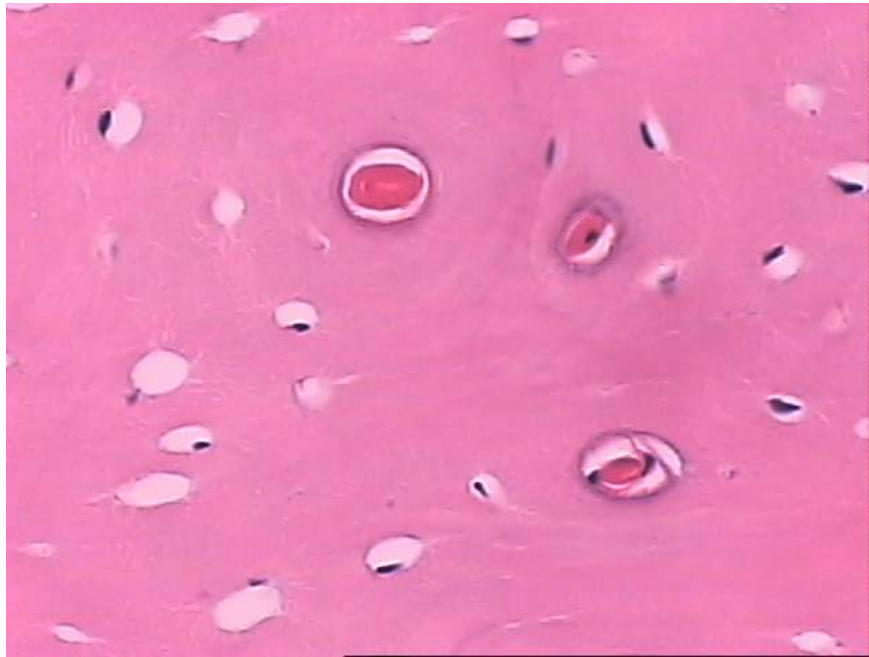


Figura 3 – Imagem capturada utilizando o Programa HL Image. Hematoxilina e Eosina. Ampliação original 40X.

