



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Anna Silvia P. Setti da Rocha

Efeito do Selenito de Sódio na Reparação Óssea em Tíbias de Ratos Irrradiados

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Doutor em
Radiologia Odontológica. Área de
Radiologia Odontológica.

PIRACICABA
2005



Anna Silvia P. Setti da Rocha



Efeito do Selenito de Sódio na Reparação Óssea em Tíbias de Ratos Irrradiados

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Doutor em
Radiologia Odontológica. Área de
Radiologia Odontológica

Orientadora: Profa. Dra. Solange Maria de Almeida

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Frab Norberto Boscolo

Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli

Prof. Dr. Plauto Christopher Aranha Watanabe

Profa. Dra. Solange Aparecida Caldeira Monteiro

Profa. Dra. Solange Maria de Almeida

PIRACICABA
2005

Ficha Catalográfica

R582a	Rocha, Anna Silvia P. Setti da. Avaliação do efeito radioprotetor do selenito de sódio na reparação óssea. / Anna Silvia P. Setti da Rocha. -- Piracicaba, SP : 2005. Orientador : Prof^a Dr^a Solange Maria de Almeida. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Osteogênese. 2. Selênio. 3. Glutathione peroxidase. I. Almeida, Solange Maria de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
-------	---

Palavras-chave em inglês (*Keywords*): Osteogenesis; Selenium; Glutathione peroxidase

Área de concentração: Radiologia Odontológica

Titulação: Doutor em Radiologia Odontológica

Banca examinadora: Prof^a Dr^a Solange Maria de Almeida; Prof. Dr. Frab Norberto Boscolo; Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli; Prof. Dr. Plauto Christopher Aranha Watanabe; Prof^a Dr^a Solange Aparecida Caldeira Monteiro

Data da defesa: 23/02/2005



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 23 de Fevereiro de 2005, considerou a candidata ANNA SILVIA PENTEADO SETTI DA ROCHA aprovada.

PROFa. DRa. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA

PROFa. DRa. SOLANGE APARECIDA CALDEIRA MONTEIRO

PROF. DR. PLAUTO CHRISTOPHER ARANNA WATANABE

PROF. DR. FRAB NORBERTO BOSCOLO

PROF. DR. MARIO ROBERTO VIZIOLI

DEDICATÓRIA

A Deus...

O meu agradecimento pelo seu amor incondicional, pelas respostas de oração e por ter realmente “me levado no colo” todos os dias, não me deixando cair. Por perdoar todas as minhas falhas, por me disciplinar e por nunca ter desistido de mim!!

“As misericórdias do Senhor são a causa de não sermos consumidos, porque a sua misericórdia não tem fim; renova-se a cada manhã. Grande é a tua fidelidade.” (Lm 3.22,23)

“De maneira alguma, te deixarei, nunca jamais te abandonarei” (Hb 13.5)

A meus pais *Ronaldo e Vera Silvia*, os quais me possibilitaram o estudo, nunca deixando que eu desanimasse. Além de pais, grandes amigos em todas as horas, me ensinando a ter paciência, amor e fé.

Amo vocês!!

Ao meu irmão *Agostinho* e a minha cunhada *Alessandra* pelos momentos de conversa e de incentivo. Que Deus realmente abençoe a união de vocês com muito amor e sabedoria.

“Se o Senhor não edifica a casa, em vão trabalham os que a edificam...”(Sl 127)

À minha querida orientadora e amiga,

PROFA. DRA. SOLANGE MARIA DE ALMEIDA

Não tenho palavras que possam descrever a minha gratidão,
admiração e respeito...!!

MUITO OBRIGADA...

Pelos seus ensinamentos,

Pelos seus conselhos,

Pelo seu incentivo,

Pela sua competência,

Pela sua coragem,

Pela sua amizade e carinho,

Pela sua disposição em ajudar sempre,
Por ter contribuído de maneira valiosa para a minha vida!!

***“Quanto melhor é adquirir a sabedoria do que o ouro! E
mais excelente adquirir a prudência do que a
prata!”(Prov.16:16)***

AGRADECIMENTOS:

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba-**UNICAMP**.

Ao *Prof.Dr. Frab Norberto Boscolo*, por dedicar parte do seu tempo precioso durante a realização deste trabalho, pelo exemplo de liderança, amizade e competência. Minha eterna gratidão!

Ao *Prof. Dr. Mário Roberto Vizioli*, pela sua dedicação, pelos seus ensinamentos valiosos na área de histologia, por toda a atenção dada e carinho no decorrer do trabalho. Sempre terá minha admiração!

Ao *Prof. Dr. Francisco Haiter Neto*, por me motivar a ser determinada e forte.Obrigada!

À *Profa. Dra. Gláucia M. Bovi Ambrosano*, da área de bioestatística do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, pela sua gentileza, dedicação e por todo o auxílio na análise estatística dos resultados deste trabalho.

Ao *Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes*, da área de histologia do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, por todos conhecimentos transmitidos e grande ajuda para esta pesquisa ser realizada.

À bióloga *Eliene Ap. Orsini Narvaes Romani*, técnica do laboratório de microscopia eletrônica do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, e ao estagiário *Gustavo*, pela sua amizade, disponibilidade e atenção especial dada no decorrer de todo o trabalho, sempre com grande simpatia, proporcionando desta forma um ambiente agradável de se trabalhar.

Às técnicas *Maria Aparecida e Ivani*, do departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, pela atenção, amizade, alegria contagiante e

colaboração valiosa para o desenvolvimento da fase laboratorial.

Ao técnico *Vanderley Francisco Vieira*, do biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, pela colaboração na manipulação e tratamento dos animais utilizados nesta pesquisa.

Aos Funcionários da Disciplina de Radiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, *Raquel, Roberta, Fernando, Antônio, Giselda*, pela amizade, eficiência e presteza em todas as horas.

À bibliotecária *Heloísa M. Ceccotti*, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, pelo auxílio na elaboração deste trabalho.

À *Profa. Dra. Rosângela Requi Jakubiak*, coordenadora do curso de Tecnologia em Radiologia Médica do Centro Federal de Educação Tecnológica/CEFET-PR. Pelo grande incentivo, amizade e por ter me dado à oportunidade de lecionar!

AOS MEUS QUERIDOS AMIGOS:

Waldeck Ribeiro, técnico da clínica de Radiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, obrigada pela sua sincera amizade e companheirismo, com certeza minha casa sempre estará aberta para te receber. Você é meu exemplo de perseverança! Que Deus abençoe muito sua vida!

Mariliani Chicarelli, obrigada pela sua amizade, paciência e “infinita” ajuda para a realização deste trabalho. Mari...sem você eu não teria conseguido chegar até o fim!!

Flavio Manzi e Maria Claudia, vocês foram indispensáveis para a realização desta pesquisa, obrigada por todo tempo dedicado e por toda “grande” ajuda prestada. Nunca irei esquecer da disposição e colaboração de vocês.

Rejane de Almeida, amiga que tenho muitas saudades, obrigada por todos os momentos em que estivemos juntas, pela sua simpatia, sabedoria e colaboração neste trabalho. Você sempre será lembrada com carinho e admiração. Que Deus te abençoe muito!

Luciane Farias, amiga muito querida, que apesar da grande distância sempre esteve presente e sempre estará guardada no meu coração. O que nos dá sentido na vida é poder compartilhar uma verdadeira amizade...!!

Rogério Roveri e Luciana Nacaratto, pelos momentos inesquecíveis de amizade e cumplicidade. Sendo mais que amigos, verdadeiros “irmãos”!

Flávia Maria Ramos e Silvana Pasetto, por dividir meus momentos no biotério, pela disposição em ensinar e ajudar sempre, muito obrigada!

Melissa, Fabrício, Flavio, Mauro, Karina, Maria Luiza, Andréa, Andréa Domingos, Etienne, Juliana, Fábio, Ricardo, Adriana, Cristiane, João, Marcelo, Sérgio, por

toda a atenção, carinho, alegria e amizade em todos os momentos.

A **CAPES**, pelo auxílio financeiro indispensável à realização das atividades científicas.

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	3
1 Introdução	5
2 Revista da Literatura	7
3 Proposição	34
4 Materiais e Métodos	35
5 Resultados	43

6 Discussão	59
7 Conclusão	69
Referências	70
Anexos	76

RESUMO

Sendo a radiação ionizante causador de efeitos deletérios no processo de reparação tecidual e o selenito de sódio um agente antioxidante, atuando contra os radicais livres no organismo, a realização deste trabalho de pesquisa teve como objetivo avaliar o efeito radioprotetor do selenito de sódio no processo de reparação óssea em tíbias de ratos fêmea (*Rattus Norvergicus*, *Albinus*, *Wistar*). A amostra, constituída por 100 ratos, foi dividida em quatro grupos experimentais: controle, irradiado, selênio e selênio/irradiado. Todos os animais foram submetidos a um ato cirúrgico que teve como finalidade a produção de um defeito ósseo nas tíbias direita e esquerda. Os animais dos grupos selênio e selênio/irradiado receberam dose única, via intraperitoneal, de 1 mg/Kg de peso corpóreo de selenito de sódio, sendo que nos animais do grupo selênio/irradiado, a dose foi injetada 15 horas antes destes serem irradiados. A irradiação para os grupos irradiado e selênio/irradiado foi realizada por um aparelho de Cobalto terapia (CO₆₀) com dose simples de 8 Gy nos membros inferiores, após três dias do procedimento cirúrgico. Transcorridos 7, 14, 21, 28 e 45 dias, o processo de reparação óssea foi avaliado em cortes histológicos corados com Hematoxilina Eosina e Tricrômico de Mallory; pela análise ultra-estrutural por microscopia eletrônica de varredura; e quantitativamente pela densidade volumétrica. Morfologicamente, observou-se que o grupo selênio/irradiado aos 7 dias apresentava-se mais atrasado que o grupo controle, entretanto aos 28 dias os

grupos controle, selênio e selênio/irradiado apresentavam um padrão de reparação óssea semelhante, o que também foi observado pela microscopia eletrônica de varredura, aos 45 dias. Quantitativamente, foi observada diferença estatisticamente significativa entre as médias de densidade volumétrica para os grupos selênio e selênio/irradiado aos 7, 14 e 28 dias e entre os grupos controle e selênio aos 14 dias. Assim, concluiu-se que o selenito de sódio, apesar de ter-se mostrado tóxico aos sete dias do processo de reparação tecidual, agiu como um eficaz radioprotetor na reparação óssea de tíbias de ratos.

ABSTRACT

Considering that the ionizing radiation may cause deleterious effects on the process of tissue repair and sodium selenite is an antioxidant agent, acting against the free radicals in the organism, this study aimed at evaluating the radioprotective effect of sodium selenite on the process of bone repair in tibiae of Wistar rats. The sample comprised 100 rats and was divided into four experimental groups: control, irradiated, selenium and selenium/irradiated. All animals were submitted to a surgical procedure for production of a bone defect in the right and left tibiae. The animals in the selenium and selenium/irradiated groups received a single dose of sodium selenite (1mg/kg of body weight) via intraperitoneal injection; the animals in the selenium/irradiated group received the injection 15 hours before irradiation. The irradiation for the irradiated and selenium/irradiated groups was applied with a cobalt therapy machine (CO₆₀) with simple dose at 8 Gy on the lower limbs, three days after surgery. After 7, 14, 21, 28 and 45 days, the process of bone repair was morphologically evaluated by Hematoxylin Eosin and Mallory Trichrome staining; ultrastructural analysis by scanning electron microscopy; and quantitatively evaluated by the volumetric density. As to morphology, it was observed that the selenium/irradiated group at 7 days presented a late repair compared to the control group; however, at 28 days, the control, selenium and selenium/irradiated groups presented a similar pattern of bone repair, which was also revealed by scanning electron microscopy at 45 days. Quantitatively, there

was a statistically significant difference between the means of volumetric density for the selenium and selenium/irradiated groups at 7, 14 and 28 days and between the control and selenium groups at 14 days. Thus, it was concluded that sodium selenite, despite being toxic at the seventh day of tissue repair, was an effective radioprotective agent for bone repair in tibiae of rats.

1 INTRODUÇÃO

O esqueleto ósseo representa uma importante função de sustentação e proteção a órgãos vitais do corpo humano. Frente a uma injúria, o osso apresenta alta capacidade de reparação. Uma simples lesão produzida no tecido ósseo ativa uma seqüência programada de eventos, que se inicia com a formação de um coágulo e posterior surgimento de células ósseas com funções específicas.

O mecanismo de reparação óssea, em condições normais, ocorre inicialmente por um aumento da atividade osteoblástica, formando rapidamente tecido ósseo imaturo, matriz orgânica, seguida pelo depósito de sais de cálcio. Os osteoblastos secretam colágeno e substância fundamental amorfa que constituem tecido ósseo não mineralizado, o osteóide (Guyton, 2002).

Entretanto, processos de formação óssea não ocorrem somente quando a arquitetura normal deste tecido é rompida. Continuamente existe reabsorção de osso pré-existente, que é realizada por células específicas para esta função os osteoclastos, e formação de novo osso. A esse processo dá-se o nome de remodelamento ósseo. Portanto, continuamente ocorre à renovação do tecido ósseo. Segundo Guyton (2002), a remodelação óssea é um fenômeno fisiológico que, torna possível a substituição de tecido ósseo sem alteração na arquitetura, mantendo a qualidade óssea, tanto mecânica quanto metabolicamente.

A radioterapia representa uma das formas de tratamento para pacientes portadores de alguns tipos de lesões malignas. Entretanto, representa um tratamento agressivo e, portanto, traz seqüelas para os pacientes. Dentre essas seqüelas, pode-se citar a osteorradionecrose, decorrente da radioterapia utilizada em tumores ósseos. Esta é bastante conhecida por profissionais que tem como área de atuação, entre outras, a região de cabeça e pescoço, bem como, a região pélvica. Assim, o Cirurgião Dentista pode conviver com as seqüelas causadas pela radioterapia na região de cabeça e pescoço.

Tendo como finalidade minimizar os efeitos deletérios da radiação, surgiram os radioprotetores. Estas substâncias têm como função impedir a ação deletéria da radiação ionizante nos tecidos normais, os quais, apesar da colimação que é dada pelo aparelho, sofrem danos decorrentes da irradiação.

A atuação dos radioprotetores pode ser pela eliminação de radicais livres, atuando como “varredores” ou, de forma indireta, pelo aumento de enzimas que são consideradas como antioxidantes, como é o caso da glutathione peroxidase. Estudos realizados indicam que o selênio é parte integrante dessa enzima, o que lhe confere ser um elemento radioprotetor.

