

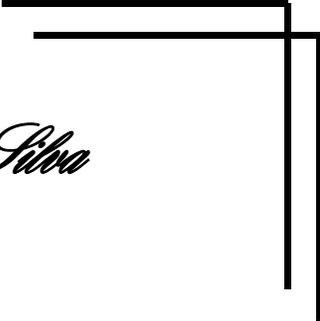
*Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba*

*Mariliani Chicarelli da Silva*

*Efeito da radiação gama no processo  
de reparação óssea em ratas com  
deficiência de estrogênio*

*Tese apresentada à Faculdade de  
Odontologia de Piracicaba – UNICAMP  
como parte dos requisitos para a obtenção do  
Título de Doutorado, Área de Radiologia  
Odontológica, Departamento de Diagnóstico  
Oral.*

*Piracicaba  
2005*



*Mariliani Chicarelli da Silva*

*Efeito da radiação gama no processo  
de reparação óssea em ratas com  
deficiência de estrogênio.*

*Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de  
Piracicaba – UNESP – como parte dos  
requisitos para a obtenção do Título de  
Doutorado, Área de Radiologia Odontológica,  
Departamento de Diagnóstico Oral.*

*Orientadora: Prof.ª. Dra. Solange Maria de Almeida*

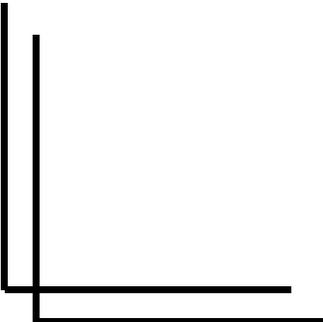
*Banca Examinadora: Prof.ª. Dra. Solange Maria de Almeida*

*Prof.ª. Dra. Gulnara Scak*

*Prof. Dr. Julio Cesar de Melo Castilho*

*Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli*

*Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo*



*Piracicaba*

*2005*

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

Si38e	<p>Silva, Mariliani Chicarelli da. Efeito da radiação gama no processo de reparação óssea em ratas com deficiência de estrogênio. / Mariliani Chicarelli da Silva. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2005.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Solange Maria de Almeida. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p style="text-align: center;">1. Osteoporose. 2. Ovariectomia. 3. Ossos – Defeitos. I. Almeida, Solange Maria. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)</p>
-------	--

Título em inglês: Effect of gama radiation in the process of bone repair in rat with estrogen deficiency

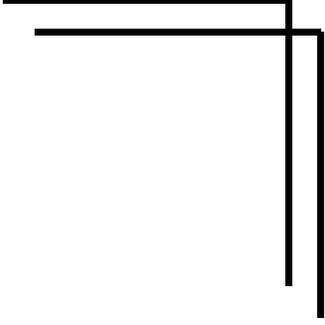
Palavras-chave em inglês (*Keywords*): Osteoporosis; Ovariectomy; Bones - Defects

Área de concentração: Radiologia Odontológica

Titulação: Doutor em Radiologia Odontológica

Banca examinadora: Solange Maria de Almeida; Gulnara Scaf; Júlio Cezar de Melo Castilho; Mário Roberto Vizioli; Frab Norberto Bóscolo

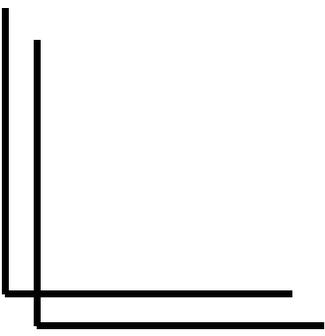
Data da defesa: 18/02/2005

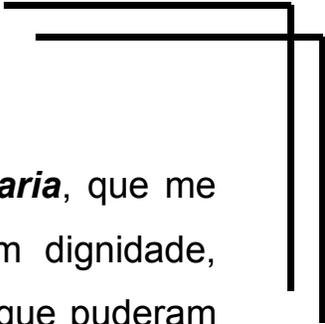


*Dedico este trabalho...*

A **Deus**, por iluminar o meu caminho, andando sempre comigo e muitas vezes me levando em seus braços, não estaria aqui se não estivesse sempre presente.

*“Tudo é possível ao que crê”  
(Jesus Cristo)*





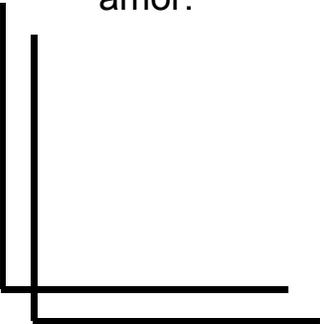
Aos meus pais, **Vanilde e Maria**, que me deram a vida e ensinaram a vivê-la com dignidade, consagrando-me com a luz mais brilhante que puderam encontrar: O estudo. Não foram apenas pais, mas também amigos e companheiros.

Ao meu irmão **Alessandro**, pelo apoio e amizade que nos uni. Sempre compartilhando todos os momentos de minha vida e torcendo para que tudo dê certo.

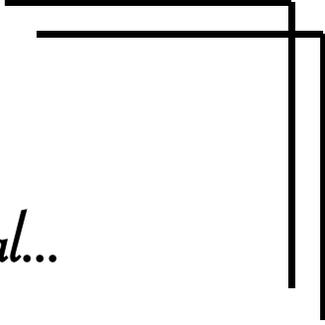
*“A família é o elo mais importante*

*da corrente da vida”*  
*(G.C.Souares)*

Ao meu marido **Rosilei**, que muitas vezes foi força, paciência, compreensão e companheirismo nessa jornada que está marcada pelo estímulo de seu amor.



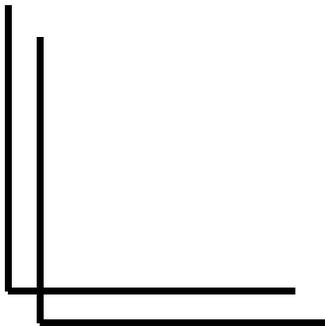
*“O amor tudo sofre, tudo crê, tudo espera,  
tudo suporta”*  
*(1 Co.13.7)*

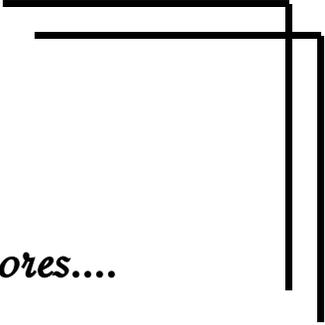


*Agradecimento especial...*

À Professora Doutora **Solange Maria de Almeida**, exemplo a ser seguido como pessoa e profissional, pela orientação, atenção, dedicação, incentivo, competência e acima de tudo amizade, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho. Meu eterno carinho, respeito, admiração e gratidão.

*“Educar é permitir  
que a sabedoria latente da alma  
se manifeste em todos os seres,  
ensinando-lhes a viver”  
(Sônia Café)*





## *Agradecimento aos professores....*

Ao Professor Doutor **Frab Norberto Bóscolo**, pelos ensinamentos, acolhida, disponibilidade e exemplo de docente a ser seguido.

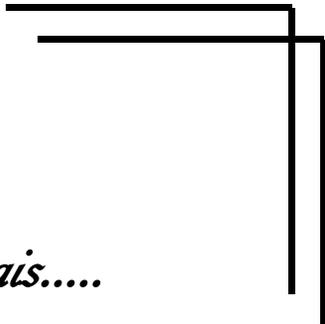
Ao Professor Doutor **Francisco Haiter Neto**, pelos ensinamentos transmitidos, estando sempre disponível nos momentos de dúvidas.

Ao Professor Doutor **Mario Roberto Vizioli**, pessoa boníssima, generosa e acima de tudo mestre no sentido mais amplo da palavra.

Ao Professor Doutor **Pedro Duarte Novaes**, pela colaboração e conselhos valiosos para o desenvolvimento deste trabalho.



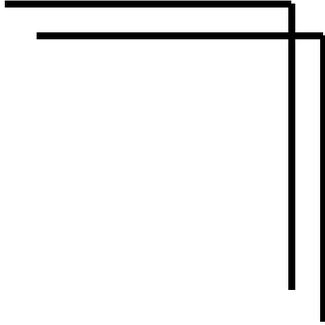
À Professora Doutora **Glaucia Maria Bovi Ambrosano**, pela orientação na escolha e elaboração da análise estatística.



*Agradecimento aos amigos especiais.....*

Aos amigos mais do que especiais, **Flávio Ricardo Manzi, Anna Silvia Rocha e Silvana Pasetto**, pela indispensável colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho, pela cumplicidade, companheirismo e amizade, me ensinando a ter força e acima de tudo fé.

*“Os anjos existem,  
mas algumas vezes não possuem asas  
e passamos a chamá-los de amigos”*



## *Agradecimentos.....*

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela oportunidade de conviver e aprender com tão experientes profissionais.

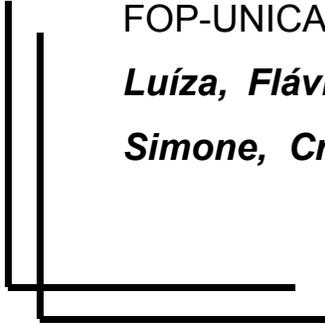
À minha instituição de origem, Universidade Estadual de Maringá-UEM e CESUMAR.

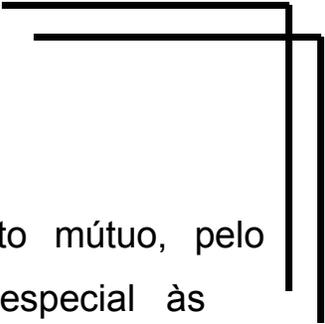
Aos amigos que sempre apoiaram e torceram para que tudo desse certo, **Luciene, Marcia, Raquel, Eduardo e Marly.**

À **Lilian**, colega de trabalho e turma, mas acima de tudo, amiga, no qual sempre me incentivou e auxiliou nesta etapa a ser vencida.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, que me apoiaram e foram exemplo de trabalho em equipe, **Renato, Vilmar, João Miguel e Neli.**

Aos meus estimados colegas alunos e ex-alunos de Pesquisa do Programa de Pós-graduação FOP-UNICAMP, **Luciane, Melissa, Fabrício, Maria Luíza, Flávia Maria, Fábio, Karina, Etienne, Adriana, Simone, Cristiane, Marcelo** e tantos outros que





cruzaram esse caminho de crescimento mútuo, pelo companheirismo e solidariedade. Em especial às amigas e irmãs **Cintia, Silvana, Estela e Mitsue**, pela convivência diária dividindo alegrias e ensinamentos.

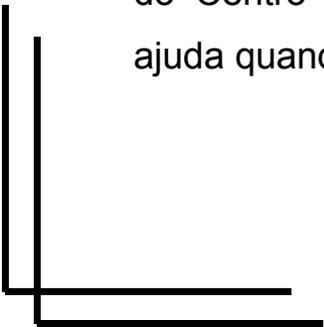
As técnicas do laboratório de Histologia, **Maria Ap.** e **Ivani** e à técnica e bióloga do laboratório de Microscopia Eletrônica, **Eliene**, pelo auxílio e amizade sincera.

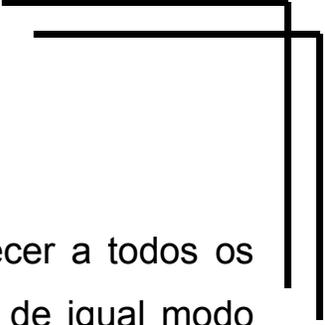
Aos Funcionários da Radiologia, **Waldeck, Roberta** e **Giselda** pela presteza e eficiência com que sempre nos auxiliam.

Ao Departamento de histologia da FOP-UNICAMP por gentilmente cederem seus laboratórios para a realização da parte prática e análises microscópicas.

Aos **Funcionários da Biblioteca** da FOP-UNICAMP, pela orientação e cooperação.

Ao Físico, **José Renato de Oliveira Rocha**, do Centro de Engenharia Biomédica, pela imensurável ajuda quando da irradiação dos animais.

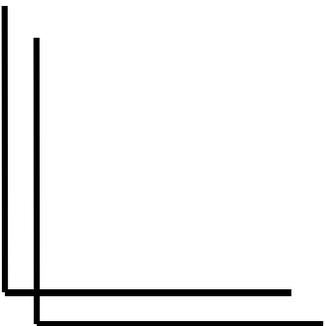




Impossível é deixar de agradecer a todos os que, de maneira direta ou indireta, foram de igual modo importantes, contribuindo com um sorriso, um olhar amigo, uma palavra de estímulo, mas que indubitavelmente, propiciaram-me condições de prosseguir e concluir este trabalho.

*A Deus, sempre presente.*

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação,  
abraçar a vida e viver com paixão, perder com  
classe e vencer com ousadia, pois o  
triunfo pertence a quem se atreve...  
e a vida é muito para ser insignificante”.*  
*(Charles Chaplin)*



# *Sumário*

Resumo	1
Abstract	3
1 Introdução	5
2 Revisão da Literatura	8
3 Proposição	48
4 Material e Métodos	49
5 Resultados	66
6 Discussão	101
7 Conclusão	115
Referência	116
Anexo	126

## *Resumo*

*S*endo a osteoporose uma condição que acarreta fragilidade óssea e a radiação ionizante dificuldades no processo de reparação, o experimento foi idealizado com a finalidade de verificar-se o efeito da associação da deficiência de estrogênio e da radiação ionizante no processo de reparação óssea. *Rattus Norvegicus Albinus Wistar*, compuseram 4 grupos experimentais: controle, ovariectomizado, irradiado e ovariectomizado/irradiado, cuja deficiência de estrogênio foi induzida através da ovariectomia. Após a comprovação da deficiência de estrogênio, nos grupos ovariectomizados, todos os grupos de animais foram submetidos à confecção de defeito ósseo em suas tíbias. Os

grupos irradiado e ovariectomizado/irradiado tiveram irradiados os membros inferiores com 8 Gy de radiação gama, após 3 dias do procedimento cirúrgico. Transcorrido 7, 14, 21, 28 e 45 dias, o processo de reparação óssea foi avaliado, utilizando-se para a avaliação morfológica a Hematoxilina-Eosina e o Tricrômico de Mallory. Também foram realizadas a análise da birrefringência (coloração com Picrosírius); a análise da densidade volumétrica (coloração com Hematoxilina-Eosina) e a análise ultra-estrutural (Microscopia Eletrônica de Varredura). Os resultados encontrados indicaram que houve atraso do processo de reparação, no grupo ovariectomizado/irradiado, no qual a associação da deficiência de estrogênio e radiação ionizante acarretou uma diminuição na produção de osso neoformado e acelerou o processo de reabsorção.

## *Abstract*

*A*s osteoporosis is a condition that causes bone fragility and ionization radiation makes the repair process difficult, the experiment was carried out to check the effect of the association of estrogen deficiency and ionization radiation on the bone repair process. The 4 experimental groups of female Wistar rats were subjected to the following conditions: control, ovariectomized, irradiated and ovariectomized/irradiated, with estrogen deficiency being induced through ovariectomy. After estrogen deficiency was confirmed, all the animals in the ovariectomized groups had a bone defect made in their tibias. The irradiated groups and ovariectomized/irradiated had their inferior members irradiated with 8 Gy of gama radiation 3 days after the surgical procedure. After 7, 14, 21, 28 and 45 days had elapsed, the bone repair process was evaluated, Hematoxylin-Eosin and Mallory's Tricomoc being used for the morphologic evaluation. The following

analyses were also carried out: birefringence analysis (Picrosirius Stain); the volumetrical density analysis (hematoxylin-eosin stain) and the ultra-structural analysis (Electronic Scanning Microscopy). The results found indicated that there was delay in the repair process in the ovariectomized/irradiated group, in which the association of the estrogen deficiency and ionization radiation caused a decrease in the production of neo- formed bone and accelerated the reabsorption process.

# *1 Introdução*

O esqueleto é um órgão metabolicamente ativo, que inicia sua formação na idade fetal e sofre contínuo remodelamento no decorrer da vida, a fim de manter a integridade estrutural e a homeostasia.

O remodelamento ósseo, caracterizado por um processo de reabsorção de osso antigo e de deposição de osso novo, parece ser um mecanismo necessário para manter o esqueleto “jovem”. O ciclo de remodelamento é iniciado pela reabsorção de tecido ósseo já existente, terminando com a mineralização da matriz óssea depositada.

Durante os processos que envolvem formação e reabsorção óssea, como por exemplo, o remodelamento e a reparação, a complexa série de passos seqüenciais, é altamente regulada e dependente de fatores intrínsecos locais, como as citocinas e as prostaglandinas; e de fatores intrínsecos sistêmicos, como hormônios paratireoidianos, calcitonina, androgênio, hormônio do crescimento,

hormônio tireoidiano e estrogênio. Portanto, a medida em que ocorre o envelhecimento do indivíduo, há uma alteração progressiva na sinalização dos processos de reabsorção e formação óssea, ocorrendo em muitos casos, um aumento no processo de reabsorção em detrimento ao processo de formação.

Como citado, um dos fatores sistêmicos envolvidos no processo de remodelamento ósseo, sendo responsável pelo equilíbrio entre reabsorção e formação óssea, é o estrogênio. Este constitui, provavelmente, um dos hormônios mais importantes, uma vez que a queda na sua produção levará a um desequilíbrio no remodelamento ósseo, decorrente de um aumento do processo de reabsorção e diminuição da formação, o que leva a uma diminuição da massa óssea, tendo como consequência o aparecimento da osteoporose. O nível de estrogênio decai fisiologicamente com o avanço da idade, sendo assim, a osteoporose tem como principal alvo indivíduos idosos, principalmente as mulheres, que após a menopausa tornam-se comprovadamente deficientes em estrogênio.

Frost, em 1997, definiu osteoporose verdadeira como sendo a condição no qual a fragilidade do osso aumenta a tal ponto, que atividades físicas normais podem causar fraturas espontâneas e/ou a chamada “Síndrome da Dor no Osso”, afetando principalmente a coluna vertebral.

Vários tipos de lesões malignas têm como principal terapêutica a associação de procedimentos cirúrgicos e radioterápicos. Indivíduos idosos também estão sujeitos a sofrerem de cânceres que necessitam deste protocolo de tratamento. Além disso, mulheres podem além da menopausa fisiológica, estarem sujeitas a uma menopausa precoce, quando submetidas a tratamentos quimioterápicos ou quando têm seus ovários excisionados como forma de tratamento para câncer. O surgimento da menopausa, portanto, torna-se preocupante quando diante de condições, onde há necessidade de cirurgia, uma vez que o tecido ósseo encontra-se deficiente em relação ao seu remodelamento.

Quando se leva em consideração o fator radiação, já é bem conhecido o seu efeito deletério no processo de reparo de tecido mole e tecido duro. O desenvolvimento de osteorradionecrose em regiões adjacentes às áreas que receberam tratamento com altas doses de radiação, é a complicação pós-irradiação mais conhecida.

Portanto, uma vez que a osteoporose ocasiona fragilidade óssea e a radiação ionizante acarreta dificuldades no processo de reparação óssea, este experimento foi idealizado com a finalidade de avaliar o processo de reparo, diante de uma situação em que se tem a associação entre deficiência de estrogênio e irradiação.

## *2 Revisão da literatura*

A revisão da literatura será referida em tópicos, estabelecendo desta forma uma divisão entre os temas a serem discutidos.

### *1 Tecido ósseo*

A estrutura óssea é um tecido vivo, que serve de suporte estrutural para o organismo e reservatório de diversas moléculas orgânicas e inorgânicas, tendo

grande capacidade de renovação, a fim de responder às necessidades metabólicas e manter o nível sérico de cálcio estável, no qual este cálcio é essencial para o suporte funcional da vida, participando de várias reações orgânicas.

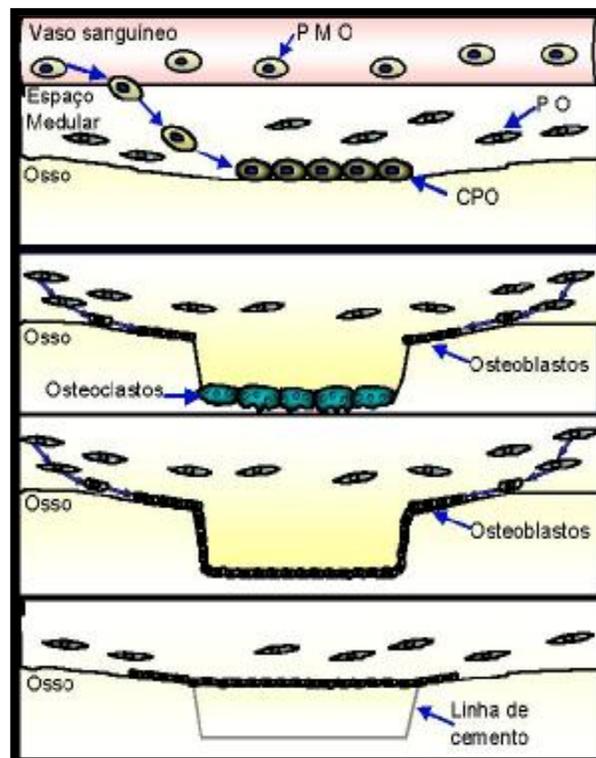
Para se manter a estrutura óssea íntegra, deve haver uma quantidade suficiente de proteínas e minerais, além da presença de três tipos de células, sendo elas os osteoblastos, que estão relacionados com a osteogênese, os osteócitos que são osteoblastos presos na matriz secretada; e os osteoclastos que são responsáveis pela reabsorção óssea (Guyton, 1997). Este mecanismo de renovação de tecido ósseo é chamado remodelamento.

## *1.1 Remodelamento ósseo*

Embora os eventos celulares e moleculares responsáveis pela formação óssea durante a embriogênese, o remodelamento ósseo e a reparação óssea sejam aparentemente idênticos, há uma série de eventos complexos, responsáveis por passos específicos, quanto à fatores histológicos, funcionais e fisiológicos. Porém, todos eles se originam de uma célula progenitora comum, conhecida como célula mesenquimal primitiva. Por meio dela, há diferenciação destas em células mesenquimais, que formarão os ossos, as cartilagens, os tendões, os músculos, os ligamentos e o estroma medular, sendo que esta diferenciação sofre influência de fatores de crescimento específicos e/ou citocinas (Bruder et al. 1994).

Como o esqueleto é um órgão metabolicamente ativo, após a formação óssea, ele sofre contínuo remodelamento ao longo da vida, havendo uma sucessiva deposição óssea pelos osteoblastos e absorção por osteoclastos ativos. Segundo Guyton (1997), estas células são formadas na seguinte seqüência:

primeiro as células mesenquimais primitivas, derivadas da medula óssea ou do tecido fibroso do periósteo, originam os osteoclastos, que secretam dois tipos de substâncias: (1) enzima proteolítica que digere ou dissolve a matriz orgânica do osso, e (2) vários ácidos, incluindo o ácido cítrico e o ácido láctico, que provocam a solubilização dos sais ósseos, na verdade, eles fazem furos no osso em grandes áreas. Geralmente os osteoclastos existem em grandes massas e uma vez que uma massa de osteoclasto começa a se desenvolver, provoca absorção óssea “cavando” um túnel que pode apresentar o diâmetro de até 1 mm, no qual a permanência dos osteoclastos é de algumas horas à vários dias, dependendo do estímulo recebido (ex. paratormônio e estrogênio). Cessado o estímulo, ligam-se a esta superfície reabsorvida os osteoblastos, que secretam colágeno e substância fundamental. Inicia-se assim a deposição de novo osso (Guyton, 1997) (Figura 1).



**Figura 1 - Seqüência de remodelamento**

Sendo o esqueleto um órgão metabolicamente ativo, durante toda a vida há o remodelamento ósseo, envolvendo passos seqüenciais altamente regulados. Raisz, em 1999, discutiu a fisiologia e a patofisiologia do remodelamento ósseo e dentre as patofisiologias, a osteoporose, no qual chegou a algumas conclusões, dentre elas que a interação entre fatores sistêmicos e locais são importantes na patogênese da osteoporose, bem como a ocorrência de mudança esquelética em hiperparatireoidismo e hipertireoidismo.

Em 2003, Teitelbaum & Ross fizeram uma revisão de literatura sobre a regulação genética dos osteoclastos, seu desenvolvimento e função e concluíram que os osteoclastos são as principais, se não as únicas células responsáveis pela reabsorção óssea, no qual sua atividade tem profundo impacto na saúde do esqueleto, estando relacionada com o aparecimento da osteoporose.

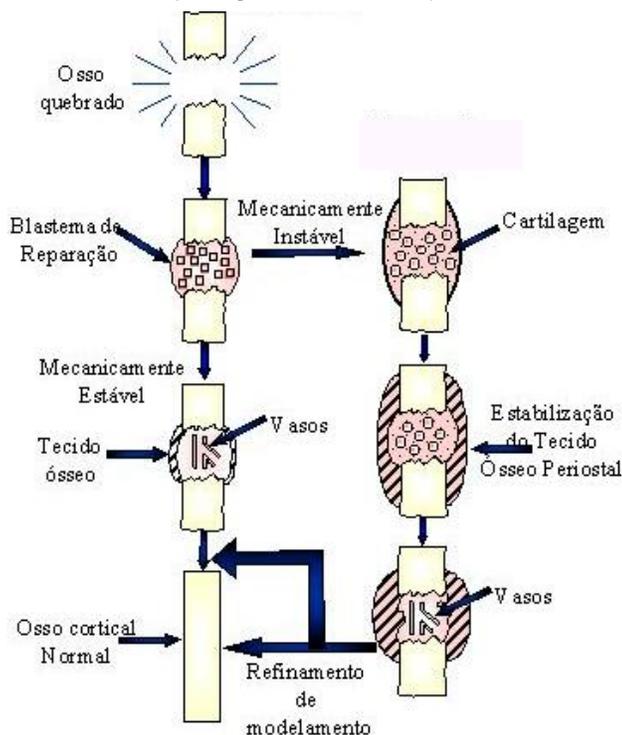
Ainda em 2003, Sasaki, baseado em seus recentes estudos ultra-estruturais e imunocitoquímicos, discutiu a diferenciação e a função dos osteoclastos, bem como o seu papel na reabsorção de tecidos mineralizados. Verificou que os osteoclastos são derivados de precursores hematopoiéticos e de unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos, sendo as principais células diretamente responsáveis pela reabsorção óssea. Sua diferenciação e função são reguladas por vários fatores derivados de osteoblastos, tais como osteoprotegerina, que é um membro da família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNF), que regula negativamente a osteoclastogênese. A deficiência de osteoprotegerina resulta em severa osteoporose em humanos e animais.

## *1.2 Reparação óssea*

Quando injúrias acontecem no tecido ósseo, ocorre a reparação, que passa a ser influenciada tanto por fatores locais, como citocinas, prostaglandinas e

fatores de crescimento, quanto por fatores sistêmicos, como mudanças nos hormônios paratireoidianos, calcitonina e estrogênio (Raisz, 1999).

O processo de reparação envolve uma série complexa de eventos, porém o mecanismo básico seria que após a fratura de um osso longo, um grupo de células, contendo células mesenquimais primitivas, migram para o sítio de fratura a fim de formar o blastema de reparação. Se a fratura permanecer sem estabilização, essas células mesenquimais primitivas, geralmente se diferenciarão dentro da cartilagem. A formação de osso periosteal proporcionará uma ponte óssea para fornecer estabilidade e resultar em vascularização. Sob estas condições, a cartilagem hipertrofia, sendo substituída por medula e eventualmente por osso. Se a fratura for mecanicamente estabilizada, o blastema de reparação pode ser coberto por vasos e as células mesenquimais primitivas diferenciam-se diretamente dentro do osso, estabelecendo a reparação da fratura (Bruder *et al.*, 1994) (Figura 2).



**Figura 2** - Processo de reparação de fratura mecanicamente estável e instável.

Em 1974, Vizioli *et al.* com o objetivo de estudar o aparecimento de trabéculas e seu desenvolvimento durante o decorrer do processo de reparação alveolar após extração dentária, realizaram a exodontia dos primeiros e terceiros pré-molares de macacos, no qual os animais foram sacrificados aos 3, 5, 7, 11, 16, 23, 31, 42, 56 e 75 dias pós-exodontia. Sobre análise microscópica, puderam concluir que o epitélio superficial da ferida alveolar está completo cerca de 2 semanas após extração dentária.

Valdrighi *et al.*, também em 1974, descreveram a seqüência de mudanças que ocorrem em condições normais nos alvéolos durante a reparação e deram atenção especial para os eventos da membrana periodontal e mudanças do remodelamento nas paredes do espaço alveolar do osso, sendo extraído os primeiros e terceiros pré-molares direitos e os animais sacrificados nos dias 1, 3, 5, 7, 11, 16, 23, 31, 42 e 56 pós exodontia. As peças foram examinadas opor meio de técnica histológica usual, obtidas em direção mesiodistal e bucolingual. Concluíram que a membrana periodontal remanescente, tem um importante papel na organização do coágulo sangüíneo e que o início da ossificação ocorre aos 11 dias, continuando até os 56 dias.

Mcinnis *et al.* (1980), avaliaram o relacionamento do fluxo sangüíneo ósseo, deposição óssea e nova formação óssea endosteal. Defeitos bilaterais de 4,4mm X 11mm foram feitos no terço distal de tíbias de oito cães e unilateralmente em quatro cães. O fluxo sangüíneo foi medido por desgaste I-Ap, a deposição de elemento traço Sr 85 foi determinada e a extração de Sr85 e sacarina {C14} foi medida pela técnica indicadora de diluição. A formação de novo osso endosteal foi determinada por um método microrradiográfico tetraciclina-combinado. Houve uma significativa correlação entre fluxo sangüíneo determinado por desgaste (I-Ap determinado sobre a área de cicatrização óssea) e nova formação de osso endosteal, expresso como relacionamentos da área de novo osso endosteal na área total cercada pelo defeito e a cavidade medular da tíbia. Essa porcentagem

variou de 12% a 62% e estava diretamente relacionada ao fluxo sanguíneo ósseo. Isso sugere que o aumento no fluxo sanguíneo no novo osso pode ser secundário a demanda metabólica aumentada.

Carvalho *et al.* em 1997, realizaram um trabalho a fim de quantificar o período de tempo da reparação dental na região periapical, meio e terço cervical do alvéolo de ratos normais, usando um método esteriológico padrão simples. Os autores utilizaram ratos que tiveram seus incisivos extraídos, sendo após 1, 2, 3 e 6 semanas mortos por decapitação e o processo de reparação quantificado. Os dados histométricos mostraram que a neoformação estende-se além de 3 semana pós-operatória.