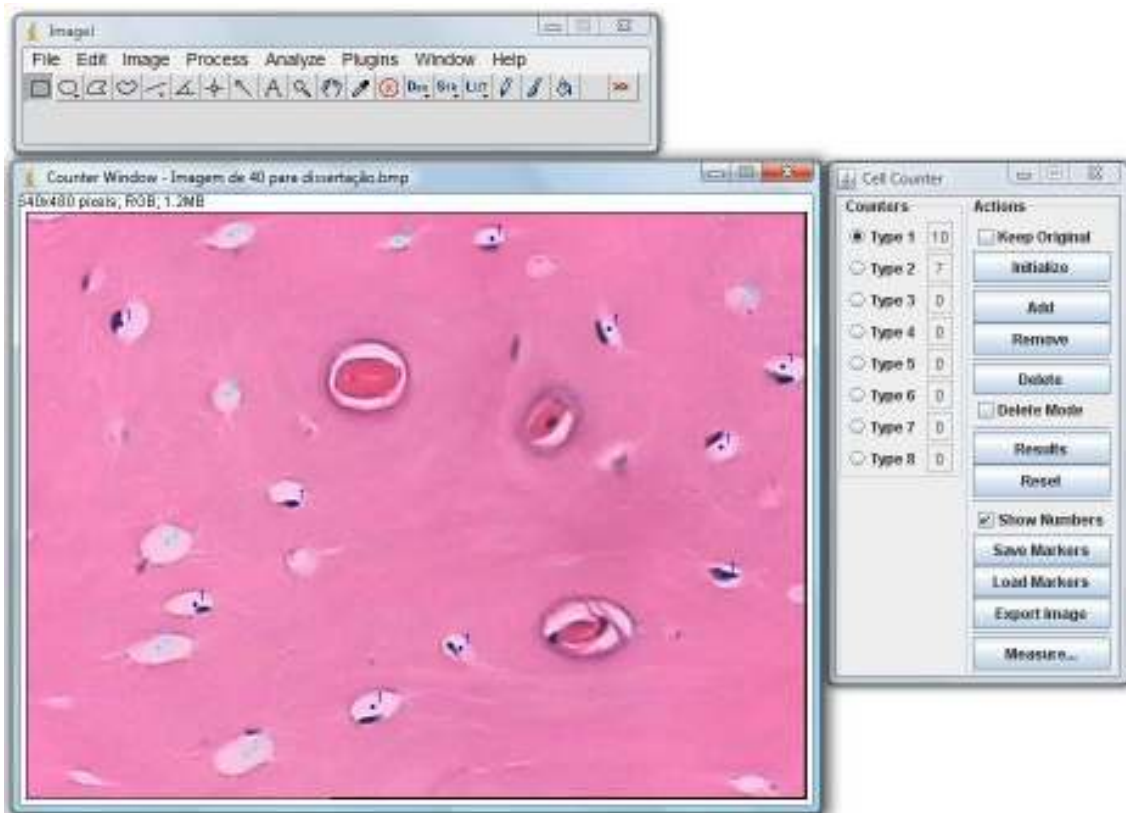


Figura 4 – Imagem no *software* ImageJ, ferramenta *cell counter*, marcando osteócitos e lacunas vazias.

4.2 Análise Estatística

Os valores de porcentagem de matriz óssea, área, perímetro, seus respectivos desvios-padrão e lacunaridade foram submetidos aos testes Kolmogorov-Smirnov e Mann Whitney. A porcentagem de lacunas de osteócitos vazias foi analisada pelos testes Kolmogorov-Smirnov e Teste t Não Pareado.

5. Resultados

A análise histológica mostrou nos dois grupos (irradiado e não irradiado) presença de osso cortical lamelar, com sistemas de Havers, característico da região de diáfise de tíbia. Também foram observados osteócitos e lacunas vazias, incluídas na matriz óssea. Nos dois grupos foram observadas linhas basofílicas que indicam processo de remodelação (Figuras 5 e 6).

A comparação entre áreas medial/lateral e cranial/caudal no mesmo espécime (tíbia) não mostrou diferença estatística significativa na área de matriz óssea (grupo irradiado: $p = 0.1025$ e grupo não irradiado: $p = 0.2428$) e na lacunaridade (grupo irradiado: $p = 0.6258$ e grupo não irradiado: $p = 0.6048$).

A comparação entre grupos mostrou diferença significativa na porcentagem de matriz óssea ($p = 0.0003$) entre os grupos não irradiado (96.71%) e irradiado (94.25%). Também houve diferença estatística significativa na área de canais ósseos (irradiado = 535.8; não irradiado = 310.8; $p=0.0173$), no perímetro dos canais (irradiado = 97.74; não irradiado = 88.08; $p=0.0437$) e na lacunaridade ($p=0.014$), sendo no grupo não irradiado de 16.48 e no grupo irradiado de 13.80. Não houve diferença estatística significativa na porcentagem de lacunas vazias ($p = 0.3177$) entre os grupos, sendo médias de 22.23% no grupo não irradiado e 20.60% no grupo irradiado (Tabela 1).

Tabela 1 – Porcentagem de Matriz Óssea, Área e Perímetro das ROIs e respectivos Desvios- Padrão (DP), Lacunaridade e Lacunas Vazias de Osteócitos.

Grupos	Matriz Óssea (%)	Área das ROIs	DP da Área das ROIs	Perímetro das ROIs	DP do Perímetro das ROIs	Lacunaridade	Lacunas Vazias de osteócitos (%)
Irradiado	94.25	535.8	1245	97.74	69.34	13.80	20.60
Não Irradiado	96.71	310.8	311.4	88.08	43.20	16.48	22.23
p	0.0003*	0.0173*	0.0072*	0.0437*	0.0039*	0.014*	0.3177

* Diferença estatística significativa ($p < 0.05$).