Assim, a realização de pesquisas que busquem avaliar a ação de substâncias radioprotetoras no processo de reparação tecidual é de extrema valia, visto que a associação entre cirurgia e radioterapia continua sendo usada para o tratamento de alguns tipos de tumores.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O TECIDO ÓSSEO

O osso é um dos tecidos mais resistentes do organismo, sendo um tecido especializado que serve de suporte estrutural para o organismo e proteção de órgãos vitais. Aloja e protege a medula óssea que é formadora de células do sangue e tem grande capacidade de renovação, a fim de responder às necessidades metabólicas do organismo. É formado por três tipos de células e pela matriz óssea (material intercelular calcificado). As células são os osteócitos, que se encontram em lacunas no interior da matriz; os osteoblastos, relacionados com a osteogênese, produtores da parte orgânica da matriz; e os osteoclastos, células gigantes multinucleadas, relacionadas com a reabsorção do tecido ósseo e que participa no processo de remodelamento.

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 a fatores histológicos, funcionais e fisiológicos. Porém, todos eles se originam de uma célula progenitora comum, conhecida como célula mesenquimal primitiva. Através dela, há diferenciação desta em células diferenciadas, 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 Schenk (1996), 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 osteoclastos começa a se desenvolver, provoca absorção óssea “cavando” um túnel que pode apresentar o diâmetro de até 1 mm, onde a permanência dos osteoclastos é de algumas horas à vários dias, dependendo do estímulo recebido (ex. paratormônio e estrogênio). Cessado o estímulo, os osteoclastos são convertidos em osteoblastos, que secretam colágeno e substância fundamental. Inicia-se assim a deposição de novo osso.

Segundo Gartner & Hiatt (2003), uma fratura óssea causa o rompimento do periósteo, do endósteo e de vasos sanguíneos. O coágulo sanguíneo preenche

o local da fratura formando o tecido de granulação, logo após ocorre invasão de células osteoprogenitoras, formando em uma semana um calo interno de osso trabecular. Em 48 horas após a lesão, ocorre um acúmulo de células osteoprogenitoras, as células mais próximas do osso que estão em vizinhança com capilares se diferenciam em osteoblastos, começando a produzir um colar ósseo; as células osteoprogenitoras do meio da massa em proliferação ficam menos vascularizadas, causando baixa de oxigênio e se diferenciam em condroblastos, formando cartilagem. Os colares formados em cada extremidade do fragmento fundem-se formando o calo externo. A cartilagem adjacente ao osso novo torna-se calcificada e substituída por osso primário, formado por ossificação endocondral. Ocorre o remodelamento ósseo substituindo o osso primário por osso secundário, eliminando o calo ósseo. O primeiro osso produzido forma-se por ossificação intramembranosa e todo osso morto é reabsorvido e substituído por osso novo formado pelos osteoblastos. O osso primário é substituído por osso secundário, reforçando a reparação da fratura.

Vizioli *et al.*, em 1974, 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, onde os animais foram sacrificados aos 3, 5, 7, 11, 16, 23, 31, 42, 56 e 75 dias pós-exodontia, sob análise microscópica, puderam concluir que, em 5 dias o tecido de granulação apresentou grande proliferação fibroblástica. A osteogênese teve seu início entre 11 a 16 dias após a extração. A

maturação do trabeculado ósseo, com a diminuição dos espaços medulares começou 23 dias após a extração se estendendo até 42 dias. O epitélio superficial da ferida alveolar apresentou-se completo cerca de duas semanas após extração dentária.

Carvalho *et al.*, em 1997, realizaram uma análise histométrica na reparação óssea alveolar em ratos com o propósito de quantificar a tempo do reparo alveolar na porção apical, média e cervical. Extraíram os incisivos superiores de ratos Wistar, sendo sacrificados após 7, 14, 21 e 42 dias. As peças foram imersas em formol por 48 horas, descalcificadas e processadas em parafina. Os cortes foram feitos em intervalo de 60mm, longitudinais e corados com Hematoxilina Eosina. Nos resultados, após sete dias observaram delicado osso trabecular com osteoblastos principalmente na apical e terço médio, tecido conjuntivo abundante e formação de capilares ainda presentes, remanescentes de coágulo na região central. Após 14 dias ocorre a progressão da formação óssea, maturação do tecido conjuntivo e osso trabecular em todo alvéolo. Após 21 dias o alvéolo começa a formar um trabeculado ósseo espesso, o que também é observado em 42 dias. O volume de trabéculas ósseas foi menor na região cervical em todos os tempos, exceto aos 42 dias. Os autores relataram que a máxima formação óssea e o máximo volume alveolar ocorreram aos 14 dias após a extração.

2.2 EFEITO DA RADIAÇÃO NO TECIDO ÓSSEO

A interação das radiações ionizantes com o tecido vivo no tratamento radioterápico provoca diversos efeitos indesejáveis ao organismo, principalmente nas áreas adjacentes à região onde está sendo realizado o tratamento.

Guglielmotti *et al.*, em 1986, realizaram um estudo com o propósito de determinar a resposta do tecido ósseo durante a reparação alveolar depois de diferentes dosagens de radiação X (15, 20, 30 Gy), aplicadas em variados intervalos de tempos depois da extração dentária (0, 3, 7 dias após cirurgia). Foram avaliadas as amostras por métodos histológicos, radiográficos e histométricos e sacrifício dos animais aos 14 dias após a extração. As peças foram fixadas em formol, descalcificadas em EDTA e incluídas em parafina. Os resultados mostraram que nenhuma diferença significativa foi vista com as diferentes doses dadas sete dias após a extração, mas houve atraso na reparação alveolar quando a irradiação foi dada imediatamente ou três dias após a extração. Com base nestas observações foi recomendado que a irradiação não seja iniciada até pelo menos uma semana depois da extração dentária.

A radioterapia é freqüentemente realizada como tratamento de lesões ósseas primárias e metastáticas ou em tumores de tecido mole adjacente ao osso, podendo posteriormente gerar fraturas patológicas. Muitos autores têm notado uma pequena, mas significativa prevalência de fraturas na cabeça do fêmur em adultos após irradiação pélvica. Muitos estudos em animais têm documentado o

efeito deletério da irradiação em parâmetros histológicos e bioquímicos em reparo de fraturas. Em 1993, Widmann *et al.* avaliaram se a irradiação dada antes de uma fratura impede a sua reparação e se a força e rigidez dessa união é afetada, examinaram os efeitos biomecânicos da reparação óssea utilizando dose única de 900 rad em fêmur de ratos, a fratura foi criada 1 dia após sendo o tempo de sacrifício dos animais de 2, 3, 4, 8 e 16 semanas após a fratura. Os resultados foram comparados com um grupo controle, o que sugeriu que o grupo irradiado 1 dia antes da fratura podem produzir uma resposta reparatória significativamente mais frágil, persistindo essa diferença até a 8ª semana.

Numerosas complicações esqueléticas têm sido relatadas em pacientes pediátricos, cujos tumores foram tratados com radioterapia e quimioterapia. A maioria dessas complicações tardias é descrita em pacientes com sarcoma de Ewing ou osteossarcoma, podendo afetar a elasticidade do osso, causar osteoporose e desmineralização óssea. Na pesquisa de Wall *et al.* em 1996, foram avaliadas complicações ósseas em crianças com sarcoma de tecido mole submetidas à radioterapia. Foram revisados prontuários de 70 crianças com sarcoma de tecido mole nas extremidades inferiores, no período de 1962 a 1991. Dos doze pacientes que tinham recebido tratamento radioterápico após a excisão cirúrgica dos tumores, três desenvolveram fratura, sendo que dois dos três tinham recebido também tratamento quimioterápico, nenhum dos 58 pacientes submetidos à cirurgia e somente quimioterapia desenvolveram fraturas. Os achados indicaram que, mesmo que o risco de fraturas após o tratamento podem

ser multifatoriais, a radiação tem papel significativo no problema. Assim, minimizando o tamanho da incisão cirúrgica ao máximo possível irá também reduzir o tamanho da área irradiada; esse aprimoramento da técnica de tratamento em conjunto com a orientação ao paciente e familiares sobre apropriadas atividades físicas irá ajudar a diminuir o risco de complicações como osteoporose e atrofia de músculo e osso, que predispõe esses pacientes a fraturas.

A radioterapia em tumores de cabeça e pescoço, freqüentemente, resulta em necrose óssea e prejuízo na vizinhança. O mecanismo em que a irradiação danifica os ossos ainda não está completamente entendido, contudo, tem sido mostrado que a irradiação causa distúrbios no equilíbrio entre a atividade osteoblástica e osteoclástica, favorecendo o processo de destrutivo. O número de osteócitos e osteoblastos após a irradiação decaem e também a síntese de colágeno e a atividade de fosfatase alcalina, a matriz formada é prejudicada e o processo de mineralização alterado, o que pode ocasionar fraturas espontâneas. O propósito da pesquisa 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 recombinante humano (rh) BMP-2 usando colágeno tipo I como um portador. Irradiação com uma única dose de 1.200 rads foi realizada 2 ou 7 dias pré-operatório. Animais não irradiados serviram como controle. Nova formação óssea foi avaliada por

quantificação de radiografias da calvária e histológico no 21º dia após a cirurgia. Concluíram que a irradiação induziu 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 crâniomaxilofacial reconstrutiva após irradiação.

Ocorrem freqüentes complicações prejudicando a reparação óssea em tratamentos de câncer combinando cirurgia e radioterapia. Essas injúrias dependem da seqüência e do intervalo de tempo, as quais foram estudadas num modelo experimental definido na pesquisa de Arnold *et al.* em 1998, onde avaliaram o prejuízo induzido pela irradiação na reparação óssea em fêmur de ratos, em diferentes tempos antes e depois da cirurgia. O efeito da irradiação no pré e pós-operatório usando dose única de raios X (4.5 Gy/min) foi mensurado nos tempos de 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, e avaliados por cortes histológicos usando o método morfométrico. Concluíram que a tolerância à irradiação aumenta se a radioterapia é dada após 4 dias da cirurgia, o que tem grande implicação na combinação de radioterapia e cirurgia envolvendo reconstrução óssea. Biologicamente, a regeneração das células alvo isoladas é insuficiente para justificar o drástico aumento na radiotolerância, que deve ser acompanhado por um aumento da resistência celular por causa da diferenciação.

A radioterapia na região de cabeça e pescoço é um tratamento comum em casos de lesões malignas, entretanto, a exposição à radiação oferece como resultado várias complicações, muitas são localizadas e expressadas em curto prazo após a irradiação. Em 2001, Nagler realizou um estudo dos efeitos da irradiação de cabeça e pescoço em longo prazo em ratos, onde grupos foram avaliados durante 1 ano. O grupo controle, não irradiado, foi comparado aos grupos irradiados em diferentes doses, sendo estas de 2,5; 5; 7; 10 e 15 Gy. O grupo que recebeu 2.5 Gy e 5 Gy sobreviveram o período de 1 ano do estudo, ao contrário aconteceu aos grupos que receberam 7.5, 10 e 15 Gy. Concluíram que os dados acumulados demonstraram o devastador resultado da irradiação em cabeça e pescoços, sendo que efeito da irradiação é dose dependente e manifestada por uma prolongada e crônica deterioração no estado geral de saúde, eventualmente resultando em morte animal.

2.3 O SELÊNIO

2.3.1 O Metabolismo do Selênio

Em 1970, Sandstead *et al.* relatam que diversas substâncias presentes na nutrição dos seres-humanos, como cobre, zinco, cromo, manganês e selênio, são bem conhecidas, porém informações a respeito da fisiologia humana ainda não são bem explicadas. Esses mesmos autores relatam ainda que estes elementos são essenciais para os mamíferos, apresentando funções metabólicas específicas, e que sua deficiência resulta em síndromes que podem ser

observadas no homem. Suas funções metabólicas podem influenciar em algumas proteínas ou outras moléculas, podendo também funcionar como coordenador de forças entre essas moléculas. Podem também agir em algumas enzimas (metaloenzimas), sendo essencial para a função das mesmas.

O decréscimo da fertilidade, o aumento da mortalidade pré-natal e um tipo de distrofia muscular é reconhecido como consequência da deficiência de selênio na dieta de gados e ovelhas na Nova Zelândia, os animais precisam de dietas suplementares de selênio para uma boa saúde e crescimento, mas não se sabe ainda se o selênio também é tão essencial na dieta humana. Thomson & Stewart, em 1974, desenvolveram métodos para avaliar a categoria nutricional do selênio em pessoas da Nova Zelândia. Utilizaram três voluntárias do sexo feminino com idade entre 20 a 33 anos onde foram submetidas a uma dose oral de $10\mu\text{Ci}$ [^{75}Se] selenito, contendo não mais que $10\mu\text{g}$ Se. Foram feitas coletas de urina, fezes, sangue, mensuração da excreção via derme e respiratória, para determinar o nível de absorção e excreção do selênio. Como resultado, verificou-se que o selênio era rapidamente excretado pela urina durante o primeiro dia, e que a maior taxa de excreção (0,4-1,4%) ocorreu durante as duas primeiras horas, indicando uma rápida absorção deste elemento pelo organismo, com um decréscimo de menos que 0,1% na décima segunda hora, totalizando uma taxa de excreção que variou de 7% a 14% da dose durante os quatorze dias de pesquisa. A excreção fecal apresentou seu maior nível durante o quarto e o quinto dia, durante os quatorze dias o índice de excreção variou de 33% a 58%, enquanto

que a dose absorvida pelo intestino variou de 44% a 70%. A dose total absorvida pelo organismo, determinada pela mensuração da perda através da excreção fecal e urinária, foi de 38% a 60% para o sétimo dia e de 35% a 53% para o décimo quarto dia. Com isso, os autores concluíram que a absorção do selenito variou consideravelmente para as três pacientes e que a média de absorção foi significativamente menor que nos ratos (92%), provavelmente devido a uma menor absorção intestinal do selênio pelo homem.

Segundo Ellenhorn & Barceloux, em 1988, o selênio é um metal essencial que facilita a redução do nível de peróxidos nos tecidos, destruindo-os através de sua ação na enzima glutathione peroxidase. Esta enzima é deficiente quando animais ou humanos consomem uma dieta pobre em selênio. Entre os sais de selênio, os mais utilizados em pesquisas para a radioproteção são o selenato de sódio e o selenito de sódio, que apresentam em humanos uma dose mínima de toxicidade de aproximadamente 22 mg/kg e 1 a 5 mg/kg respectivamente, com os sintomas de náuseas, vômitos, dores abdominais e tremores que são normalizados em 24 horas.

Em 1989, Patterson *et al.*, desenvolveram um modelo cinético que reproduzia o metabolismo humano a fim de verificar o comportamento do selênio quando administrado na forma de selenito. Com isso, esses autores relataram que em humanos o selenito é rapidamente absorvido no plasma, em aproximadamente 30 minutos, apresentando na urina sua máxima excreção, nas duas primeiras

horas após a dosagem. Também foi verificado que o selênio é excretado nas fezes, porém, baseado no corrente modelo de estudo, foi observado que nos humanos, o selênio é excretado em maior quantidade pela bile e pelo sulco pancreático, em comparação aos ratos. Esses autores ainda citam que o selenito é uma molécula altamente reativa e que quando introduzida no organismo, apresenta uma série de complexas reações resultando na produção de várias espécies de selênio como selenides, selenotrisulfidres e selênio elementar. A máxima concentração de selênio ocorre entre 9 e 14 horas após a administração, apresentando uma considerável diminuição na sua concentração no plasma sanguíneo após ao dia da dosagem, podendo ser resultado da utilização pelos tecidos do material retornado pelo fígado. Com isso especula-se que a secreção ou a excreção do selênio pelo fígado se dá em forma de proteínas, possivelmente a glutathione peroxidase ou outra selenoproteína.