O mecanismo de reparação óssea foi revisado por Probst & Spiegel em 1997. Segundo os autores, a extensão da formação do calo ósseo em torno de uma fratura óssea depende da rigidez da estabilização da fratura. O mecanismo que converte o estímulo mecânico na resposta biológica é desconhecido. Com base na literatura existente, atenção tem sido dada para definir um modelo que explique essa transdução mecanobiológica. Uma vez que a integridade do osso é rompida, uma seqüência de eventos celulares e bioquímicos inicia-se induzindo reações inflamatórias. Mensageiros (em geral, metabólitos do coágulo ou sistema complemento, eicosanóides ou fatores de crescimento) são liberados ou ativados. Eles controlam a migração, proliferação e síntese de proteínas celulares que são essenciais para a angiogênese e formação de tecido conjuntivo. O componente chave nessa seqüência inflamatória parece ser o macrófago. Fatores de crescimento (em geral liberados pelo macrófago) estimulam células endoteliais que formarão capilares e células mesenquimais para sintetizarem matriz óssea. Em áreas mecanicamente neutras, a cavidade da fratura é revascularizada e osteoblastos proliferam e formam osso. Em áreas de fraturas mecanicamente instáveis, capilares disseminados são rompidos por forças cortantes. Nessas áreas, portanto, o meio torna-se novamente hipotóxico. Esse meio parece suportar

a diferenciação de condrócitos que estabilizam a fratura pela formação da cartilagem. Se a força do tecido de reparação é ultrapassada, o rompimento do tecido de reparação desencadeia os mecanismos de inflamação novamente e células adicionais migram e proliferam. Essa síntese de proteína aumenta o calo de reparação. O aumento da formação do calo, entretanto, pára quando o tecido é capaz de resistir ao movimento. Uniões na formação do calo em osteíte são conhecidas.

Wang, em 2000, avaliou se a orientação dos elementos da cortical óssea da diáfise é restabelecida durante 18 meses de reparação. Para tanto, foram criados cirurgicamente orifícios com brocas de 3 mm de diâmetro na cortical do fêmur e tíbia de coelhos adultos, sendo estudado por microscopia de luz e polarização 1, 4, 8 e 16 semanas e 6, 12 e 18 meses, após os defeitos terem sido criados. De 16 semanas a 12 meses, os defeitos foram reparados completamente com osso lamelar, embora a orientação espacial longitudinal da reparação lamelar fosse em um ângulo diferente daquele do osso original. Aos 18 meses, a organização interna dos maiores elementos microscópicos individuais (ósteons) foi reconstituída de uma maneira similar àquela do osso original; entretanto a orientação espacial tridimensional dos ósteons na reparação óssea em relação ao longo do eixo dos ósteons do osso original adjacente e do osso removido para criar o defeito, não foi restabelecida completamente. A disposição espacial imperfeita dos elementos microscópicos do tecido ósseo pode contribuir significativamente para uma nova fratura de um osso longo, após remoção de parafusos de placas de fraturas.

Uma compreensão atual da reparação de fratura foi realizada em 2001, por Mandracchia *et al.*, proporcionando evidências investigativas no uso de fatores de crescimento exógenos que aumentam a cicatrização de fraturas. Os autores acreditam que fatores de crescimento exógenos têm enormes aplicações clínicas e continuarão a influenciar a cicatrização óssea no futuro. Segundo os autores,

com a expansão do conhecimento da intrincada biologia celular e molecular da reparação de fratura sendo realizada, cirurgiões poderão ser capazes de aumentar e assegurar a cicatrização de osteotomia cirúrgica, redução de fraturas ósseas, ou união retardada. Esse campo da medicina está continuamente crescendo e as possibilidades parecem infinitas.

## *2 Osteoporose*

A osteoporose é o tipo mais comum de doença óssea metabólica, resultante da redução simultânea de mineral e matriz óssea, havendo diminuição da quantidade de osso (Guyton, 1997).

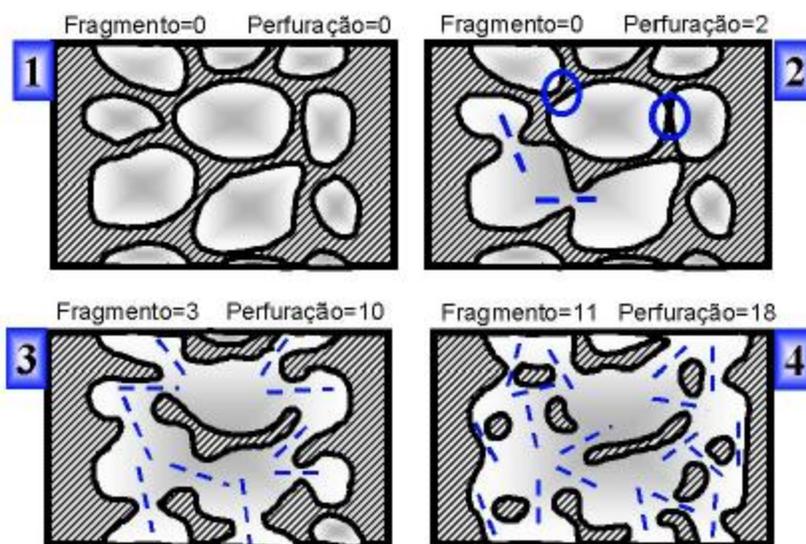
Segundo Frost, 1997, a definição de osteoporose verdadeira é dada quando se tem uma “osteopenia naturalmente irreversível” acompanhada de um aumento na fragilidade óssea. O paciente passaria a apresentar dores ósseas e/ou fraturas espontâneas ou ainda fraturas que afetam a coluna vertebral mais do que as extremidades, decorrentes de atividade física usual, que não aconteceriam em outras pessoas de semelhante sexo, idade, raça e hábitos. No caso da “osteopenia fisiológica”, a atividade normal não causaria fraturas espontâneas ou dores ósseas, ocorrendo fraturas somente após queda ou outro tipo de injúria, afetando as extremidades ósseas mais do que a coluna vertebral.

Finkelstein, também em 1997, classificou a osteoporose em tipo I e II, na qual a tipo I é também chamada de “pós-menopausa”, clinicamente se manifestando por meio de fraturas vertebrais enquanto a tipo II ou “senil” é resultante do envelhecimento normal que ocorre tanto em mulheres quanto em homens, estando associada a uma redução mais equilibrada da massa óssea cortical e trabecular, sendo comum a ocorrência de fraturas do quadril, da pelve, do punho, do úmero proximal, da tíbia proximal e dos corpos vertebrais.

As causas da osteoporose são inúmeras, entre elas tem-se: inatividade física, dieta, carência de vitamina D, doença de Cushing, acromegalia (Guyton, 1997), administração de corticosteróides (Exton-Smith & Stewart, 1972), inferior desenvolvimento esquelético em meninas, artrite reumatóide, uso de adrenocorticóides e heparina (Chesnut & Kribbs, 1982), idade avançada e deficiência de estrogênio (Guyton, 1997; Chesnut & Kribbs, 1982; Parfitt, 1987; Frost, 1997; Finkelstein, 1997) entre outras.

Segundo Finkelstein (1997) o mecanismo pelo qual a deficiência de estrogênio resulta em perda óssea, ainda não foi definido, porém evidências sugerem que a deficiência de estrogênio aumenta a produção local de citocinas, como a interleucina-1 e 6 (IL-1 e IL-6), responsáveis pela ativação do processo de reabsorção óssea, diminuindo a produção do fator de crescimento insulino-símile 1 (IGF-1) e do fator de crescimento de transformação- $\beta$  (TGF  $\beta$ ), responsáveis pela formação óssea e ainda aumentaria a sensibilidade do esqueleto aos efeitos reabsorventes do paratormônio (PTH). Assim sendo, a deficiência de estrogênio resulta em pequena elevação dos níveis séricos de cálcio, o que suprime a secreção de PTH, com conseqüente redução da formação renal de 1,25-(OH) $_2$  vitamina D que, a seguir, limita a absorção intestinal do cálcio.

Todo este desequilíbrio acarreta uma maior reabsorção óssea em detrimento da deposição, no qual os espaços medulares tornam-se maiores, devido a remoção completa de partes de suas paredes ósseas, de maneira que, os espaços medulares que estão previamente separados por trabéculas ósseas coalescem, onde este processo inicia-se com a perfuração focal do osso trabecular e se continua pelo alargamento das perfurações, criando assim fenestrações ósseas e cavitação subendosteal do interior do córtex, acarretando portanto, aumento do espaço trabecular e fina cortical óssea (Parfitt, 1987) (Figura 3).



**Figura 3:** Reabsorção óssea, conduzindo a aumento do espaço ósseo trabecular.

Eastell em 2003, fez uma revisão da literatura, considerando o efeito do estrogênio no esqueleto nas diferentes idades, no qual segundo o autor, se a deficiência de estrogênio ocorre durante a adolescência ou na idade de adulto jovem, o efeito impedirá a chegada de pico de massa óssea, se ocorrer após os 30 anos, provocará uma aceleração da perda óssea, descrevendo ainda todo o processo de remodelamento ósseo.

Também em 2003, Stepan *et al.* fizeram uma revisão da literatura sobre o remodelamento ósseo e as conseqüências da deficiência de estrogênio, comparando as drogas disponíveis na terapia de reabsorção óssea e os cuidados necessários com os pacientes e concluíram que investigações são requeridas para avaliar os diferentes modelos de ação destes agentes terapêuticos e seu efeito a longo prazo no osso e em outros tecidos.

Em 2004, Van der Linden *et al.*, assumiram que mudanças nas propriedades dos tecidos, levam a mudanças de deformação tecidual, induzindo a

adaptação da arquitetura. Eles se perguntaram se mudanças na arquitetura óssea medular com a idade e osteoartrose precoce, podem ser explicadas pelas mudanças nas propriedades teciduais. Usaram espécimes obtidos da autópsia da vértebra-L4 de 3 doadores, 2 homens de 37 e 77 anos e 1 mulher de 87 anos, que serviram de modelo para serem avaliados por meio da Tomografia Computadorizada, no qual foi feita a reconstrução 3D do osso medular e cálculo de volume, sendo investigado o efeito das mudanças na rigidez do tecido ósseo, na massa óssea global, rigidez global e arquitetura tecidual. Os resultados encontrados mostraram que alterações no osso trabecular com a idade e doença podem ser particularmente explicadas por mudanças na propriedade tecidual.

Uma vez que a osteoporose pré-menopausica pode ocorrer, estando normalmente associada com terapias crônicas com glucocorticóides, amenorréia prolongada, anorexia nervosa, artrite reumatóide e doenças que afetem o metabolismo de cálcio e vitamina D, além de outras, Gourlay & Brown em 2004, discutiram o assunto e enfatizaram as informações clínicas relevantes quanto aos cuidados físicos primários, que são geralmente os primeiros a serem realizados em pacientes pré-menopausicas com risco de perda óssea precoce.

## *2.1 Ovariectomia e padrão ósseo*

Uma das formas de induzir o aparecimento da osteoporose em animais de laboratório é a realização da ovariectomia, o que acarreta uma deficiência de estrogênio, provocando o aparecimento da doença, permitindo estudar as alterações no metabolismo, arquitetura e *turnover* ósseo, além de possíveis conseqüências e tratamento, possibilitando extrapolar os resultados encontrados para os seres humanos.

Um dos animais utilizados para a produção de ovariectomia são as ratas. Em 1975, Hoar & Hickman demonstraram as mudanças no tecido vaginal durante o ciclo estral, o efeito da remoção dos ovários e o efeito da administração de estrogênio no animal ovariectomizado. Os autores descreveram ainda as fases diestro, proestro, estro e metaestro, como executar a remoção dos ovários e a administração de hormônios.

Até 1985, haviam numerosos estudos utilizando técnicas bioquímicas e radiográficas que demonstravam a perda óssea em ratas ovariectomizadas. Contudo este fenômeno não estava bem documentado pelos métodos histológicos. Assim, Wronski *et al.* em 1985, realizaram um estudo a fim de determinar por métodos histomorfométricos a extensão de perda óssea trabecular e associada anormalidade na reabsorção e formação óssea em ratas ovariectomizadas. Foram utilizadas ratas divididas em dois grupos: um grupo com ovariectomia bilateral e outro *sham*. Derivados da tetraciclina foram administrados para cada animal em duas ocasiões separadas, a fim de ocorrer a marcação dos sítios de formação óssea. Todos os animais foram sacrificados 5 semanas após ovariectomia, sendo feito na tíbia uma análise óssea histomorfométrica quantitativa, que permitiu aos autores concluir que a ovariectomia induz a perda óssea e acelera o metabolismo esquelético em ratas.

Embora hajam mudanças no remodelamento esquelético resultante da interrupção da função ovariana em mulheres na menopausa, a aceleração da perda óssea é de natureza multifatorial, não devendo ser subestimado outros fatores dietéticos e fisiológicos. O objetivo do estudo de Dannucci *et al.* em 1987, foi avaliar o efeito precoce da ovariectomia, utilizando análise bioquímica do soro e o remodelamento trabecular ósseo em cães, no qual beagles adultos foram divididos em dois grupos, *sham* e ovariectomizados, acompanhados por 6 meses. Durante a cirurgia foi realizada uma biópsia na crista ilíaca para estabelecer dados base de remodelamento. Os animais foram sacrificados às 8, 10, 14, 16, 22 e 24

semanas após a cirurgia, sendo obtida uma segunda biópsia contralateral, o que permitiu aos autores concluírem que até os 6 meses, há significativo aumento na taxa de remodelamento ósseo ilíaco. As mudanças séricas, bem como as mudanças no remodelamento trabecular do osso ilíaco são consistentes com aquelas observadas nas mulheres pós-menopausa, que sofrem de alto remodelamento osteoporótico.

Como a osteopenia tem sido considerada um achado em ratas ovariectomizadas, alguns estudos tem demonstrado que este fenômeno está associado com o aumento do *turnover* ósseo. Sendo assim, Wronski *et al.* em 1988, com o propósito de caracterizar as mudanças osteopenicas em ratas ovariectomizadas em função do tempo, que variou de 14 a 180 dias pós ovariectomia, utilizaram ratas divididas em dois grupos, um *sham* e outro com ovariectomia bilateral. Os animais foram sacrificados nos tempos 14, 35, 52, 70, 100, 125 e 180 dias pós ovariectomia e as peças devidamente processadas para análise histomorfométrica. Os resultados obtidos permitiram aos autores concluírem que a fase inicial rápida de perda óssea em ratas ovariectomizadas, coincide com o aumento da máxima taxa de *turnover* ósseo. Nos tempos mais tardios pós ovariectomia, perda e *turnover* ósseo diminuem. Estes achados enfatizam a associação temporal entre o desenvolvimento de osteopenia e aumento do *turnover* ósseo em ratas ovariectomizadas.

Wronski *et al.* em 1989, estudaram por meio da histomorfometria as alterações ósseas que podem ocorrer à longo prazo após a ovariectomia ou decorrentes da idade avançada. Os autores utilizaram ratas com 90 dias de idade, sendo divididas em 2 grupos, um *sham* e outro ovariectomizado, sendo os animais sacrificados nos tempos de 270, 370 e 540 dias pós ovariectomia. As tíbias proximais foram processadas, sendo feita então uma análise óssea quantitativa histomorfométrica, permitindo aos autores concluírem que seus achados são indicativos de uma relação temporal entre o desenvolvimento de osteopenia e o

aumento do *turnover* ósseo tanto em ratas ovariectomizadas, quanto em ratas mais velhas.

Uma das conseqüências da osteoporose é a redução da quantidade de tecido ósseo calcificado. O objetivo do trabalho de Devlin & Ferguson em 1989, foi determinar se medidas lineares e peso de osso intacto estão estatisticamente associados com mudanças no conteúdo de cálcio em fêmur, após ovariectomia, podendo ser usado como um índice de osteoporose. Os autores utilizaram ratas que foram divididas em grupo *sham* e ovariectomizado, no qual passados 210 dias pós-operatório, os animais foram sacrificados, removidos o fêmur esquerdo e fixados. Os espécimes foram radiografados e tiveram calculado a sua perda de cálcio por meio de dois índices de osteoporose, o índice ponderal e o escore do fêmur. Concluíram que a ovariectomia em ratas acelera tanto a perda de cálcio do fêmur quanto aumento de deposição de gordura.

Schot & Schuurs em 1990, fizeram uma revisão da literatura sobre a patofisiologia da perda óssea em animais castrados e resumiram suas observações dizendo que ambos, ratos machos e fêmeas, perdem rapidamente osso trabecular na metáfise de tíbia e fêmur, devido um desequilíbrio entre reabsorção e formação óssea, no qual mudanças na sensibilidade do osso de ratos castrados aos hormônios calciotróficos podem ter um papel importante na falta de efeito estimulador direto de estrogênio gonadal e androgênio em células ósseas, além disso, vários dados indicaram que a prostaglandina pode também estar envolvida.

Como alguns autores questionam o modelo de osteoporose e osteopenia animal em ratas quando em comparação ao humano, Frost & Jee em 1992, realizaram uma revisão da literatura e concluíram que as ratas podem proporcionar um modelo muito útil de osteopenia humana e de alguns outros problemas esqueléticos humanos importantes, havendo uma resposta similar entre ratas e humanos quanto as influências mecânicas, hormonais e de drogas.

Osteoclastos são células responsáveis pela reabsorção óssea, que se desenvolvem de precursores hematopoiéticos da medula óssea, sendo controlados por fatores produzidos em seu microambiente. Segundo estudos, a citocina interleucina-6 (IL-6) pode promover a hematopoiese e osteoclastogênese, sendo inibida pelo  $17\beta$ -estradiol. Sendo assim, JILKA *et al.* em 1992, resolveram testar a hipótese de que a perda de estrogênio aumenta a osteoclastogênese, em decorrência de um aumento na produção de IL-6 no microambiente da medula. Os autores utilizaram ratas ovariectomizadas e *sham*, divididas em vários grupos. Em um grupo, as ratas imediatamente após ovariectomia, receberam um implante subcutâneo com grânulos contendo pequena liberação de  $17\beta$ -estradiol. Após 14 dias, os animais foram sacrificados e cultura de células de fêmur e de baço foram preparadas, tendo como finalidade observar o efeito da ovariectomia e estrogênio nas unidades formadoras de colônia de granulócitos e macrófagos (CFU-GM). Em outro grupo, após 14 e 28 dias da ovariectomia, os animais foram sacrificados e obtidas células medulares do fêmur, sendo que os animais do grupo 28 dias receberam grânulos de estrogênio, cuja finalidade foi avaliar o efeito da ovariectomia e reposição hormonal na formação de osteoclastos. No terceiro grupo, os animais ovariectomizados foram subdivididos em ovariectomizados sem tratamento, ovariectomizados com implantes de  $17\beta$ -estradiol, ovariectomizados com injeções semanais de IgG e ovariectomizados com injeções de Interleucina-6. Quatorze dias após, os animais foram sacrificados e tiveram as células da medula óssea colhidas para realização de cultura, a fim de avaliar o efeito de anticorpos para IL-6 e administração de estrogênio, no aumento de CFU-GM e formação de osteoclastos. Por fim, todos os animais utilizados tiveram suas tíbias removidas, processadas e coradas com Orange G, Phloxine B e hematoxilina-eosina. O estudo permitiu aos autores concluir que a perda de estrogênio resultou em uma estimulação da osteoclastogênese mediada pela IL-6, o que sugeriu a existência de um mecanismo para aumentar a reabsorção óssea em osteoporose pós-menopausa.

Estrogênio é considerado um hormônio que mantém a massa óssea em decorrência da supressão da reabsorção óssea. Este efeito anti-reabsorção tem sido demonstrado ser um efeito direto do estrogênio no osso, induzindo células da linhagem osteoblástica a inibir reabsorção óssea osteoclástica. Com a finalidade de avaliar o efeito de níveis fisiológicos de estrogênio na formação óssea, Clow *et al.* em 1992, utilizaram ratas Wistar ovariectomizadas, no qual 3 dias após cirurgia, em um grupo foi administrado uma dose subcutânea única de HHPPrBP(3-amino-1-hidroxi-propilideno-1-bifosfonato). Em outros grupos foram administradas injeções subcutâneas diárias de 1, 10 e 100µg/kg de 17β-estradiol durante 17 dias. Calceína e tetraciclina hidrocloreada foram injetadas intraperitonealmente 12 e 6 dias antes do sacrifício, respectivamente. Vinte e quatro horas após a injeção do agente experimental, os animais foram sacrificados e removidas as tíbias, analisando-as histomorfometricamente. A conclusão chegada pelos autores foi de que o estrogênio manteve o volume ósseo, não somente por meio da inibição da reabsorção óssea, mas também em decorrência da estimulação da formação óssea.

Como a ovariectomia diminui a massa óssea trabecular, Miller & Wronski, em 1993, descreveram e quantificaram as mudanças à longo prazo na estrutura óssea trabecular. Para tanto, as ratas foram ovariectomizadas ou tiveram uma ovariectomia simulada. Os ossos foram coletados 540 dias mais tarde, sendo o corpo da vértebra lombar preparado para microradiografia e análise estrutural do osso trabecular. O úmero proximal foi preparado para microscopia eletrônica de varredura. Os resultados encontrados foram perda de osso trabecular na região esponjosa central do corpo vertebral e úmero de ratas ovariectomizadas. Mudanças nos elementos estruturais trabeculares, no qual o volume medular foi maior na ovariectomia, indicaram uma maior separação das trabéculas. Ao microscópio eletrônico de varredura, a trabécula metafiseal do grupo controle, consistiu de hastes e placas, mas no animal ovariectomizado, as trabéculas remanescentes foram geralmente hastes longitudinais com menores hastes

conectivas transversais. O osso remanescente na ovariectomia foi encontrado na área de metáfise lateral, sendo consistente com a manutenção da capacidade estrutural do osso. Estas mudanças à longo prazo na estrutura óssea medular, são comumente devido a continuação da carga funcional esquelética, mas uma diminuição nos hormônios gonadais resultam em menor necessidade de manter um depósito mineral esquelético para fins de reprodução.

Em 1993, Giardino *et al.* avaliaram comparativamente a patofisiologia e terapêutica da osteoporose. Assim, as ratas fêmeas tiveram seus ovários removidos bilateralmente, sendo sacrificadas nos tempos 40 e 100 dias pós cirurgia. Foram realizadas avaliações laboratoriais de calcemia, fosforemia, fosfatase alcalina, osteocalcina, exame densitométrico, exame histológico e exame mineral do fêmur. Concluíram que 40 dias após ovariectomia é possível observar osteopenia, que se torna progressivamente mais pronunciada após os 100 dias.

A fim de estudar o efeito da idade, da ovariectomia à longo prazo e da administração de estrogênio na cortical óssea femural de ratas, comparando dados como tamanho ósseo, massa óssea, composição, redistribuição geométrica e propriedades biomecânicas ósseas, Danielsen *et al.*, em 1993, utilizaram 12 grupos de ratas, sendo 6 grupos normais, sacrificados nos tempos 2, 6, 9, 12, 15 e 24 meses de idade; 4 grupos de ratas ovariectomizadas e sacrificadas nos tempos 9, 12, 15 e 24 meses de idade; um grupo normal tratado com estrogênio e sacrificados aos 24 meses; e por fim, um grupo ovariectomizado, tratado com estrogênio e sacrificado com 24 meses de idade. Verificaram que ovariectomia pode induzir um aumento de peso, redução de massa óssea e afinamento das paredes da diáfise femural. O estresse mecânico compressivo de osso intacto e a qualidade mecânica do colágeno ósseo, não são afetados pela ovariectomia, assim como ela não influencia a formação óssea periosteal, mas induz uma

reabsorção óssea endosteal não presente em ratas normais. O tratamento com estrogênio normaliza o peso corpóreo, interrompe a reabsorção óssea endosteal .

Li & Nishimura, 1994, realizaram um estudo com o objetivo de investigar o efeito da deficiência de estrogênio e progesterona no remodelamento ósseo da crista residual de ratas ovariectomizadas, no qual 10 dias após ovariectomia tiveram seus molares removidos e então sacrificados 2, 4 e 8 semanas após exodontia, sendo observada a crista residual em microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura. Puderam concluir que as ratas ovariectomizadas são modelos experimentais de osteoporose bastante úteis; os níveis plasmáticos de estrogênio e progesterona diminuem 8 dias após ovariectomia; e ainda sugeriram que condições sistêmicas tais como deficiência de estrogênio, podem alterar a expressão fenotípica de células associadas com a crista residual e resultar em menor atividade osteoclástica e em um diferente tipo de tecido calcificado.

Uma citocina produzida por células da medula e células ósseas, conhecida como interleucina-1 (IL-1), tem sido envolvida com a patogênese de osteoporose pós-menopausa, devido seu potencial de estimular a reabsorção óssea *in vitro* e *in vivo*. Assim, Kimble *et al.* em 1994, investigaram o papel da IL-1 na perda óssea causada por deficiência de estrogênio. Ratas foram ovariectomizadas, ou sofreram cirurgia com reposição dos ovários no local (*sham*). Após quatro semanas ou imediatamente após cirurgia, receberam injeção subcutânea de antagonista para receptor de IL-1 (IL-1ra), durante 4 semanas. A densidade óssea da distal do fêmur foi medida por Absorciometria Radiográfica. O *turnover* ósseo foi avaliado por histomorfometria óssea e por medidas séricas de osteocalcina (um marcador de formação óssea) e pela excreção urinária de piridinolina (um marcador de reabsorção óssea). Os resultados encontrados permitiram concluir que a IL-1 ou mediadores induzidos pela ação da IL-1, tem

papel importante no mecanismo de indução de perda óssea em ratas, especialmente imediatamente após ovariectomia.

A fim de entender as mudanças estruturais que acompanham a perda óssea induzida pela deficiência de estrogênio, Dempster *et al.* em 1995, utilizaram ratas com dois meses de idade, que foram divididas em grupo *sham* e ovariectomizadas bilateralmente. As ratas ovariectomizadas foram sacrificadas nos tempos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 dias pós cirurgia e as *sham* nos tempos 0, 25 e 50 dias, sendo dado intraperitonealmente Declomycin e Achromycin, 6 e 2 dias antes do sacrifício respectivamente. A seguir o material foi processado e realizado uma análise histomorfométrica e medidas de densidade óssea mineral. Os resultados sugeriram que a perda óssea medular devido a deficiência de estrogênio é decorrente de uma diminuída ligação trabecular, provavelmente devido perfuração osteoclástica da placa trabecular, ou pela completa remoção da placa sem prévia redução generalizada.

O objetivo do experimento de Dick *et al.* em 1996, foi determinar o efeito da ovariectomia na massa óssea, no cálcio e fósforo renais e no hormônio calcitropic, comparando as mudanças observadas com aquelas vistas em mulheres em menopausa. Os animais foram mantidos com uma dieta de 0,1% de cálcio, utilizando 34 ratas submetidas a ovariectomia ou operação *sham*. Foram analisadas a densidade óssea do fêmur e coluna, bem como conteúdo mineral ósseo global, no dia da cirurgia e 6 semanas após. Amostras de sangue e urina foram coletadas nos tempos 0, 1, 3 e 6 semanas pós cirurgia e medida a quantidade sérica e urinária de cálcio, fósforo, potássio, cloreto de sódio, creatinina, proteína total, fosfatase alcalina e bicarbonato, além de várias variáveis bioquímicas como o hormônio paratireoideo e calcitriol. Os resultados encontrados comparando o grupo ovariectomizado com o *sham*, foram que o grupo ovariectomizado perdeu mais osso, aumentou a quantidade de cálcio e fósforo na urina entre a primeira e terceira semana, houve aumento na máxima

reabsorção tubular renal de fósforo, mas não uma mudança clara no cálcio. Não houve significativa mudança nem no calcitriol nem no hormônio paratireoideano. Houve significativa perda óssea generalizada e um equilíbrio negativo de cálcio. O estudo ainda mostrou que ratas ovariectomizadas com baixa concentração de cálcio na dieta, têm muitas similaridades de homeostasia de cálcio e fósforo observadas em mulheres com menopausa.

A deficiência de estrogênio na menopausa aumenta o *turnover* ósseo com perda óssea por todo o esqueleto. Sims *et al.* em 1996, descreveram um aumento em marcadores bioquímicos e histomorfométricos de reabsorção óssea, antes do aumento da formação e perda óssea trabecular em ratas ovariectomizadas. Utilizaram ratas divididas em grupo *sham* e ovariectomizadas, que foram sacrificadas aos 0, 6, 9, 15, 18, 21 e 42 dias pós operatoricamente, coletando o fêmur e determinando o volume ósseo trabecular (BV/TV), a presença de células semelhantes a osteoclastos, bem como até os 18 dias pós operatório, exame da vértebra lombar e exames de sangue e urina para a análise das variáveis bioquímicas. Com a realização do experimento, puderam concluir que houve um aumento nas células semelhantes a osteoclastos até 6 dias pós operatório, com aumento da excreção de hidroxiprolina na urina e até 9 dias após, um aumento sérico de osteocalcina e atividade da fosfatase alcalina. Foram observados aumento na taxa de aposição mineral até 12 e 15 dias após a cirurgia, bem como um aumento no volume ósseo trabecular em sítios específicos e em áreas do centro de metáfise-diafise, porém significativamente menor. Após os 18 dias, a quantidade de superfície para células semelhantes a osteoclastos, mostrou-se elevada em ratas ovariectomizadas na região de vértebra lombar. Houve ainda um aumento sistêmico na reabsorção óssea até 6 dias pós ovariectomia, precedido por aumento de formação.

Embora a osteoporose e o edentulismo tenham causas diferentes, há vários sintomas patológicos em comum, como por exemplo, a redução na massa

óssea. Jahangiri *et al.* em 1997, realizaram um trabalho, objetivando determinar se a deficiência de estrogênio ou a terapia de reposição hormonal tem algum efeito no fenômeno de remodelamento da crista residual. Foram usados 3 grupos de animais compostos por ovariectomia mais placebo, ovariectomia mais 1,5 µg/dia de 17β-estradiol e controle (*sham*). Dez dias após a ovariectomia e 2 dias após a administração da droga, os animais tiveram seus molares direitos extraídos, sendo sacrificados 30 dias pós exodontias e obtido os espécimes para exame histológico e biomolecular. Os achados sugeriram que a deficiência de estrogênio e a terapia de reposição hormonal parecem afetar a atividade de remodelamento da crista óssea residual a nível molecular, onde na ovariectomia e ovariectomia mais tratamento com estrogênio houve reduzida quantidade de colágeno tipo I. Quanto ao colágeno tipo II, este mostrou nível reduzido no grupo ovariectomizado e aumentado no grupo ovariectomizado mais estrogênio. Não foram observados o colágeno tipo IX e X em nenhum dos grupos.

Bagi *et al.* em 1997, com o objetivo de quantificar as mudanças ósseas corticais e medulares da cabeça do fêmur em ratas ovariectomizadas, bem como correlacionar as mudanças na massa óssea, utilizaram 80 ratas divididas em 2 grupos, ovariectomizadas e *sham*, sacrificadas aos 4, 8 e 12 semanas após ter sido realizada a ovariectomia. Os animais receberam marcadores ósseos 9 e 2 dias antes do sacrifício. Todas as ratas antes da cirurgia e do sacrifício foram examinadas por Densitometria de Dupla Emissão com Fonte de Raios X (DEXA) para verificação da densidade mineral. O fêmur direito foi removido e usado para a realização de histomorfometria óssea, enquanto o esquerdo foi usado para medidas *in vitro* no DEXA e teste mecânicos. O experimento permitiu encontrar como resultado que, os animais ovariectomizados aumentaram seu peso corpóreo e acumularam gordura. A densidade mineral mostrou-se diminuída, sendo observada redução no número de trabéculas e na espessura, com aumento da separação trabecular e espaço medular; a espessura da cortical mostrou-se reduzida pela alta reabsorção endocortical, que devido a reabsorção do osso

medular, houve pouca conexão trabecular endocortical. Além disso, a cabeça do fêmur mostrou reduzida força e menor espessura.