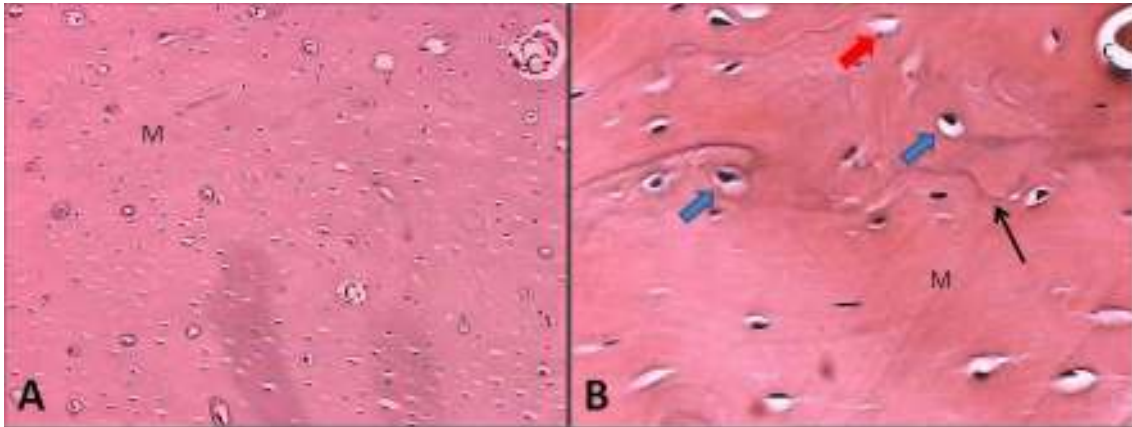


Figura 5 – Fotomicrografia da cortical da tíbia do grupo controle (não irradiado). A) Distribuição dos canais ósseos (ROIs). Matriz (M). Canais ósseos(C). Ampliação Original de 10X (HE). B) Distribuição de osteócitos e lacunas vazias na matriz. Matriz (M). Canais ósseos(C). Linhas Basofílicas(→). Osteócitos(→). Lacunas Vazias. (→) Ampliação Original de 40X (HE).

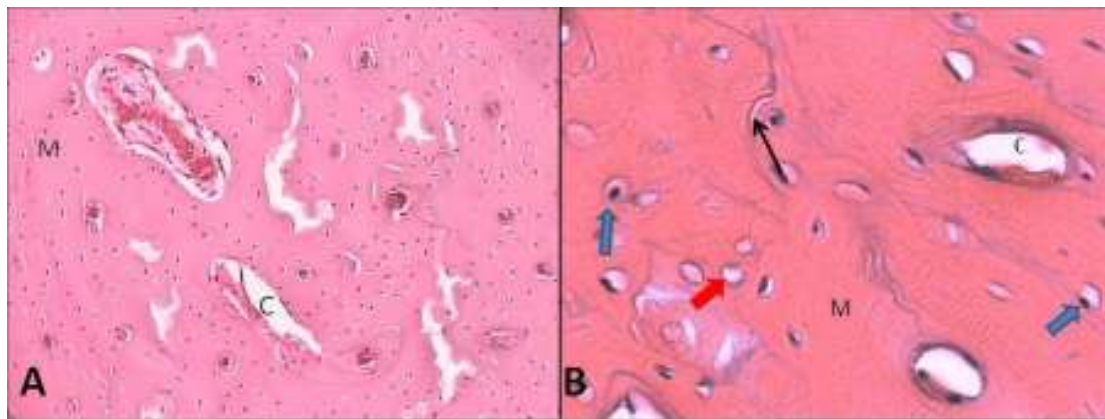


Figura 6 – Fotomicrografia da cortical da tíbia do grupo teste (irradiado). A) Distribuição dos canais ósseos (ROIs). Canais ósseos (C). Ampliação Original de 10X (HE). B) Distribuição de osteócitos e lacunas vazias na matriz. Matriz(M). Canais ósseos (C). Linhas Basofílicas (→). Osteócitos (→). Lacunas Vazias(→). Ampliação Original de 40X (HE).

6. Discussão

A radioterapia é um método de terapia que busca a erradicação das células tumorais, no entanto, não existe restrição apenas a células neoplásicas, atingindo também os tecidos sadios incluídos no campo da radiação. Estudos sobre os efeitos da radioterapia são cada vez mais frequentes, refletindo a constante preocupação com a reabilitação destes pacientes. Dentre as técnicas de reabilitação, a realização de procedimentos que envolvem processo de reparo ósseo são comuns, como por exemplo, colocação de enxertos particulados ou em bloco ou instalação de implantes osseointegráveis.

Em estudos experimentais, o coelho tem sido amplamente utilizado como modelo animal (Fagundes e Taha, 2004), inclusive para avaliar os efeitos da radioterapia nos tecidos. Este animal apresenta similaridades quanto ao comportamento e resposta biológica, além de apresentar “turnover” ósseo três vezes mais rápido que nos humanos (Johnsson *et al.*, 2000).