Em alguns lugares da China e África central, a deficiência de selênio pode estar associada com problemas cardíacos e musculares, e também a osteoartrose (Síndrome de Kashin-Beck), mas o envolvimento de células ósseas como os osteoblastos na progressão dessa doença, ainda não está claro. Dreher *et al.*, em 1998, pesquisaram o envolvimento de selenioproteínas no mecanismo de diferenciação e defesa celular, para isso estudaram a ação da glutathione peroxidase em osteoblastos de fetos humanos (células hFOB) usando bagagem metabólica de selênio-75. Concluíram que a ação das selenioproteínas na glutathione peroxidase em células hFOB representa um novo sistema de defesa

antioxidante dos osteoblastos, protegendo-o contra os peróxidos de hidrogênio produzidos pelos osteoclastos durante a remodelação óssea.

2.3.2 Mecanismos da Ação Antioxidante do Selênio

Tappel, em 1965, estudou os danos provocados pelos radicais livres na peroxidação de lipídios e sua inibição pelo selênio e pela vitamina E a nível celular, e concluiu que esses danos atingem as mitocôndrias e o retículo endoplasmático, produzindo grandes alterações nos mesmos. Também verificou que o mecanismo de ação antioxidante do selênio é semelhante ao dos radicais sulfurados, porém com uma superioridade em relação aos mesmos, sendo classificado em: a) antioxidante lipídico que inibe a peroxidação; b) decomposição do peróxido; c) captura dos radicais livres; d) reparo dos danos moleculares.

Em 1972, Rotruck *et al.* realizaram um experimento com a finalidade de verificar a possível relação do selênio com a enzima glutathione peroxidase. Ratos foram submetidos a dietas com deficiência de selênio e dietas com 0,5 ppm de selênio, na forma de selenito de sódio, estando todas as dietas acrescidas de 50 mg de alfa-tocoferol por kilograma de dieta. Como resultado foi observado que os animais do grupo com deficiência de selênio, apresentavam muito menos glutathione peroxidase do que o grupo da dieta com selênio. Isso possibilitou o início de uma suspeita de que o selênio poderia fazer parte da constituição da glutathione peroxidase, tornando-se alvo de várias pesquisas, pois se tinha o conhecimento de que o mecanismo primário desta enzima é a degradação, em

baixos níveis, de peróxido de hidrogênio nas células, além de também agir nos hidroperóxidos de ácidos insaturados gordurosos, mostrando ser um importante protetor dos lipídios da membrana celular contra a desintegração a partir da oxidação.

Em 1973, Flohe *et al.* classificaram a enzima glutathione peroxidase como uma selenoenzima, pois verificaram que a deficiência de selênio levava a diminuição na atividade desta enzima, o que permitia considerar o selênio um essencial componente da glutathione peroxidase. Este achado pode, segundo os autores, explicar algumas manifestações patológicas que ocorrem com a deficiência do selênio que, normalmente, estão relacionadas com a peroxidação de lipídios insaturados em membranas biológicas.

Em 1974, o efeito da dieta com o selênio na atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px) também foi verificado nos eritrócitos e no fígado de ratos por Hafeman *et al.* que utilizaram uma dieta com selenito de sódio, onde foram feitos dois experimentos. No primeiro, foi utilizado o selênio em diversas concentrações (0; 0.05; 0.10; 0.5; 1 e 5 ppm), dividindo os animais em seis grupos. Os autores observaram que o selênio tinha uma grande influência na atividade da glutathione peroxidase apresentando, nos eritrócitos, sua maior atividade no grupo com 5 ppm de selenito de sódio, com uma média de 132% de acréscimo em relação ao nível inicial, enquanto que no fígado sua influência foi sempre mais pronunciada, com uma maior atividade no grupo com 1 ppm de selenito de sódio, contrariando os

achados para os eritrócitos, podendo ser explicado, provavelmente, pelo dano hepático provocado pela toxicidade do selênio em grandes concentrações. No segundo experimento, foram utilizados ratos submetidos a uma dieta com deficiência de selênio durante nove meses, sendo em seguida dividido em quatro grupos que foram administrado uma dieta com diferentes concentrações de selenito de sódio (0, 0.1, 0.5 e 5 ppm). Foi observado que estes animais possuíam, previamente à administração do selênio, uma deficiência na atividade da glutathione peroxidase ao nível dos eritrócitos e que, após a administração do selênio, o aumento da atividade enzimática foi maior no grupo com 5 ppm de selenito de sódio. Com esses resultados Hafeman *et al.* afirmam que o selênio é essencial para a atividade da glutathione peroxidase.

No mesmo ano, Chow *et al.* explicaram que a glutathione peroxidase é uma importante enzima responsável pela desintoxicação da maioria dos peróxidos lipídios que podem ser formados no organismo, protegendo desta maneira, os tecidos contra os efeitos deletérios dos mesmos. Também afirmaram que o selênio é uma parte integrante da enzima glutathione peroxidase, sendo utilizado para esse estudo ratos submetidos a dietas contendo selênio na forma de seleniometiona. Como resultado foi verificado que o grupo que possuía deficiência de selênio apresentava uma deficiência na atividade da glutathione peroxidase em aproximadamente 53% no coração e 39% para os pulmões, sendo que o maior decréscimo foi verificado no plasma e o menor nas células vermelhas. Quando foi utilizada a dieta com selênio, foi observado que entre os tecidos estudados, o

plasma mostrou a maior mudança na atividade da glutathione peroxidase, com um acréscimo de 419% em relação ao grupo da dieta com deficiência de selênio. Também foi verificado um aumento da atividade enzimática nos outros tecidos estudados. Com isso, os autores concluem que o selênio é extremamente necessário para a atividade da glutathione peroxidase, sendo mais eficaz no plasma, rim, coração, eritrócitos, pulmões e fígado, enquanto que com a diminuição do selênio a menor atividade enzimática foi encontrada no plasma, rim, coração, pulmão, fígado e eritrócitos. Sendo assim, devido o plasma ser o mais sensível na atividade enzimática em relação à dieta com o selênio, os autores ainda afirmam que é possível determinar o nível de selênio pela atividade da glutathione peroxidase no plasma.

Lawrence *et al.*, em 1976, através de uma experiência com ratos submetidos a uma dieta com deficiência de selênio, afirmaram que a atividade da enzima glutathione peroxidase está diretamente ligada a dieta com selênio, e que dietas com deficiência desta substância diminuam a atividade desta enzima contra o peróxido de hidrogênio. Para isto, os animais foram divididos em dois grupos, um com uma dieta com deficiência de selênio, e outro com adição de 0,5 mg/kg de selenito de sódio. Foi verificado que a atividade da glutathione peroxidase em relação ao Peróxido de Hidrogênio teve um decréscimo, no grupo com deficiência de selênio, de 8% a 42% em relação ao grupo com administração de selênio.

2.3.3 Mecanismo da Ação Radioprotetora do Selênio

Breccia *et al.*, em 1969 investigaram a radioproteção química em organismos vivos através da administração intraperitoneal de derivados de selênio, entre esses a selenocisteína, o selenocromo e o selenometionina, em ratos, comparando seus efeitos radioprotetores com o da cisteína. Cinco minutos após a injeção destas substâncias, os ratos foram irradiados com 600, 750 e 900R de radiação gama e observados por quarenta dias após a exposição. Os resultados permitiram concluir que na dose de 600R o selenocromo apresentou a mesma proteção da cisteína, enquanto que todos os outros derivados do selênio foram mais eficazes. Com 750R, que representa a dose letal, todos os ratos tratados com derivados de selênio tiveram uma taxa de sobrevivência igual ou maior que 50%, com exceção do selenometionina. Porém, com a dose de 900R, nenhum dos componentes derivados do selênio testados foram eficazes, ao contrário da cisteína e da selenourea.

Os selenoaminoácidos têm mostrado ser um potente radioprotetor, podendo até cruzar a barreira placentária e possivelmente proteger o embrião dos efeitos deletérios da irradiação. No estudo de Cekan *et al.*, em 1985, testaram o efeito radioprotetor do selênio contra mal-formações induzidas pela irradiação em ratos. Administraram uma dose única de selenito de sódio (0.5 mg Se/kg b.w.) via intraperitoneal em ratos com 9 dias de gestação, dada 30 minutos ou 2 horas antes de receberem 1.75 Gy de irradiação no corpo todo. Nos resultados,

obtiveram uma significativa diminuição no número de malformações quando o selenito de sódio foi injetado 2 horas antes da irradiação, o que não aconteceu no grupo em que foi injetado 30 minutos antes.

Segundo Borek *et al.*, em 1986, analisando a ação inibidora radiogênica e os mecanismos do selênio e da vitamina E, relatam que o selênio é um essencial constituinte da enzima glutathione peroxidase, que é responsável pela destruição do peróxido de hidrogênio. Nesse trabalho as células foram tratadas com 2,5 µM de selênio e 7µM de vitamina E, sendo expostas 24 horas depois à radiação X. Os resultados indicaram um considerável aumento dos níveis de glutathione peroxidase, catalase e proteínas não tióis, quando feito um pré-tratamento com selênio. Quanto ao tratamento com a vitamina E nenhum aumento nos níveis destas enzimas foi observada. Quando foi feita a interação do selênio com a vitamina E, não foi constatado aumento na atividade do selênio.

Em 1987, Weiss *et al.* avaliaram o efeito radioprotetor e a redução da toxicidade do WR-2721 através do pré-tratamento com o selênio em camundongos, devido ser esta substância utilizada em pacientes submetidos a tratamento radioterápico, quimioterápico; e em exposição acidental a explosões nucleares ter seu uso limitado pela grande toxicidade que esta droga possui, incluindo como sintomas náuseas e vômitos. Foi utilizado o selenito de sódio injetado intraperitonealmente em um volume que era de aproximadamente 1% por peso corporal do animal e foi dada uma dose de radiação de 9Gy de ⁶⁰CO. Como

resultado, estes autores observaram que quando o selênio era administrado 24 horas antes da dose letal de WR2721 (800-1200mg/kg) foi encontrado um aumento significativo no número de sobreviventes que era potencializado com a dose do selênio, enquanto que quando o selênio era administrado simultaneamente, ele não reduzia a toxicidade do WR2721. Quando foi analisada a ação somente do selênio, foi verificado que havia um moderado efeito radioprotetor. Estes dados indicam que o pré-tratamento com o selênio além de diminuir a toxicidade do WR2721, provoca também um aumento em sua ação radioprotetora.

Sandström *et al.*, em 1989(a) verificaram que o selênio induz à variação do nível de atividade da enzima glutathione peroxidase, porém não tendo efeito na proteção da quebra do DNA e da lise celular provocada pela radiação. Para esse experimento foram utilizados três tipos de células mamárias as quais sofreram um "banho" de um soro contendo baixa concentração de selênio e após um período de três semanas foi adicionado 100nM de selenito de sódio. A radiação utilizada era produzida por uma fonte de ^{137}C (raios Gama) de $0,60 \text{ Gy min}^{-1}$. Não houve diferença quanto a radiosensibilidade entre o grupo controle e o grupo tratado com o selênio, contrariando a grande diferença da atividade enzimática da glutathione peroxidase, que se apresentava bastante aumentada. Também foi testado o nível de atividade de outras enzimas, como a CuZn superoxide dismutase e catalase, porém com os resultados minimamente influenciados pelo tratamento com o selênio. A diferença também foi insignificante quanto ao número

de quebras nos DNAs pela radiação em relação ao grupo controle e o grupo tratado. Os resultados mostraram que os efeitos radioprotetores do selênio não são devido ao aumento da atividade da enzima glutathione peroxidase, mas a um possível fator de dependência do selênio.

Sandström *et al.*, também em 1989(b), avaliaram o aumento da atividade da glutathione peroxidase para a proteção das células humanas contra o peróxido de hidrogênio através do selênio. A pesquisa foi feita com células humanas a qual foi tratada com 100nM de selenito por 10 a 15 dias e expostas ao peróxido de hidrogênio por 30 a 60 minutos, o que permitiu concluir que estas células sofreram um aumento considerável no nível da atividade da glutathione peroxidase, porém o autor cita que, mesmo com o aumento desta enzima, ela é incapaz de proteger o DNA da ação das radiações ionizantes, agindo apenas na prevenção da lise celular provocado pelo peróxido de Hidrogênio que não destrói o DNA.

Borek *et al.*, em 1986, cita que quando utilizado o agente anti-carcinogênico (C3H 10T1/2) com células de Hamster pré-tratadas com Selênio e expostas aos diversos tipos de radiações como raios X, luz ultravioletas, entre outros, estas células aumentavam o nível de glutathione peroxidase e catalase, aumentando assim a destruição dos peróxidos. Ele também relata que o selênio, assim como outras substâncias antioxidantes e certas vitaminas podem ter ação anticarcinogênica.

Em 1995, Wu *et al.* pesquisaram a ação do metabolismo do selênio e a indução da morte celular através do seleniodiglutationa, comparando seus efeitos celulares com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Para isso, os autores utilizaram células mamárias de ratos da linhagem C57, utilizando também uma célula clonada desta, que se denominava B19. Esta célula clonada era resistente ao seleniodiglutationa, que é o primeiro metabólito formado quando há a redução do selenito em glutathione, e é um agente anti-carcinogênico apresentando também uma alta toxicidade que pode provocar a apoptose. Os resultados mostraram que a seleniodiglutationa provoca mudanças morfológicas celulares similares ao peróxido de hidrogênio sugestivo de apoptose, porém através de mecanismos diferentes, fato que foi verificado nas células resistentes ao seleniodiglutationa que se apresentavam igualmente sensíveis ao H_2O_2 sendo induzidas à morte células. Estes autores concluem que tanto o seleniodiglutationa como o peróxido de hidrogênio induzem à morte celular, porém o mecanismo como isso ocorre não foi esclarecido.

Ainda neste ano, Lu *et al.* avaliaram a genotoxicidade do selênio dissociando dos efeitos inibitórios de crescimento celular (ação anticarcinogênica), ou seja, tinham como objetivo avaliar se a quebra do DNA (single-strand break) poderia ser dissociado dos efeitos biológicos que estão associados com a inibição do câncer. Foram utilizados vários componentes do selênio, entre eles o selenito de sódio com uma linhagem de células tumorais epiteliais de mama de ratos (MOD). Estes autores verificaram que a ação inibitória do crescimento pode ser

dissociada da genotoxicidade, porém o selenito induz a quebra de DNA (single e double-strand break) e à morte celular. Também foi verificado que o mecanismo de ação molecular dos compostos de selênio são diferentes, visto que o metilseleniocianato e o SE-metilselenocisteína não induzem ao DNA single-strand break, mas produzem inibição da proliferação celular e à morte celular.