Segundo Peng *et al.*, em 1997, as mudanças qualitativas que possivelmente dão lugar a composição química do osso durante osteoporose são pobremente entendidas. Os autores utilizaram ratas ovariectomizadas e *sham* que foram sacrificadas aos 0, 2, 4, 8, 16, 28 e 40 semanas pós ovariectomia, sendo verificadas as mudanças no peso corporal, na força do fêmur, na porcentagem de incorporação de cálcio pela tíbia, no número de osteoclastos e no *turnover* da cabeça femoral, entre outras. Puderam concluir que a deficiência de estrogênio em ratas conduz a perda significativa e permanente de osso trabecular. A perda da força óssea na cabeça do fêmur devido a idade é de certo modo neutralizada por fatores associados a ovariectomia, sendo uma possível explicação o aumento de peso corpóreo, que poderia servir como proteção, ou devido um aumento do peso do osso, ou ainda devido uma diferença no metabolismo. Outra explicação pode incluir possível formação óssea periosteal, estimulada pela ovariectomia, que pode compensar a perda da força óssea observada no decorrer da idade.

Como a diminuição de estrogênio pode levar a alterações na hematopoiese de ratas e aumento no número de células mononucleares no timo, baço e medula óssea, Elben *et al.* em 1998, investigaram o efeito da redução de estrogênio na hematopoiese e *turnover* ósseo, utilizando ratas divididas em grupo *sham* ou ovariectomizadas, que foram sacrificadas aos 1, 2, 3 e 4 semanas após ovariectomia. Foi retirado sangue 3 semanas pós ovariectomia antes do sacrifício do animal e imediatamente após este, sendo removidas as tíbias. Foram realizadas análise citométrica de células da medula óssea (BMC) e histomorfometria óssea. Os resultados encontrados permitiram concluir que a ovariectomia regula através do aumento a linfopoiese B na medula óssea, aumentando também a diferenciação de células mielóides dentro do macrófago-monócito e possivelmente também a linhagem de osteoclastos.

A deficiência de estrogênio em humanos causa tanto perda óssea trabecular quanto deterioração da arquitetura, ocorrendo maior incidência de fraturas osteoporóticas. Com o propósito de estudar o assunto, Lane *et al.* em 1998, usaram Tomografia Microscópica de alta resolução para determinar o tempo pós cirúrgico da deterioração do tecido trabecular de conexão em ratas ovariectomizadas e também as mudanças associadas a marcação bioquímica de reabsorção óssea em tíbias de ratas. Os animais foram então divididos, aleatoriamente, em grupo *sham*, onde as tomografias foram repetidas nos tempos 5, 13, 29 e 42 dias pós cirurgia. Já no grupo ovariectomizado, as tomografias foram obtidas nos dias 8, 13, 33 e 50 pós ovariectomia. Assim sendo, os autores puderam concluir que na fase inicial de deficiência de estrogênio, as perdas ósseas são caracterizadas por uma deterioração estrutural imediata, com concomitante declínio no volume ósseo, o que sugeriu a necessidade de utilização de um agente que suprima o *turnover* ósseo provocado pela deficiência de estrogênio o mais cedo possível, a fim de prevenir a deterioração trabecular estrutural e reduzir o risco de osteoporose.

Tanaka *et al.*, 1999, estudaram as mudanças no osso medular do côndilo mandibular de ratas após deficiência de estrogênio, avaliando-os histomorfometricamente. Utilizaram 64 animais divididos em dois grupos, um *sham* e outro ovariectomizado bilateralmente. Os animais foram sacrificados aos 0, 7, 14, 30 e 60 dias pós cirurgia. Antes do sacrifício, foram administradas tetraciclina e calceína em todos os animais. Após a observação histológica e histomorfometria óssea do côndilo mandibular, que foi dividida em duas amostras, região subcondral e região central, a análise dos resultados sugeriu que a deficiência de estrogênio induziu a perda óssea subcondral transitória, ao passo que, na região central ele inibiu o ganho ósseo, sugerindo que a carga mecânica, modula a perda óssea induzida por ovariectomia, encontrada em outras partes do esqueleto.

Devido ter sido postulado que a ligação tubária induz a um *deficit* de estrogênio, Rico *et al.*, 2002, compararam um grupo de ratas ovariectomizadas com ratas que sofreram ligação das trompas uterinas, onde 60 dias pós cirurgia, foi avaliada a massa óssea por densitometria e ultrasonografia, o que revelou uma massa óssea periférica e axial significativamente baixa em ratas com ligação das trompas uterinas, sugerindo que há um *deficit* de estrogênio nestes animais.

De acordo com Lill *et al.* em 2002, a osteoporose pós-menopausa é um problema de saúde de grandes proporções, no qual comumente há maior risco de fraturas ósseas e a reparação dessas fraturas parece estar prejudicada com o passar da idade. O objetivo do estudo realizado por estes autores foi comparar 3 diferentes modalidades de indução de osteoporose em relação a densidade óssea mineral, parâmetros estruturais e propriedades mecânicas dos ossos nas 3 modalidades, objetivando complementar os dados já publicados. Os autores utilizaram ovelhas divididas em 4 grupos; um grupo ovariectomizado que recebeu dieta restrita de Cálcio e vitamina D, um grupo ovariectomizado que recebeu diariamente injeção de esteróide (metilprednisolona), um grupo ovariectomizado com dieta restrita de cálcio, vitamina D e injeção de metilprednisolona diariamente e o último grupo sem ovariectomia e sem tratamento. A cada 2 meses era determinada a densidade mineral óssea na porção distal do rádio. Depois de 6 meses os animais foram sacrificados e biopsiados o corpo vertebral e cabeça femural. Foram observadas a espessura trabecular, o número de trabéculas, a reparação trabecular, a fração da superfície óssea e a fração do volume ósseo. Obtiveram como resultados, uma maior diminuição de densidade óssea no grupo ovariectomizado com dieta restrita de cálcio, vitamina D e injeção de esteróide. Na biópsia do corpo vertebral, uma proeminente mudança nos parâmetros estruturais foi observada, sendo que estas mudanças foram menos pronunciadas que na cabeça femural. No teste de compressão do corpo vertebral o grupo ovariectomizado com dieta restrita de cálcio, vitamina D e injeção de esteróides tiveram 40% menos rigidez, que o grupo controle.

Muitos estudos sugerem uma relação positiva entre osteoporose sistêmica e perda óssea bucal e entre osteoporose e perda dentária. A fim de verificar as mudanças estruturais trabeculares na mandíbula após deficiência de estrogênio à longo prazo, Tanaka *et al.*, 2003, utilizaram ratas divididas em 2 grupos, *sham* e ovariectomizadas. Após um ano da ovariectomia, histomorfometria óssea e análise ultra-estrutural foram realizadas no septo interradicular do primeiro molar inferior, usando tomografia microcomputadorizada e microscopia de varredura a laser “confocal”. Os autores concluíram que após ovariectomia, perda óssea e fragmentação trabecular ocorrem no osso alveolar de mandíbula de ratas.

## *2.2 Ovariectomia e reparação óssea*

Uma vez que a osteoporose apresenta uma série de alterações ósseas, podendo conduzir a ocorrência de fraturas, inclusive espontâneas, é importante conhecer se esta doença causa interferências no processo de reparação.

A fim de verificar o efeito da ovariectomia sobre o osso alveolar e formação óssea após ovariectomia, Hsieh *et al.*, 1995, ovariectomizaram ratas e extraíram o primeiro molar inferior direito. Medidas dinâmicas de formação óssea alveolar foram determinadas 10 dias após cirurgia, usando técnica de marcação com fluorocômio e comparadas com animais controles, possibilitando aos autores concluírem que a deficiência de estrogênio pode afetar a deposição óssea alveolar seguida à extração dentária.

A reparação de fraturas é influenciada por fatores mecânicos e biológicos, porém, a capacidade de reparação de fraturas diminui com a idade, embora os riscos aumentem. Walsh *et al.* em 1997, examinaram a tensão, curvatura e propriedades histológicas da reparação de fraturas em ratas ovariectomizadas e normais, onde após 6 semanas da ovariectomia foi realizada fratura no fêmur,

sendo os animais sacrificados aos 2, 4 e 6 semanas. Foram realizadas radiografias, testes biomecânicos e estudo histológico. Os dados dos testes mecânicos de tensão e curvatura apontaram no sentido de que, a ovariectomia prejudica a reparação de fraturas, necessitando mais estudos, a fim de determinar seu efeito à longo prazo, pelo menos 3 meses antes da ocorrência de uma fratura. No início da fratura houve a ocorrência de hemorragia na cavidade intramedular, com mínima hemorragia subperiosteal. A fratura óssea após 10 dias no grupo controle já estava unida, enquanto no grupo ovariectomizado havia mais tecido mesenquimal indiferenciado e trabéculas ósseas mais finas, que estiveram presente por mais tempo do que no grupo controle. Aos 42 dias, o calo de fratura mostrou-se similar nos dois grupos.

Como até em 1998 poucos estudos estavam sendo realizados em mandíbula, sendo que muitos tratamento dentários, inclusive extrações são realizadas em indivíduos após a menopausa, Shimizu *et al.*, 1998, estudaram o processo de reparação óssea seguida a extração do primeiro molar inferior em ratas adultas, com seis meses de idade, 60 dias após a ovariectomia, através de microscopia eletrônica de varredura, que foram divididas em dois grupos, *sham* e ovariectomizadas bilateralmente. Os animais foram sacrificados nos dias 4, 7, 30 e 60 após exodontia e as regiões ao redor do local examinadas, sugerindo que nas condições experimentais realizadas, a ovariectomia estimula a reabsorção óssea.

Em um osso osteoporótico fraturado é importante conhecer se a habilidade de reparação é influenciada pela osteoporose, onde há pouco conhecimento a respeito de sua influência à longo prazo. Para tentar elucidar a influência da osteoporose na reparação de fraturas, Kubo *et al.*, 1999, induziram osteoporose em ratas através da ovariectomia, mantendo-as sob dieta com baixa quantidade de Cálcio. Os animais foram pesados e medida a densidade mineral óssea antes e 4, 8 e 12 semanas depois da ovariectomia ou cirurgia *sham*. Doze semanas após ovariectomia foi feita uma fratura transversa na diáfise do fêmur,

sendo estabilizadas com fio de aço e monitorado o processo de reparação radiograficamente, histologicamente e biomecanicamente durante 6 e 12 semanas. Os autores concluíram que deficiência de estrogênio e baixa ingestão de cálcio afetam muito o osso no período tardio do processo de reparação, mas não afetam muito no período inicial de reparação.

Devido às mudanças no metabolismo ósseo em ratas com deficiência de estrogênio e humanos serem similares e como a osteoporose pode induzir a reabsorção de ossos dos maxilares, Shimizu *et al.*, em 2000, estudaram o processo de reparação após extração do primeiro molar inferior em ratas ovariectomizadas, por meio de análise quantitativa de imagem eletrônica dispersa (quantitative back-scattered electron image analysis) e microanálise da energia dispersiva de raios X (energy-dispersive X-ray). As ratas foram divididas em dois grupos, um *sham* e outro ovariectomizado bilateralmente, onde 60 dias pós-operatório, os primeiros molares inferiores foram extraídos e nos dias 7, 30 e 60 pós extração, os animais foram sacrificados. As mandíbulas foram removidas e processadas devidamente para análise. Os resultados encontrados sugeriram aos autores que a reparação óssea mostrou-se significativamente reduzida em animais com osteoporose.

A ovariectomia causa significativa diminuição dos níveis séricos de estradiol, como resultado, induz a perda óssea osteoporótica no osso trabecular, mas não cortical. Tanaka *et al.*, 2001, estudaram o efeito agudo da ovariectomia no processo de reparação óssea após extração do primeiro molar inferior, por meio de análise quantitativa, microscopia eletrônica de varredura e microanálise de energia dispersiva de Raios X. Os autores utilizaram ratas que foram divididas em dois grupos: um *sham* e outro cujos animais foram ovariectomizados bilateralmente. Sete dias pós ovariectomia, foi realizada a exodontia do primeiro molar inferior, sendo os animais sacrificados aos 7, 30 e 60 dias, com dissecação da mandíbula para análise, que foram processadas e analisadas. Os resultados

observados sugeriram que deficiência aguda de estrogênio estimula a reabsorção do osso de sustentação, mas tem menor efeito na formação óssea sendo assim, a reparação óssea alveolar após extração não tem significativo atraso, mas o osso de suporte recém formado na superfície óssea maxilar do lado vestibular do alvéolo, encontrou-se significativamente diminuído, devido ao aumento da reabsorção óssea.

A idade avançada prejudica a reparação de fraturas devido a deficiência de estrogênio ou presença de osteoporose e/ou estado nutricional deficiente. Meyer *et al.*, 2001, estudaram o impacto tanto da idade, quanto da ovariectomia na reparação de fraturas em fêmur de ratas, concluindo que a idade e ovariectomia prejudicam significativamente o processo de reparação de fraturas, que foi avaliado por meio da medida de rigidez e força de quebra em 3 pontos de envergadura e por adição de mineral dentro do calo da fratura.

Namkung-Matthai *et al.*, em 2001, examinaram as propriedades mecânicas e eventos histológicos durante a fase precoce de reparação de fraturas, em ratas normais e osteoporóticas, induzidas por ovariectomia e baixa ingestão de cálcio. Três meses após ovariectomia, foi criada uma fratura no fêmur sendo a seguir estabilizada com pino intramedular, tanto no grupo ovariectomizado quanto no grupo *sham*. As ratas foram sacrificadas aos 4, 7, 14, 18 e 21 dias pós fratura, onde foi realizada análise morfológica da calosidade óssea, localização histoquímica de osteoclastos, marcação com tetraciclina, realizando ainda aos 18 dias, histomorfometria do calo ósseo e aos 21 dias, o teste de força biomecânica. Concluíram que excessiva perda óssea, devido a deficiência de estrogênio e baixa dieta em cálcio, afeta marcadamente o processo precoce de reparação óssea em ratas osteoporóticas, sendo necessário maiores estudos a fim de investigar se as alterações na força óssea permanecem a longo prazo.

Em 2003, Lill *et al.*, estudaram a reparação de fraturas em osso osteoporótico usando osteotomia em tíbia de ovelhas. Foram feitas osteotomias em animais osteoporóticos e normais, fixando-as durante oito semanas e medindo semanalmente *in vivo*, a rigidez da curvatura óssea, a área do calo ósseo e a densidade do calo. O estado osteoporótico foi determinado aos 0, 4 e 8 semanas usando tomografia computadorizada quantitativa periférica. Após o sacrifício e retirada da tíbia, analisaram também a rigidez de curvatura e torção da zona do calo. Análise dos resultados demonstrou um atraso na reparação de fraturas em tíbia de ovelhas osteoporóticas quanto a formação do calo, mineralização e propriedades mecânicas.

Jakubas-Przewlocka *et al.*, em 2003, levantaram a questão de que, a destruição da estrutura trabecular ocorre da mesma maneira na osteoporose senil e pós menopausa. A fim de tentar responder esta questão, estudaram espécimes trans-ilíacas de mulheres com osteoporose senil, pós-menopausicas e normais, onde a seguir foram realizadas micrografias digitalizadas visualizando os elementos longitudinais e transversais do tecido ósseo. A análise das imagens permitiu aos autores verificarem que a anisotropia estrutural de trabéculas ósseas é maior em pós-menopausa do que em osteoporose senil e grupo controle.

Segundo Xu *et al.*, 2003, na osteoporose há diminuição da massa óssea, aumento da destruição de microestruturas ósseas e da suscetibilidade a fraturas, onde geralmente o tratamento objetiva a prevenção delas. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da osteoporose na reparação de fraturas através da análise de mudanças histomorfológicas, densidade mineral do calo ósseo e a distribuição do fator de crescimento de transformação (TGF- $\beta$ 1), fator de crescimento de fibroblastos básico (FGFb) e proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) em ratas ovariectomizadas, com 12 semanas de idade, que foram divididas em 2 grupos: ovariectomizada e *sham*. Três meses após a operação, foi realizada uma fratura no fêmur com estabilização do sítio da fratura. Antes da

ovariectomia e 3 meses após, foi medida a densidade óssea mineral de todos os animais, sacrificando-os aos 3, 7, 14, 28 e 42 dias pós fratura. A seguir foi observada a formação do calo ósseo, usando métodos histológicos e imunohistoquímicos. Os autores concluíram que a osteoporose influencia a quantidade e qualidade do calo ósseo no período inicial da reparação. O efeito da reparação de fraturas em indivíduos osteoporóticos tem relação com a expressão de BMP-2 ou FGF b, havendo diminuição da expressão de osteoblastos, que pode causar uma diminuição na qualidade da reparação de fraturas após osteotomia.

### *3 Radiação e reparação óssea*

A fim de descrever o resultado de uma série de trabalhos quanto ao efeito da irradiação com dose única ou múltipla, durante formação de “calo ósseo” em sítios de fraturas, Hayashi & Suit em 1971, utilizaram ratos que tiveram seu fêmur fraturado depois da irradiação em perna e coxa. O tamanho do “calo” foi medido por estudo planimétrico. O ponto final da dose de irradiação utilizada foi o CID<sub>50</sub> (dose que produz uma inibição da formação de “calo” em metade dos indivíduos). O CID<sub>50</sub> foi de 1.750 rads, 2.270 rads, 3.020 rads e 3.600 rads ministrados em 1, 2, 5 ou 10 doses fracionadas. O CID<sub>50</sub> foi 2.270, 2.420 e 2.470 rads para intervalos de tempo entre uma dose (1.000 rads) e outra de 1, 7 e 28 dias respectivamente. Os autores puderam concluir que danos da reparação após uma dose única de 275 rads, foram aparentemente menores do que os danos de reparação provocados com doses repetidas de 275 rads, talvez devido a presença de um pequeno subgrupo de células que apresentam uma baixa capacidade de reparação e que não houve essencialmente proliferação ou mudanças na distribuição da idade celular de sobrevivência de células, durante este período, onde as células do sistema tecidual envolvido não tiveram resposta proliferativa para 1000 rads. Conseqüentemente o CID<sub>50</sub> para irradiação fracionada depende

quase inteiramente do número de frações, não sendo afetado pela proliferação celular.

Grande interesse tem sido focalizado no fato da irradiação causar osteomielite pós exodontia. Uma combinação de irradiação, trauma e infecção foi considerado como um possível fator etiológico para a radiosteomielite. O objetivo do experimento realizado por Horn *et al.*, em 1979, foi estudar o efeito de dose única de 1500 R na reparação inicial de alvéolo, que foi realizada duas semanas antes ou imediatamente após exodontia, em mandíbula de ratos sacrificados aos 48, 72, 96 horas e 1 semana após exodontia. As peças foram processadas para exame em microscopia ótica, onde após observação concluíram que irradiação de alvéolo duas semanas antes da exodontia em ratos, não permite adequada regeneração óssea alveolar.

Há normalmente uma concordância que dentes com prognóstico duvidoso, devido à cárie ou a doença periodontal, deveriam ser removidos antes da irradiação, contudo o intervalo entre a extração e a radioterapia era um assunto de controvérsia. O trabalho de Guglielmotti *et al.*, em 1986, foi realizado a fim de determinar a resposta do tecido ósseo durante a reparação alveolar. Para tanto, diferentes doses de radiação X foram aplicadas em vários intervalos de tempos depois da extração dentária, sendo avaliada a reparação óssea por métodos histológicos, radiográficos e histométricos 14 dias após extração dentária. A irradiação cefálica foi dada em 0, 3 e 7 dias após cirurgia em doses de 15, 20 ou 30 Gy. Os dados evidenciaram que não houve diferença significativa entre as diferentes doses dadas sete dias após extração, contudo foi atrasada quando a irradiação foi realizada imediatamente ou três dias após extração. Com base nestas observações é recomendado que a radiação não seja iniciada até pelo menos uma semana depois da extração dentária.

Estudos quantitativos e qualitativos tem demonstrado que o perióstio e endóstio tem sua origem primária de células osteogênicas, em enxerto ósseo, e

a irradiação diminui a capacidade regenerativa. O objetivo do estudo de Lorente *et al.*, em 1992, foi o desenvolvimento de um sistema de modelo de ratos para mandíbula irradiada, examinando a contribuição do perióstio, do tecido mole e do osso, na reparação de um defeito ósseo em uma área irradiada. Foi estudado o efeito do tempo de reparação de cirurgia após irradiação. A contribuição do componente tecidual na reparação de defeito ósseo, foi estudada usando pó de osso desmineralizado (DBP) irradiado ou não. O melhor preenchimento ósseo ocorreu no leito irradiado e preenchido com DBP não irradiado, sugerindo que, pelo menos no período inicial após irradiação, o leito não é o fator limitante em reparação de defeitos ósseos e o componente osteogênico de osso na DBP pode ser mais afetado pela irradiação. No leito irradiado, o defeito produzido 2 semanas após irradiação curou-se mais rapidamente do que aqueles realizados a 4 semanas. Assim, o tempo para realização da cirurgia após irradiação também tem papel importante no processo de reparação, onde a cirurgia precoce produziu melhores resultados.

A radioterapia é usada comumente no tratamento de pacientes com lesões ósseas primárias, metástases ou com tumores de tecido mole adjacente ao osso, podendo posteriormente ocasionar fraturas patológicas nestes pacientes. Em 1993, Widmann *et al.*, avaliaram se a radiação antes de uma injúria, impede a reparação de fraturas, afetando a força e rigidez da união. Os autores utilizaram ratos que foram irradiados com dose única de 900 rads, administrada 1 dia antes da fratura do fêmur, sacrificando-os aos 2, 3, 4, 8 e 16 semanas pós fratura, foram realizados testes biomecânicos e histológicos nas peças, o que sugeriu como resultado que ossos irradiados 1 dia antes da produção da fratura, podem produzir uma resposta reparatória significativamente fraca, persistindo até a 8ª semana.

Em muitos casos de radioterapia curativa, ossos maduros recebem altas doses de radiação, ou por serem o sítio da lesão ou estarem no local da irradiação, ocorrendo muitos casos de osteorradionecrose na mandíbula, costela e

pélvis, levando a sérias complicações. Várias mudanças histológicas ocorrem após irradiação incluindo perda de osteócitos, ausência de osteoblastos na superfície óssea, fibrose vascular e substituição de medula óssea por tecido conjuntivo frouxo. O objetivo do trabalho de Arnold *et al.*, em 1995, foi descrever e quantificar o efeito da irradiação pré-operatória. No trabalho foram usados ratos *Wistar* adultos, onde o fêmur foi irradiado localmente com dose única de Raios X de 0, 10, 15, 19 e 22 Gy e 1 dia após, foi realizada através do uso de brocas, com 1,2 mm de diâmetro, uma ferida que estendeu-se através da diáfise cortical dentro da cavidade medular. A reparação da lesão foi acompanhada nos tempos 7, 10, 16 e 30 semanas. O experimento permitiu encontrar que em ossos não irradiados a reparação foi completa na 7<sup>a</sup> semana. Irradiação com dose acima de 15 Gy, causou um atraso dose-dependente na formação de “calo” primário e sua subsequente substituição por osso maduro, enquanto após doses mais altas a reparação permaneceu permanentemente comprometida ou até suprimida.

Numerosas complicações esqueléticas têm sido relatadas em pacientes pediátricos, cujos tumores foram tratados com radiação e quimioterapia. Há uma clara associação entre estas terapias de tumores ósseos e o desenvolvimento de complicações esqueléticas, como diminuição da elasticidade óssea, osteoporose e desmineralização óssea. Sendo assim, o objetivo de Wall *et al.*, em 1996, foi avaliar as complicações ósseas em crianças. Para isso foram revisados prontuários de 70 crianças com sarcoma de tecido mole, nas extremidades inferiores, no período de 1962 a 1991. Destes pacientes, 12 haviam recebido radiação após excisão cirúrgica dos tumores, onde 3 subsequente desenvolveram fratura e 2 dos 3 tinham também recebido quimioterapia. Os achados indicaram que, embora o risco à fraturas após terapia para sarcoma de tecido mole possam ser multifatoriais, a radiação pode ter papel significativo no problema, onde o efeito da radioterapia em osso em crescimento pode conduzir a uma redução na mitose, maturação desordenada das células e subsequente necrose, podendo observar mudanças microscópicas com doses abaixo de 3 Gy

que podem ser observadas a partir de 2 a 4 dias. O restabelecimento do tecido geralmente é mais rápido quando são irradiados com doses abaixo de 12 Gy. Doses de 30 a 50 Gy normalmente estão associadas à danos celulares e morte, podendo ser observado alterações ósseas radiográficas.

Radiografia diagnóstica imediatamente após cirurgia para avaliação da osseointegração de implantes dentais vem sendo desaprovada, devido a possibilidade dos efeitos nocivos da radiação ionizante na reparação e remodelamento do osso. Assim, Dare *et al.*, em 1997, investigaram o efeito da radiação ionizante na proliferação e diferenciação de osteoblastos, usando células semelhantes a osteoblastos, isoladas da calvária de ratos recém nascidos (ROB) e uma linhagem de células osteoblásticas clonais (MC3T3-E1). As células foram expostas no terceiro dia de cultura à doses únicas de Raios X de 40, 100, 400 ou 4000 mGy, respectivamente. O efeito da radiação em células de crescimento e atividade específica de fosfatase alcalina (ALP) foram avaliadas em intervalos de 3 dias após a irradiação, acima de 12 dias em células ROB e avaliados até o décimo segundo dia em células MC3T3-E1. Os resultados indicaram que, a radiação em dose única acima de 400mGy não induz a mudanças significativas em células de crescimento e diferenciação das células semelhantes a osteoblastos, pelo menos *in vitro*. Altas doses de radiação (4000mGy) podem exercer efeito diferente na proliferação celular e diferenciação de osteoblastos, dependendo do tipo de célula afetada.

A radioterapia de tumores de cabeça e pescoço, muito freqüentemente, resulta em prejuízo da reparação de ossos crânio-maxilo-faciais na vizinhança. O mecanismo de danos da radiação nos ossos, ainda não está completamente entendido, contudo, tem sido mostrado que a irradiação altera o equilíbrio entre atividade osteoblástica e osteoclástica, em favor do processo de destruição. O objetivo do trabalho de Würzler *et al.*, em 1998, foi investigar o potencial de BMPs (proteínas ósseas morfogenéticas) em melhorar a reparação óssea prejudicada

pela irradiação. Dois defeitos de 3 mm de diâmetro foram criados na calvária de ratos. O defeito foi tratado com diferentes doses de BMP-2 recombinante humano usando colágeno tipo I como um carreador. Irradiação com uma única dose de 1.200 rads foi realizadas 2 ou 7 dias pré-operatoriamente. Animais não irradiados serviram como controle. Nova formação óssea foi avaliada por quantificação de radiografias da calvária e histologia no 21º dia após a cirurgia. Foi concluído que, a radiação induziu um prejuízo na reparação da calvária que pode ser evitado pela rhBMP-2. Assim o conceito de regeneração induzida pela BMP-2 tem importante aplicação em cirurgia crânio-maxilo-facial reconstrutiva após irradiação, na qual o uso de rhBMP-2 minimiza a perda e enfraquecimento ósseo.

A reparação óssea pode ser prejudicada quando se faz a combinação de cirurgia e radioterapia no tratamento de lesões de câncer. O trabalho de Arnold *et al.*, em 1998, teve como finalidade investigar o efeito de doses únicas de radiação na reparação óssea, em diferentes tempos, antes ou depois do trauma cirúrgico, no fêmur de ratos, irradiando-os com Raios X na dose de 4,5 Gy/min, nos tempos 1 dia, 1, 4, 7, 10 e 26 semanas antes da cirurgia e 6 horas, 1, 2, 3, 4, 7 e 14 dias após cirurgia, sendo sacrificados e realizados cortes histológicos usando método morfométrico. Puderam observar que a radiação do osso adulto resulta em depressão do metabolismo mineral e alteração do remodelamento ósseo, que persiste por muitos meses. Além disso, conduz a uma progressiva diminuição do volume vascular, fluxo sanguíneo e tensão de oxigênio no tecido. Outra alteração encontrada foi que a radiação prejudica a reparação óssea principalmente por seu efeito específico sobre a capacidade proliferativa de precursores celulares, localizados no retículo medular ósseo, periendóstio e endóstio que apresentam um intervalo de *turnover* celular de aproximadamente 8 semanas, havendo portanto um período de latência na qual somente será notado a ocorrência da alteração, quando estas células mesenquimais indiferenciadas precisam se proliferar frente a um estímulo, não conseguindo responder satisfatoriamente a necessidade local

A fim de revisar a indução de fraturas pélvicas como resultado de radioterapia e avaliar como conduzi-la, Tai *et al.* em 2000 revisaram os prontuários de pacientes com câncer endometrial e vaginal, irradiados entre os períodos de 1991 a 1995. Todos os pacientes foram tratados com máquinas megavolts e fótons de energia com 25MV de cobalto. Os autores concluíram que fraturas podem ser facilmente confundidas com lesões metastáticas (37,5%), que acabam sendo tratadas com dose maior de radiação. Embora não haja uma diferença estatisticamente significativa, houve uma tendência para reparação precoce com drogas quimioterápicas. Mais estudos são requeridos para garantir dados quantitativos a fim de relacionar dose e resposta, e ainda avaliar o efeito de drogas terapêuticas na reparação de tais fraturas.

Segundo Dudziak *et al.* em 2000, sabe-se que a radiação ionizante em um sítio de fratura óssea, ocasiona diminuição no número de osteócitos, supressão da atividade osteoblástica e diminuição da vascularização. Contudo, o mecanismo biológico da osteorradionecrose e a prejudicada reparação de fratura de um osso irradiado, permanece indefinido. O propósito do trabalho foi investigar o efeito da radiação ionizante na proliferação, maturação e produção de citocinas de células semelhantes a osteoblastos (MC3T3-E1) *in vitro*, onde após o preparo da cultura de células, elas foram irradiadas com radiação gama (Césio-137) nas doses 0, 40, 400 e 800 cGy e a seguir avaliados a expressão do TGF- $\beta$ 1, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fosfatase alcalina, proliferação celular de MC3T3-E1, habilidade de regulação da proliferação de células endoteliais aórticas e o efeito da terapia de gene TGF- $\beta$ 1, mediada por adenovírus, na tentativa de evitar danos em osteoblastos irradiados. Observou-se que a exposição de células semelhantes a osteoblastos à radiação ionizante resultou em diminuição, na proliferação celular, sendo dose-dependente, bem como estimulou a diferenciação celular, causou diminuição na produção total de TGF- $\beta$ 1 e proteína VEGF. Porém não estimulou a proliferação de células endoteliais aórticas bovinas e finalmente diminuiu a produção celular de proteína TGF- $\beta$ 1 e VEGF. Assim os autores

levantaram a hipótese de que as alterações induzidas pela radiação ionizante no perfil das citocinas e estado de diferenciação de osteoblastos, podem ser fatores intrínsecos do mecanismo celular, provocando osteorradionecrose e prejudicando a reparação de fraturas.