A dose de radiação de 15 Gy, utilizada neste estudo, é suficiente para produzir efeitos no tecido ósseo, tais como os também observados por Johnsson *et al.* (2000) e Kudo *et al.* (2001), que encontraram uma inflamação avançada, fibrose, áreas de reabsorção óssea e necrose do osso neoformado em contato com implantes, após radioterapia.

Previamente a análise entre grupos irradiado e não irradiado, procedeu-se comparação entre as áreas medial/lateral e cranial/caudal na mesma tíbia, pois Viana *et al.* (2009) observaram diferença na rede de canais entre as regiões anterior e posterior, sugerindo maior interconectividade dos canais ósseos nas áreas de maior stress mecânico. O presente estudo não encontrou diferença entre as regiões estudadas (medial/lateral e cranial/caudal) provavelmente por estas regiões sofrerem stress mecânico equivalente, ou seja, como as áreas eram capturadas no mesmo corte, entende-se que estavam no mesmo nível.

A menor quantidade de matriz óssea observada no grupo irradiado indica efeitos deletérios tardios da radioterapia, como relatado em outros estudos. Da Cunha *et al.* (2007a), observaram redução na espessura de

pernas de rato irradiadas após 6 semanas, embora não apresentassem outras diferenças significantes, inclusive histológicas. Dados semelhantes também foram encontrados por Kiyohara *et al.* (2003) que relataram reabsorções ósseas nas pernas irradiadas a partir da quarta semana pós tratamento, com afinamento das trabéculas ósseas. Chicarelli *et al.* (2007) observaram que os animais irradiados apresentavam menor densidade óssea e menor quantidade de matriz orgânica aos 7 e 28 dias de reparo pós cirúrgico e que isso ocasionaria um processo de reabsorção mais acelerado na fase final do processo de reparo.

O grupo irradiado apresentou valores de área e perímetro das ROIs maiores, inclusive com diferenças significativas entre os grupos. Os desvios-padrão também apresentaram diferença significativa entre grupos. Não obstante, o valor da média do desvio padrão da área do grupo irradiado foi aproximadamente 4 vezes maior que do grupo não irradiado e a média do desvio padrão do perímetro também foi mais expressivo neste grupo. Estes resultados indicam que os canais ósseos do grupo irradiado apresentavam tamanhos e formas bem heterogêneos.

A lacunaridade representa a homogeneidade de tamanho e forma das ROIs relacionando com a distribuição espacial das mesmas na imagem. Assim, o valor médio encontrado no grupo irradiado foi menor, representando uma morfologia e distribuição dos canais na matriz óssea mais heterogênea, corroborando também com os resultados de área, perímetro e seus respectivos desvios-padrão. O maior valor de lacunaridade encontrado no grupo controle representa uma maior invariância translacional com uma gama ampla de ROIs distribuídas na imagem (Dougherty e Henebry, 2002).

A correlação de todos os dados representa uma descontinuidade no padrão e organização das ROIs no grupo irradiado, o que sugere canais ósseos distribuídos aleatoriamente, com formas e padrões heterogêneos, indicando complexidade e desorganização da rede de canais. Esta desorganização indica que o processo de reparo ósseo ocorrido pós radiação não estabeleceu uma conformidade na estrutura dos canais, característica do

osso não irradiado. Sugere-se que devido à estas mudanças as propriedades biomecânicas do osso fiquem alteradas.

Maeda *et al.* (1988) também observaram aumento na porosidade óssea e diminuição da área cortical pós radiação, em análise histológica, apesar da ausência de alterações macroscópicas. Estas alterações na microestrutura dos canais ósseos podem interferir nas propriedades biomecânicas do osso irradiado, comprometendo a resistência mecânica e conseqüentemente a função óssea.

A contagem de lacunas vazias, que representaria um possível dano celular, não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos. Este fato pode ser devido ao tempo de sacrifício pós radiação ter sido relativamente extenso. Provavelmente em períodos menores de observação, os danos celulares sejam mais representativos, pois com o tempo o tecido estabelece uma condição de retorno à normalidade.