O estudo da inibição da atividade do mecanismo de ligação do DNA através do uso do selenito e o selenodiglutationa (GS-Se-SG) foi avaliado por Spyrou et al em 1995. Sabendo-se que o complexo AP-1 é um importante fator de transcrição para a regulação do crescimento e diferenciação celular, estes autores avaliaram a ligação desse complexo com o DNA, utilizando extratos nucleares de linfócitos humanos 3B6. Para isso, foram realizados pré- tratamentos com selenito e com selenodiglutationa nos linfócitos intactos e também diretamente no extrato nuclear. Os resultados demonstraram que quando aplicados diretamente no extrato nuclear durante 10 minutos, o selenito necessitou de uma dose de 7,5 μM para uma inibição de 50% da ligação AP1-DNA e de 0,75 μM para a mesma taxa de inibição utilizando o GS-Se-SG, enquanto que para o selenato necessitou-se uma alta concentração (250 μM). Quando se aplicou estes componentes com as mesmas doses em linfócitos intactos, a inibição da ligação AP1-DNA foi de 50% para o selenito, enquanto que para o selenato não houve inibição. Com isso estes autores concluíram que o selenito e o GS-Se-SG são potentes inibidores do AP1-

DNA e, conseqüentemente, inibidores do crescimento celular, mostrando ser um possível mecanismo da inibição do crescimento de células tumorais.

Em 1998, Rafferty *et al.* realizaram um trabalho avaliando as diferentes expressões das selenoproteínas em células epiteliais humanas, e a proteção do selênio contra a indução da morte celular pela radiação UVB. Concluíram que, das trinta selenoproteínas existentes, somente quatorze tiveram ação efetiva contra as radiações UVB, e destas as mais eficazes foram a selenometionina, selenocisteína e o selenito de sódio. Seu estudo foi definido analisando o perfil dos queratinócitos, melanócitos e fibroblastos, porém as selenoproteínas produziram proteção somente nas duas primeiras células. Em relação ao queratinócito, a dose de UVB (960J/m^2) utilizada produziu uma mortalidade de 80% quarenta e oito horas após a irradiação. Com a adição do selenito de sódio e a selenometionina previamente à exposição, este obteve um aumento significativo na prevenção à morte celular, com uma proteção mais efetiva do selenito de sódio com doses de 1 a 200nM, sendo considerada a dose ideal em aproximadamente 10nM. Em relação ao selenometionina, foi verificado que este se apresentava menos eficaz em relação ao selenito de sódio, e que era necessárias altas doses para uma significativa proteção aos raios UVB. Na análise dos melanócitos, estes se apresentavam mais sensíveis às radiações UVB em relação aos queratinócitos, necessitando de uma dose de 720J/m^2 para produzir uma morte de aproximadamente 80% das células, apresentando os efeitos dos compostos de selênio semelhantes aos encontrados nos queratinócitos. Também foi verificado

que tanto para os queratinócitos como para os melanócitos, os efeitos do selenito de sódio e do selenometionina foram maiores quando administrados vinte e quatro horas antes da exposição, com a máxima dose de proteção em 50nM para o selenito de sódio, e de 200nM para a selenometionina.

Em 1999, Stewart *et al.*, avaliaram três componentes de selênio quanto sua toxicidade, atividade na enzima glutathione peroxidase, apoptose e radioproteção. Para isto, foram utilizadas culturas de células de ratos (queratinócitos) previamente tratadas com selenito, selenocistamina e selenometionina, onde após 24 horas foram feitas as análises. Quanto a toxicidade, foi verificado que o selenito é o mais citotóxico, induzindo citotoxicidade em doses acima de 10 µg Se/ml, enquanto que o selenometionina não apresentou toxicidade em nenhuma das doses analisadas. Na atividade da enzima antioxidante glutathione peroxidase, foi verificado que todos os derivados de selênio testados apresentaram um aumento em sua concentração, estando diretamente ligado com os resultados preventivos das lesões oxidativas no DNA, provocados nas células testadas com a exposição à radiação UVB. Quanto ao índice de apoptose, foi verificado que o selenito apresentou o maior índice, seguido pela selenocistamina, enquanto que o selenometionina não apresentou índices significativos de apoptose.

Tuji, em 2001, avaliou a ação do selenito de sódio como substância radioprotetora através do processo de reparação tecidual. Foram produzidas

feridas na região dorsal de ratos, os quais foram divididos em 4 grupos; controle, irradiado, selênio, selênio/irradiado. Os resultados obtidos mostraram que a aplicação de selenito de sódio administrado 24 horas antes de altas doses de irradiação de elétrons (6 MeV) em tecido de granulação apresentou-se como radioprotetor eficaz, visto que o grupo irradiado no qual foi administrado o selenito de sódio comportou-se histologicamente semelhante ao grupo controle.

2.3.4 O Selênio no Metabolismo Ósseo

Há uma concordância geral em que a deficiência do selênio combinada com a deficiência de vitamina E leva a anormalidades severas, com a patologia de Kashin-Beck, com osteoartrose degenerativa crônica. Em 1997, Turan *et al.*, investigou o efeito da dieta de selênio e vitamina E em tecido ósseo e propriedades biomecânicas do osso. Utilizaram coelhos jovens de ambos os sexos divididos em um grupo com dieta apropriada de selênio e vitamina E, dieta deficiente de selênio e vitamina E e uma dieta excessiva de selênio. Na análise microscópica do tecido ósseo, os grupos com deficiência de selênio e vitamina E mostraram achados compatíveis com a osteomalacia. O decréscimo da força biomecânica no tecido ósseo foi significativo nos grupos com deficiência em selênio, em vitamina E e em dieta excessiva em selênio quando comparados ao grupo controle.

No mesmo ano, Sun & Liu, avaliaram a relação entre o selênio e a osseointegração de implantes de titânio. A pesquisa foi feita em coelhos adultos,

onde receberam uma dose de 10 microgramas/kg de Na_2SeO_3 , via intramuscular por 6 dias pós-operatório. Achados histológicos e testes mecânicos foram avaliados. Os resultados mostraram que no grupo contendo selênio, o osso ao redor do implante teve relatos positivos na solidez na sua fixação. Concluíram que o selênio pode acelerar a osseointegração e promover maior intensidade na fixação dos implantes quando comparado ao grupo controle em 1 a 4 semanas após a cirurgia.

Yttrhus *et al.*, em 1999, realizaram um estudo com o objetivo de esclarecer a etiologia e a alta frequência de fraturas ósseas e osteoporose em duas populações de alces na Noruega, no sul e região central. Usaram amostras do fígado, analisando vários metais e entre eles o selênio. Analisaram também o metacarpo com exames histológicos, radiológicos e químicos. Uma considerável diferença na concentração de selênio no fígado foi observada, sendo que na região sul esta concentração era 10 vezes maior do que na região central. Mesmo assim os alces não apresentavam sinais de toxicidade ou qualquer anormalidade como cirrose hepática, que é um achado típico na intoxicação crônica de selênio. Os autores concluíram que não foi encontrada nenhuma indicação que os elementos traçados estivessem envolvidos no aumento de fraturas ósseas nos alces da região sul da Noruega.

A importância do selênio no metabolismo ósseo não é conhecida, algumas condições clínicas como a osteoartropatologia de Kashin-Beck tem sido

associada com a deficiência do selênio. Também, na deficiência do selênio ocorre retardo do crescimento em ratos, mas isto não está bem definido se a inibição do crescimento esta associada com mudanças no metabolismo ósseo. Em 2001, Moreno-Reyes *et al.*, investigaram o efeito da deficiência do selênio no metabolismo ósseo em ratos. Utilizaram ratas que foram submetidas a uma dieta pobre em selênio contendo 0.005 mg/kg por no mínimo 42 dias antes de serem fecundadas. A dieta pobre de selênio causou grande redução da ação da enzima glutathiona peroxidase e sua concentração no plasma, diminuição na altura em 31%, redução do hormônio de crescimento em 68%, diminuição do cálcio no plasma e aumento da concentração de cálcio na urina e ainda a redução em 23 a 21% da densidade do osso mineral no fêmur e tíbia. Concluíram que o atraso do crescimento induzido pela deficiência de selênio esta associada com o metabolismo ósseo e osteopenia na segunda geração em ratos com dieta pobre em selênio.

Em 2002, Jakob *et al.*, relatam que a expressão de tireodoxina redutase e outras selenoproteínas em células ósseas representam um meio importante na regulação da reabsorção e remodelamento ósseo. Selenoproteínas e seus substratos podem influenciar intra e extracelular, como na transcrição do fator de atividade, modificações de proteínas. Mesmo assim, a avaliação de todos os fatores biológicos em osso e seu potencial terapêutico esta apenas começando a ser pesquisado.

3 PROPOSIÇÃO

Devido a grande importância que a radioterapia desempenha no tratamento de lesões malignas, apesar das diversas seqüelas produzidas nos tecidos adjacentes à área irradiada, não foram encontradas na literatura, pesquisas que avaliassem a ação de compostos derivados do selênio, na reparação óssea em tecido irradiado, embora o efeito radioprotetor deste elemento já seja bem conhecido em outros tecidos. Assim, a realização deste trabalho de pesquisa teve como finalidade avaliar o efeito radioprotetor do selenito de sódio no processo de reparação óssea em tíbias de ratos irradiados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Após a aprovação pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas, foram selecionados para a presente pesquisa 100 ratos fêmeas (*Rattus Norvegicus*, Albinus, Wistar), adultos (90 dias), com pesos médios de 250 gramas, sendo os mesmos procedentes do Biotério Central da UNICAMP. Todos os animais foram mantidos durante o período experimental, em gaiolas de policarbonato, que se encontravam em local com temperatura e umidade controladas, com um ciclo alternado de 12 horas claro-escuro. A alimentação dos animais constou de ração balanceada padrão e água *ad libitum*, diariamente.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos, de forma aleatória, em quatro grupos experimentais:

- Grupo I: Controle
- Grupo II: Selênio
- Grupo III: Irradiado

- Grupo IV: Selênio/ Irradiado

Cada grupo era constituído por 25 animais.

4.3 PRODUÇÃO DOS DEFEITOS ÓSSEOS

Para a avaliação do processo de reparação tecidual foram produzidos defeitos ósseos nas tíbias dos animais. Assim, o procedimento cirúrgico foi constituído das seguintes fases:

- **Anestesia:** os animais foram pesados e a seguir anestesiados via intramuscular com 1,0 ml/Kg de peso corpóreo de solução de Cloridrato de Ketamina (Dopalen®, Agribands do Brasil Ltda., Paulínea, SP, Brasil). Foram utilizadas seringas descartáveis, utilizadas comumente para injeções de insulina (Becton Dickson Indústrias Cirúrgicas Ltda).
- **Tricotomia:** os animais foram então submetidos à tricotomia na região onde seria produzido o defeito ósseo. Em seguida foi realizada a anti-sepsia local com álcool iodado.
- **Acesso ao tecido ósseo:** Com bisturi cirúrgico e utilizando-se lâminas descartáveis (lâmina de bisturi nº 15), foi realizada uma incisão contínua de aproximadamente 1 cm. Os tecidos subcutâneo e muscular foram divulsionados, utilizando-se tesoura romba (tipo *Metzembbaum*), tendo-se

acesso ao periósteo, o qual foi incisionado e descolado, proporcionando livre acesso à superfície óssea da tíbia (figura 1).

- **Produção do defeito ósseo:** sob irrigação constante com solução salina, foi confeccionado o defeito ósseo, nas tíbias direita e esquerda com broca carbide nº 6 em baixa rotação, apresentando assim com diâmetro e profundidade de 0,6mm. Após produzido o defeito, os tecidos foram reposicionados e suturados com 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 1ml/kg de antibiótico (Pentabiótico Veterinário pequeno porte, FORT DODGE Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil). Após cirurgia nenhuma restrição de movimentação foi imposta aos animais.



Figura 1: Defeito ósseo produzido na tíbia

4.4 ADMINISTRAÇÃO DO SELÊNIO

Foi administrado o selenito de sódio com dose de 1,0 mg Se/Kg (Merck KgaA, Darmstadt, Germany), diluído em água destilada e injetado via intraperitoneal nos animais dos grupos selênio e selênio/irradiado. Nos animais dos grupos controle e irradiado foi realizada a injeção de água destilada na quantidade equivalente ao selenito de sódio, tendo como finalidade submeter os animais ao mesmo procedimento, causando assim o mesmo tipo de estresse nos animais. A injeção de selênio para o grupo selênio/irradiado e de água destilada para o grupo irradiado foi realizada 15 horas antes da irradiação com raios gama.



Figura 2 – Selenito de Sódio Pentahidratado Pentahidratado (pró-



Figura 3 – Aplicação da solução de selenito de sódio intraperitonealmente

Três dias após a produção dos defeitos ósseos, os animais pertencentes aos grupos irradiado e selênio/irradiado, receberam uma dose simples de radiação gama equivalente a 8 Gy, somente nos membros inferiores. Para a irradiação foi utilizado um aparelho de Cobalto Terapia (Cobalto₆₀) modelo Alcyon, cujas constantes físicas foram: 125MeV, 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 4).

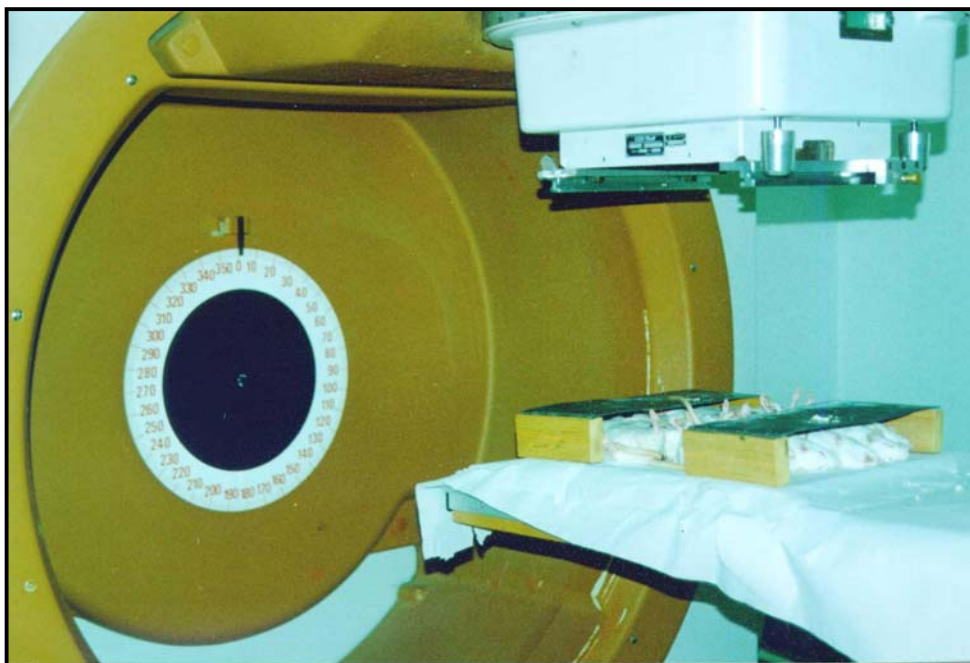


Figura 4: Irradiação dos animais, somente nos membros inferiores.