Irradiação de cabeça e pescoço é um tratamento muito comum no caso de lesões malignas, gerando uma série de complicações locais e sistêmicas, tanto à curto quanto à longo prazo. O objetivo do estudo de Nagler em 2001, foi examinar vários parâmetros sistêmicos, após exposição aguda à radiação na região de cabeça e pescoço de ratos, avaliando ainda a validade deste modelo animal para estudo de desenvolvimento de anormalidade em humanos. Os autores utilizaram ratos Wistar divididos em seis grupos que foram avaliados por um período de um ano. O grupo controle, não irradiado, foi comparado com cinco grupos irradiados com diferentes doses de 2,5; 5; 7; 10 e 15 Gy. Foram removidos vários órgãos para exame, onde o grupo controle e grupo que recebeu 15 Gy foram analisados aos 2, 6, 9 e 12 meses pós irradiação. Os dados acumulados demonstraram o devastador resultado da irradiação na região de cabeça e pescoço em modelos de ratos, sendo o efeito da irradiação dose dependente e manifestado por uma deterioração prolongada e crônica no estado geral de saúde, eventualmente resultando em morte animal.

Szymczyk *et al.* em 2004, a fim de testar a hipótese de que a radiação induz a osteorradionecrose devido indução da apoptose de células ósseas, expuseram células MC3T3-E1, que são células semelhantes a osteoblastos, à radiação  $\gamma$  em doses que variaram de 0 a 60 Gy. Os autores avaliaram a vitalidade celular 34 horas após a irradiação e mediram a atividade de desidrogenase dos osteoblastos. A análise dos resultados permitiu concluir que a radiação ionizante suprime a proliferação normal de osteoblastos, mostrando que células irradiadas exibiram elevada atividade de fosfatase alcalina e diminuição nos níveis de TGF- $\beta$ 1, a radiação ionizante induz a uma interrupção da fase G2 de divisão

celular e sensibiliza células ósseas à apoptose, ativando o processo de morte celular. Devido a profunda alteração provocada na função osteoblástica há uma redução na massa óssea e força mecânica.

#### *4 Osteoporose e radiação*

Segundo Shirota *et al.* (1995), estudos experimentais têm mostrado que a capacidade de reparação óssea é retardada com o avanço da idade, inclusive diminuindo a capacidade de reparação após a colocação de implantes, uma vez que osso irradiado parece ter uma limitada capacidade de restabelecer-se da injúria da radiação, especialmente após exposição a altas doses. Segundo os autores a reparação óssea do tecido irradiado após implante é dependente da dose de radiação, do método de irradiação e do intervalo de tempo após radioterapia, sendo ratos mais velhos mais vulneráveis ao efeito da radiação do que ratos jovens.

A osteoradionecrose é uma complicação da radioterapia em carcinoma de cabeça e pescoço, que ocorre em 3 a 10% dos pacientes irradiados. O objetivo de Gal *et al.* em 2000, foi avaliar os fatores envolvidos no remodelamento ósseo e reparação de feridas que podem ser alterados por radioterapia. Para isso, foram utilizadas células de ratos irradiados com 0, 2, 4 ou 6 Gy e os espécimes colhidos aos 1, 7, 17, 28 e 42 dias após irradiação, sendo feitos testes imunohistoquímicos da expressão de TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 1 tipo I e II para seus receptores. A produção de colágeno foi medida aos 1, 7, 28, 35 e 49 dias após irradiação, sendo avaliado ainda o efeito da dexametazona na produção de colágeno e proliferação de células. Puderam verificar que a atividade da fosfatase alcalina tornou-se ligeiramente diminuída nas células irradiadas, mudanças nas células irradiadas não resultou de alteração de fenótipo. A irradiação inibiu a proliferação de

osteoblastos, que parece ter ocorrido em função de uma atenuada taxa de crescimento em células irradiadas e não em função da morte celular induzida pela radiação. A proliferação de osteoblastos foi diminuída em células tratadas com dexametasona, conforme o já conhecido efeito de corticoides na formação óssea, que pareceu ser acentuado pela radiação. Outras alterações encontradas foram a redução prolongada na produção de colágeno principalmente nas células que receberam 4 e 6 Gy, cujo efeito aparentemente diminui com o tempo. O efeito da radiação sobre as células MC3T3-E1, inclui ainda um aumento em receptores de TGF- $\beta$  tipo I e II.

### *3 Proposição*

*D*evido aos transtornos causados pela deficiência de estrogênio, principalmente em relação ao tecido ósseo e pela escassez de pesquisas que avaliem o efeito da radiação ionizante no processo de reparação óssea em associação com esta condição, propõe-se nesta pesquisa, avaliar-se o efeito de 8 Gy de radiação Gama no processo de reparação tecidual de defeitos ósseos, produzidos artificialmente, em animais com deficiência de estrogênio.

## *4 Materiais e métodos*

### *4.1 Seleção dos animais*

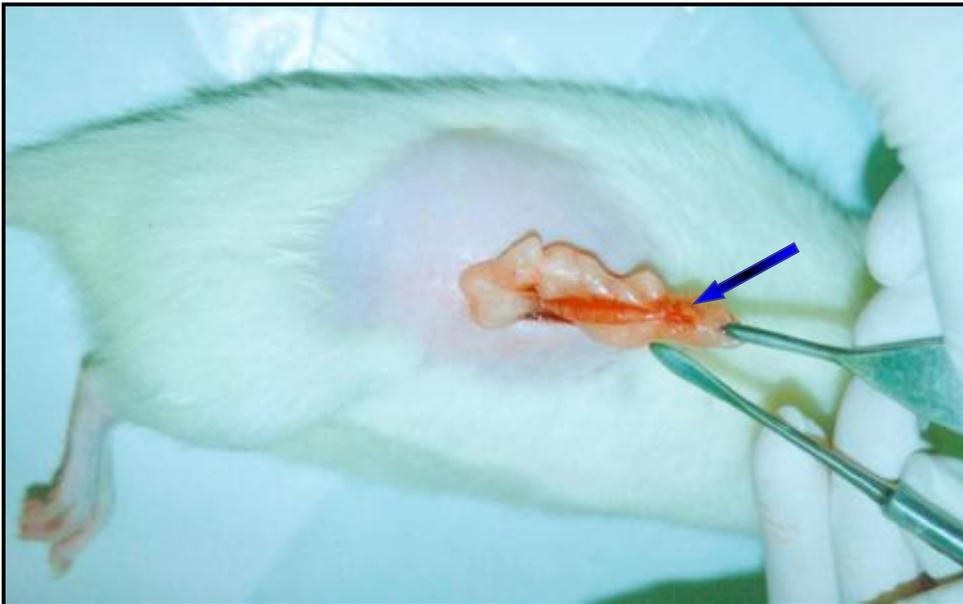
Esta pesquisa teve início após a aprovação do protocolo de pesquisa pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (protocolo N° 599-2 em anexo).

Foram selecionadas cem (100) ratas Wistar (*Rattus Norvegicus*, *Albinus*, Wistar), adultas (90 dias), pesando em média 250 g. Os animais foram

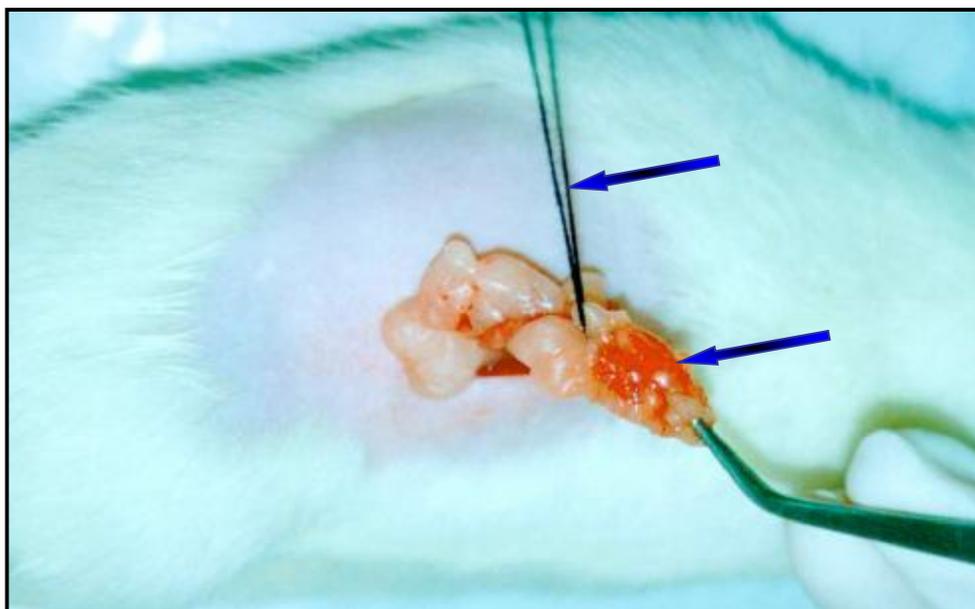
mantidos durante todo o período experimental, em grupos de cinco, em gaiolas plásticas sob as mesmas condições ambientais e água “*ad libitum*”. Houve restrição alimentar (5 mg/dia) para o grupo de ratas ovariectomizadas, a fim de prevenir o aumento de peso induzido pela diminuição do nível de estrogênio (Wronski *et al.*, 1985 e 1986)

#### *4.2 Ovariectomia e Ovariectomia simulada*

Os animais, após serem pesados, receberam via intramuscular 1,0 ml/Kg de peso corpóreo de solução de Cloridrato de Ketamina (Dopalen®, Agribands do Brasil Ltda., Paulínea, SP, Brasil), sendo submetidos à tricotomia das regiões laterais. Após a antisepsia local com álcool iodado, foram realizadas incisões cutâneas bilaterais, sendo o tecido muscular divulsionado para a exposição dos ovários (Figura 4). Metade dos animais tiveram seus ovários intactos recolocados na posição original. Este procedimento teve como finalidade submeter todos os animais ao estresse cirúrgico. Nos cinquenta animais restantes, os ovários foram excisionados (Figura 5). Procedeu-se então a sutura (fio Mononylon 4.0, Ethicon®, Johnson do Brasil S.A., São José dos Campos, SP, Brasil) e administração intramuscular de 1mg/kg de peso corpóreo de antibiótico (Pentabiótico Veterinário pequeno porte, Laboratório FORT DODGE Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil).



**Figura 4-** Tricotomia e identificação do ovário, estrutura avermelhada.



**Figura 5-** Ovário amarrado com fio de sutura para a realização da excisão.

### *4.3 Delimitação do estudo*

Dentre os 50 animais que foram submetido ao procedimento cirúrgico para a simulação da ovariectomia e dos 50 animais ovariectomizados, quatro grupos experimentais constituíram o estudo, sendo os animais aleatoriamente divididos da seguinte forma:

- Grupo Controle (n = 25) = animais que sofreram o procedimento cirúrgico com finalidade de simular a ovariectomia;
- Grupo Ovariectomizado (n = 25) = animais que sofreram o procedimento cirúrgico para a remoção de seus ovários;
- Grupo Irrradiado (n = 25) = animais que sofreram o procedimento cirúrgico com finalidade de simular a ovariectomia e submetidos à radiação;
- Grupo ovariectomizado/irradiado (n = 25) = animais que sofreram o procedimento cirúrgico para a remoção de seus ovários e submetidos à radiação.

### *4.4 Avaliação do efeito da ovariectomia*

Três procedimentos foram realizados para avaliar-se o efeito da ovariectomia nos animais:

#### *4.4.1 Exame do ciclo estral*

A fim de comprovar-se o efeito da ovariectomia, duas semanas após a realização cirúrgica da mesma, todos os animais foram submetidos ao exame do

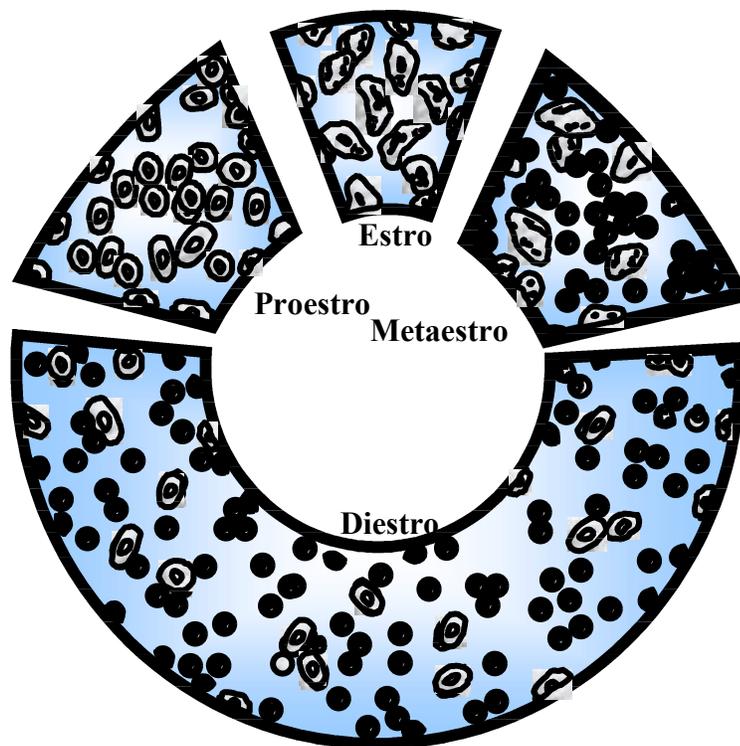
ciclo estral, por meio da coleta de líquido vaginal durante 5 dias consecutivos. A técnica de execução consistiu na dispensa de pequena quantidade de solução salina no interior da vagina da rata, com o auxílio de uma pipeta, sendo a solução rapidamente aspirada e seu conteúdo transferido para uma lâmina e imediatamente observado por meio de microscopia óptica (Hoar & Hickman, 1975 e Marcondes *et al.*, 2002) (Figura 6).



**Figura 6** – Coleta do fluido vaginal com auxílio de pipeta.

O período do ciclo estral de ratas é ideal para investigar as mudanças ocorridas no ciclo reprodutivo. Este ciclo dura de 4 a 5 dias, repetidos ao longo dos anos, podendo ser dividido em quatro fases: metaestro, diestro, proestro e estro (Figura 7). Estas fases relacionam o tipo de célula predominante no esfregaço vaginal com o nível de hormônios sexuais presentes no animal. Na fase Metaestro, observam-se leucócitos e algumas células epiteliais anucleadas remanescentes. Nesta fase inicia-se o aumento da secreção de estrógeno e o primeiro pico de progesterona. Na fase Diestro observam-se basicamente

leucócitos e algumas células epiteliais nucleadas, sendo marcado pelo final do primeiro pico de progesterona e baixos níveis de estrógeno (Hoar & Hickman, 1975; Marcondes *et al.*, 2002 e Duarte, 2003). Na terceira fase, Proestro, o número de células epiteliais nucleadas aumenta enquanto os leucócitos praticamente desaparecem, ocorrendo neste momento o pico de secreção de estrógeno e o segundo pico de progesterona, enquanto na fase Estro, são visualizadas basicamente células epiteliais queratinizadas da camada córnea e o nível de estrógeno retorna aos valores basais. Sendo assim, os animais que foram submetidos a ovariectomia permaneceram sempre na fase Diestro, enquanto aqueles nos quais foi realizada somente a simulação, não houve qualquer alteração em seu ciclo estral. (figuras 7, 8 e 9).



**Figura 7 -** Fases do Ciclo estral das ratas .



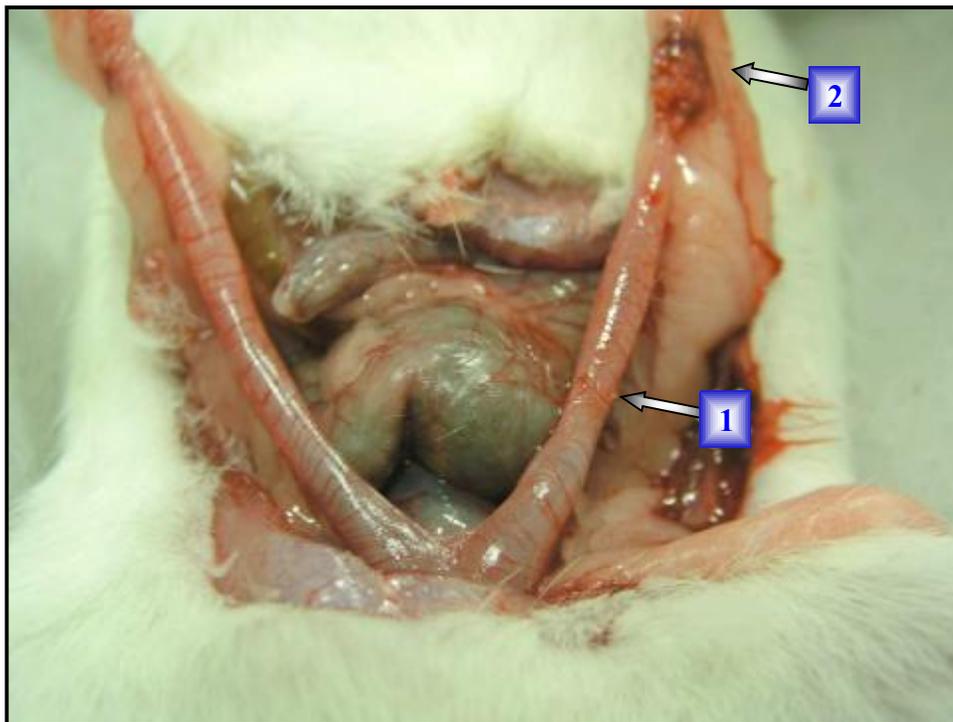
**Figura 8-** Ciclo estral na fase diestro no aumento de 40 X.



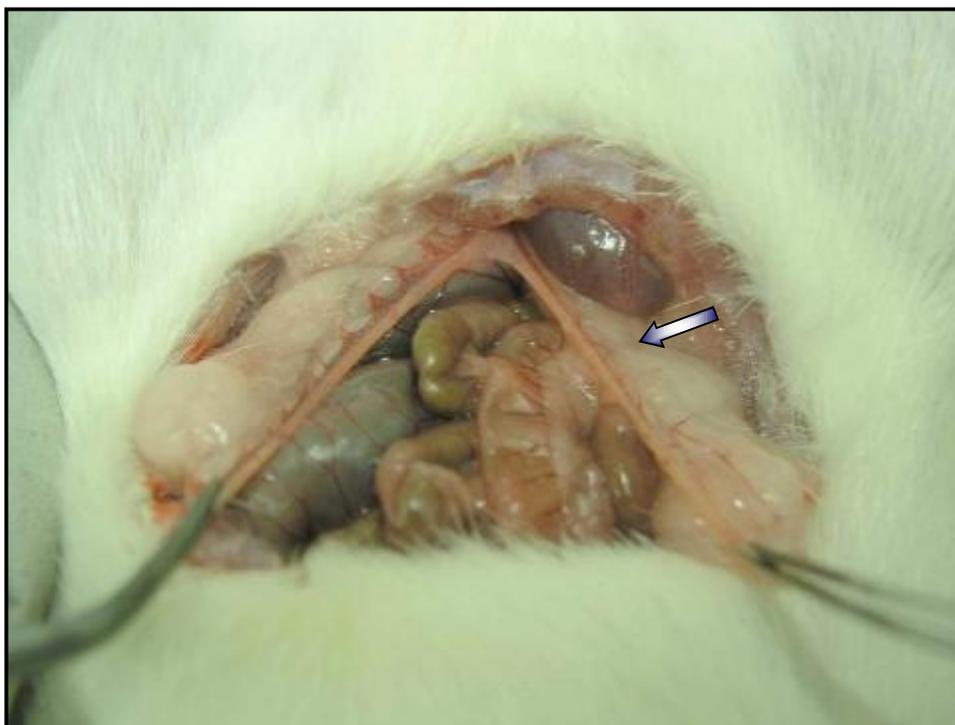
**Figura 9-** Ciclo estral na fase diestro no aumento de 100 X.

#### *4.4.2 Avaliação macroscópica dos cornos uterinos*

Outra forma de avaliar-se o efeito da ovariectomia, consiste do exame macroscópico dos cornos uterinos. Assim, antes dos animais serem sacrificados, foi realizada uma incisão abdominal em cada animal para localização dos respectivos cornos uterinos. Na presença de hormônio, eles apresentaram-se róseos, volumosos e totalmente preenchidos por fluido (Figura 10); enquanto na deficiência do mesmo, ou seja, nos animais ovariectomizados, apresentaram-se finos, atróficos e anêmicos (Figura 11).



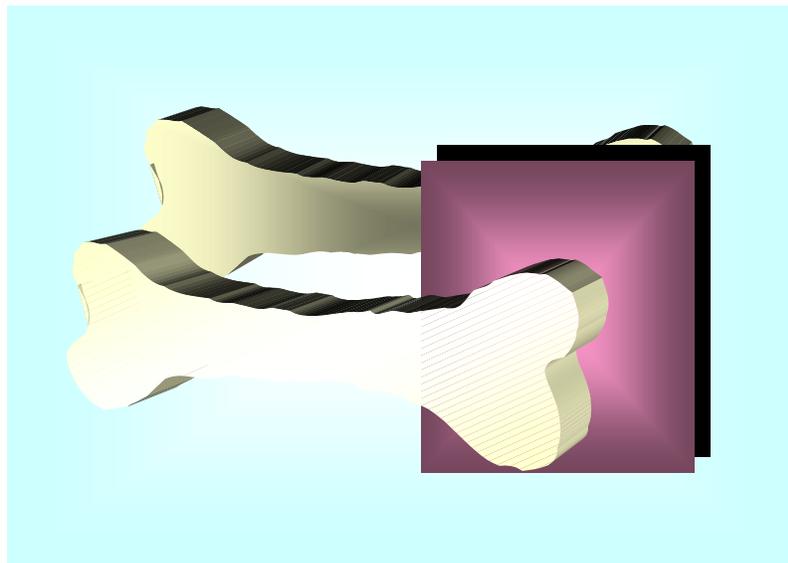
**Figura 10** - 1. Útero de aspecto normal, 2. Presença do ovário.



**Figura 11**- Útero atrofiado confirmando sucesso da ovariectomia.

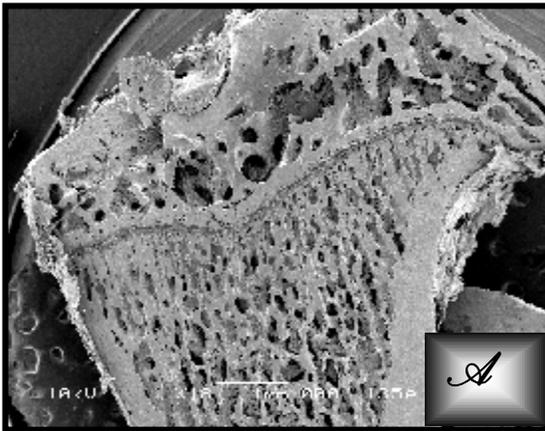
### *4.4.3 Avaliação do trabeculado ósseo*

Os espécimes obtidos aos 91 dias, após fixação em glutaraldeído 2,5% tamponado, por 72 horas, foram cortados no centro da cabeça da tíbia (figura 12), sendo abundantemente lavados em água corrente por cerca de 2 horas; a seguir lavados com solução de Triton a 1% durante 10 minutos e novamente lavados abundantemente por cerca de 4 horas em água corrente. Terminada a lavagem, os espécimes foram colocados na estufa à 37°C “*overnight*” e montados em porta-espécies (*stubs*), levados ao metalizador (Sputter Coater MED 010, Balzers, Liechtenstein) por 100 segundos para uma cobertura de ouro de aproximadamente 10 nanômetros e observados ao microscópio eletrônico de varredura DSM 940<sup>A</sup> da Zeiss (Germany).

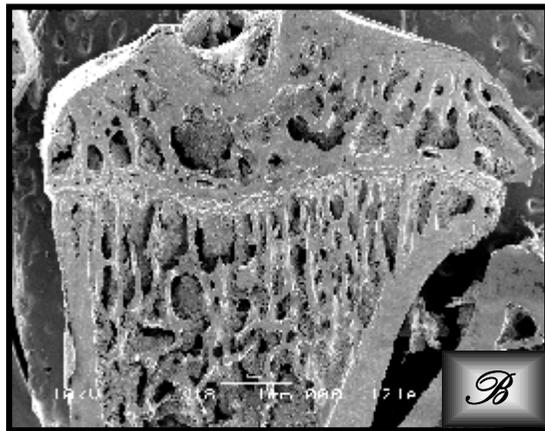


**Figura 12-** Corte longitudinal, no centro da cabeça da tíbia.

Ao microscópio eletrônico de varredura DSM 940<sup>A</sup> da Zeiss (Germany), foram examinados os espécimes obtidos da cabeça da tíbia, onde pode-se perceber que o padrão do trabeculado ósseo não se alterou para o grupo controle, enquanto no grupo ovariectomizado observou-se que, aparentemente, havia uma maior quantidade de espaços medulares. Segundo Peng *et al.* (1997) e Bagi *et al.* (1997), devido a um aumento da aposição periosteal e reabsorção endocortical em ossos longos, estes normalmente sofrem um aumento no volume medular, indicando maior separação trabecular (alteração micro-estrutural) (figuras 13 e 14).



**Figura 13** - Cabeça da tíbia em Microscopia Eletrônica de Varredura do Grupo Controle.



**Figura 14** - Cabeça da tíbia em Microscopia Eletrônica de Varredura do Grupo Ovariectomizado.

#### *4.5 Confeção dos defeitos ósseos*

Quarenta e seis dias após a ovariectomia, todos os animais foram submetidos a novo procedimento cirúrgico, tendo como objetivo a confecção de um defeito ósseo na tíbia. Para este procedimento os animais foram anestesiados, segundo o protocolo previamente descrito. Em seguida, após terem sido realizadas a tricotomia e a anti-sepsia local com álcool iodado, foi feita uma incisão de aproximadamente 1,0 cm na porção proximal da tíbia, utilizando-se lâmina de bisturi n.º 5, proporcionando assim livre acesso à superfície óssea.

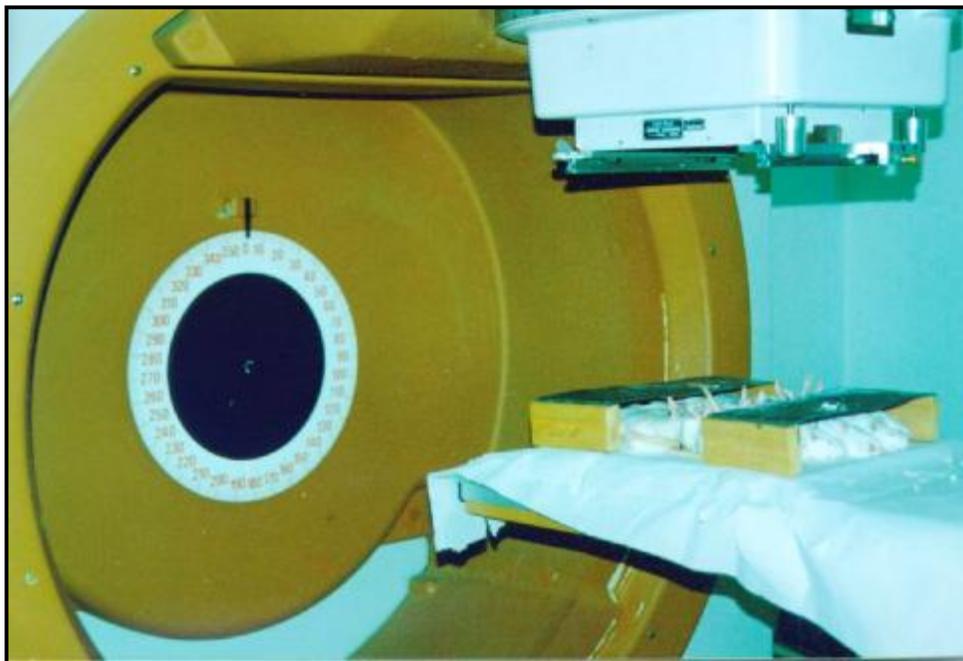
Sob irrigação constante com solução salina, foi produzido o defeito ósseo nas tíbias direita e esquerda, com broca carbide n.º 6 em baixa rotação (Fava) (Figura 15). Os tecidos foram então reposicionados e suturados com pontos simples e fio de Mononylon 4.0 (Ethion®, Johnsons do Brasil S.A., São José dos Campos, SP, Brasil) . Os animais receberam, via intramuscular, dose única de 1,0 mg/kg de antibiótico (Pentabiótico Veterinário pequeno porte, FORT DODGE Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil), não sendo feito nenhum tipo de contenção.



**Figura 15-** Defeito produzido na tíbia, com broca carbide número 6, em baixa rotação e constante irrigação.

#### *4.6 Irradiação*

Três dias após a produção dos defeitos ósseos, os animais pertencentes ao grupo irradiado e ao grupo ovariectomizado/irradiado, receberam na região de seus membros inferiores, uma dose simples de radiação gama, equivalente a 8 Gy, emitida de um aparelho de Cobalto Terapia (Cobalto 60) modelo Alcyon, cujas constantes físicas foram: 125 MeV, distância alvo-fonte de 80 cm, tempo de exposição de 7,98 minutos, campo com 10 ratos de 31x16 cm, sendo o rendimento da fonte de 89,6 cGy/min (Figura 16).



**Figura 16** - Irradiação dos animais, somente nos membros inferiores.

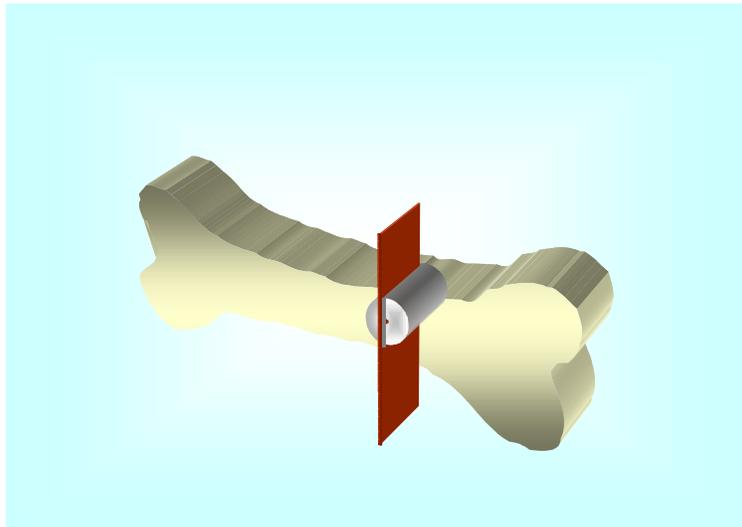
#### *4.7 Obtenção dos espécimes*

Aos 7, 14, 21, 28 e 45 dias após a produção do defeito ósseo, cinco animais de cada grupo foram submetidos à anestesia por Cloridrato de Ketamina, sendo então removidos os espécimes, os quais constituíam-se das tíbias direita e esquerda de cada animal. Estas foram imediatamente colocadas em formol neutro tamponado por no mínimo 72 horas. As tíbias removidas aos 45 dias foram fixadas em glutaraldeído 2,5% tamponado (pH 7,3-0,1M), também pelo mesmo período.