Da Cunha *et al.* (2007a), observaram diminuição no número de osteócitos, embora sem diferença estatística significativa. Pelisser *et al.* (2007), analisando teleterapia fracionada por cobalto-60 em mandíbula de ratos, observou aumento do número de lacunas vazias imediatamente e após 30 dias pós radiação. Maeda *et al.* (1988) encontraram diferença significativa no número de osteócitos apenas no período de duas semanas, sendo não mais diferente nos outros períodos analisados, afirmando que esta alteração faz parte dos efeitos imediatos desta terapia. Da Cunha *et al.* (2007b) encontraram maior número de osteócitos nos grupos irradiados submetidos à sessões de radioterapia concomitantemente à terapia utilizando laser de baixa potência, quando comparados ao grupo que recebeu apenas a radioterapia, o que representaria um efeito bioestimulativo do laser, importante no processo de regeneração. Estes estudos que utilizaram contagem de células, quer osteócitos ou lacunas, não utilizaram para avaliar processo de reparo ou cicatrização, apenas, para avaliar os efeitos diretos da radiação no osso.

Os efeitos da radioterapia na constituição e organização do tecido ósseo já foram demonstrados anteriormente, no entanto, o mecanismo específico destas alterações ainda não está totalmente esclarecido.

7. Conclusão

De acordo com os resultados pode-se concluir que a radioterapia provoca redução da quantidade de matriz óssea e altera a microestrutura da rede de canais ósseos, tornando-a mais heterogênea e menos organizada.

Referências

1. Almeida FCS, Cazal C, Durazzo MD, Ferraz AR, Silva DP. Radioterapia em cabeça e pescoço: efeitos colaterais agudos e crônicos bucais. *Rev Bras Patol Oral*. 2004;3(2):62-9.
2. 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.
3. Chicarelli M, Ramos FM, Manzi FR, Novaes PD, Bóscolo FN, Almeida SM. Effect of gamma rays on the bone repair process in rats with estrogen deficiency. *Braz Oral Res*. 2007;21(1):75-80.
4. Da Cunha SS, Sarmiento VA, Ramalho LMP, Freitas AC, Almeida D, Tavares ME, Souza JC, Veeck EB, da Costa NP. Effects of radiotherapy on bone tissue. *Radiol Bras*. 2007a;40(3):189-92.
5. Da Cunha SS, Sarmiento VA, Ramalho LMP, Almeida D, Veeck EB, da Costa NP, Mattos A, Marques AM, Gerbi M, Freitas AC. Effects of laser therapy on bone tissue submitted to radiotherapy: experimental study in rats. *Photomed Laser Surg*. 2007b;25(3):197-204.
6. Da Fontoura Costa L, Viana MP, Beletti ME. Complex channel networks of bone structure. *Appl. Phys. Lett*. 2006; 88 (033903).
7. Da-Silva VC, Bakker AD, Blaauboer ME, Bacabac RG, Semeins CM, Marcantonio RAC, Klein-Nulend J, Cirelli JA. Efeito de TNF α e IL-1 β na produção de óxido nítrico por osteócitos e osteoblastos induzida por carga mecânica in vitro. *Braz Oral Res*. 2008;22(Suppl. 1):300.
8. Dougherty G, Henebry GM. Lacunarity analysis of spatial pattern in CT images of vertebral trabecular bone for assessing osteoporosis. *Med Eng Phys* 2002;24(2):129-38.
9. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2004;19(1):59-65.

10. Frank SA. Dynamics of Cancer. Incidence, Inheritance and Evolution. Princeton University Press. 2007.
11. Ghelardi IR, Soares Junior LAV, Santos PSS, Teixeira SS, Matsushita CM, Carrillo CM, Antequera R, de Melo Peres MPS. A necessidade da avaliação e tratamento odontológico pré-radioterapia. *Prática Hospitalar*. 2008;AnoX(58):149-51.
12. Grimaldi N, Sarmiento V, Provedel L, Almeida D, Da Cunha S. Dental care in prevention and treatment of osteoradionecrosis: literature review. *Rev Bras Cancerologia*. 2005;51(4):319-24.
13. Huang CP, Chen XM, Chen ZQ. Osteocyte: the impresario in the electrical stimulation for bone fracture healing. *Med Hypotheses*. 2008;70(2):287-90.
14. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Radioterapia – perguntas e respostas. Disponível em: <www.inca.gov.br>. Acesso em 09 de Março de 2009.
15. Johnsson AA, Jacobsson M, Granström G, Johansson CB, Strid K, Turesson I. A microradiographic investigation of cancellous bone healing after irradiation and hyperbaric oxygenation: a rabbit study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2000;48(2):555-63.
16. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara. 2004. 136-53 p.
17. Katchburian E, Arana Chaves V. *Histologia e Embriologia Oral*. Rio de Janeiro: Guanabara. 2004.
18. Kiyohara S, Sakurai T, Kashima I. Early detection of radiation-induced structural changes in rat trabecular bone. *Dentomaxillofac Radiol*. 2003;32(1):30-8.
19. Klein-Nulend J, Bacabac RG, Mullender MG. Mechanobiology of bone tissue. *Pathol Biol (Paris)*. 2005;53(10):576-80.
20. Kudo M, Matsui Y, Ohno K, Michi K. A histomorphometric study of the tissue reaction around hydroxyapatite implants irradiated after placement. *J Oral Maxillofac Surg*. 2001;59(3):293-300.
21. 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.