4.6 OBTENÇÃO DAS PEÇAS

A obtenção das peças foi realizada aos 7, 14, 21, 28 e 45 dias após a cirurgia. Cinco animais foram utilizados para cada grupo e então submetidos à anestesia por Cloridrato de Ketamina, sendo removidas as duas tíbias de cada animal, as quais foram devidamente lavadas com solução fisiológica e colocadas em formol neutro tamponado por no mínimo 72 horas para fixação. As tíbias removidas aos 45 dias foram fixadas em glutaraldeído 2,5% tamponado (pH 7,3-0,1M), também pelo mesmo período. Posteriormente à obtenção das peças, os animais foram sacrificados com prolongamento da anestesia.

4.7 MÉTODOS HISTOLÓGICOS

Transcorrido o tempo de fixação das peças e posterior lavagem com tampão fosfato, as amostras foram descalcificadas em EDTA 5%, incluídas em Paraplast Plus, seguindo a técnica de rotina e seccionadas em micrótomo, obtendo-se secções de 6 µm de espessura. Estas foram processadas segundo o protocolo de Histologia da FOP/UNICAMP para Hematoxilina Eosina e Tricrômico de Mallory.

As peças obtidas aos 45 dias, após fixação em glutaraldeído 2,5% tamponado, foram cortadas no centro do reparo, sendo abundantemente lavadas em água corrente, por cerca de 2 horas. A seguir lavadas com solução de Triton à 1% durante 10 minutos e novamente lavadas abundantemente, por cerca de 4

horas em água corrente. Terminada a lavagem as peças foram colocadas na estufa a 37°C por uma noite e montadas em porta-espécies. A seguir foram levadas ao metalizador (Sputter Coater MED 010, Balzers, Liechtenstein) por 100 segundos para uma cobertura de ouro de aproximadamente 10 nanômetros e observadas no microscópio eletrônico de varredura DSM 940A da Zeiss (Alemanha).

4.8 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO

4.8.1 Avaliação Qualitativa

- Coloração com Hematoxilina Eosina: permitiu a avaliação morfológica do tecido ósseo neoformado.
- Coloração com Tricrômico de Mallory: permitiu a avaliação morfológica do tecido ósseo neoformado, evidenciando melhor certos detalhes do tecido ósseo.
- Microscopia Eletrônica de Varredura: foi utilizada para a avaliação ultra-estrutural do tecido ósseo maduro, a qual foi realizada aos 45 dias.

4.8.2 Avaliação Quantitativa

- Análise de Densidade Volumétrica: A densidade volumétrica da área de reparação óssea nos diferentes grupos foi determinada através do método de impacto de pontos, observado ao microscópio óptico no aumento de

10X, onde o campo foi superposto em um retículo com 100 pontos, sendo que cada ponto equivalia a $0,065 \text{ mm}^3$.

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

V_v = densidade volumétrica

P = número de pontos de impacto.

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

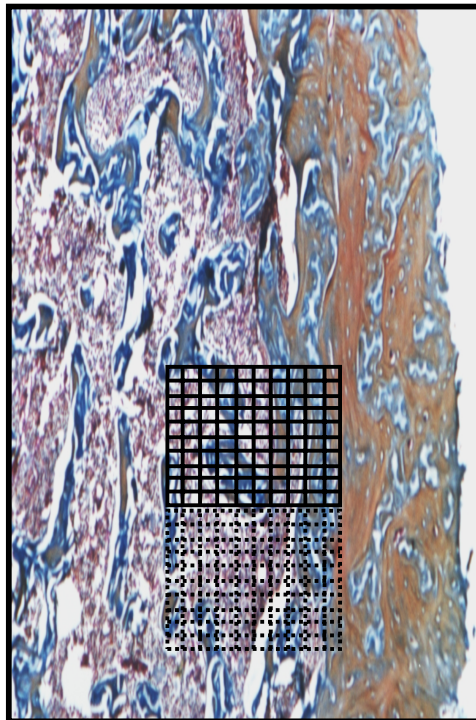


Figura 5: Grade reticulada para medir os pontos de impacto.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO QUALITATIVA

5.1.1 Descrição Morfológica: Coloração por Hematoxilina Eosina.

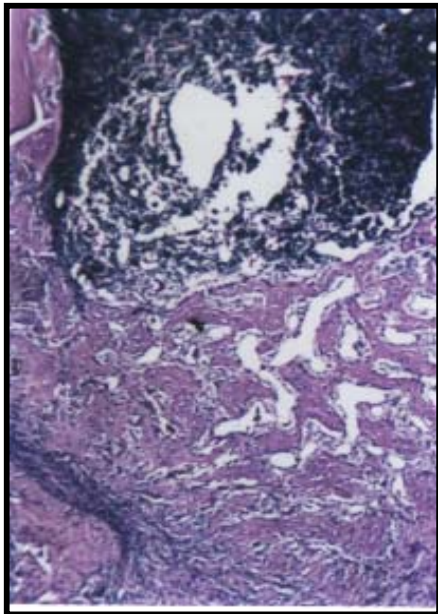
➤ **7º dia do Processo de Reparação Óssea (Prancha 1):**

O grupo **controle** exibe o local do defeito ósseo evidente, coberto por fina camada de tecido de granulação, já apresentando grande número de trabéculas formadas presentes. O grupo **irradiado** apresenta o local da ferida , somente na sua porção inferior, preenchido por trabéculas ósseas, as quais encontram-se recoberta por um tecido de granulação. O grupo **selênio** mostra o local da ferida preenchida por tecido de granulação pouco organizado, observando a presença de poucas trabéculas ósseas na porção inferior, que embora em menor espessura, uma vez que recobre o tecido ósseo neoformado, apresenta uma certa semelhança com o tecido de granulação que preenche o defeito ósseo no grupo irradiado. O grupo **selênio/irradiado** apresenta um aspecto bastante semelhante àquele mostrado pelo grupo selênio, podendo-se observar que a área correspondente ao defeito ósseo encontra-se totalmente preenchida por tecido de granulação imaturo.

Aos 7 dias do processo de reparação óssea, a análise morfológica mostra que dos quatro grupos avaliados, os grupos selênio, irradiado e selênio/irradiado apresentam-se com o processo de reparação óssea atrasado em relação ao controle, sendo que o grupo selênio/irradiado apresenta o maior retardo.

Prancha 1: Coloração por Hematoxilina Eosina

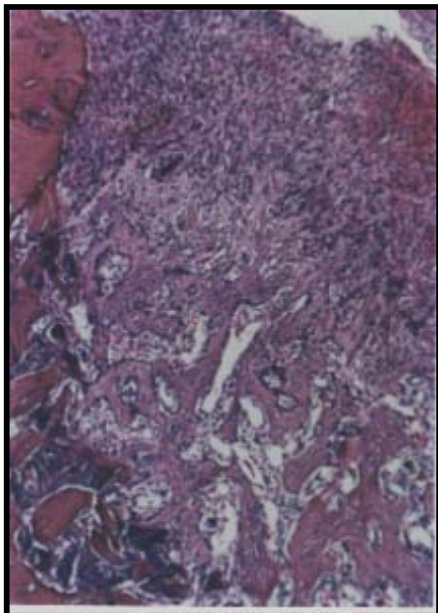
7 dias (aumento original 6,3 x 1,25 x 10)



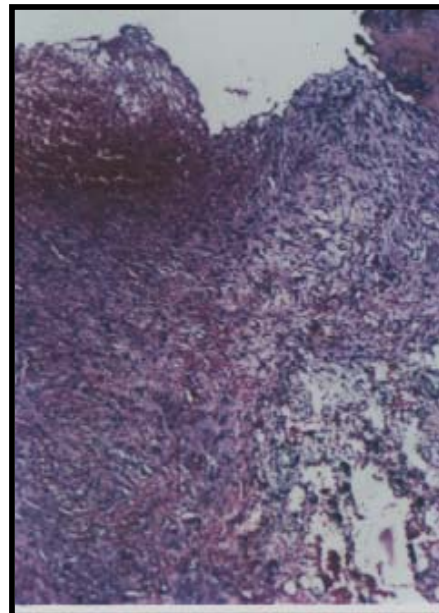
Grupo Controle



Grupo Selênio



Grupo Irradiado



Grupo Selênio/Irradiado

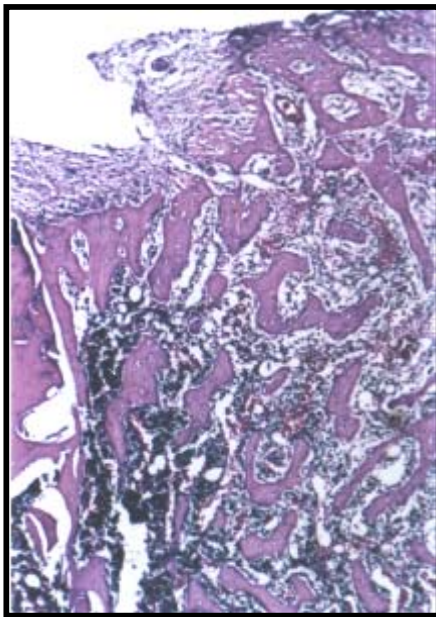
➤ **14º dia do Processo de Reparação Óssea (Prancha 2):**

Aos 14 dias o grupo **controle** exibe o local da perfuração parcialmente preenchido por fibras colágenas pertencentes ao periósteo recém formado, mostrando uma formação bastante intensa de trabéculas ósseas, podendo ser observados sinais de formação de medula vermelha. O grupo **irradiado** apresenta trabéculas neoformadas, bastante espessas e em menor número que o grupo controle, observando-se a presença de espessa camada de fibras colágenas. O grupo **selênio** mostra a presença de espessas trabéculas ósseas, com espaços medulares menores e pequena quantidade de medula vermelha, aparentando atraso em relação ao controle. O grupo **selênio/irradiado** apresenta-se atrasado em relação aos grupos controle e selênio, com um padrão de reparação óssea semelhante ao grupo irradiado, observando-se, portanto trabéculas ósseas recobertas por fibras colágenas.

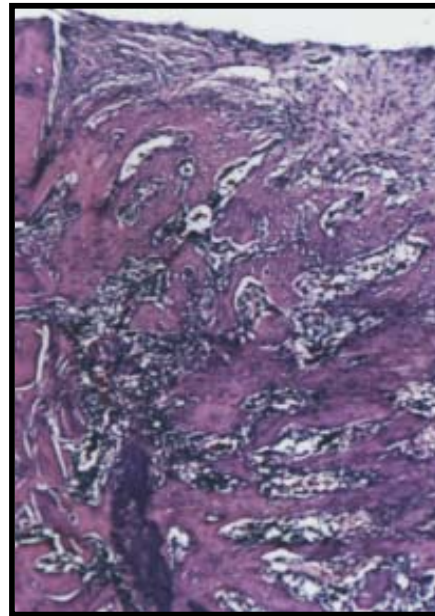
A análise morfológica aos 14 dias demonstrou uma evolução no processo de reparação, quando comparado ao tempo de 7 dias, em todos os grupos avaliados. Entretanto, o padrão de reparação aos 14 dias mostra que os grupos selênio, irradiado e selênio/irradiado apresentam-se com uma reparação óssea atrasada em relação ao grupo controle, sendo que, os grupos irradiado e selênio/irradiado apresentam agora um processo de reparo com um padrão de evolução semelhante.

Prancha 2: Coloração por Hematoxilina Eosina

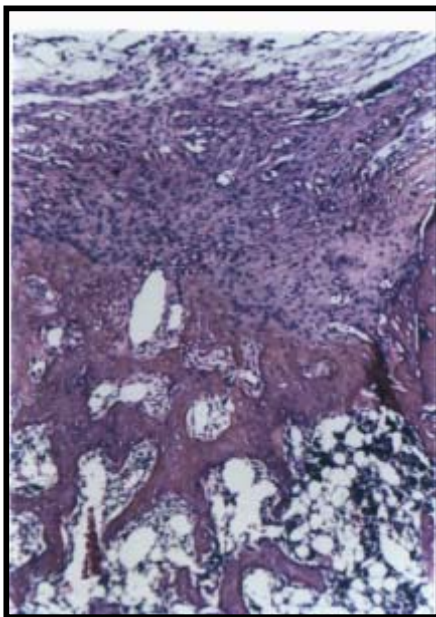
14 dias (aumento original 6,3 x 1,25 x 10)



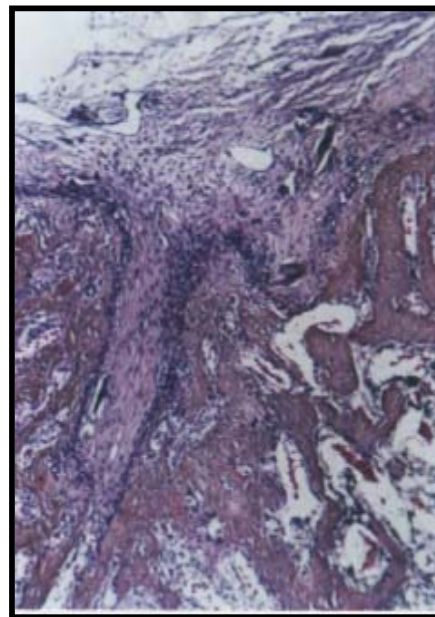
Grupo Controle



Grupo Selênio



Grupo Irrradiado



Grupo Selênio/Irradiado

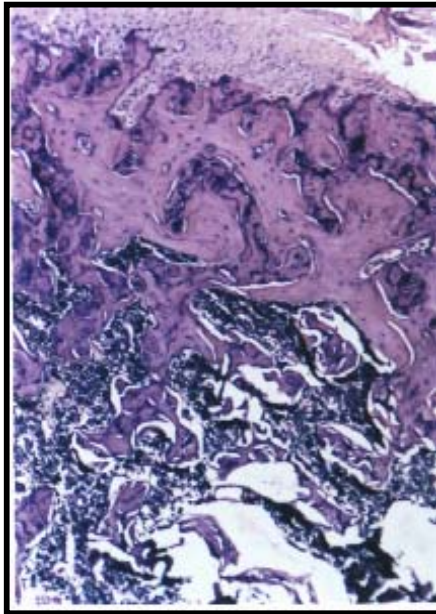
➤ **21º dia do Processo de Reparação Óssea (Prancha 3):**

O processo de reparo do defeito ósseo mostra-se bem evoluído no grupo **controle** aos 21 dias, evidenciado pela presença da espessa cortical óssea fechando o defeito, observando-se ainda tecido fibroso recobrindo esta cortical. O número de trabéculas ósseas encontra-se reduzido, o que demonstra a fisiologia normal do tecido. Abundante quantidade de medula vermelha pode ser observada. O grupo **irradiado** apresenta fibras colágenas na superfície da ferida, indicando que o defeito ósseo ainda não se encontra recoberto por osso cortical. O grupo **selênio** apresenta, como no grupo controle, a cortical óssea neoformada, embora em menor espessura, indicando, portanto, que a sua formação se deu posteriormente à do grupo controle. No grupo **selênio/irradiado** observa-se trabéculas ósseas bastante espessas fechando o local do defeito ósseo, indicando também o início da formação de osso cortical. Pode se observar também a presença de tecido fibroso recobrindo a cortical óssea neoformada. Em relação à cortical óssea, a formação desta é bem semelhante à do grupo controle.