## *4.8 Métodos histológicos*

Transcorrido o tempo de 72 horas de fixação dos espécimes e posterior lavagem com tampão fosfato de uso, os espécimes foram descalcificados em EDTA 5%, incluídos em Paraplast Plus, seguindo a técnica de rotina e processados em micrótomo, obtendo-se secções de 6  $\mu\text{m}$  de espessura, em cortes longitudinais aos defeitos ósseos confeccionados. Estes foram processados, segundo o protocolo de Histologia da FOP-UNICAMP para Tricrômico de Mallory, Picrosírius e Hematoxilina-Eosina (Figura 17).

Os espécimes obtidos aos 45 dias, após fixação em glutaraldeído 2,5% tamponado, foram cortados no centro do defeito ósseo e sofreram o mesmo procedimento citado anteriormente quando da preparação da cabeça da tíbia para avaliação do trabeculado ósseo. Esses espécimes também foram observados ao microscópio eletrônico de varredura DSM 940<sup>A</sup> da Zeiss (Germany) (Figura 17).



**Figura 17-** Corte no centro do defeito ósseo.

#### *4.8.1 Métodos histológicos para microscopia óptica*

- **Coloração por Hematoxilina Eosina:** permite a avaliação morfológica simples do tecido ósseo neoformado;
- **Coloração por Picrosírius:** avalia a birrefringência de forma da matriz colágena do osso, sob luz polarizada;
- **Coloração por Tricrômico de Mallory:** permite a avaliação morfológica detalhada do tecido ósseo neoformado.

#### *4.8.2 Análise da Birrefringência*

Para a análise da birrefringência, foram utilizadas as lâminas coradas com Picrosírius, cuja avaliação foi feita ao microscópio de polarização (Zeiss Axiolab – Zeiss – Alemanha) com lente objetiva no aumento de 10X e acoplado a esta uma microcâmera (Microcâmera Sony CCD/RGB COLOR – Japão), a fim de digitalizar as imagens histológicas que foram transmitidas ao computador.

Através do programa analisador de imagens (KS 400 2.0 – Kontron Electronics – Alemanha) foram realizadas 3 medidas ( $\text{cm}^2$ ) sendo uma do centro do defeito e uma de cada lado do defeito, logo abaixo da cortical óssea (Figura 18). Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA ( $p < 0,05$ ).



**Figura 18** - Áreas medidas na birrefringência.

### *4.8.3 Análise de densidade volumétrica*

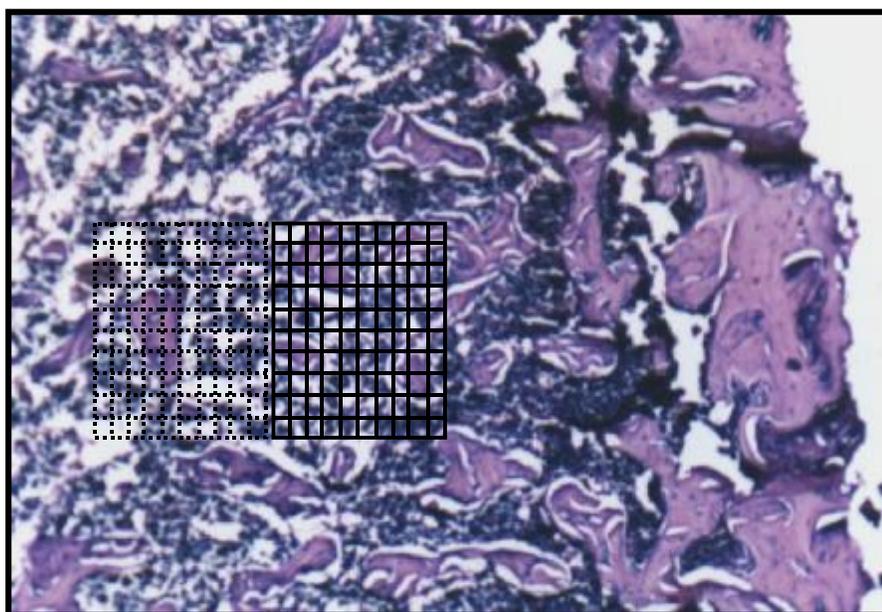
A densidade volumétrica da área de reparação óssea, nos diferentes grupos, foram determinadas através do método de impacto de pontos, observado ao microscópio óptico no aumento de 10X, onde o campo de observação foi superposto em uma grade reticulada com 100 pontos, sendo que cada ponto eqüivalia a  $0,065\text{mm}^3$  (Figura 19).

$$\text{Formula } Vv = P \times (0,065)^3 / 100 \times (0,065)^3 \text{ mm}^3/\text{mm}^3$$

$Vv$  = densidade volumétrica

P = número de pontos de impacto.

A seguir os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA ( $p < 0,05$ ).



**Figura 19** - Grade reticulada para medir os pontos de impacto.

## *5 Resultados*

- *Descrição Morfológica: Coloração por Hematoxilina-Eosina*

- *7 dia do processo de reparação óssea:*

O grupo controle exibiu o local do defeito ósseo evidente, coberto por fina camada de tecido de granulação e já com formação de numerosas trabéculas ósseas. O grupo irradiado ao contrário, mostrou-se incipiente no que tange a formação de trabéculas ósseas, exibindo uma considerável quantidade de tecido de granulação pouco organizado. O grupo ovariectomizado mostrou um padrão de

formação óssea menos evidente que o grupo controle, entretanto, quando comparado o grupo ovariectomizado com o grupo irradiado, o ovariectomizado mostrou maior formação óssea. Já o grupo ovariectomizado/irradiado apresentou maior prejuízo em relação ao processo de reparo, exibindo tecido necrótico na superfície do local da incisão, restos de coágulo e apenas início de formação de tecido de granulação.

Desta maneira, sob uma análise morfológica comparativa do processo de reparo aos 7 dias de evolução, observou-se que dos três grupos experimentais, o grupo ovariectomizado/irradiado foi aquele que apresentou o maior grau de retardo, mostrando-se portanto menos evoluído (Prancha 1).

- *14<sup>o</sup> dia do processo de reparação óssea:*

Aos 14 dias o grupo controle exibiu o local da perfuração preenchido por fibras colágenas remanescentes do tecido de granulação e uma grande quantidade de trabéculas ósseas, já mostrando sinais de formação de medula vermelha. O grupo irradiado apresentou-se com formação óssea diminuída em relação ao grupo controle, embora também exibindo aspectos de formação de medula vermelha, no entanto o local da perfuração estava ocluído por tecido de granulação espesso, o mesmo ocorrendo nos grupos ovariectomizado e ovariectomizado/irradiado.

O grupo ovariectomizado apresentou um padrão de reparação óssea em que podia-se observar trabéculas ocupando a maior parte do defeito ósseo, estando a porção superior do mesmo preenchida por fibras colágenas. Embora esse padrão também fosse observado no grupo controle, a área preenchida por trabéculas ósseas era maior no grupo controle, o que indica portanto maior

evolução. Já o grupo irradiado apresentou aos 14 dias um preenchimento do defeito ósseo com maior quantidade de trabéculas que o do grupo ovariectomizado, observando-se entretanto, que a porção superior do defeito estava preenchida por fibras colágenas, enquanto uma pequena porção no fundo do defeito, estava preenchida por trabéculas ósseas.

O grupo ovariectomizado/irradiado, apresentou o maior retardo em relação aos demais, uma vez que era evidente o preenchimento por fibras colágenas de todo o defeito ósseo.

A análise morfológica aos 14 dias demonstrou uma evolução no processo de reparação quando comparado ao tempo de 7 dias, entretanto o padrão de reparação aos 14 dias entre os grupos permaneceu semelhante, sendo evidente o retardo no grupo ovariectomizado/irradiado (Prancha 2).

- *21º dia do processo de reparação óssea:*

O processo de reparo do defeito ósseo mostrou-se bem evoluído no grupo controle aos 21 dias, evidenciado pela presença da cortical óssea fechando o defeito. Esta descrição também pode ser feita em relação aos grupos ovariectomizado e ovariectomizado/irradiado. Já o grupo irradiado apresentou ainda a presença de tecido de granulação na porção superior do defeito.

Com relação ao padrão trabecular, o maior número de trabéculas foi observado no grupo controle, seguido pelo grupo irradiado. Os grupos ovariectomizado e ovariectomizado/irradiado mostraram o espaço do defeito ósseo preenchido por medula vermelha e amarela. Entretanto, como no grupo ovariectomizado/irradiado, ainda observou-se a presença de tecido fibroso recobrendo a cortical óssea neoformada, o que não foi observado no grupo

ovariectomizado, pode-se afirmar que o grupo ovariectomizado/irradiado teve maior prejuízo na evolução do processo de reparo (Prancha 3).

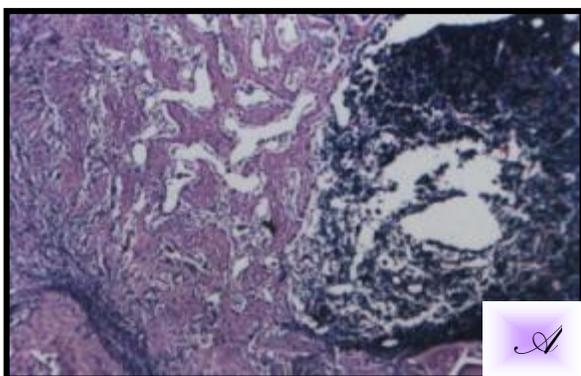
● *28<sup>o</sup> dia do processo de reparação óssea:*

Aos 28 dias, o processo de reparo do defeito ósseo continuou com o padrão de evolução normal no grupo controle, podendo-se observar a presença do periósteo superficialmente da espessa camada de osso cortical. Ainda observou-se também a presença de trabéculas ósseas.

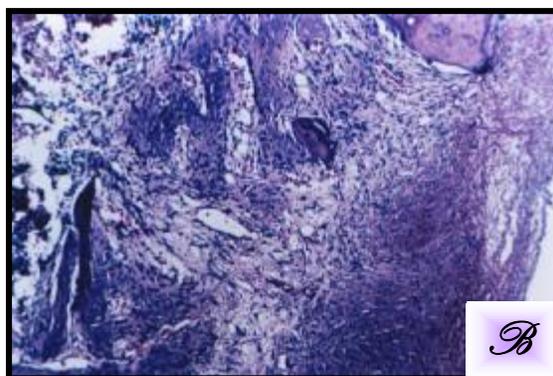
O grupo irradiado apresentou aos 28 dias a presença de cortical óssea, embora ainda imatura. Também pode ser observada uma diminuição no número de trabéculas ósseas, quando comparou-se este mesmo grupo com o irradiado aos 21 dias. Quando comparou-se o grupo irradiado aos 28 dias com o grupo ovariectomizado e ovariectomizado/irradiado no mesmo período, observou-se que o grupo ovariectomizado/irradiado, apresentou total ausência de trabéculas ósseas (Prancha 4).

*Plancha 1 - Processo de reparação óssea aos 7 dias:*

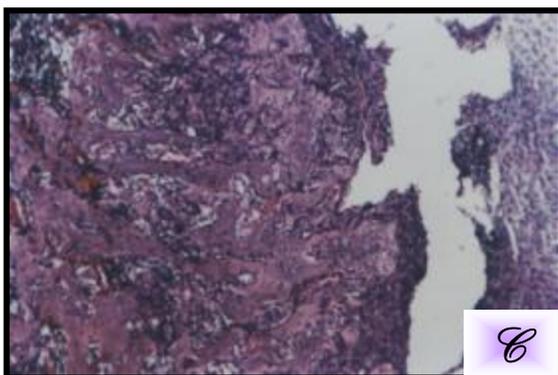
*Coloração por Hematoxilina-Eosina (Aumento Original: 6,3 x 1,25 x 10).*



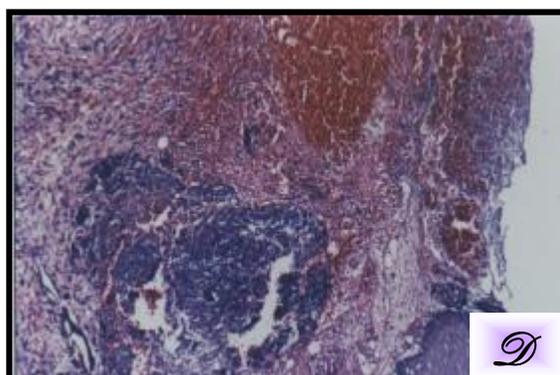
A- Grupo Controle



B- Grupo Irrradiado



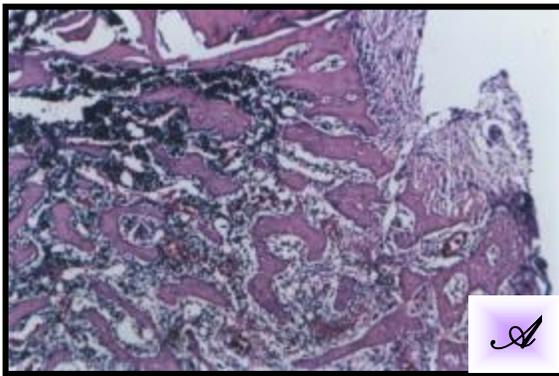
C-Grupo Ovariectomizado



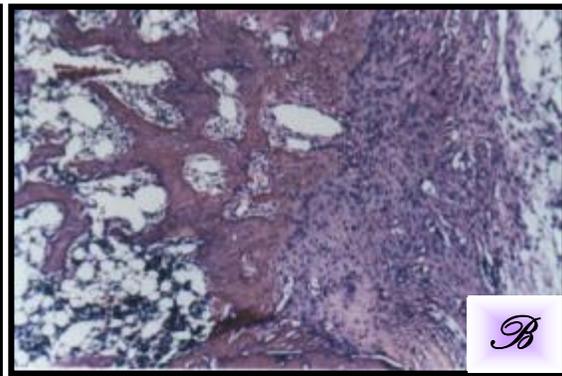
D- Grupo Ovariectomizado / Irradiado

*Plancha 2 - Processo de reparação óssea aos 14 dias:*

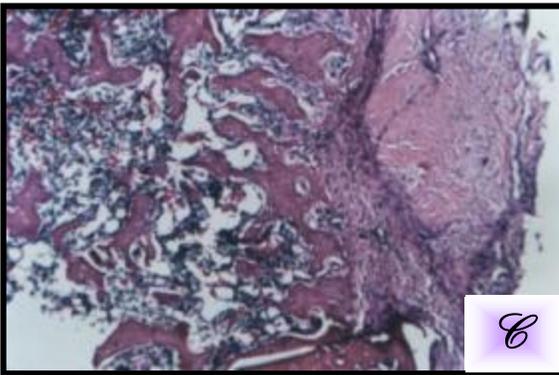
*Coloração por Hematoxilina-Eosina (Aumento Original: 6,3 x 1,25 x 10).*



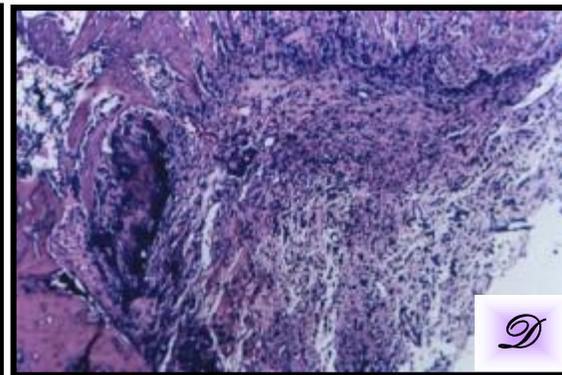
**A-** Grupo Controle



**B-** Grupo Irrradiado



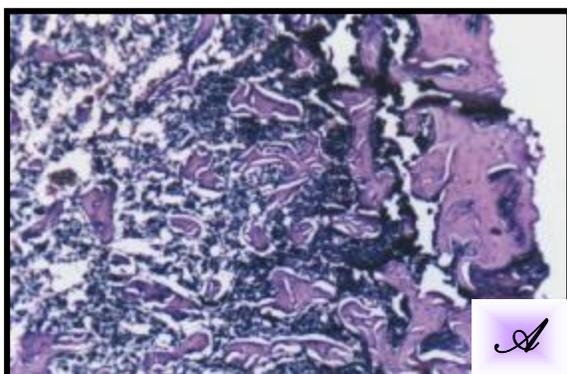
**C-** Grupo Ovariectomizado



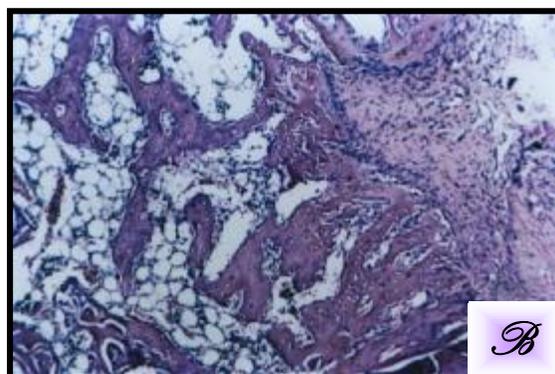
**D-** Grupo Ovariectomizado / Irradiado

*Plancha 3 - Processo de reparação óssea aos 21 dias:*

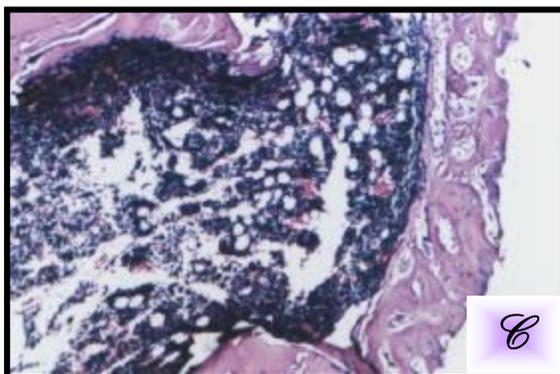
*Coloração por Hematoxilina-Eosina (Aumento Original: 6,3 x 1,25 x 10).*



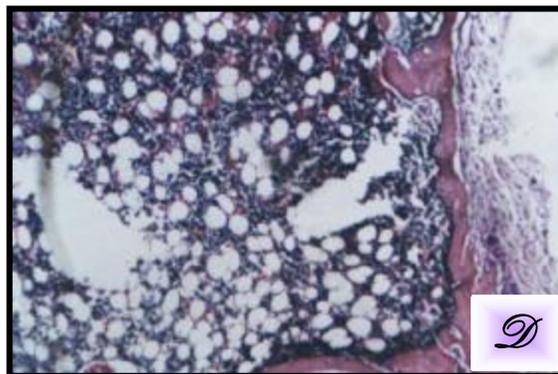
A- Grupo Controle



B- Grupo Irrradiado



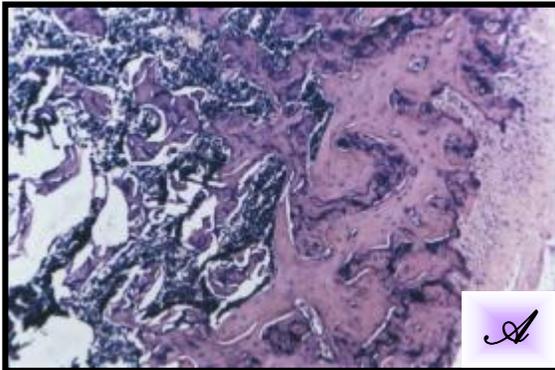
C-Grupo Ovariectomizado



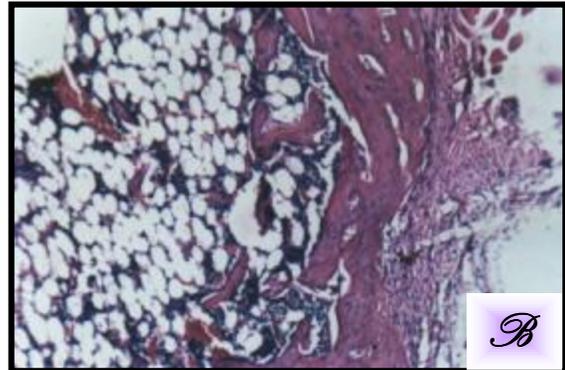
D- Grupo Ovariectomizado / Irrradiado

*Plancha 4 - Processo de reparação óssea aos 28 dias:*

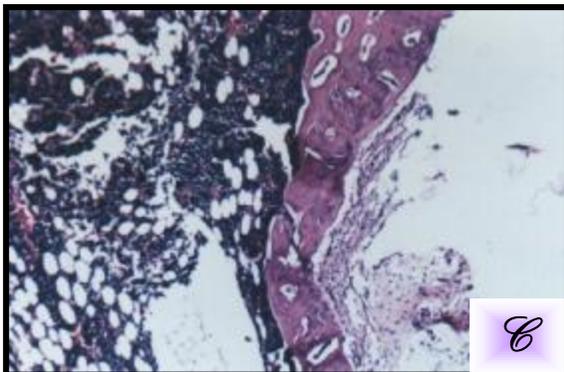
*Coloração por Hematoxilina-Eosina (Aumento Original: 6,3 x 1,25 x 10).*



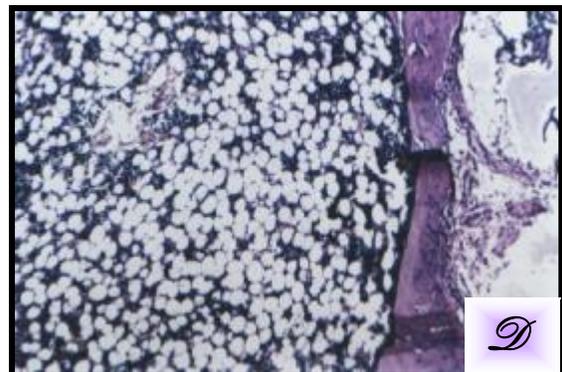
A- Grupo Controle



B- Grupo Irrradiado



C-Grupo Ovariectomizado



D- Grupo Ovariectomizado/ Irrradiado

● *Descrição Morfológica: Coloração por Tricrômico de Mallory:*

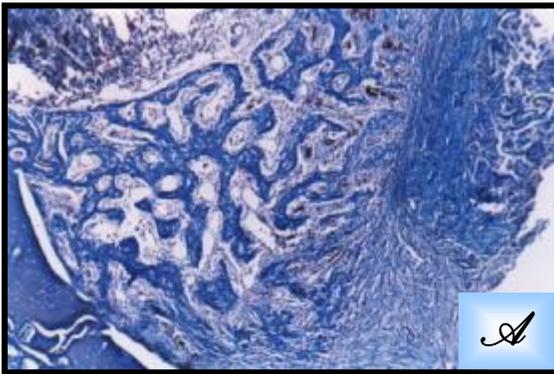
O Tricrômico de Mallory é um método morfológico que evidencia as fibras colágenas presentes no tecido ósseo, possibilitando uma avaliação do grau de maturação do tecido neoformado. No caso do presente trabalho, as trabéculas ósseas coradas em azul, revelam a sua natureza ainda imatura, ao passo que, uma coloração azul amarelada mostra a maturação deste tecido. Nestas condições, quanto mais azul o tecido ósseo se apresentar, mais imaturo ele se encontra.

Assim sendo, pode-se observar que, em relação ao grupo controle, os demais grupos experimentais mostraram-se menos evoluídos, fato que se notou muito bem aos 14 dias, onde o grupo irradiado mostrou trabéculas mais próximas ao controle que o grupo ovariectomizado e principalmente ao grupo ovariectomizado/irradiado.

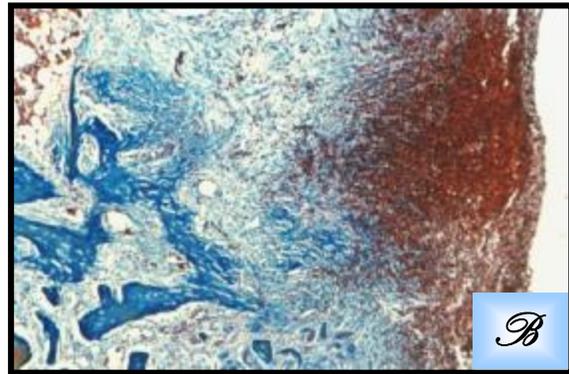
O mesmo fenômeno pode ser observado em relação a cortical óssea aos 21 dias e 28 dias, onde se notou que a maturação ocorreu muito mais rapidamente no grupo controle, diminuindo respectivamente nos grupos irradiado, ovariectomizado e ovariectomizado/irradiado (Pranchas 5, 6, 7 e 8).

*Plancha 5 - Processo de reparação óssea aos 7 dias:*

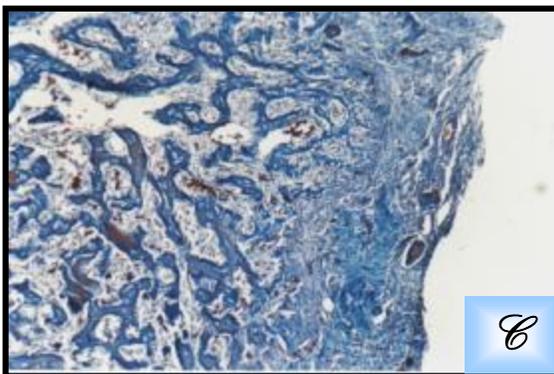
*Coloração por Tricrômico de Mallory (Aumento Original: 6,3 x 1,25 x 10)*



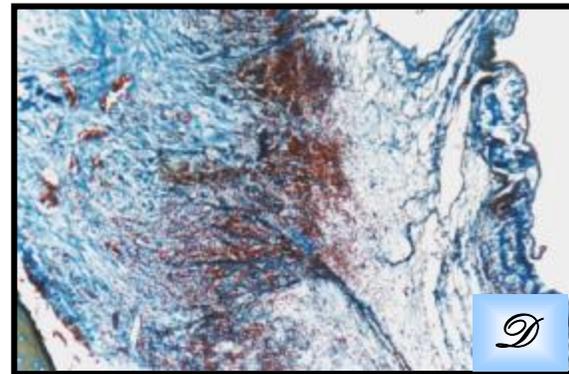
A- Grupo Controle



B- Grupo Irradiado



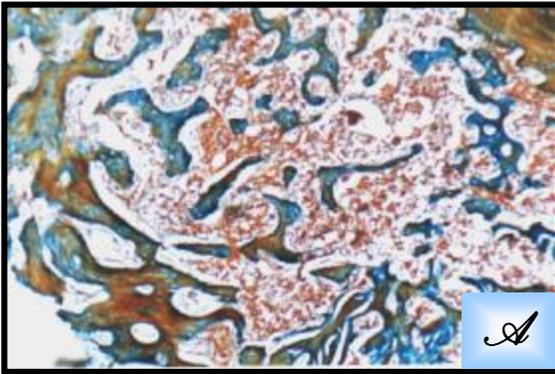
C-Grupo Ovariectomizado



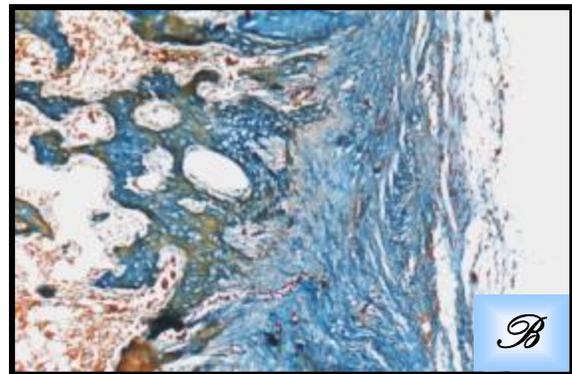
D- Grupo Ovariectomizado/Irradiado

*Plancha 6 - Processo de reparação óssea aos 14 dias:*

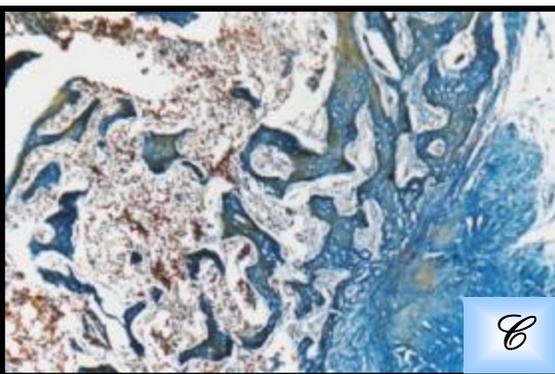
*Coloração por Tricrômico de Mallory (Aumento Original: 6,3 x 1,25 x 10)*



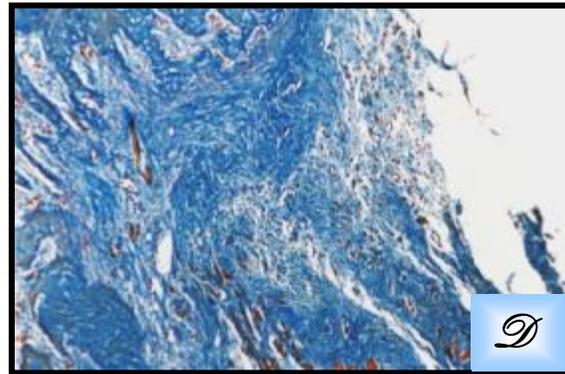
A- Grupo Controle



B- Grupo Irrradiado



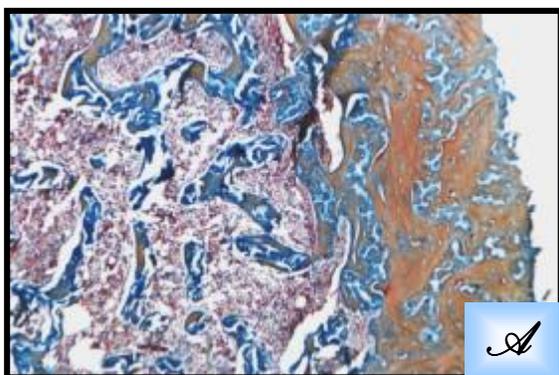
C-Grupo Ovariectomizado



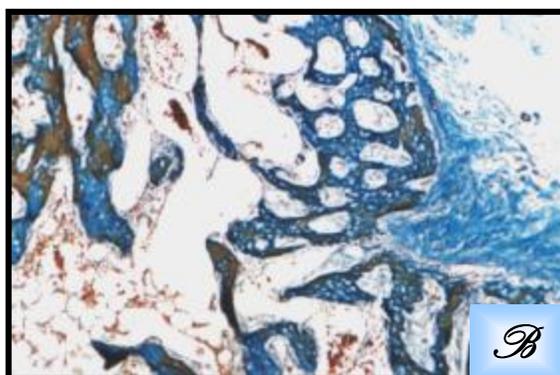
D- Grupo Ovariectomizado /Irradiado

*Plancha 7 - Processo de reparação óssea aos 21 dias:*

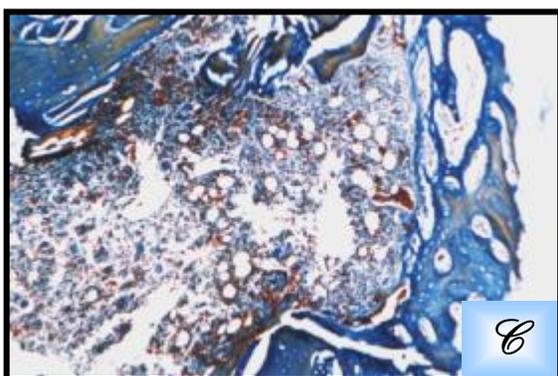
*Coloração por Tricrômico de Mallory (Aumento Original: 6,3 x 1,25 x 10)*