22. Marx RE, Garg AK. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent.* 1998;7(4):267-76.
23. Muhonen A, Haaparanta M, Grönroos T, Bergman J, Knuuti J, Hinkka S, Happonen RP. 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.
24. Nyaruba MM, Yamamoto I, Kimura H, Morita R. Bone fragility induced by X-ray irradiation in relation to cortical bone-mineral content. *Acta Radiol.* 1998;39(1):43-6.
25. Oliveira RC, Costa LF, Fernandes EA, Alvarenga BO, Matioli SR, Beletti ME. Bone histomorphometry of broilers submitted to different phosphorus sources in growing and finisher rations. *Pesq. agropec. bras.* 2006;41(10):1517-23.
26. Pelisser A, Vier-Pelisser FV, Fontanella VRC, Figueiredo MAZ. Microscopical analysis of fractionated cobalt-60 radiotherapy effects on mandibles of rats. *Radiol Bras.* 2007;40(2):113-8.
27. Schön R, Ohno K, Kudo M, Michi K. Peri-implant tissue reaction in bone irradiated the fifth day after implantation in rabbits: histologic and histomorphometric measurements. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996;11(2):228-38.
28. Schultze-Mosgau S, Lehner B, Rödel F, Wehrhan F, Amann K, Kopp J, Thorwarth M, Nkenke E, Grabenbauer G. 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;61(4):1189-96.
29. Segreto HRC, Segreto RA. Revisão e atualização em radiobiologia. Aspectos celulares, moleculares e clínicos. *A Folha Médica.* 2000;119(4):6-26.
30. Springer IN, Niehoff P, Açil Y, Marget M, Lange A, Warnke PH, Pielenz H, Roldán JC, Wiltfang J. BMP-2 and bFGF in an irradiated bone model. *J Craniomaxillofac Surg.* 2008;36(4):210-7.

31. Tauhata L, Salati IPA, Prinzi RD, Prinzi MARRD. Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos. 5^a Revisão. Agosto/2003. Rio de Janeiro/RJ. IRD/CNEN. 239p.
32. Viana MP, Tanck E, Beletti ME, Costa L da F. Modularity and robustness of bone networks. *Mol Biosyst.* 2009;5(3):255-61.
33. Waldemarin KCA, Beletti ME, Da Fontoura Costa L. Nuclear Morphometry of neoplastic cells as a method for diagnosis of histiocytoma, mastocytoma and transmissible venereal tumor in dogs. *Real-Time Imaging.* 2004;10:197-204.
34. Willey JS, Lloyd SA, Robbins ME, Bourland JD, Smith-Sielicki H, Bowman LC, Norrdin RW, Bateman TA. Early increase in osteoclast number in mice after whole-body irradiation with 2 Gy X rays. *Radiat Res.* 2008;170(3):388-92.

ANEXO



**Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)**

Campus Santa Mônica, Bloco 1J

www.comissoes.propp.ufu.br

Telefone: 3239.4531

PARECER

O projeto com o título “**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO COM O USO DO PRP ASSOCIADO A ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO E AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS NO OSSO EM COELHOS IRRADIADOS E NÃO IRRADIADOS**”, coordenado pela Profa. Dra. Paula Dechichi, com colaboração e execução de Gustavo Davi Rabelo e Guilherme Romano Scartezini, foi submetido ao Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) em formulário próprio para Protocolo de Utilização de Animais e, avaliado segundo as normas éticas orientadoras do Comitê, recebeu parecer de “**APROVADO**”.

Uberlândia, 25/04/2008

Prof. Dr. Alcino Eduardo Bonella,

Coordenador *Pró-tempore* da

Comissão de Ética para Utilização de Animais (CEUA) - UFU