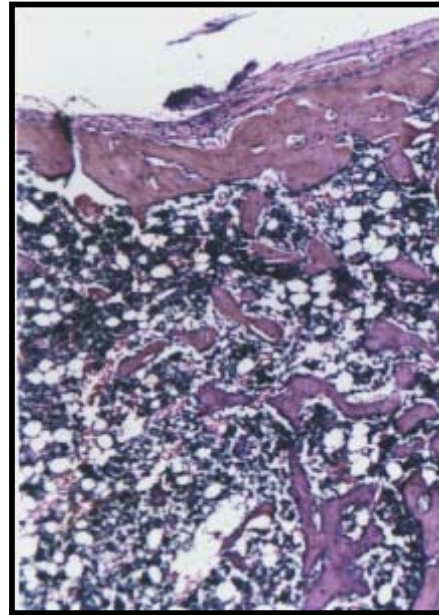
Aos 21 dias o grupo irradiado é o mais atrasado. O processo de reparação óssea do grupo selênio/irradiado mostra-se com um padrão bem semelhante àquele do grupo controle. O grupo selênio apresenta o processo de reparo mais evoluído.

Prancha 3: Coloração por Hematoxilina Eosina

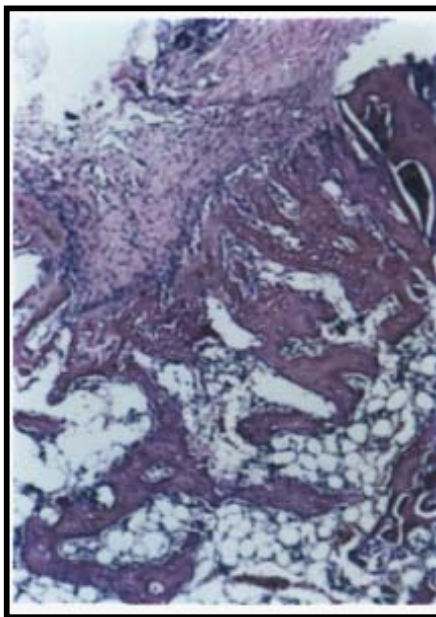
21 dias (aumento original 6,3 x 1,25 x 10)



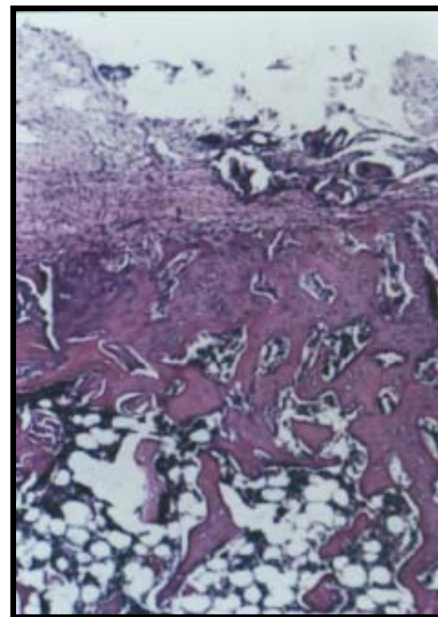
Grupo Controle



Grupo Selênio



Grupo Irrradiado



Grupo Selênio/Irradiado

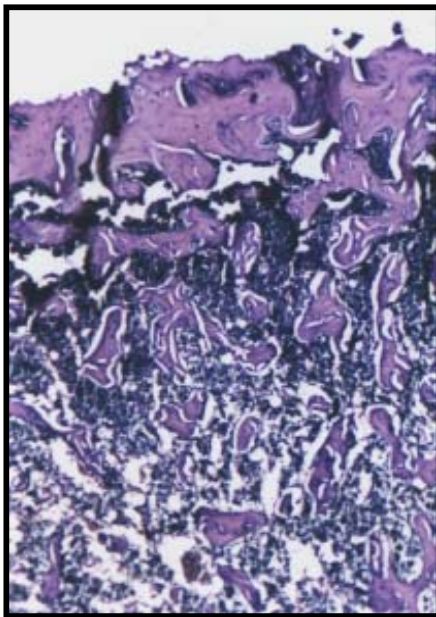
➤ **28º dia do Processo de Reparação Óssea (Prancha 4):**

Aos 28 dias, no grupo **controle**, o processo de reparo do defeito ósseo continuou seguindo o padrão de evolução normal, podendo-se observar a presença da camada de osso cortical que recobre trabéculas maduras. Presença intensa de medula vermelha. No grupo **irradiado**, observa-se agora a presença da camada de osso cortical neoformado, com restos de tecido fibroso e pequeno número de trabéculas ósseas. No grupo **selênio**, a cortical óssea encontra-se em maior espessura que àquela observada no grupo controle, porém não indica que nesta o processo de reparo esteja mais adiantado, pois essa maior espessura evidencia evolução quando compara-se com o mesmo grupo, aos 21 dias, no qual apresenta-se menos espessa. Também é marcante a presença de medula vermelha. No grupo **selênio/irradiado**, o padrão de reparação óssea é bastante semelhante ao do grupo controle, podendo-se observar que a medula vermelha encontra-se presente, como nos grupos controle e selênio.

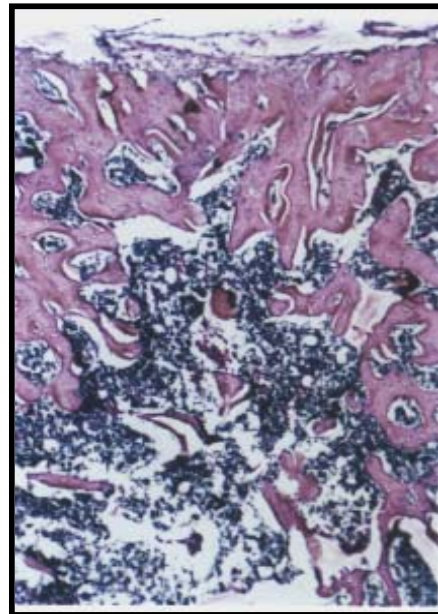
Aos 28 dias pode-se observar que o processo de reparação óssea no grupo irradiado continua atrasado em relação aos demais.

Prancha 4: Coloração por Hematoxilina Eosina

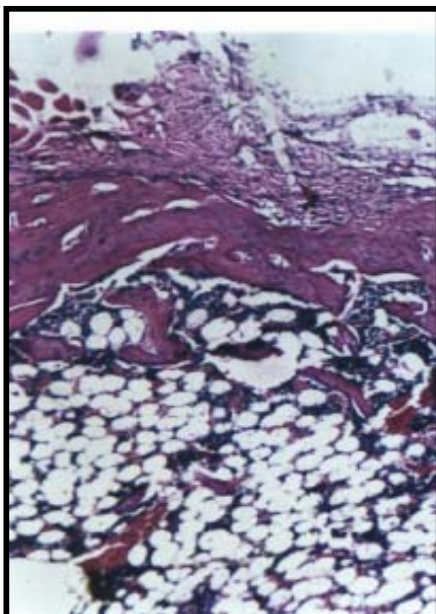
28 dias (aumento original 6,3 x 1,25 x 10)



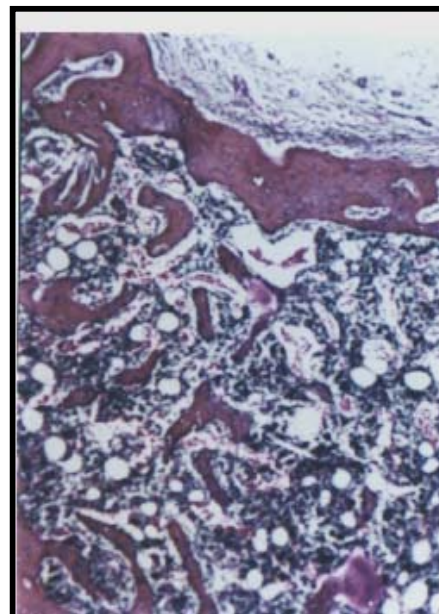
Grupo Controle



Grupo Selênio



Grupo Irradiado



Grupo Selênio/Irradiado

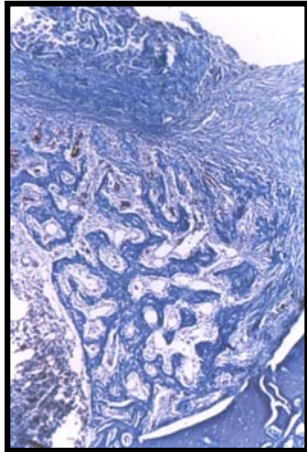
5.1.2 Descrição Morfológica: Coloração por Tricrômico de Mallory

O Tricrômico de Mallory, também como a coloração por Hematoxilina Eosina, foi utilizado para a avaliação morfológica. Entretanto, esse evidencia melhor certos detalhes do tecido ósseo, entre outros. As trabéculas ósseas coradas em azul revelam a sua natureza ainda imatura, ao passo que, uma coloração castanha mostra a evolução deste tecido. Nestas condições, quanto mais castanha o tecido ósseo se apresentar, mais evoluída é a sua maturação.

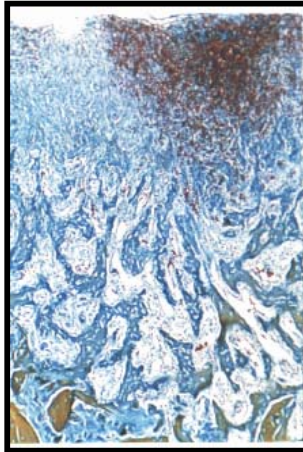
Assim sendo, pode-se observar que, em relação ao grupo **controle**, os demais grupos experimentais mostraram-se menos evoluídos, até o décimo quarto dia (prancha 5). Aos 21 dias, pode-se observar que as trabéculas ósseas dos grupos controle, selênio e selênio/irradiado apresentam coloração castanha; entretanto, no grupo **controle** esta é bem mais acentuada (prancha 6). Quando todos os grupos apresentam a cortical óssea, aos 28 dias, torna-se bem acentuada a diferença entre os grupos, observando-se que os grupos **controle**, **selênio** e **selênio/irradiado** apresentam um padrão de maturação da cortical bastante semelhante. O grupo **irradiado**, ao contrário, apresenta somente regiões localizadas de maturação óssea na sua cortical, indicando o retardo em relação aos demais grupos. Quanto às trabéculas ósseas, é evidente o processo no grupo **controle**, estando mais próximo a esse padrão normal de maturação óssea, o grupo **selênio/irradiado** (prancha 6).

Prancha 5: Coloração por Tricrômico de Mallory

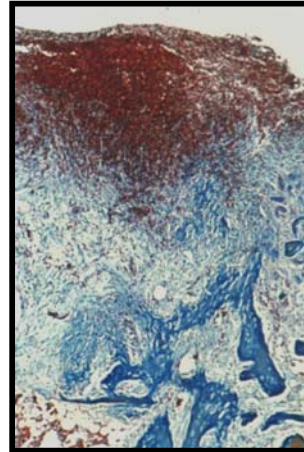
7 dias (aumento original 6,3 x 1,25 x 10)



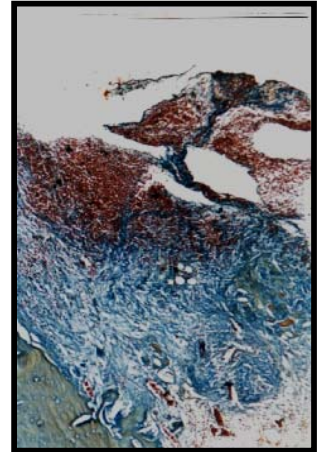
Grupo Controle



Grupo Selênio



Grupo Irradiado

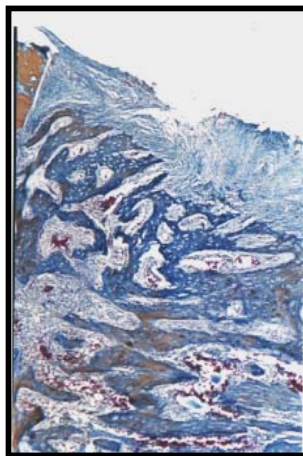


**Grupo
Selênio/Irradiado**

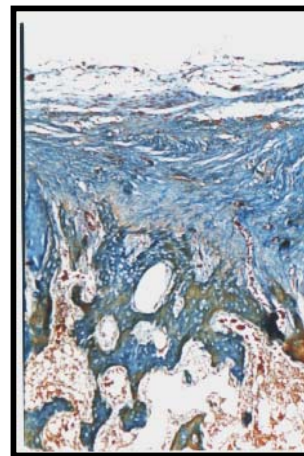
14 dias(aumento original 6,3 x 1,25 x 10)