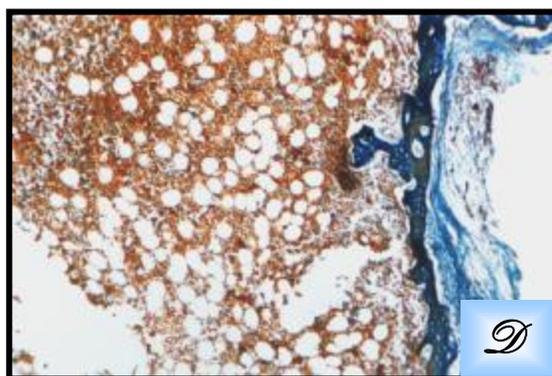
A- Grupo Controle



B- Grupo Irrradiado



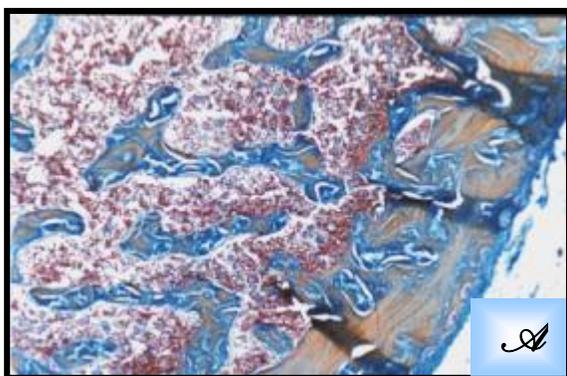
C-Grupo Ovariectomizado



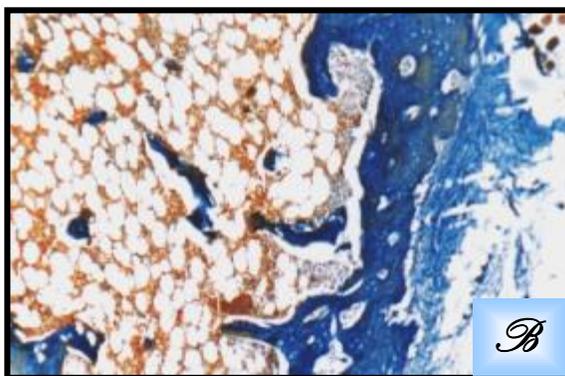
D- Grupo Ovariectomizado / Irrradiado

*Plancha 8 - Processo de reparação óssea aos 28 dias:*

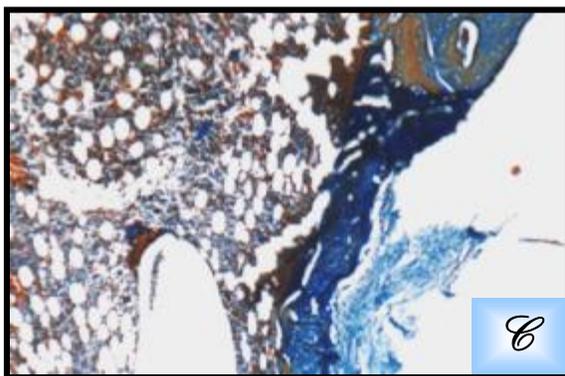
*Coloração por Tricrômico de Mallory (Aumento Original: 6,3 x 1,25 x 10)*



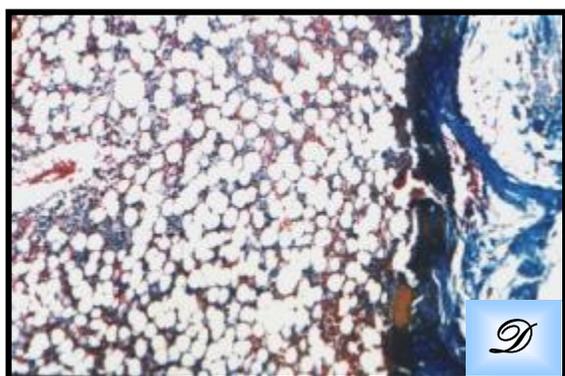
A- Grupo Controle



B- Grupo Irrradiado



C-Grupo Ovariectomizado



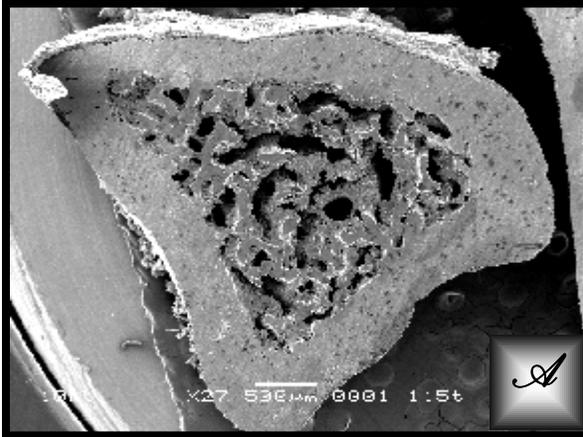
D- Grupo Ovariectomizado/Irradiado

- *Avaliação ultra-estrutural qualitativa da área de defeito ósseo:*

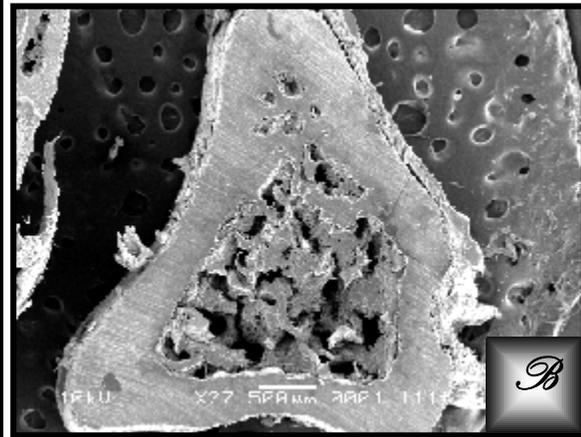
Aos 45 dias do processo de reparação, quando se observou a área do defeito, os grupos controle e irradiado apresentaram ainda trabeculado ósseo, sendo a quantidade de trabéculas no grupo irradiado menores que a do grupo controle, enquanto os grupos ovariectomizado e ovariectomizado/irradiado não tinham trabeculado ósseo, denotando ter ocorrido uma reabsorção mais acentuada nestes dois grupos. No grupo ovariectomizado/irradiado pode-se perceber a cortical óssea com áreas de espessura ainda delgada. (Prancha 9).

*Plancha 9 - Processo de reparação óssea aos 45 dias:*

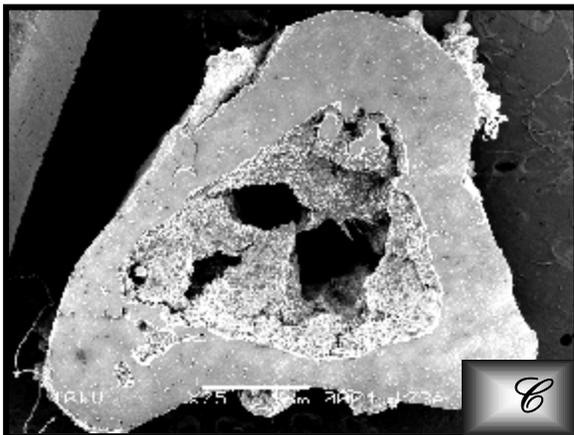
*Microscopia Eletrônica de Varredura*



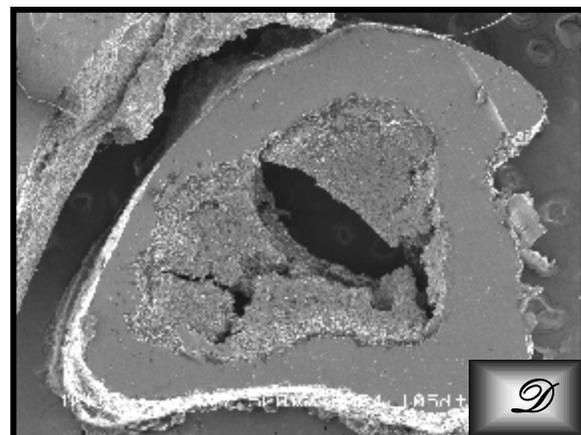
A- Grupo Controle



B- Grupo Irrradiado



C- Grupo Ovariectomizado



D- Grupo Ovariectomizado/Irradiado

- *Avaliação quantitativa da área de fibras colágenas pela coloração de Picrosírius:*

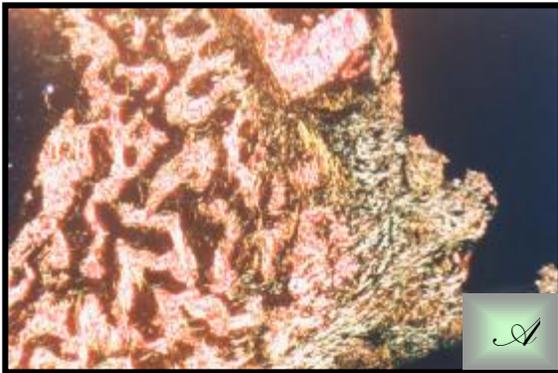
O termo birrefringência significa um fenômeno óptico em que a um raio incidente correspondem dois refratários. As substâncias que possuem essa propriedade óptica são chamadas birrefringentes (2 índices de refração).

Esta coloração foi usada para a detecção da birrefringência de forma da matriz orgânica colágena do osso, sob luz polarizada, permitindo observar o brilho dos feixes de colágeno, que expressa seu grau de orientação macromolecular, tornando-se mais intenso quanto mais numerosos e mais maduros eles estejam. Assim sob luz polarizada, o brilho dos feixes de fibras colágenas em tons vermelhos indicam o grau de organização macromolecular do tecido (prancha 10).

Os dados obtidos pelo programa analisador de imagens histológicas (KS 400 2.0 – Kontron Electronics – Alemanha), tiveram como finalidade medir as áreas, em  $\text{cm}^2$ , dos feixes com birrefringência, onde a seguir, os dados foram submetidos ao Teste ANOVA ( $P < 0,05$ ) para os grupos dentro de cada período de tempo.

*Plancha 10 - Processo de reparação óssea aos 7 dias:*

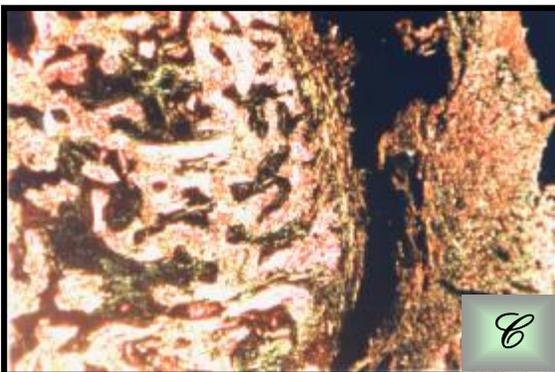
*Coloração por Picrosirius*



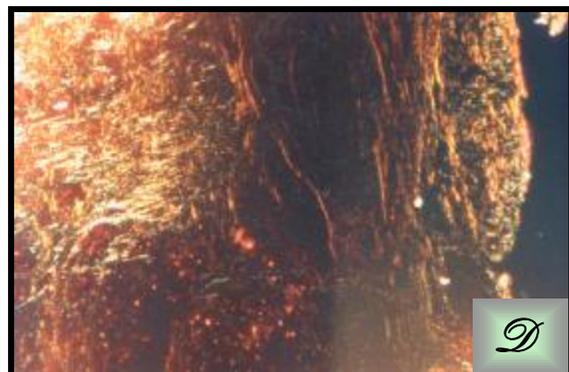
**A-** Grupo Controle



**B-** Grupo Irrradiado



**C-** Grupo Ovariectomizado



**D-** Grupo Ovariectomizado/ Irradiado

Os resultados encontrados pela análise estatística da birrefringência, podem ser visualizadas nos gráficos a seguir. A Tabela 1 e o Gráfico 1 representam a média das medidas da birrefringência no tecido ósseo aos 7 dias, observando-se que os grupos controle e ovariectomizado apresentaram a maior birrefringência, sendo esta estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais grupos. O grupo ovariectomizado/irradiado foi o que apresentou a menor média, sendo estatisticamente diferente dos demais grupos.

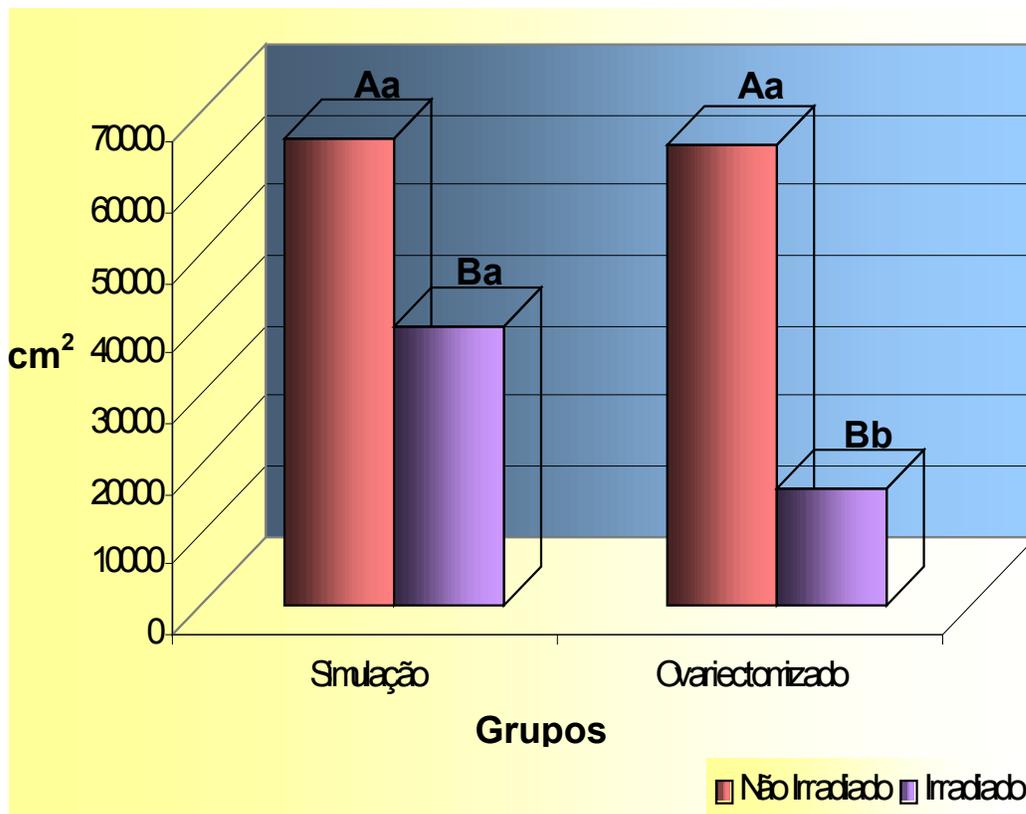
*Tabela 1-* Médias e Desvios-Padrão da birrefringência do tecido

ósseo aos 07 dias do processo de reparação óssea.

TEMPO		NÃO IRRADIADO	IRRADIADO
7 Dias	SIMULAÇÃO	66566 <b>Aa</b> (16207)	39478 <b>Ba</b> (8333)
	OVARIECTOMIZADO	65369 <b>Aa</b> (12376)	16394 <b>Bb</b> (6576)

Medidas seguidas de letras distintas (Maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada tempo) diferem entre si pela ANOVA ( $p < 0,05$ ). Simulação não irradiado = grupo controle, simulação irradiado = grupo irradiado, ovariectomizado não irradiado = grupo ovariectomizado e ovariectomizado irradiado = grupo ovariectomizado/irradiado.

**Gráfico 1-** Médias das medidas da birrefringência do tecido ósseo em função do grupo, aos 07 dias do processo de reparação óssea.



Medidas seguidas de letras distintas (Maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada tempo) diferem entre si pela ANOVA ( $p < 0,05$ ). Simulação não irradiado = grupo controle, simulação irradiado = grupo irradiado, ovariectomizado não irradiado = grupo ovariectomizado e ovariectomizado irradiado = grupo ovariectomizado/irradiado.

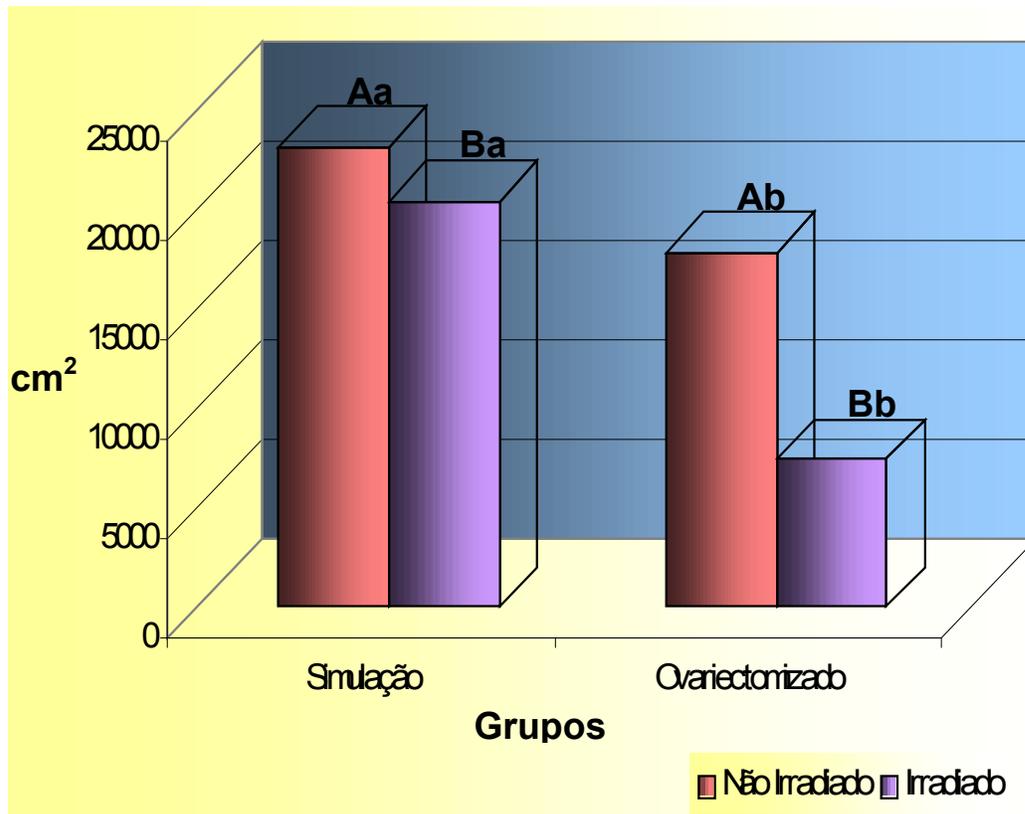
Aos 14 dias do processo de reparação óssea, a maior média de birrefringência encontrada foi no grupo controle, seguido do grupo irradiado, ovariectomizado e ovariectomizado/irradiado, sendo estas diferenças estatisticamente significante ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos comparados (tabela 2 e o gráfico 2).

*Tabela 2-* Médias e Desvios-Padrão da birrefringência do tecido ósseo aos 14 dias do processo de reparação óssea.

TEMPO		NÃO IRRADIADO	IRRADIADO
14 Dias	SIMULAÇÃO	23292 <b>Aa</b> (10095)	20552 <b>Ba</b> (4606)
	OVARIECTOMIZADO	17932 <b>Ab</b> (3383)	7460 <b>Bb</b> (2015)

Medidas seguidas de letras distintas (Maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada tempo) diferem entre si pela ANOVA ( $p < 0,05$ ). Simulação não irradiado = grupo controle, simulação irradiado = grupo irradiado, ovariectomizado não irradiado = grupo ovariectomizado e ovariectomizado irradiado = grupo ovariectomizado/irradiado.

**Gráfico 2-** Médias das medidas da birrefringência do tecido ósseo em função do grupo, aos 14 dias do processo de reparação óssea.



Medidas seguidas de letras distintas (Maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada tempo) diferem entre si pela ANOVA ( $p < 0,05$ ). Simulação não irradiado = grupo controle, simulação irradiado = grupo irradiado, ovariectomizado não irradiado = grupo ovariectomizado e ovariectomizado irradiado = grupo ovariectomizado/irradiado.

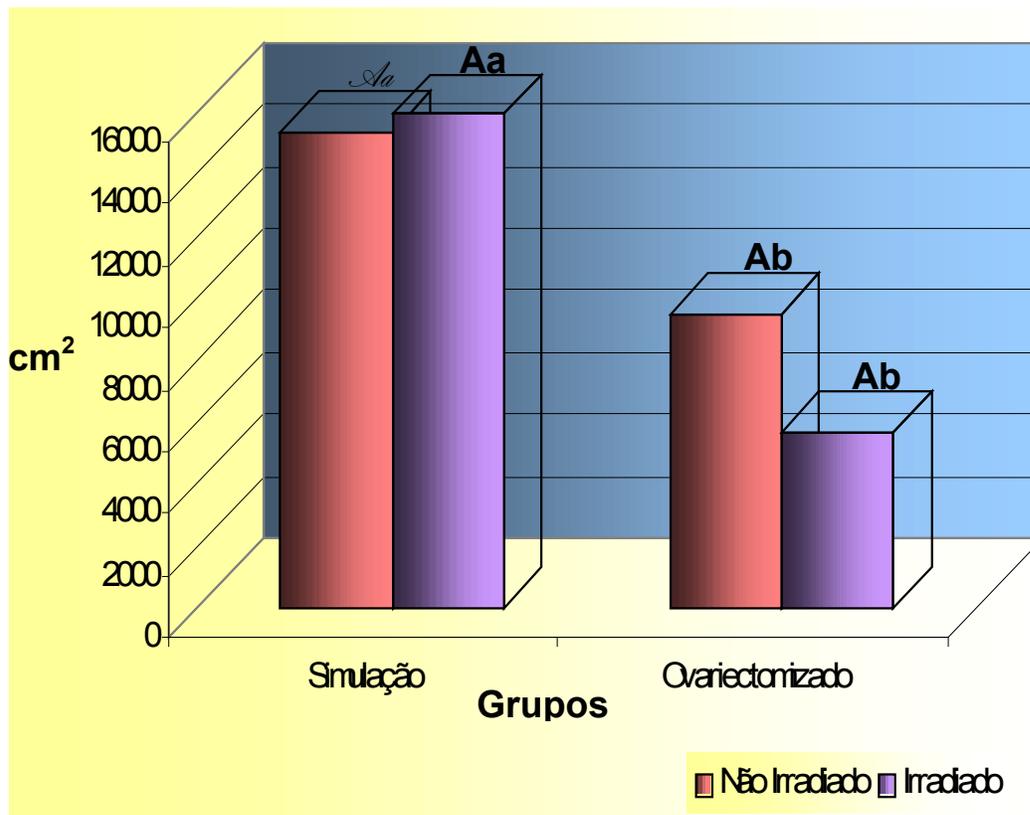
A tabela 3 e o gráfico 3 representam as médias aos 21 dias do processo de reparação e observa-se que o grupo irradiado apresentou a maior média de birrefringência seguido pelos grupos controle, ovariectomizado e ovariectomizado/irradiado, não existindo diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos controle e irradiado e entre os grupos ovariectomizado e ovariectomizado/irradiado, porém havendo diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos controle e ovariectomizado e entre o irradiado e ovariectomizado/irradiado.

*Tabela 3-* Médias e Desvios-Padrão da birrefringência do tecido ósseo aos 21 dias do processo de reparação óssea.

TEMPO		NÃO IRRADIADO	IRRADIADO
21 Dias	SIMULAÇÃO	15404 <b>Aa</b> (11285)	15940 <b>Aa</b> (5947)
	OVARIECTOMIZADO	9477 <b>Ab</b> (2265)	5688 <b>Ab</b> (2615)

Medidas seguidas de letras distintas (Maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada tempo) diferem entre si pela ANOVA ( $p < 0,05$ ). Simulação não irradiado = grupo controle, simulação irradiado = grupo irradiado, ovariectomizado não irradiado = grupo ovariectomizado e ovariectomizado irradiado = grupo ovariectomizado/irradiado.

**Gráfico 3-** Médias das medidas da birrefringência do tecido ósseo em função do grupo, aos 21 dias do processo de reparação óssea.



Medidas seguidas de letras distintas (Maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada tempo) diferem entre si pela ANOVA ( $p < 0,05$ ). Simulação não irradiado = grupo controle, simulação irradiado = grupo irradiado, ovariectomizado não irradiado = grupo ovariectomizado e ovariectomizado irradiado = grupo ovariectomizado/irradiado.

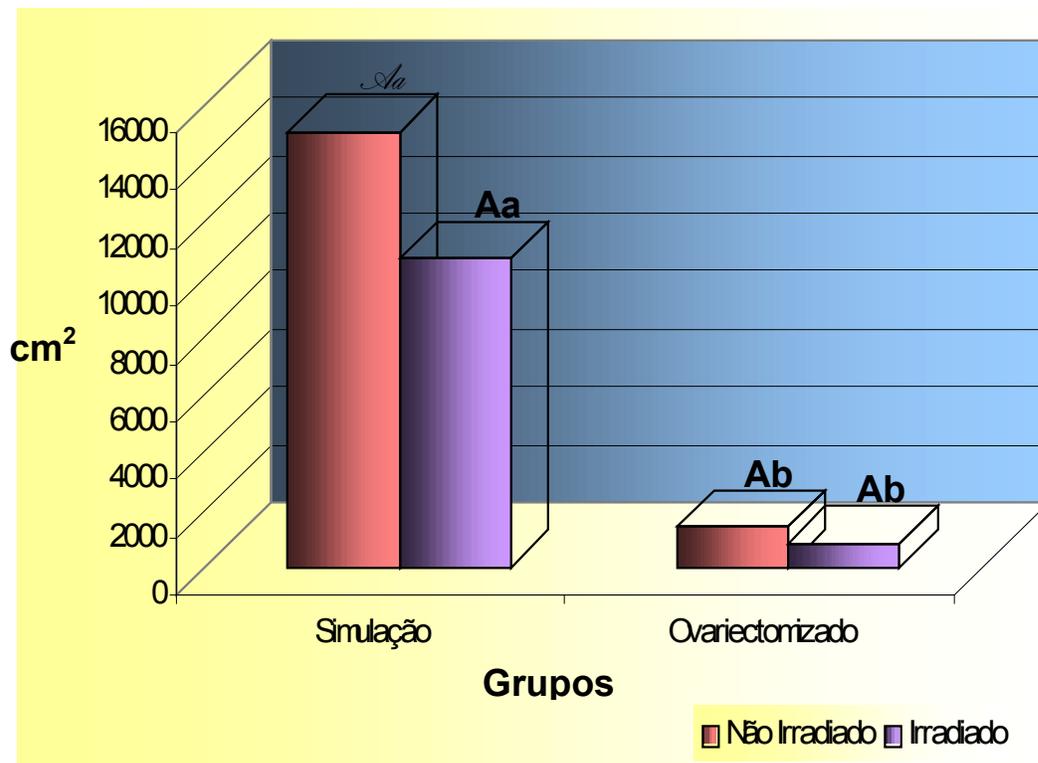
As médias aos 28 dias do processo de reparação representadas na tabela 4 e no gráfico 4 mostram, que os grupos ovariectomizado e ovariectomizado/irradiado, apresentaram as menores médias de birrefringência, não sendo estas estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) entre si, porém com diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos controle e irradiado. Quanto aos grupos controle e irradiado, o controle apresentou a maior média em relação ao irradiado, porém não sendo esta média estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ).

*Tabela 4-* Médias e Desvios-Padrão da birrefringência do tecido ósseo aos 28 dias do processo de reparação óssea.

TEMPO		NÃO IRRADIADO	IRRADIADO
28 Dias	SIMULAÇÃO	15091 <b>Aa</b> (3961)	10692 <b>Aa</b> (4961)
	OVARIECTOMIZADO	1362 <b>Ab</b> (487)	839 <b>Ab</b> (445)

Medidas seguidas de letras distintas (Maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada tempo) diferem entre si pela ANOVA ( $p < 0,05$ ). Simulação não irradiado = grupo controle, simulação irradiado = grupo irradiado, ovariectomizado não irradiado = grupo ovariectomizado e ovariectomizado irradiado = grupo ovariectomizado/irradiado.

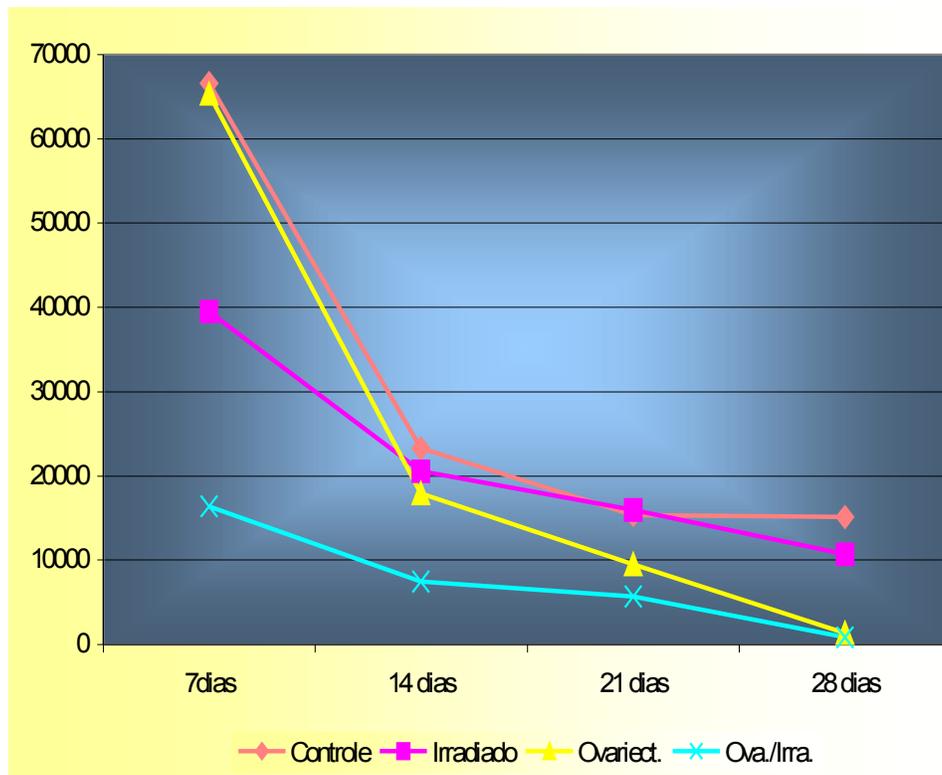
**Gráfico 4-** Médias das medidas da birrefringência do tecido ósseo em função do grupo, aos 28 dias do processo de reparação óssea.



Medidas seguidas de letras distintas (Maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada tempo) diferem entre si pela ANOVA ( $p < 0,05$ ). Simulação não irradiado = grupo controle, simulação irradiado = grupo irradiado, ovariectomizado não irradiado = grupo ovariectomizado e ovariectomizado irradiado = grupo ovariectomizado/irradiado.

Analisando o gráfico 5 que evidencia os grupos em relação aos tempos do processo de reparação óssea, percebe-se que todos apresentaram uma diminuição dos valores de birrefringência, a medida em que ocorreu a diminuição da quantidade de trabéculas ósseas, porém o grupo ovariectomizado/irradiado sempre apresentou a menor birrefringência em comparação aos demais grupos.

*Gráfico 5-* Médias das medidas da birrefringência do tecido ósseo em função do grupo e dos tempos do processo de reparação óssea.



● *Avaliação quantitativa da densidade volumétrica:*

A fim de verificar a densidade volumétrica em  $\text{mm}^3/\text{mm}^3$  de osso, foram feitas 2 medidas em áreas diferentes na mesma lâmina, como explicado anteriormente em materiais e métodos, contando os pontos de intersecção entre o retículo e as trabéculas ósseas, sendo a seguir calculada a densidade volumétrica do osso pela fórmula ( $Vv = P \times (0,065)^3/100 \times (0,065)^3 \text{ mm}^3/\text{mm}^3$ ) e submetidos ao teste ANOVA ( $p < 0,05$ ) para os grupos dentro de cada período de tempo.

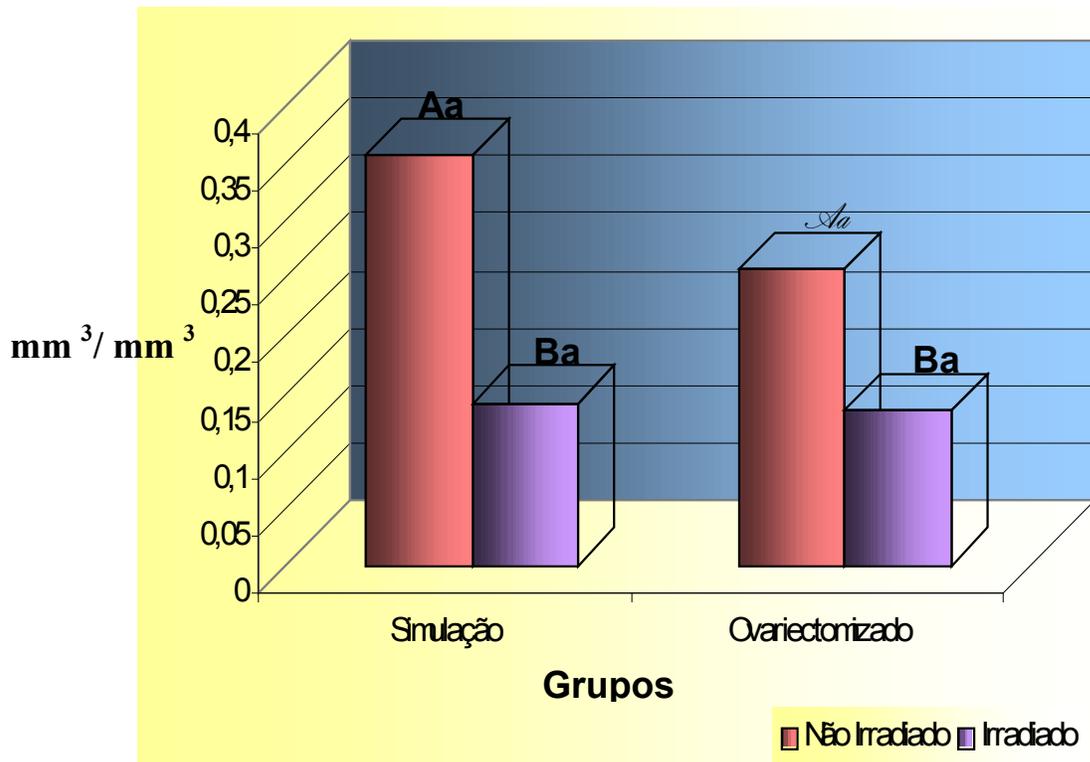
A tabela 5 e o gráfico 6, representam a média da densidade volumétrica do osso em  $\text{mm}^3/\text{mm}^3$  aos 7 dias, onde observou-se que a maior média foi a do grupo controle, seguido do grupo ovariectomizado, não existindo diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), assim como não houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos irradiado e ovariectomizado/irradiado, porém existindo diferença entre os grupos controle e irradiado e entre os grupos ovariectomizado e ovariectomizado/irradiado.

*Tabela 5-* Médias e Desvios-Padrão da densidade volumétrica do tecido ósseo aos 7 dias do processo de reparação óssea.

TEMPO		NÃO IRRADIADO	IRRADIADO
7 Dias	SIMULAÇÃO	0.36 <b>Aa</b> (0.09)	0.14 <b>Ba</b> (0.05)
	OVARIECTOMIZADO	0.26 <b>Aa</b> (0.09)	0.13 <b>Ba</b> (0.08)

Medidas seguidas de letras distintas (Maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada tempo) diferem entre si pela ANOVA ( $p < 0,05$ ). Simulação não irradiado = grupo controle, simulação irradiado = grupo irradiado, ovariectomizado não irradiado = grupo ovariectomizado e ovariectomizado irradiado = grupo ovariectomizado/irradiado.

**Gráfico 6-** Médias das medidas da densidade volumétrica do tecido ósseo em função do grupo, aos 7 dias do processo de reparação óssea.



Medidas seguidas de letras distintas (Maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada tempo) diferem entre si pela ANOVA ( $p < 0,05$ ). Simulação não irradiado = grupo controle, simulação irradiado = grupo irradiado, ovariectomizado não irradiado = grupo ovariectomizado e ovariectomizado irradiado = grupo ovariectomizado/irradiado.

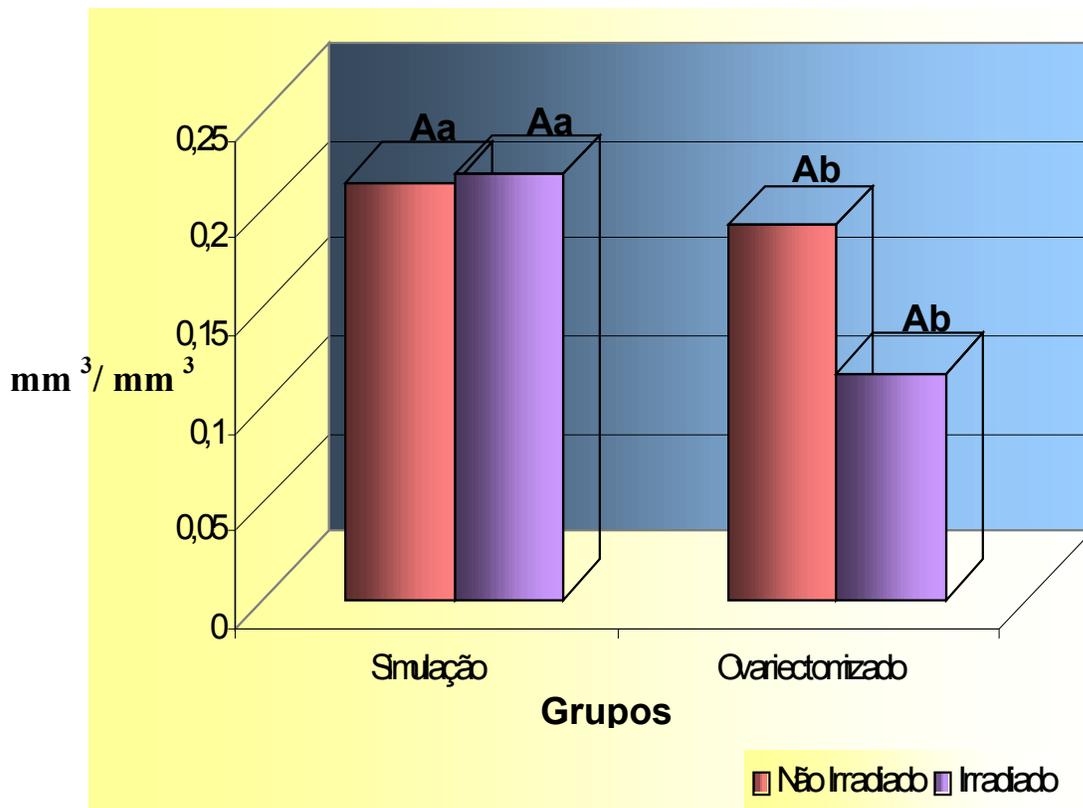
Na tabela 6 e gráfico 7 aos 14 dias, a média de densidade volumétrica em  $\text{mm}^3/\text{mm}^3$ , embora o grupo ovariectomizado/irradiado, seguido pelo ovariectomizado representem a menor média, não há diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre eles, assim como não há diferença entre os grupos controle e irradiado, porém existindo diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos controle e ovariectomizado e entre os grupos irradiado e ovariectomizado/irradiado.

*Tabela 6-* Médias e Desvios-Padrão da densidade volumétrica do tecido ósseo aos 14 dias do processo de reparação óssea.

TEMPO		NÃO IRRADIADO	IRRADIADO
14 Dias	SIMULAÇÃO	0.21 <b>Aa</b> (0.07)	0.22 <b>Aa</b> (0.04)
	OVARIECTOMIZADO	0.19 <b>Ab</b> (0.06)	0.11 <b>Ab</b> (0.04)

Medidas seguidas de letras distintas (Maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada tempo) diferem entre si pela ANOVA ( $p < 0,05$ ). Simulação não irradiado = grupo controle, simulação irradiado = grupo irradiado, ovariectomizado não irradiado = grupo ovariectomizado e ovariectomizado irradiado = grupo ovariectomizado/irradiado.

**Gráfico 7-** Médias das medidas da densidade volumétrica do tecido ósseo em função do grupo, aos 14 dias do processo de reparação óssea.



Medidas seguidas de letras distintas (Maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada tempo) diferem entre si pela ANOVA ( $p < 0,05$ ). Simulação não irradiado = grupo controle, simulação irradiado = grupo irradiado, ovariectomizado não irradiado = grupo ovariectomizado e ovariectomizado irradiado = grupo ovariectomizado/irradiado.

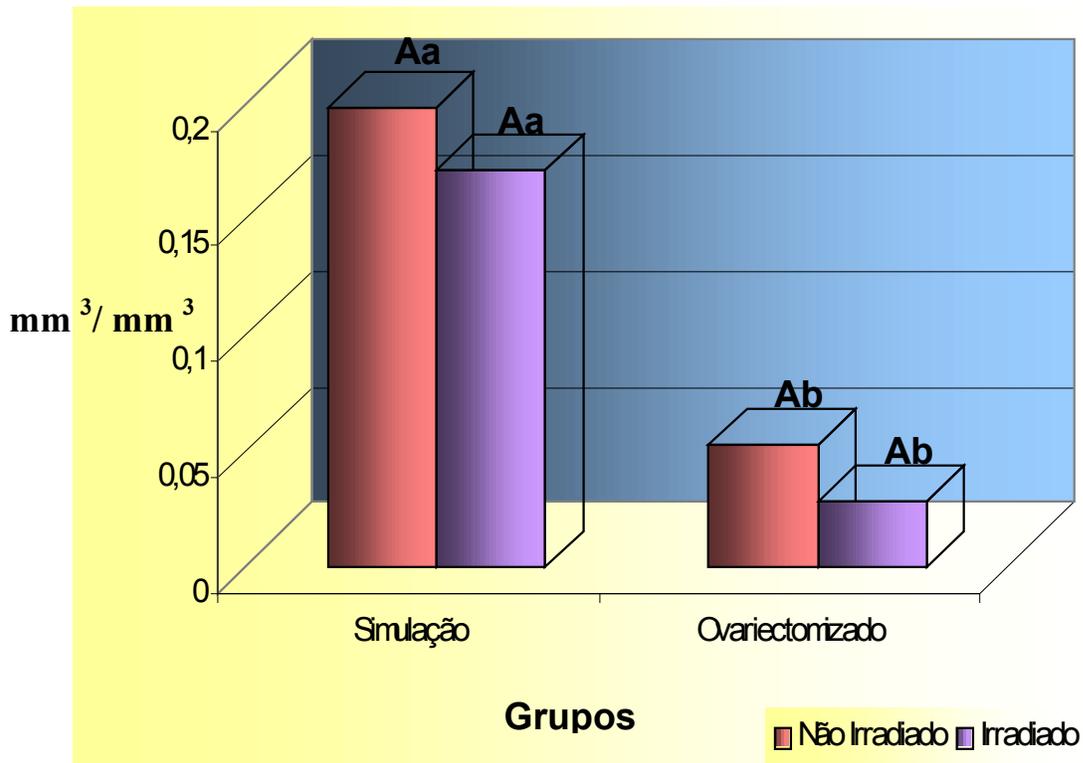
Aos 21 dias, o grupo controle continuou apresentando a maior média, sendo esta estatisticamente significativa em relação ao grupo ovariectomizado. O grupo irradiado não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle enquanto existiu em relação ao grupo ovariectomizado/irradiado, onde este grupo não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao ovariectomizado, como podemos observar na tabela 7 e gráfico 8.

*Tabela 7-* Médias e Desvios-Padrão da densidade volumétrica do tecido ósseo aos 21 dias do processo de reparação óssea.

TEMPO		NÃO IRRADIADO	IRRADIADO
21 Dias	SIMULAÇÃO	0.20 <b>Aa</b> (0.01)	0.17 <b>Aa</b> (0.01)
	OVARIECTOMIZADO	0.05 <b>Ab</b> (0.05)	0.03 <b>Ab</b> (0.01)

Medidas seguidas de letras distintas (Maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada tempo) diferem entre si pela ANOVA ( $p < 0,05$ ). Simulação não irradiado = grupo controle, simulação irradiado = grupo irradiado, ovariectomizado não irradiado = grupo ovariectomizado e ovariectomizado irradiado = grupo ovariectomizado/irradiado.

**Gráfico 8-** Médias das medidas da densidade volumétrica do tecido ósseo em função do grupo, aos 21 dias do processo de reparação óssea.



Medidas seguidas de letras distintas (Maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada tempo) diferem entre si pela ANOVA ( $p < 0,05$ ). Simulação não irradiado = grupo controle, simulação irradiado = grupo irradiado, ovariectomizado não irradiado = grupo ovariectomizado e ovariectomizado irradiado = grupo ovariectomizado/irradiado.

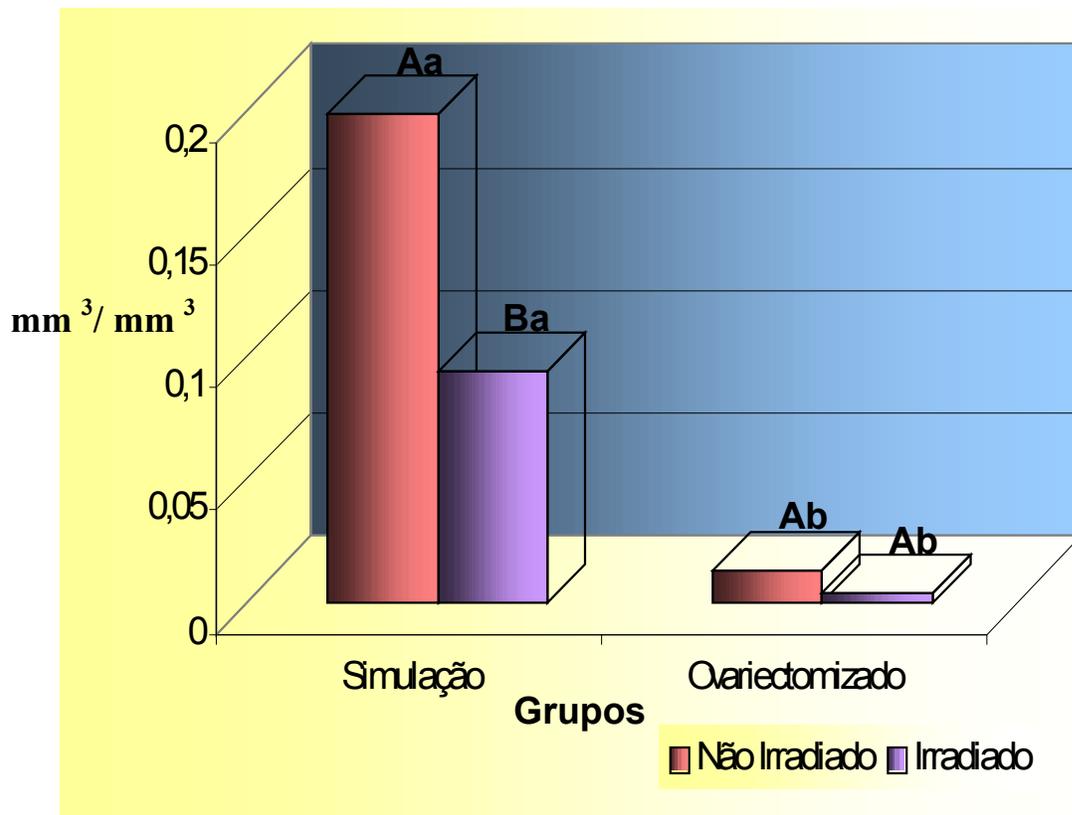
O 28° dia representado na tabela 8 e gráfico 9 evidencia a menor média de densidade volumétrica no grupo ovariectomizado/irradiado que não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo ovariectomizado, mas sendo diferente do grupo irradiado. A maior média de densidade volumétrica foi encontrada no grupo controle que apresentou diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos irradiado e ovariectomizado.

*Tabela 8-* Médias e Desvios-Padrão da densidade volumétrica do tecido ósseo aos 28 dias do processo de reparação óssea.

TEMPO		NÃO IRRADIADO	IRRADIADO
28 Dias	SIMULAÇÃO	0.20 <b>Aa</b> (0.03)	0.09 <b>Ba</b> (0.06)
	OVARIECTOMIZADO	0.01 <b>Ab</b> (0.01)	0.004 <b>Ab</b> (0.003)

Medidas seguidas de letras distintas (Maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada tempo) diferem entre si pela ANOVA ( $p < 0,05$ ). Simulação não irradiado = grupo controle, simulação irradiado = grupo irradiado, ovariectomizado não irradiado = grupo ovariectomizado e ovariectomizado irradiado = grupo ovariectomizado/irradiado.

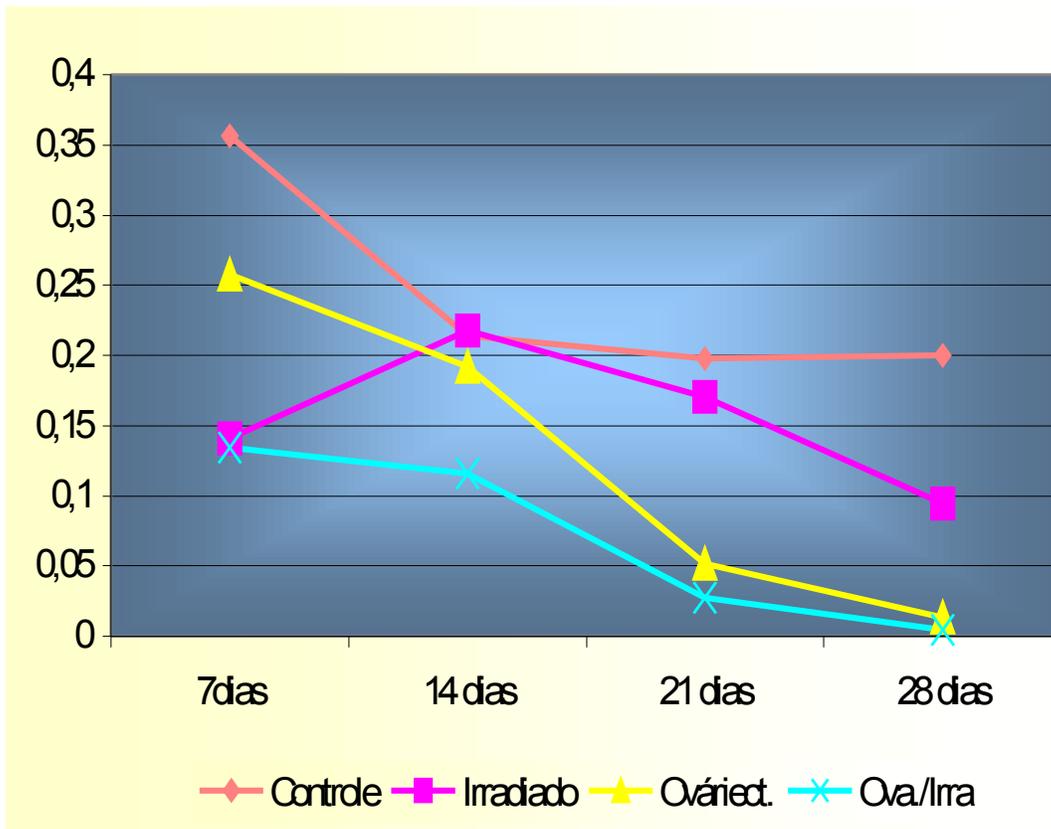
**Gráfico 9-** Médias das medidas da densidade volumétrica do tecido ósseo em função do grupo, aos 28 dias do processo de reparação óssea.



Medidas seguidas de letras distintas (Maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical dentro de cada tempo) diferem entre si pela ANOVA ( $p < 0,05$ ). Simulação não irradiado = grupo controle, simulação irradiado = grupo irradiado, ovariectomizado não irradiado = grupo ovariectomizado e ovariectomizado irradiado = grupo ovariectomizado/irradiado.

No gráfico 10, pode-se observar as médias da densidade volumétrica dos grupos em função dos tempos, onde observa-se que o grupo ovariectomizado/irradiado sempre apresentou a menor quantidade de osso trabecular.

*Gráfico 10-* Médias das medidas da densidade volumétrica do tecido ósseo em função do grupo e dos tempos do processo de reparação óssea.



## *6 Discussão*

O esqueleto ósseo é um órgão metabolicamente ativo, cuja atividade é essencial para manter a integridade tecidual e a homeostasia (Raisz, 1999), apresentando 3 importantes funções: função mecânica, servindo de sustentação ao corpo, como o local de inserção dos músculos; função protetora, fazendo a proteção de órgãos nobres como as vísceras e medula óssea; e função

metabólica, no qual representa o maior reservatório de íons cálcio, fósforo e magnésio, que como dito, é necessário para a manutenção da homeostasia mineral (Guyton, 1997).

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, sendo formado por células e material extracelular calcificado, que corresponde à matriz óssea. Como constituintes celulares têm-se os osteócitos, os quais estão situados em cavidades no interior da matriz óssea; os osteoblastos, responsáveis pela produção da parte orgânica que comporá a matriz óssea; e por fim, os osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção do tecido ósseo, apresentando participação ativa no processo de remodelamento. Este consiste de 4 fases distintas: a ativação, a reabsorção, a reversão e a formação óssea. Nada mais é do que a reabsorção do osso “velho” e formação de osso “novo”, estando sempre em equilíbrio nos indivíduos adultos.

A formação óssea inicia-se ainda na vida intra-uterina. Uma vez que o esqueleto encontra-se completamente formado em um indivíduo adulto jovem, quase toda a atividade metabólica ocorre através do remodelamento, também conhecido como *turnover* (Raisz *et al.*, 1999). Sendo assim, o remodelamento ósseo corresponde a um processo, de reabsorção e formação óssea, contínuo durante toda a vida de um indivíduo. Entretanto, para que seja mantido este processo, é necessária a interação de duas linhagens de células: a linhagem mesenquimal osteoblástica e a linhagem osteoclástica hematopoiética, segundo Bruder *et al.* (1994), Raisz *et al.* (1999) e Teitelbaum & Ross (2003). De acordo com Sasaki (2003), estas são as principais células diretamente responsáveis pela reabsorção.

Toda a função de remodelamento ósseo e metabolismo do esqueleto está sempre em equilíbrio e depende de fatores sistêmicos e locais. Dentre os fatores sistêmicos o estrogênio é, provavelmente, o hormônio mais importante na manutenção do *turnover* ósseo normal (Raisz *et al.*, 1999). Já, quanto aos fatores

locais que interferem no remodelamento ósseo, têm-se os fatores de crescimento (IGF, TGF  $\beta$ ), as citocinas, as prostaglandinas e as proteínas da família de receptores do fator de necrose tumoral (Raisz *et al.*,1999; Teitelbaum & Ross, 2003; Xu *et al.*,2003).

Diante de um fator que cause a alteração da integridade do tecido ósseo, como no caso de fraturas e cirurgias, este necessita de reparação, a fim de voltar a exercer suas atividades funcionais normais (Junqueira & Carneiro, 1999; Carano & Filvaroff, 2003). Sendo assim, como todo processo biológico, a reparação óssea pode ser influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos, como a osteoporose e a radiação, respectivamente. Uma vez que durante o processo de reparo também ocorrem eventos de remodelamento ósseo, este também pode sofrer a ação destes fatores (Probst & Spiegel, 1997; Walsh *et al.*, 1997; Meyer *et al.*,2001).

A osteoporose é a enfermidade óssea metabólica humana mais comum, resultante da redução simultânea de mineral e matriz óssea, havendo diminuição da quantidade de osso, que apesar disso, permanece normal quanto a sua composição (Finkelstein, 1997, Guyton, 1997).

Com o aumento da idade e independente do gênero, ocorrem microdanos ósseos, os quais são evidenciados por microcrateras. Estes danos ocorrem mais rapidamente do que o processo intrínseco pode reparar, levando a importantes conseqüências, como: deterioração microarquitetural; diminuição da força óssea e rigidez conduzindo a um aumento da fragilidade óssea e fraturas relacionadas à idade. Assim, tanto a deficiência de estrogênio quanto a insuficiente percepção de esforço biomecânico, são os principais mecanismos que contribuem para a alteração na habilidade do osso em detectar e reagir a danos (Van der Linden *et al.*, 2004).

As mulheres são mais comumente afetadas pela osteoporose. A perda óssea no gênero feminino é considerada resultante de duas fases: o efeito agudo

da deficiência de estrogênio e o efeito à longo prazo dos fatores relacionados à idade (Eastell, 2003). Pode-se observar que a deficiência de estrogênio aumenta o recrutamento de osteoclastos e a taxa de origem da nova unidade óssea. Esta sofre um ciclo de remodelamento, prolongando a fase de reabsorção óssea pela reduzida apoptose de osteoclastos (Stepan *et al.* 2003), o que leva a um aumento no tamanho dos espaços medulares, contribuindo assim para um aumento da fragilidade óssea.

Embora muitas alterações no tecido ósseo ocorram com a idade, a osteoporose por si só é clinicamente silenciosa, ou seja, assintomática. A única preocupação é quanto ao aumento no risco de ocorrência de fraturas (Finkelstein, 1997; Goulay & Brown, 2004). As fraturas de quadril correspondem às complicações mais devastadoras, estando associadas a quedas de intensidade moderada ou, em alguns casos, sem que haja previamente uma queda (Fimkelstein, 1997).

Após o levantamento da literatura, concorda-se com Lill *et al.* (2003), que afirmaram haver poucos estudos disponíveis sobre as diferenças de reparação óssea em indivíduos normais e portadores de osteoporose, embora estes indivíduos aparentemente apresentem uma reduzida capacidade de reparação e remodelamento. Entretanto, graças aos estudos com animais ovariectomizados, uma série de informações sobre as possíveis alterações agudas e crônicas causadas pela deficiência de estrogênio, podem ser obtidas e correlacionadas com os seres humanos. Jilka *et al.* (1992) confirmaram que a perda da função ovariana em animais e humanos, tais como na menopausa, causa uma dramática e precipitada perda óssea. Peng *et al.* (1997) acreditam que a ovariectomia em animais está associada com semelhantes mudanças histológicas em ossos de ratas e ossos humanos, podendo assim proporcionar informações benéficas relativas à perda óssea humana pós-menopausa. Outras alterações correspondem a um acelerado metabolismo ósseo (Wronski *et al.*, 1985;

Peng *et al.*, 1997); alterações transitórias na quantidade relativa de magnésio (Peng *et al.*, 1997); perda acelerada de cálcio no fêmur (Devkin & Ferguson, 1989); aumento no *turnover* ósseo (Wronski *et al.*, 1985; Dempster *et al.*, 1995; Simn *et al.*, 1996; Lane *et al.*, 1998; Elben *et al.*, 1998; Giardino *et al.*, 1998), o que acaba conduzindo a uma perda de conectividade trabecular (Wronsk *et al.*, 1985; Dannucci *et al.*, 1987; Schot & Schuurs, 1990; Danielsen *et al.*, 1993; Bagi *et al.*, 1997 ; Lane *et al.*, 1998; Lill *et al.*, 2002). Aumento da taxa de crescimento ósseo longitudinal e crescimento periosteal com redução na formação óssea endosteal, foram encontrados por Wronsk *et al.*, (1985 e 1988) e Schot & Schuurs (1990). Redução na quantidade de colágeno tipo I e II foi encontrada por Jahangiri *et al.* (1997) e aumento na superfície de osteoclastos foi observado por Wronsk *et al.* (1985), Jilka *et al.* (1992), Dempsteer *et al.* (1995), Sims *et al.* (1996), Lane *et al.* (1998), Elben *et al.* (1998) e Rico *et al.* (2002).

Quanto ao outro fator que pode interferir na reparação e remodelamento ósseo, a radiação ionizante, é freqüentemente empregada no tratamento de pacientes com lesões ósseas primárias ou metastáticas ou até mesmo no tratamento de tecidos moles adjacentes ao osso (Widmann *et al.*, 1993; Würzler *et al.*, 1998). Dentre as alterações que podem ocorrer têm-se as neoplasias localizadas na região de cabeça e pescoço (Nagler, 2001), cuja irradiação freqüentemente resulta em necrose óssea das áreas vizinhas (Würzler *et al.*, 1998). Essas alterações estão na dependência da dose total de radiação empregada no tratamento de neoplasias, que é relativamente alta (30 a 80 Gy), sendo na maioria das vezes fracionada de acordo com os protocolos usados para os diferentes casos, mesmo assim, resultando em uma variedade de efeitos deletérios nos tecidos e nos órgãos expostos (Wall *et al.*, 1996; Nagler, 2001).