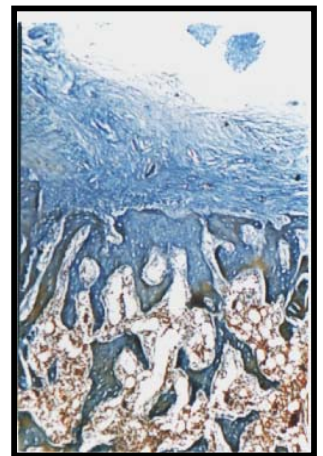
Grupo Controle



Grupo Selênio



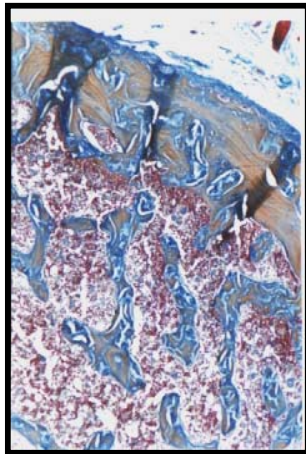
Grupo Irradiado



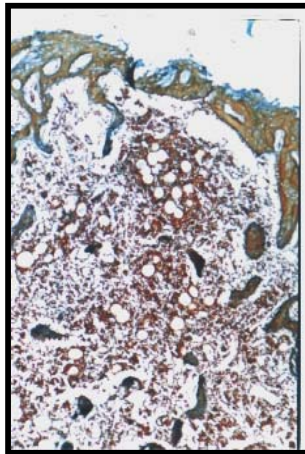
**Grupo
Selênio/Irradiado**

Prancha 6: Coloração por Tricrômico de Mallory

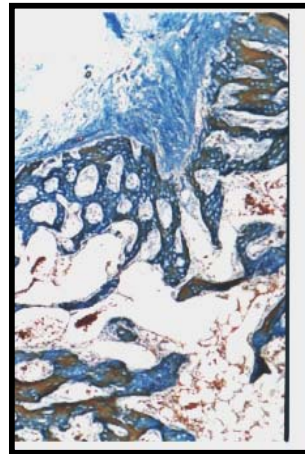
21 dias (aumento original 6,3 x 1,25 x 10)



Grupo Controle



Grupo Selênio

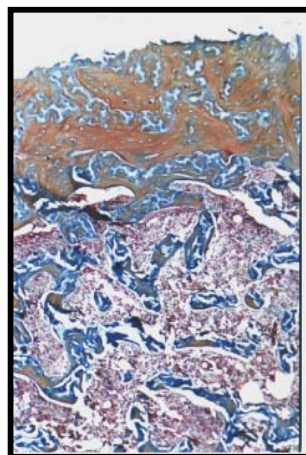


Grupo Irrradiado

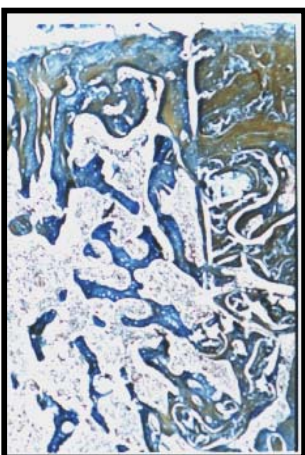


**Grupo
Selênio/Irradiado**

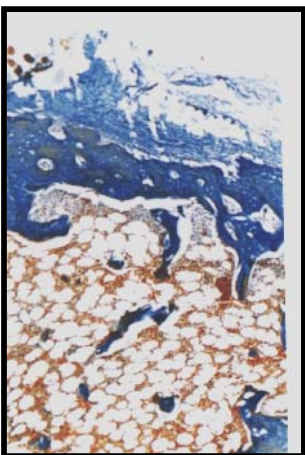
28 dias (aumento original 6,3 x 1,25 x 10)



Grupo Controle



Grupo Selênio



Grupo Irrradiado



**Grupo
Selênio/Irradiado**

5.1.3 Avaliação do Padrão Ósseo (Prancha 7)

A fim de verificar o padrão ósseo, utilizou-se a microscopia eletrônica de varredura. Para avaliar o padrão ósseo maduro, as peças foram avaliadas aos 45 dias. Nos grupos controle, selênio e selênio/irradiado, observou-se a presença das corticais ósseas, e no interior destas, o osso esponjoso. No grupo irradiado, observa-se ausência total de osso esponjoso entre as corticais ósseas.

Prancha 7: Microscopia Eletrônica de Varredura

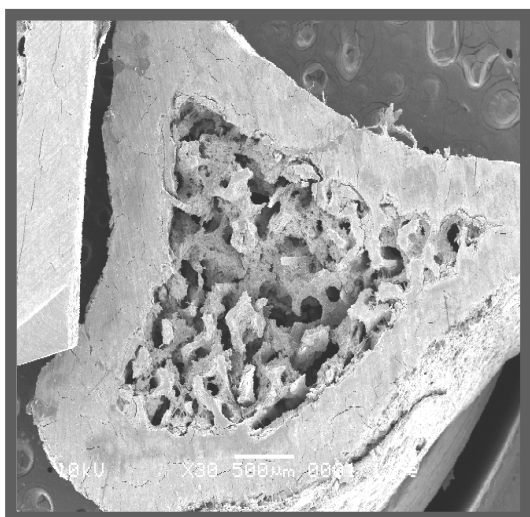


Figura 2.1 – Controle 45 dias

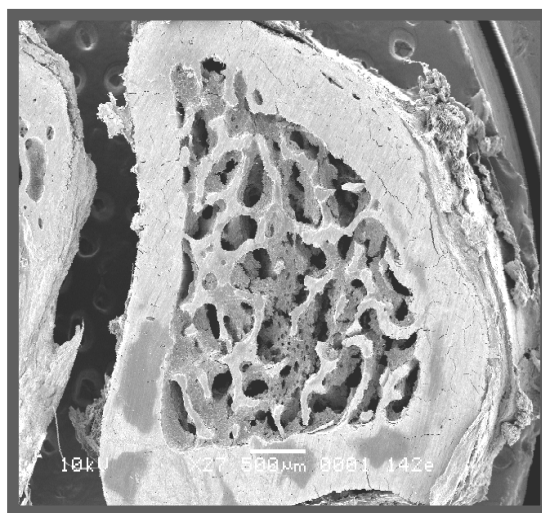


Figura 2.3 – Selênio 45 dias

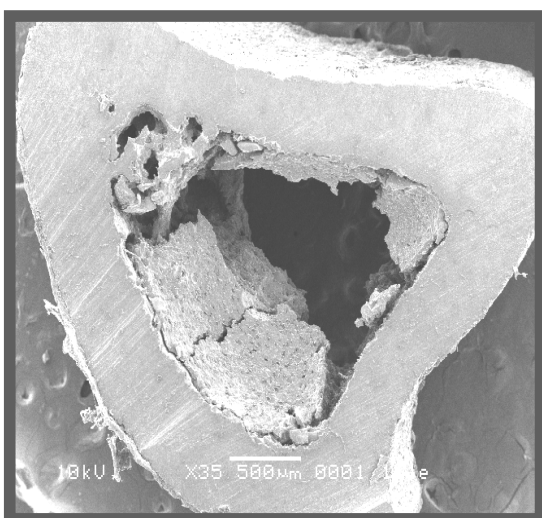


Figura 2.2 – Irradiado 45 dias

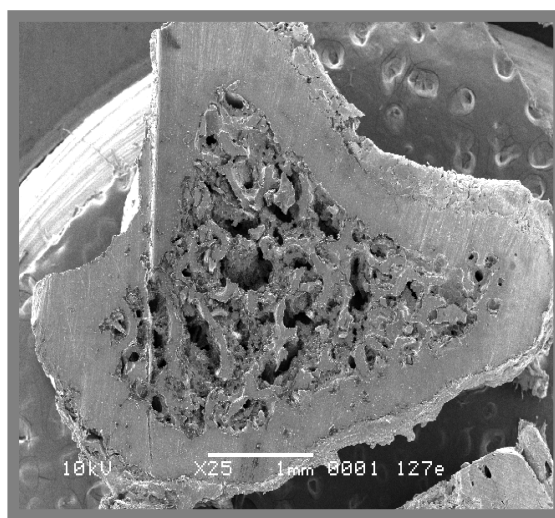


Figura 2.4 – Selênio Irradiado 45 dias

5.2 Avaliação Quantitativa

5.2.1 Densidade Volumétrica

A fim de verificar a densidade volumétrica em mm³ do osso, foram feitas 2 medidas em áreas diferentes, na mesma lâmina, como explicado anteriormente em materiais e métodos, contando os pontos de intersecção entre a grade e as trabéculas ósseas. A seguir foi calculada a densidade volumétrica do osso pela fórmula:

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

Os dados obtidos pela medida da densidade volumétrica foram submetidos a tratamento estatístico pelo teste de Tukey. Os resultados estão disponíveis na Tabela 1.

Tabela 1: Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na vertical dentro de cada tempo e Minúsculas na horizontal) diferem entre si pela ANOVA e teste de Tukey.

TEMPO	SELENIO	IRRADIAÇÃO			
		<i>Com</i>		<i>Sem</i>	
		2 - Média	2 - DP	1- Média	1- DP
7	Com	0.027 Ab	0.002739	0.22 Aa	0.066427
	Sem	0.015 Ab	0.028284	0.23 Aa	0.05863
14	Com	0.224 Bb	0.176685	0.477 Aa	0.034022
	Sem	0.32 Aa	0.087106	0.197 Ba	0.032519
21	Com	0.209 Aa	0.060249	0.18 Aa	0.098489
	Sem	0.178 Aa	0.090526	0.22 Aa	0.187383
28	Com	0.069 Ab	0.023822	0.218 Aa	0.041322
	Sem	0.057 Ab	0.041018	0.205 Aa	0.035355

Observa-se pela **Tabela 1**, que quando comparados os grupos selênio/irradiado e selênio houve diferença estatística nos tempo 7, 14 e 28, sendo semelhantes, portanto, apenas aos 21 dias. Comparando-se os grupos irradiado e controle houve diferença estatisticamente significativa nos tempos de 7 e 28 dias.

Comparando-se os grupos selênio/irradiado e selênio observa-se diferença apenas aos 14 dias, em que o grupo irradiado obteve maior média.

Comparando-se agora os grupos selênio e controle, observa-se que também houve diferença estatisticamente significativa apenas aos 14 dias, estando o grupo selênio com a maior média.

6 DISCUSSÃO

O osso constitui um tecido metabolicamente ativo, cuja atividade é essencial para manter a integridade tecidual e a homeostasia do organismo. Essas funções são desempenhadas por um conjunto de ossos que corresponde ao esqueleto ósseo. Segundo Guyton (1997), o esqueleto apresenta três importantes funções: mecânica, servindo de sustentação ao corpo, sendo o local de inserção dos músculos; função protetora, protegendo assim órgãos nobres como as vísceras e a medula óssea; e, por fim, função metabólica, representando o maior reservatório de íons cálcio, fósforo e magnésio, os quais são necessários para a manutenção da homeostasia mineral.

O tecido ósseo corresponde a um tipo especializado de tecido conjuntivo. É formado por três tipos de células: os osteócitos, que se encontram 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. Estes tipos celulares estão dispostos em uma matriz óssea, a qual corresponde a um material extracelular calcificado.

Visto que o esqueleto ósseo é um órgão metabolicamente ativo, ele sofre um processo contínuo de formação e absorção. Esse processo é conhecido como remodelamento ósseo ou *turnover* ósseo e sofre a influência de diversos fatores, tanto intrínsecos, sistêmicos e locais, quanto fatores extrínsecos. Dentre os fatores sistêmicos o estrogênio é, provavelmente, o hormônio mais importante na manutenção do *turnover* ósseo normal (Raisz, 1999). Já, quanto aos fatores locais que interferem no remodelamento ósseo, têm-se os fatores de crescimento (IGF, TGF β), as citocinas, as prostaglandinas e as proteínas da família de receptores do fator de necrose tumoral (Raisz, 1999).

O remodelamento ósseo tem início ainda na vida intra-uterina. Uma vez que o esqueleto encontra-se completamente formado, quase toda a atividade metabólica ocorre através do remodelamento (Raisz, 1999). 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).

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.

Avaliando-se os resultados morfológicamente, pelos métodos Hematoxilina Eosina e Tricrômico de Mallory, observou-se que aos 7 dias do processo de reparação óssea, o grupo controle apresentava a região onde foi realizado o defeito ósseo, completamente preenchido por trabéculas ósseas, as quais correspondiam, portanto, a osso neoformado. Segundo Vizioli *et al.* (1974), um processo de reparação óssea aos 5 dias apresenta um tecido de granulação com grande proliferação fibroblástica, o que seria o início do processo de reparação, uma vez que os osteoblastos surgem a partir dessas células mesenquimais, como foi realizado nesta pesquisa. Vizioli *et al.* (1974), observaram que a osteogênese teve início entre 11 e 16 dias, portanto num período posterior àquele em que já observava-se a presença de trabéculas ósseas no presente trabalho de pesquisa que, como já citado, foi de 7 dias. Entretanto, Carvalho *et al.* (1997), observaram que pelo menos nas regiões apical e terço médio de alvéolos de ratos Wistar, aos 7 dias, já é possível observar um delicado osso trabecular com a presença de osteoblastos. Observa-se, portanto, que aos 7 dias do processo de reparação tecidual avaliado nesta pesquisa, este se encontra, segundo a descrição, um pouco mais adiantado em relação àqueles observados por Vizioli *et al.* (1974) e Carvalho *et al.* (1997). Convém, portanto, fazer-se uma ressalva: nos trabalhos citados o processo de reparo foi decorrente de extrações dentais, deixando a região em um meio mais propício a apresentar fatores que

possam, mesmo que minimamente, interferir no processo normal de reparação óssea, principalmente no início do processo, quando pode ocorrer rompimento do coágulo. Nesta pesquisa, os defeitos ósseos foram produzidos nas tíbias de ratos e, portanto, em outras condições.

Gartner & Hiatt (2003), observaram também que após uma semana da ocorrência de uma fratura, já existe um calo interno de osso trabecular.

Ainda aos sete dias do processo de reparação óssea, embora o grupo selênio apresente início de osteogênese, observa-se que esta é incipiente em relação ao grupo controle. A propriedade antioxidante de uma grande maioria de derivados do selênio, dentre eles, o selenito de sódio é bastante conhecida como observado nas pesquisas realizadas por Tappel (1965). Sabe-se que durante um ato cirúrgico, em que a arquitetura normal de um tecido é rompida, ocorre a formação de radicais livres. Assim, era esperado que o grupo de animais que recebeu selenito de sódio, apresentasse o processo de reparação tecidual mais evoluído em relação ao grupo controle, uma vez que os animais receberam o antioxidante. Entretanto, isso não foi observado.

Embora o selenito de sódio seja considerado um potente antioxidante, este corresponde a um mineral tóxico, quando ministrado em altas doses, conforme citado por Hafeman *et al.* (1974). Assim, o padrão de reparação óssea apresentado pelo grupo selênio aos sete dias, pode ser perfeitamente explicado

pela dose de selênio ministrada, que foi de 1,0 mg/Kg de peso corpóreo), evidenciando-se, portanto como uma dose tóxica.

Como o grupo selênio apresentou retardo no processo de reparo, e o animal foi submetido a um agente externo agressor, no caso a radiação, era de se esperar que o processo mostrasse um padrão de reparação óssea com maior prejuízo. Realmente, avaliando-se as lâminas histológicas, aos sete dias do processo de reparação tecidual, o grupo selênio/irradiado apresentava o maior retardo, evidenciando mais uma vez o efeito tóxico do selênio, bem como o dano causado pela radiação que também pode ser observado quando se avaliou o grupo que foi somente irradiado. Danos da radiação no tecido ósseo também foram observados por outros autores em experimentos animais (Guglielmotti *et al.*, 1986; Widmann *et al.*, 1993; Würzler *et al.*, 1998; Arnold *et al.*, 1998) e também em experiências com indivíduos submetidos à radioterapia (Wall *et al.*, 1996).

Aos 14 dias, o processo de reparação tecidual mostrou-se com padrões diferentes em relação aos sete dias. Embora, o grupo selênio ainda apresentasse o processo de reparo mais atrasado que do grupo controle, este estava mais adiantado em relação aos grupos irradiado e selênio/irradiado.

Aos 21 dias, entretanto, o grupo selênio apresentava a reparação óssea mais adiantada do que àquela do grupo controle. Este fato pode ser explicado pela excreção de uma porção do selenito de sódio. Na pesquisa realizada por Thomson & Stewart (1974), foi observado que aos 14 dias houve uma taxa de excreção do

selênio pela urina de 7% a 14% e pelas fezes de 33% a 58%. Assim, uma vez que foi eliminado uma parte do selenito de sódio, a qual seria tóxica, o processo de reparação tecidual seguiu normalmente. Este fato foi evidenciado também pelo grupo selênio/irradiado, demonstrando o efeito radioprotetor do selenito de sódio. A ação radioprotetora do selenito de sódio foi evidenciada nas pesquisas realizadas por Breccia *et al.*, 1969; Borek *et al.*, 1986; Weiss *et al.*, 1987; Sandström *et al.*, 1989; Borek, 1986; Rafferty *et al.*, 1998; e Tuji, em 2001. A ação radioprotetora do selenito de sódio pode ser observada também aos 28 dias.

O padrão de reparação óssea observado pelo método de Hematoxilina Eosina foi mantido por todos os grupos, quando avaliado pelo método de coloração de Tricrômico de Mallory. Como citado anteriormente, o Tricrômico de Mallory mostra a maturação tecidual. Assim, quanto mais maduro o tecido mais tonalidade de coloração castanha será observada. Aos 28 dias, torna-se evidente a diferença entre os grupos, principalmente quando se observa a cortical óssea.

A avaliação quantitativa, realizada através da densidade volumétrica, mostrou que quando comparados os grupos selênio e selênio/irradiado houve diferença estatisticamente significativa nos tempos 7, 14 e 28 dias. O grupo selênio/irradiado apresentou menores médias em relação ao grupo selênio, com exceção do processo de reparo avaliado aos 21 dias, em que os grupos apresentavam, estatisticamente, um padrão ósseo semelhante ao do grupo selênio/irradiado apresentando maior média. Essa maior média apresentada,

provavelmente, seja decorrente do fato de que aos 21 dias, o grupo selênio/irradiado mostrava trabéculas bastante espessas, sendo semelhante ao grupo controle, não se observando diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos, ou seja, controle e selênio/irradiado, o que indica o efeito radioprotetor do selenito de sódio.

A espessura das trabéculas ósseas pode explicar também o fato de que entre os grupos controle e selênio, foi observada diferença estatística somente aos 14 dias, observando-se que as trabéculas no grupo selênio apresentavam-se bastante espessas, o que resultou em médias maiores de densidade volumétrica para esse grupo, mas não significando que o processo de reparo se mostrasse mais adiantado em relação ao grupo controle, pois embora com trabéculas mais espessas, esse trabeculado ósseo apresentava-se, no entanto, imaturo.

A análise por microscopia eletrônica de varredura foi realizada com o objetivo de ser avaliado o tecido ósseo maduro, uma vez que Vizioli *et al.* (1974), observaram em sua pesquisa que a maturação do trabeculado ósseo iniciou-se aos 23 dias. Observou-se que o grupo irradiado não apresentou trabeculado ósseo entre as corticais da tíbia, portanto, diferente dos demais grupos. A ausência do trabeculado ósseo pode ser decorrente de um processo de reabsorção mais acentuado, decorrente da ação da radiação, indicando, portanto, que o osso neoformado em animais que foram irradiados apresenta deficiência mineral, tornando-se mais susceptível à ação de cargas, alterando, portanto, a

fisiologia normal do remodelamento ósseo. Outro fator que pode ter levado a essa ausência de trabeculado ósseo, pode ser decorrente do fato de que, continuando-se com um raciocínio de que o conteúdo mineral do osso neoformado é diferente quando o animal não foi irradiado ou quando foi utilizado o radioprotetor, pode ser que até tenham se formado trabéculas, mas durante o tratamento dado as peças para a avaliação no microscópio de varredura, estas foram destruídas, o que não invalidaria a suposição da diferença do tecido entre os grupos estudados.

A diferença entre esses dois grupos, irradiado e selênio/irradiado, pode estar associada à ação do selênio no metabolismo ósseo, visto que segundo Turam *et al.* (1997), deficiência em selênio e vitamina E está associada à síndrome de Kashin-Beck com osteoartrose degenerativa crônica e em seu experimento, observaram que coelhos com deficiência nestas duas substâncias apresentavam achados compatíveis com osteomalácia. Aceleração na osseointegração foi observada em animais que receberam implantes de titânio e foram submetidos a uma dose de 10 microgramas de selênio pós-operatoriamente, conforme citam Sun & Liu (1997). Uma dieta pobre em selênio resultou em atraso no crescimento na segunda geração de ratos, o qual, segundo Moreno-Reys *et al.* (2001), está associado ao metabolismo ósseo e osteopenia. Segundo Jacob *et al.* (2002), a expressão da tireodoxina redutase e outras selenoproteínas em células ósseas, representam uma importante forma de regulação da reabsorção e remodelamento ósseo.

Apesar do efeito radioprotetor do selenito de sódio, não se pode esquecer que esta substância também se apresenta como tóxica, como observado nos tempos iniciais do processo de reparo nesta pesquisa. Entretanto, esta toxicidade está relacionada com a dose, como observado nos trabalhos de pesquisa realizados por Ellenhorn & Barceloux (1988) e Hafeman *et al.* (1974). No entanto, Ytrehus *et al.* (1999), observaram que apesar de alces do sul da Noruega estarem sujeitos a uma dose de selênio 10 vezes maior que os animais da região central, não foi observado qualquer sinal de toxicidade nestes animais, como cirrose hepática, não havendo também indicação da relação entre a alta concentração de selênio e a fragilidade óssea nesses animais.

A ação antioxidante do selênio, segundo Tappel (1965) é decorrente de sua capacidade em inibir a peroxidação, decompor radicais peróxidos, capturar radicais livres e reparar danos moleculares. Todas essas funções parecem estar relacionadas com uma conhecida enzima antioxidante: a glutathione peroxidase. A suspeita da relação do selênio com esta enzima iniciou-se com a pesquisa de Rotruck *et al.* (1972), sendo que Flohe *et al.* (1973) classificaram a glutathione peroxidase como uma selenoenzima. Autores como Hafeman *et al.* (1974) e Chow *et al.* (1974) afirmam que o selênio é extremamente necessário para a atividade da glutathione peroxidase. Pode-se supor então que, a administração do selenito de sódio nos animais da presente pesquisa aumentou o nível dessa enzima, contribuindo assim, para sua atividade antioxidante.

Apesar da toxicidade do selenito de sódio, o que pode ser perfeitamente estudada, através de estudos subseqüentes, é importante salientar o risco-benefício da utilização do selenito de sódio no processo de reparação óssea em indivíduos submetidos à radioterapia. Acredita-se que as seqüelas que possam surgir após a radioterapia, justificam inteiramente a utilização desse eficaz radioprotetor, contribuindo assim para uma melhor qualidade de vidas dos nossos pacientes.

7 CONCLUSÃO

Dos resultados obtidos nesta pesquisa, e dentro das condições experimentais utilizadas, obteve-se a seguinte conclusão:

Apesar da toxicidade inicial do selenito de sódio, este se mostrou como um eficaz radioprotetor na reparação óssea em tíbias de ratos irradiados.

REFERÊNCIAS*

Arnold M, Kummermehr J, Schultz-Hector S, Trott KR. 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.

Borek C, Ong A, Mason H, Donahue L, Biaglow JE. Selenium and vitamin E inhibit radiogenic and chemically induced transformation in vitro via different mechanisms. **Med Sci**. 1986; 83: 1490-94.

Breccia A, Badiello R, Trenta A, Matth M. On the chemical radioprotection by organic selenium compounds in vivo. **Radiat Res**. 1969 ; 38: 483-92.

Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. **J Cell Biochem**. 1994; 56: 283-94.

Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. **Drug Discov Today**. 2003; 8(21): 980-9.

Carvalho TL, Bombanato KF, Brentegani LG. Histometric Analysis of Rat Alveolar wound Healing. **Braz Dent J**. 1997; 8(1): 9-12.

Cekan E, Tribukait B, Vokal-Borek H. Protective effect of selenium against ionizing radiation-induced malformations in mice. **Acta Radiol Oncol**. 1985; 24(3): 267-71.

* De acordo com a norma utilizada na FOP/Unicamp, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Chow CK, Tappel ALL. Response of glutathione peroxidase to dietary selenium in rats. **J Nutr.** 1974; 104(4): 444-51.

Dreher I, Schutze N, Baur A, Hesse K, Schneider D, Kohrle J *et al.* Selenoproteins are expressed in fetal human osteoblast-like cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 1998; 245(1): 101-7.

Ellenhorn MJ, Barceloux DG. **Medical toxicology**: diagnosis and treatment of human poisoning. New York: Elsevier; 1988. 1512p.

Flohe L, Gunzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. **Febs Lett.** 1973; 32(1): 132-4.

Gartner LP, Hiatt JL. **Tratado de histologia em cores.** 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003. 456p.

Guglielmotti MB, Ubios AM, Cabrini RL. Alveolar wound healing after x-irradiation: a histologic, radiographic, and histométrica study. **J Oral Maxillofac Surg.** 1986; 44(12): 972-6.

Guyton AC. **Tratado de fisiologia médica.** 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. 973p.

Hafeman DG, Sunde RA, Hoekstra WG. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **J Nutr.** 1974; 104(5): 580-7.

Jakob F, Becker K, Paar E, Ebert-Duemig R, Schutze N. Expression and regulation of thiredoxin redutases and other selenoproteins in bone. **Methods Enzymol.** 2002; 347: 168-79.

Junqueira LCU, Carneiro J. **Histologia básica**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. **Biochem Biophys Res Commun**. 1976; 71(4): 952-8.

Lu J, Jiang C, Kaeck M, Ganther H, Vadhanavikit S, Ip C, Thompson H. Dissociation of the genotoxic and growth inhibitory effects of selenium. **Biochem Pharmacol**. 1995; 50(2):213-9.

Moreno-Reyes R, Egrise D, Neve J, Pasteels JL, Schoutens A. Selenium deficiency-induced growth retardation is associated with an impaired bone metabolism and osteopenia. **J Bone Miner Res**. 2001; 16(8): 1556-63.

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

Patterson BH, Levander OA, Helzlsouer K, Mcadam PA, Lewis SA, Taylor PR *et al*. Human selenite metabolism: a kinetic model. **Am J Physiol**. 1989; 257(3 pt.2): R556-67.

Rafferty TS, McKenzie RC, Hunter JAA, Howie AF, Arthur JR, Nicol F *et al*. Differential expression of selenoproteins by human skin cells and protection by selenium from UVB-radiation-induced cell death. **Biochem J**. 1998; 332(pt.1): 231-6.

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

Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Hoekstra WG. prevention of oxidative damage to rat erythrocytes by dietary selenium. **J Nutr.** 1972; 102(5): 689-96.

Sandstead HH, Burk RF, Booth GHJ, Darby WJ. Current concepts on trace mineral. **Med Clin North Am.** 1970; 54(6): 1509-24.

Sandstrom BE, Carlsson J, Marklund SL. Selenite-induced variation in glutathione peroxidase activity of three mammalian cell lines: no effect on radiation-induced cell killing or DNA strand Breakage. **Radiat Res.** 1989a; 117(2): 318-25.

Sandstrom BE, Grankvist K, Marklund SL. Selenite-induced increase in glutathione peroxidase activity protects human cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage, but not from damage inflicted by ionizing radiation. **Int J Radiat Biol.** 1989b; 56(5): 837-41.

Schenk, RK. **Regeneração óssea guiada na implantodontia.** São Paulo: Quintessence Books. 1996.

Spyrou G, Bjornstedt M, Kumar S, Holmgren A. AP-1 DNA-binding activity is inhibited by selenite and selenodiglutathione. **Febs Lett.** 1995; 368(1): 59-63.

Stewart MS, Spallholz JE, Neldner KH, Pence BC. Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. **Free Radic Biol Med.** 1999; 26(1-2): 42-8.

Sun B, Liu B. The relation between trace element selenium and osseointegration of titanium implants. **Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.** 1997; 32(6): 378-80.

Tappel AL. Free-radical lipid peroxidation damage and its inhibition by vitamin E and selenium. **Fed Proc.** 1965; 24: 73-8.

Thomson CD, Stewart RDH. Metabolism of [⁷⁵Se] selenite in young women. **Br J Nutr.** 1974; 32(1): 47-57.

Tuji FM. **Avaliação do efeito Radioprotetor do selenito de sódio no processo de reparação tecidual. Estudo experimental em ratos.** [dissertação]. Piracicaba: FOP/UNICAMP; 2001.

Turan B, Balcik C, Akkas N. Effect of dietary selenium and vitamin E on the biomechanical properties of rabbit bones. **Clin Rheumatol.** 1997; 16(5): 441-9.

Vizioli MR, Valdrighi L, Bozzo L. The appearing and evolution of reticulin: observations on the repair of the post-extraction marmoset sockets. **Ann Histochem.** 1974; 19(1): 65-72.

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.

Weiss JF, Hoover RL, Kumar KS. Selenium pretreatment enhances the radioprotective effect and reduces the lethal toxicity of wr-2721. **Free Radc Res Commun.** 1987; 3(1/5): 33-8.

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.

Wu L, Lanfear J, Harrison PR. The selenium metabolite selenodiglutathione induces cell death by a mechanism distinct from H₂O₂ toxicity. **Carcinogenesis**. 1995; 16(7): 1579-84.

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 Craniof Surg**. 1998; 9(2): 131-7.

Ytrehus B, Skagemo H, Stuve G, Sivertsen T, Handeland K, Vikoren T. Osteoporosis bone mineralization, and status of selected trace elements in two populations of moose calves in Norway. **J Wildl Dis**. 1999; 35(2): 204-11.



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

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **645-1**, sobre "**EFEITO DO SELENITO DE SÓDIO NA REPARAÇÃO ÓSSEA EM TÍBIA DE RATOS IRRADIADOS**" sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Solange Maria de Almeida / Anna Silvia Penteado Setti da Rocha** 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 11 de Março de 2004.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº **645-1**, entitled "**EFFECT OF SODIUM SELENITE ON BONE HEALING IN THE TIBIA IRRADIATED RATS**", 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 March 11, 2004.

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

Campinas, 11 de Março de 2004.

Fátima Alonso
Secretária - CEEA/IB/UNICAMP

17/03/2004