O mecanismo de danos da irradiação no osso, ainda não está completamente entendido, contudo, experimentos têm demonstrado que a radiação perturba o equilíbrio entre a atividade osteoclástica e osteoblástica, em

favor do processo destrutivo (Horn *et al.*,1979; Guglilmotti *et al.*,1986; Arnold *et al.*,1995; Würzler *et al.*,1998; Tai *et al.*,2000; Dudziak *et al.*,2000; Szymczyk *et al.*,2004).

Uma vez que indivíduos com osteoporose podem ser submetidos a diferentes tipos e doses de radiação, tanto com finalidade de diagnóstico quanto terapêutica, esta pesquisa foi desenvolvida para avaliar as prováveis implicações da associação dos dois fatores no processo de reparação óssea. Para tanto, criou-se um modelo experimental, em que os animais foram submetidos a um ato cirúrgico, sendo realizada a remoção de seus ovários, levando assim a uma deficiência de estrogênio. A comprovação da deficiência de estrogênio foi executada mediante a utilização dos seguintes métodos: o monitoramento do ciclo estral, a observação do aspecto macroscópico dos cornos uterinos e a avaliação ultra-estrutural da cabeça da tíbia.

O ciclo estral é ideal para investigar-se as mudanças ocorridas durante o período reprodutivo. Nas ratas, este tem a duração de 4 a 5 dias, repetindo-se ao longo dos anos, sendo caracterizado por 4 fases, onde tem-se em cada uma, a ocorrência de várias mudanças na vagina do animal e nos níveis de hormônios sexuais (Hoar & Hickman, 1975; Marcondes *et al.*, 2002). O monitoramento deste ciclo foi realizado através da observação do tipo de célula presente no esfregaço vaginal. Todos os animais submetidos a ovariectomia permaneceram sempre na fase diestro, que representa o final do primeiro pico de progesterona e presença de baixo nível de estrogênio de acordo com Hoar & Hickman (1975) e Marcondes *et al.* (2002), enquanto os demais seguiram o curso normal do seu ciclo estral.

As observações do aspecto macroscópico dos cornos uterinos após o sacrifício, indicaram que todos os animais ovariectomizados, apresentavam seus úteros finos, atróficos e anêmicos, enquanto os demais, apresentavam-se róseos, volumosos e totalmente preenchidos por fluido, sendo estas observações semelhantes as de Duarte (2003).

A observação ultra-estrutural da cabeça da tíbia, realizada ao microscópio eletrônico de varredura DMS 940<sup>A</sup> do Zeiss (Alemanha), permitiu visualizar que o padrão do trabeculado ósseo não se alterou no grupo controle, enquanto no grupo ovariectomizado houve um aumento na superfície dos espaços medulares. De acordo com Peng *et al.*, 1997; Bagi *et al.*, também em 1997 e Jakubas-Przewlocka *et al.*, 2003; devido a um aumento da aposição periosteal e reabsorção endocortical em ossos longos, estes normalmente sofrem uma alteração em sua geometria, na qual o volume medular torna-se aumentado, indicando maior separação trabecular, cujas trabéculas remanescentes constituem-se geralmente de hastes longitudinais, com hastes menores conectadas transversalmente (alteração micro-estrutural). Desta forma, esta alteração estrutural na cabeça da tíbia, pode confirmar a existência de deficiência de estrogênio, conduzindo o tecido ósseo a alterações micro-estruturais.

Tornando-se os animais deficientes em estrogênio após 46 dias, defeitos ósseos com diâmetro de 1,8mm foram confeccionados em suas tíbias, sendo irradiados três dias após, com 8 Gy de radiação gama. A avaliação do processo de reparação óssea se deu aos 7, 14, 21 e 28 dias após a irradiação e o padrão ósseo néo formado foi avaliado 45 dias após este mesmo procedimento.

O processo de reparação foi avaliado, levando-se em consideração o aspecto morfológico do tecido, utilizando-se as colorações com hematoxilina-eosina e Tricrômico de Mallory; a organização e maturação tecidual por meio da análise da birrefringência; a densidade volumétrica óssea; e análise ultra-estrutural do tecido neoformado por meio da microscopia eletrônica de varredura.

Uma vez que a integridade do osso é rompida, uma seqüência de eventos celulares e bioquímicos inicia-se, induzindo reações inflamatórias. Mensageiros, como metabólitos do coágulo ou sistema complemento e fatores de crescimento são liberados ou ativados. Eles controlam a migração, a proliferação e a síntese de proteínas celulares, que são essenciais para a angiogênese e a

formação de tecido conjuntivo. O componente chave nessa seqüência inflamatória parece ser o macrófago. Fatores de crescimento, em geral liberados pelos macrófagos, estimulam células endoteliais para formar capilares e células mesenquimais para sintetizar sua matriz óssea. Em áreas mecanicamente estáveis, como por exemplo, defeitos ósseos como os produzidos nos animais desta pesquisa, ou em cavidades de fratura estabilizada, a ferida é revascularizada e osteoblastos proliferam e formam osso. No caso de fraturas mecanicamente instáveis, os capilares disseminados são rompidos por forças que atuam no local, o que leva a uma hipóxia. Esse meio permite a diferenciação de condrócitos em condroblastos que produzem cartilagem, estabilizando a fratura. Uma vez formado o tecido de reparação e havendo a atuação de uma força capaz de romper o tecido neoformado, desencadeiam-se mecanismos de inflamação novamente e células adicionais migram e proliferam. Essa síntese de proteína aumenta o calo de reparação. O aumento da formação do calo, entretanto, pára quando o tecido é capaz de resistir ao movimento (Probst & Spiegel, 1997). No caso do processo de reparo dos defeitos ósseos produzidos nas tíbias das ratas utilizadas nesta pesquisa, no grupo controle, não houve nenhum fator que interferisse na sua evolução, uma vez que eram áreas mecanicamente estáveis.

Aos 7 dias, a avaliação morfológica realizada através da coloração por hematoxilina-eosina, evidenciou no grupo controle um padrão de reparação óssea normal, observando-se a presença de tecido de granulação já contendo trabéculas ósseas. Esta descrição está de acordo com o padrão de reparação óssea descrita por Vizioli *et al.*, 1974; Valdrighi *et al.*, 1974 e Carvalho *et al.*, 1997; embora os autores tenham estudado a reparação óssea em alvéolo dentário. Entretanto, esse processo não difere da fase inicial da reparação em ossos longos. Aos 14 dias, a quantidade de trabéculas era grande, podendo-se observar sinais de medula vermelha. O processo de reparação óssea prosseguiu normalmente até o último período avaliado, 28 dias, observando-se indícios de reabsorção óssea fisiológica e a presença de osso cortical.

No grupo ovariectomizado, a evolução do processo de reparo mostrou-se menos evidente em relação ao grupo controle, porém a presença de trabéculas ósseas também era pronunciada aos 7 dias. Isto pode ser observado quando se avalia a densidade volumétrica, no qual embora exista uma diferença entre os dois grupos, esta não é estatisticamente significativa aos 7 dias, sendo estatisticamente significativa aos 14, 21 e 28 dias, no qual houve uma queda na densidade volumétrica, sendo ela significativa. Com relação a birrefringência, esta mostrou-se também estatisticamente significativa aos 14, 21 e 28 dias; observando-se o declínio à medida que o processo de reparação avança. Parffit *et al.* (1987) e Hsieh *et al.* (1995) encontraram uma maior aposição de tecido ósseo até os 5 dias, observando haver maior remodelamento aos 9 dias. Uma vez que o primeiro período avaliado neste estudo foi aos 7 dias, provavelmente aos 5 dias os dois grupos exibissem o mesmo padrão ósseo, ou até mesmo, levando-se em consideração os resultados de Parffit *et al.* (1987) e Hsieh *et al.* (1995), o grupo ovariectomizado talvez apresentasse maior formação óssea, daí não haver diferença estatisticamente significativa. Mais uma vez concorda-se com os autores citados em relação à diferença entre os dois grupos, visto que igualmente como Parffit *et al.* (1987), Hsieh *et al.* (1995) e Shimizu *et al.* (1998 e 2000), também foi introduzido um fator sistêmico, no caso a deficiência de estrogênio, afetando o *turnover* ósseo. Wronski *et al.* (1988 e 1989) e Walsh *et al.* (1997) observaram relação entre osteopenia e aumento do *turnover* ósseo. Segundo Namkung-Matthai *et al.* (2001), quando avaliando a fase precoce de reparação de fraturas, observaram que há excessiva perda óssea ocorrendo mais rapidamente na área de fratura.

O processo de reparo evoluiu e no 21<sup>o</sup> dia foi observada a presença de uma fina cortical óssea. Entretanto, foi evidente o processo de reabsorção, o que é comum durante a reparação óssea; no entanto, ocorrendo precocemente em relação ao grupo controle. No grupo ovariectomizado pode-se observar, pela densidade volumétrica, que à partir dos 14 dias, houve diferença estatisticamente

significante entre ele e o controle. Segundo Tanaka *et al.* (2001), a deficiência aguda de estrogênio estimula a reabsorção do osso de sustentação, tendo menor efeito na formação óssea, o que justificaria um atraso no processo de reparo, sendo a reabsorção mais evidente a partir dos 21 dias. O mesmo fato pode ser observado aos 28 dias. A explicação para tal ocorrência pode ser devida à deficiência de estrogênio, concordando-se, portanto, com a citação de Clow *et al.* (1992), quando afirmam que o estrogênio mantém a massa óssea, não somente através da inibição da reabsorção óssea, mas também estimulando a sua formação. Isso coincide com a citação de Danielsen *et al.* (1993) de que o tratamento com estrogênio interrompe a reabsorção óssea endosteal. Outros autores também relataram perda de osso trabecular em animais submetidos à ovariectomia como Wronski *et al.* (1985), Schot & Schuurs (1990), Miller & Wronski (1993), Dick *et al.* (1996), Tanaka *et al.* (1999) e Tanaka *et al.* (2003).

No grupo irradiado o processo de reparo mostrou-se incipiente, principalmente em relação ao grupo controle, podendo-se observar pela densidade volumétrica, haver diferença estatisticamente significante entre estes dois grupos aos 7 e 28 dias; já em relação ao grupo ovariectomizado/irradiado, o grupo irradiado apresentou um maior número de trabéculas, existindo diferença estatisticamente significante à partir dos 14 dias. Quanto à birrefringência, o grupo irradiado em relação ao grupo controle apresentou diferença estatisticamente significante aos 7 e 14 dias, sendo esta birrefringência menor, denotando menor grau de maturação tecidual. Em relação ao grupo ovariectomizado/irradiado, a média da birrefringência do grupo irradiado foi sempre maior, existindo diferença estatisticamente significante em todos os tempos do processo de reparação. Assim, embora não esteja completamente claro o mecanismo pelo qual a radiação cause dano ao tecido ósseo, existe comprovação de que o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea é alterado, prevalecendo eventos de reabsorção. Segundo Hayashi & Suit (1971), os danos na reparação podem ser devidos à presença de um pequeno subgrupo de células que apresentam uma baixa

capacidade de reparação em decorrência de danos da radiação. Segundo Horn *et al.* (1979), Guglielmotti *et al.* (1986), Arnold *et al.* (1995), Würzler *et al.* (1998), Tai *et al.* (2000), Dudziak *et al.* (2000), Szczyk *et al.* (2004) há uma diminuição no número de osteócitos e osteoblastos ou até mesmo ausência de osteoblastos na superfície óssea, o que ocasiona declínio na síntese de colágeno e atividade da fosfatase alcalina, conseqüentemente prejudicando o processo de mineralização e aumentando a reabsorção óssea, o que pode ocasionar fraturas espontâneas (Guglielmotti *et al.*,1986; Würzler *et al.*,1998; Tai *et al.*,2000). Também Dare *et al.* (1997) citam que altas doses, como 4 Gy, podem exercer efeito diferente na proliferação celular e diferenciação de osteoblastos, o que justificariam os resultados obtidos nesta pesquisa, uma vez que utilizou-se uma dose de 8 Gy.

O grupo ovariectomizado/irradiado apresentou o maior atraso em relação ao processo de reparação óssea, quando comparado a todos os grupos avaliados. Pelas médias das medidas da densidade volumétrica, aos 7 dias houve diferença significativa entre este e o grupo ovariectomizado, existindo diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo irradiado à partir dos 14 dias. A análise da birrefringência, aos 7 dias mostrou que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo irradiado e aos 7 e 14 dias somente em relação ao ovariectomizado.

Em síntese, avaliando-se o aspecto morfológico da reparação óssea nos diversos grupos utilizados nesta pesquisa e sob as condições experimentais pré-determinadas, observa-se que no grupo controle o processo seguiu os padrões normais, onde aos 7 dias tem-se a formação de trabéculas ósseas no qual, à medida que o tecido evolui, vão diminuindo em número, sendo observada ainda aos 28 dias a presença destas trabéculas. Já nos demais grupos o início de formação das trabéculas foi retardado. Além desse atraso, observou-se um fato interessante: a reabsorção óssea ocorreu antes mesmo que houvesse a total formação do tecido, principalmente nos grupos ovariectomizado e

ovariectomizado/irradiado. Supõe-se, portanto, que a radiação afeta inicialmente a formação óssea e que a deficiência de estrogênio acelera o processo de reabsorção óssea. Além disso a radiação inicia um processo de reabsorção, na fase final da reparação, mais acelerado. Portanto, como o grupo ovariectomizado/irradiado apresentou a associação dos dois fatores, ou seja, a deficiência de estrogênio e a radiação ionizante, no início do processo de reparação houve pouca formação de trabéculas e menor maturação tecidual, devido a atuação dos dois fatores e a partir dos 14 dias, houve reabsorção acentuada das poucas e imaturas trabéculas ósseas presentes.

Pela microscopia eletrônica de varredura observou-se o padrão ósseo do processo de reparo aos 45 dias, que corresponde a um tecido maduro. Nos ossos longos, observou-se a presença de uma haste longa chamada diáfise, correspondendo à cavidade medular e 2 extremidades expandidas chamadas epífises, sendo constituídas por osso esponjoso. A porção que sobressai da epífise, diretamente contígua à diáfise, é chamada metáfise sendo também constituída por osso esponjoso, embora este apresente menor número de trabéculas do que aquele presente na epífise. Sendo assim, a microscopia eletrônica de varredura mostrou um padrão de reparação óssea deficitário nos grupos ovariectomizado e ovariectomizado/irradiado, evidenciando efeitos dos dois fatores utilizados, no *turnover* ósseo, onde a deficiência de estrogênio agiu na reabsorção óssea e a radiação mais na formação.

Alguns fatores podem ter contribuído para o prejuízo observado nos grupos experimentais; Mcinnis *et al.* (1980), citam que o fluxo sanguíneo na área onde está ocorrendo a reparação está diretamente relacionado à porcentagem de formação óssea. Danos em células endoteliais, com aumento da fragilidade das paredes dos vasos sanguíneos, ocasionando hemorragias secundárias foram observados por Hayashi & Suit, 1971; Messerschmidt, 1989; Arnold *et al.*, 1995 e 1998; Würzler *et al.*, 1998; fibrose vascular foi observada por Hayashi & Suit, 1971;

Arnold *et al.*, 1995 e 1998; Würzler *et al.*, 1998; que resulta em diminuída vascularização. Além dessas alterações vasculares citadas, Arnold *et al.* (1998) acreditam que a irradiação pode resultar em depressão do metabolismo mineral, alteração do remodelamento ósseo, interferência na capacidade proliferativa de precursores celulares localizados no retículo medular ósseo, periendóstio e endóstio. Como estas células apresentam um intervalo de *turnover* celular de aproximadamente 8 semanas, os efeitos latentes da radiação somente serão notados quando ocorrer a necessidade de proliferação celular mediante um estímulo; segundo Gal *et al.* (2000), a radiação além de causar uma diminuição na atividade da fosfatase alcalina, inibe a proliferação de osteoblastos, sendo isto decorrente de uma taxa de crescimento menor e não devido à morte celular, também citam redução na produção de colágeno. Mandracchia *et al.* (2001), citam que fatores de crescimento exógenos exercem enorme influência na reparação óssea. O efeito nocivo da radiação em citocinas foi citado por Dudziak *et al.* (2000).

É conhecido que a utilização de corticosteróide pode produzir osteoporose (Exton-Smith & Stewart, 1972). Analisando-se o trabalho realizado por Gal *et al.* (2000), os autores citam que células tratadas com dexametazona apresentam proliferação diminuída, sendo este efeito acentuado pela radiação. Também Shirota *et al.* (1995) observaram haver uma maior sensibilidade à radiação em ratos mais velhos, nos quais sabe-se que o padrão ósseo está alterado. Portanto, de acordo com o que foi observado nesta pesquisa, os dois fatores, isoladamente, provocaram atraso na reparação óssea e quando associados, este atraso mostrou-se mais acentuado. Levando-se em consideração que, como comentado por Wang (2000), a orientação espacial tridimensional dos ósteons no processo de reparação óssea normal não é restabelecida completamente, este efeito pode ser acentuado mais ainda por outros fatores, como a deficiência de estrogênio e a radiação, alterando assim o processo de reparo ou a organização tecidual, o que poderia levar este osso neo formado a ser reabsorvido mais rapidamente.

Embora nesta pesquisa tenha-se evidenciado que a deficiência de estrogênio e a radiação ionizante provocaram danos no processo de reparação óssea, pela metodologia empregada e pela proposta inicial, não há subsídios para se afirmar qual fator ou fatores foram cruciais para causar estes danos.

## *7 Conclusões*

*D*entro das condições experimentais e dos resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que no grupo ovariectomizado/irradiado:

- 1) As análises morfológica e estrutural do tecido ósseo neoformado indicaram haver atraso do processo de reparação;
- 2) A associação entre deficiência de estrogênio e radiação levou a uma diminuição na produção de osso neoformado e acelerou o processo de reabsorção.

## *Referências\**

Arnold M, Kummermehr J, Trott K-R. Radiation-induced impairment of osseous healing: quantitative studies using a standard drilling defect in rat femur: **Radiot Res.** 1995; 143(1): 77-84.

Arnold M, Stas P, Kummermehr J, Schultz-Hector S, Trott K-R. Radiation-induced impairment of bone healing in the rat femur: effects of radiation dose, sequence and interval between surgery and irradiation. **Radiother Oncol.** 1998; 48(3): 259-65.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o MEDLINE.

Bagi CM, Ammann P, Rizzoli R, Miller SC. Effect of estrogen deficiency on cancellous and cortical bone structure and strength of the femoral neck in rats. **Calcif Tissue Int.** 1997; 61(4): 336-44.

Bruder SP, Flin DJ, Caplan A I. Mesenchymal stemcells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. **J Cell Biochem.** 1994; 56(3): 283-94.

Carvalho TL, Bombonato KF, Brentegani LG. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. **Braz Dent J.** 1997; 8(1): 40-3.

Chesnut CH, Kribbs PJ. Osteoporosis: Some aspects of pathophysiology in therapy. **J Prosthet Dent.** 1982; 48(1): 4-7.

Chow J, Tobias JH, Colston KW, Chambers TJ. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. **J Clin Invest.** 1992; 89(1): 74-8.

Danielsen CC, Mosekilde L, Svenstrup B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy and estrogen substitution. **Calcif Tissue Int.** 1993; 52(1): 26-33.

Dannucci GA, Martin RB, Patterson-Buckendahl P. Ovariectomy and trabecular bone remodeling in the dog. **Calcif Tissue Int.** 1987; 40(4): 194-9.

Dare A, Hachisu R, Yamaguchi A, Yokose S, Yoshihi S, Okano T. Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. **J Dent Res.** 1997; 76(2): 658-64.

Dempster DW, Birchman R, Xu R, Lindsay R, Shen V. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. **Bone**. 1995; 16(1): 157-61.

Devilin H, Ferguson MWJ. Compositional changes in the rat femur following ovariectomy. **Acta Anat**. 1989; 136(1): 38-41.

Dick IM, John AS, Heal S, Prince RL. The effect of estrogen deficiency on bone mineral density, renal calcium and phosphorus handling and calcitropic hormones in the rat. **Calcif Tissue Int**. 1996; 59(3): 174-78.

Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Greenwald JA, Gittes GK *et al*. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. **Plastic Reconstr Surg**. 2000; 106(5): 1049-61.

Eastell R. Management of osteoporosis due to ovarian failure. **Med Pediatr Oncol**. 2003; 41(3): 222-7.

Elben RG, Raith S, eberle J, Stangassinger M. Ovariectomy augments B lymphopoiesis and generation of monocyte-macrophage precursors in rat bone marrow. **Am J Physiol Endocrinol**. 1998; 274(3): 476-83.

Exton-Smith N, Stewart RJ. Bone resorption in old age. **Proc R Soc Med**. 1972; 65(7): 614.

Finkelstein JS. Osteoporose. *In*: Bennett, editores. **Cecil/ Tratado de medicina interna**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. v.2, p.1526-32.

Frost HM. Defining osteopenias and osteoporoses: Another view (Whith insights from a new paradigm). **Bone**. 1997, 20(5): 385-91.

Frost HM, Jee WSS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. **Bone Miner.** 1992; 18(3): 227-36.

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

Giardino R, Finni M, Giavaresi G, Mongiorgi R, Gnudi S, Zati A. Experimental surgical model in osteoporosis study. **Boll Soc Ital Biol Sper.** 1993; 69(7-8): 453-60.

Gourlay ML, Brown SA. Clinical considerations in premenopausal osteoporosis. **Arch Intern Med** . 2004; 164(22): 603-14.

Gughielmotti MB, Ubios AM, Cabrini RL. Alveolar wound healing after X-irradiation: A histologic, radiographic and histometric study. **J Oral Maxillofac Surg.** 1986, 44(12): 972-6.

Guyton AC. **Tratado de fisiologia médica.** 5.ed. Rio de Janeiro: Interamericana; 1997.

Hayashi S, Suit HD. Effect of fractionation of radiation dose on callus formation at site of fracture. **Radiology.** 1971; 101(1): 181-86.

Hoar W, Hickman CP. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In whoar & CP Hickman, editors. **General and comparative physiology.** 2.ed. New Jersey: Prentice-hall; 1975. p.260-5.

Horn Y, Sela m n, Shlomi B, Ulmansky M, Sela J. Effect of irradiation-timing on the initial socket healing in rat. **Int J Oral Surg.** 1979; 8(6): 457-61.

Hsieh YD, Devlin H, McCord F. The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. **Archs Oral Biol.** 1995; 40(6): 529-31.

Jahangiri L, Kim A, Nishimura I. Effect of ovariectomy on the local residual ridge remodeling. **J Prosthet Den.** 1997; 77(4): 435-43.

Jakubas-Przewlocka J, Sawicki A, Przewlocki P. Assessment of trabecular bone structure in postmenopausal and senile osteoporoses in women by image analysis. **Scand J Rheumatol.** 2003, 32(5): 295-9.

Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Willians DC, Abrams JS *et al.* Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. **Science.** 1992; 257(3): 88-91.

Kimble RB, Vannice JL, Bloedow DC, Thompson RC, Hopfer W, Kung VT *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats. **J Clin Invest.** 1994; 93(5): 1959-67.

Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshiok M, Honjo H, Urabe M *et al.* Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 1999, 68(5-6): 197-202.

Lane NE, Thompson JM, Haupt D, Kimmel DB, Modin G, Kinney JH. Acute changes in trabecular bone connectivity and osteoclast activity in the ovariectomized rat in vivo. **J Bone Miner Res.** 1998; 13(2): 229-36.

Li X, Nishimura I. Altered bone remodeling pattern of the residual ridge in ovariectomized rats. **J Prosthet Dent.** 1994; 72(3): 324-30.

Lill CA, Fluegel AK, Schneider E. Effect of ovariectomy, malnutrition and glucocorticoid application on bone properties in sheep: A pilot study. **Osteoporos Int.** 2002; 13(6): 480-86.

Lill CA, Hessel J, Schlegel U, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. **J Orthop Res.** 2003, 21(5): 836-42.

lorete CA, Song BZ, Donoff RB. Healing of bony defects in the irradiated and unirradiated rat mandible. **J Oral Maxillofac Surg.** 1992, 50(12): 1305-9.

Mandracchia VL, Nelson SC, Barp EA. Current concepts of bone healing. **Clin Podiatr Med Surg.** 2001; 18(1): 55-77.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. **Braz J Biol.** 2002, 62(4): 609-14.

McInnis JC, Robb RA, Kelly PJ. The relationship of bone blood flow, bone tracer deposition, and endosteal new bone formation. **J Lab Clin Med.** 1980; 96(3): 511-22.

Meyer Jr RA, Tsahakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow M E, Kiebzak GM. Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical proprieties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. **J Orthop Res.** 2001, 19(3): 428-35.

Miller SC, Wronsk TJ. Long-term osteopenic changes in cancellous bone structure in ovariectomized rats. **Anat Rec.** 1993; 236(3): 433-41.

Nagler RM. Extended-term effects of head and neck irradiation in the rodent. **Eur J Can.** 2001; 37(15): 1938-45.

Namkung-Matthal H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht s, Swain M *et al.* Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. **Bone.** 2001, 28(1): 80-6.

Parfitt AM. Trabecular bone architecture in the pathogenesis and prevention of fracture. **Am J Med.** 1987; 82(1B): 68-72.

Peng ZQ, Väänänen HK, Zhang HX. Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. **Bone.** 1997; 20(3): 207-12.

Probst A, Spiegel HU. Cellular mechanisms of bone repair. **J Invest Surg.** 1997; 10(3): 77-86.

Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. **Clin Chem.** 1999; 45(8 pt.2): 1353-8.

Rico H, Cuesta C, Cortis J, Seco C, Monteagudo MD, Hernández ER. Effect of uterine horn ligation on bone mass: an experimental study in rats. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** 2002; 102(1): 48-52.

Sasaki T. Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. **Microsc Res Tech.** 2003; 61(6): 483-95.

Schot LPC, Schuurs H W M. Pathophysiology of bone loss in castrated animals. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 1990; 37(3): 461-5.

Shimizu M, Ryoichi F, Kawawa T, Sasaki T. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats: Quantitative backscattered electron image analysis. **Anat Rec.** 2000, 259(5): 76-85.

Shimizu M, Sasaki T, Ishihara A, Furuya R, Kawawa T. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats. **J Elect Microsc.** 1998, 47(5): 517-26.

Shirota T, Donath K, Ohno K, Matsui Y, Michi K. Effect of aged and radiation on bone healing adjacent to hydroxyapatite placed in the tibia of rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 1995; 79(3): 285-94.

Sims NA, Morris HA, Moore RJ, Durbridge TC. Increased bone resorption precedes increased bone formation in the ovariectomized rat. **Calcif Tissue Int.** 1996; 59(2): 121-7.

Stepan J J, Alenfeld F, Boivin G, Feyen JHM, Lakatos P. Mechanisms of action of antiresorptive therapies of post menopausal osteoporosis. **Endocr Regul.** 2003; 37(4): 225-38.

Szymczyk KH, Shapiro IM, Adams CS. Ionizing radiation sensitizes bone cells to apoptosis. **Bone.** 2004; 34(1): 148-56.

Tai P, hammond A, Dyk JV, Stiii L, Tonita J, Coad T, Radwan J. Pelvic fractures following irradiation of endometrial and vaginal cancers- a case series and review of literature. **Radither Oncol.** 2000; 56(1): 23-28.

Tanaka M, Ejiri S, Nakajima M, Kohno S, Ozawa H. Changes of cancellous bone mass in rat mandibular condyle following ovariectomy. **Bone.** 1999; 25(3): 339-47.

Tanaka M, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H, Ejiri S. Long-term changes in trabecular structure of aged rat alveolar bone after ovariectomy. **Oral Surg Oral med Oral Pathol.** 2003; 95(4): 495-502.

Tanaka S, Shimizu M, Debari K, Furuya R, Kawawa T, Sasaki T. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. **Anat Rec.** 2001, 262: 203-12.

Teitelbaum SL, Ross P. Genetic regulation of osteoclast development and function. **Nat Rev Genet.** 2003; 4(8): 638-49.

Valdrighi L, Bozzo L, Vizioli MR. Repair of the post-extraction sockets in marmosets (*Callithrix jacchus*): A histological study. **Acta Anat.** 1974; 90(4): 523-38.

Van Der Linden JC, Day JS, Verhaar JAN, Weinans H. Altered tissue properties induce changes in cancellous bone architecture in aging and diseases. **J biomech.** 2004; 37(3): 367-74.

Vizioli MR, Valdrighi L, Bozzo L. The appearing and evolution of reticulin: Observations on the repair of post-extraction marmoset sockets. **Ann Histochem.** 1974; 19(1): 65-71.

Wall JE, Kaste SC, Greenwald CA, Jenkins JJ, Douglass EC, Pratt CB. Fractures in children treated with radiotherapy for soft tissue sarcoma. **Orthopedics.** 1996; 19(8): 657-64.

Walsh WR, Sherman MD, Howlett CR, Sonnabend DH. Fracture healing in a rat osteopenia model. **Clin Orthop.** 1997; (342):218-27.

Wang J. Spacial Orientation of the microscopic elements of cortical repair bone. **Clin Orthop.** 2000; (374): 265-77.

Widmann RF, Pelker RR, Friedlaender GE, Panjabi MM. Peschel RE. Effects of prefracture irradiation on the biomechanical parameters of fracture healing. **J Orthop Res.** 1993, 11(3): 422-8 .

Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. **Calcif Tissue Int.** 1988; 43(3): 179-83.

Wronski TJ, Cintron M, Doherty AL, Dann LM. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. **Endocrinology.** 1988; 123(2): 681-6.

Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the skeleton. **Calcif Tissue int.** 1989; 45(6): 360-6.

Wronski TJ, Sowry PL, Walsh CC, Ignaszewski L A. Skeletal alterations in ovariectomized rats. **Calcif Tissue Int.** 1985; 37(3): 324-8.

Würzler KK, Deweese TL, Sebald W, Reddi AH. Radiation-induced impairment of bone healing can be overcome by recombinant human bone morphogenetic protein-2. **J Craniofacial Surg.** 1986; 9(2): 131-7.

XU S, yu R, Zhao GF, Wang. Early period of fracture healing in ovariectomized rats. **J Clin Invest.** 2003, 93(2): 1959-67.



**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA-IB-UNICAMP**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 599-2, sobre "**EFEITO DA RADIAÇÃO NA REPARAÇÃO ÓSSEA NA TÍBIA DE RATOS OVARIETOMIZADOS**" sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Solange Maria de Almeida/Mariliani Chicarelli** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 12 de Fevereiro de 2004.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº 599-2, entitled "**EFFECT OF RADIATION ON BONE HEALING IN THE TIBIA OF OVARIETOMIZED RAT**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on February 12, 2004.

Campinas, 12 de Fevereiro de 2004.

Profa. Dra. Liana Verinaud  
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Fátima Alonso  
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP