

EFEITOS DA RADIOTERAPIA NO TECIDO ÓSSEO*

Samantha Seara Da Cunha¹, Viviane Almeida Sarmiento², Luciana Maria Pedreira Ramalho², André Carlos de Freitas², Darcy de Almeida¹, Maria Eulina Tavares³, Jaílton Caetano Souza⁴, Elaine Bauer Veeck⁵, Nilza Pereira da Costa⁶

Resumo **OBJETIVO:** Avaliar os efeitos da radioterapia e a acurácia da mensuração do nível de cinza do tecido ósseo em imagens radiográficas. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Quatro ratos Wistar foram submetidos a radioterapia externa (dose única de 3.000 cGy) em uma área de 2 cm × 2 cm na perna direita. Os animais foram sacrificados seis semanas após a radioterapia, e tanto as pernas irradiadas quanto as contralaterais (não-irradiadas) foram avaliadas na sua espessura, radiografadas de forma padronizada e processadas histologicamente (hematoxilina-eosina e picrossírius). As radiografias foram digitalizadas e a média dos níveis de cinza foi mensurada no programa Image Tool[®]. **RESULTADOS:** A espessura do fêmur foi maior na perna contralateral do que na irradiada ($p < 0,05$). Radiograficamente, observou-se maior quantidade de tecido ósseo na perna contralateral em relação à perna irradiada, porém sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Histologicamente, foi possível observar, na perna irradiada, diminuição do número de osteócitos e dos canais de Havers, porém sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Por outro lado, foi observado aumento significativo de adipócitos, com conseqüente diminuição de tecido medular na perna irradiada ($p < 0,05$) e maior atividade osteoblástica na perna contralateral ($p < 0,05$). **CONCLUSÃO:** A radioterapia, na dose aplicada, determinou diminuição da atividade de remodelação óssea, que pôde ser detectada radiograficamente na maioria dos espécimes avaliados.

Unitermos: Radioterapia; Radiação ionizante; Tecido ósseo.

Abstract *Effects of radiotherapy on bone tissues.*

OBJECTIVE: To investigate the effects of radiotherapy on bone tissues and the accuracy of gray level measurements on radiographic images. **MATERIALS AND METHODS:** Four Wistar rats were submitted to external radiotherapy (single 3000 cGy dose) on an area of 2 cm × 2 cm of their right legs. The animals were sacrificed six weeks after radiotherapy, and both irradiated and contralateral (non-irradiated) legs were removed, dissected, evaluated for thickness, x-rayed in a standardized form and histologically processed (stained with hematoxylin-eosin and picosirius red). The radiographs were digitalized and the gray level average was measured with the ImageTool[®] software. **RESULTS:** The femur thickness of non-irradiated legs was greater than that of the irradiated legs ($p < 0.05$). Radiographically, the findings indicated a higher bone density in the non-irradiated legs, although with no statistically significant difference ($p > 0.05$). Histological analysis of the irradiated legs demonstrated a decrease in the number of osteocytes and Haversian canals, although with no statistically significance ($p > 0.05$). On the other hand, a significant increase in adipocytes was observed, resulting in a reduction of medullary tissue in the irradiated legs ($p < 0.05$), besides a higher osteoblastic activity in the non-irradiated legs ($p < 0.05$). **CONCLUSION:** Radiotherapy within the above mentioned parameters determined a decrease in activity of bone remodeling, which could be radiographically detected in the majority of the evaluated specimens.

Keywords: Radiotherapy; Ionizing radiation; Bone tissue.

INTRODUÇÃO

De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde⁽¹⁾ (WHO), mais de 11 milhões de pessoas são diagnosticadas com câncer todos os anos, sendo estimado que a partir de 2020 irão existir mais de 16 milhões de novos casos por ano. Além disso, o câncer causa, anualmente, sete mi-

lhões de mortes, ou seja, 12,5% das mortes do mundo. Entre as modalidades terapêuticas, a radioterapia representa um recurso bem estabelecido para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço. Aproximadamente metade dos pacientes com câncer utiliza a radioterapia em alguma fase do tratamento da doença, seja de maneira isolada ou associada a outras formas de terapia oncológica⁽²⁾.

O uso de altas doses de radiação, apesar de ser comumente observado no tratamento de tumores malignos, pode gerar efeitos colaterais não-desejados, devendo-se ao

* Trabalho realizado na Universidade Federal da Bahia (UFBA), Hospital Santa Izabel (HSI) e União Metropolitana de Educação e Cultura (Unime), Salvador, BA, e na Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.

1. Doutores pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, PB, e Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil.

2. Doutores pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Professores Adjuntos do Departamento de Propedêutica e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, BA, Brasil.

3. Radioterapeuta do Hospital Santa Izabel (HSI), Salvador, BA, Brasil.

4. Físico do Hospital Santa Izabel (HSI), Salvador, BA, Brasil.

5. Doutor, Professor Adjunto da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.

6. Doutor pela Universidade de São Paulo (USP), Bauru, SP, Professor Titular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brasil.

Endereço para correspondência: Dra. Samantha Seara Da Cunha, Alameda Praia de Jaguaribe, 76, Vilas do Atlântico. Lauro de Freitas, BA, Brasil, 42700-000. E-mail: samanthaseara@hotmail.com

Recebido para publicação em 13/7/2006. Aceito, após revisão, em 25/10/2006.

fato de que a radiação ionizante não consegue distinguir células tumorais de células sadias^(3,4). Conseqüentemente, a destruição do tecido saudável limita a ampla capacidade da utilização da radioterapia.

Assim como outros tecidos, o osso também está sujeito às ações da radiação, resultando numa grande dificuldade na capacidade de regeneração quando é lesionado^(4,5). Uma das alterações seria um distúrbio no equilíbrio de atividades osteoblásticas e osteoclásticas, a favor de um processo destrutivo, podendo ser observada, também, uma diminuição do número de osteócitos e de osteoblastos após a irradiação do tecido. As grandes alterações na matriz óssea após a irradiação são desenvolvidas lentamente, onde as mudanças iniciais são resultados de uma injúria ao sistema de remodelagem óssea, ou seja, os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os osteoblastos tendem a ser mais radiosensíveis que os osteoclastos, portanto, pode ocorrer um aumento da atividade da lise celular⁽⁶⁾. Com isso, o processo de formação de matriz óssea é paralisado, impedindo o processo de mineralização, o que pode levar a fraturas ósseas espontâneas e à osteorradionecrose⁽⁷⁻⁹⁾. As células endoteliais também são fortemente afetadas e a fibrose vascular resulta numa diminuição da vascularização, afetando a vitalidade do osso e das células medulares, tornando a área suscetível a uma infecção e necrose, mesmo após um pequeno trauma^(5,9). Por esse motivo, as extrações dentárias são contra-indicadas num período de um ano após a radioterapia⁽¹⁰⁾.

As lesões teciduais vão depender da dose total de radioterapia, da dose efetiva biológica, do tamanho do campo irradiado, do número e intervalo entre as sessões, do fracionamento da dose e da agressão cirúrgica e/ou traumática ao tecido irradiado. Os casos severos de destruição tecidual geralmente estão associados a doses maiores que 7.000 cGy, embora 6.000 cGy possam resultar em osteorradionecrose na mandíbula^(11,12).

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da radioterapia sobre o tecido ósseo e a acurácia da mensuração do nível de cinza do tecido ósseo em imagens radiográficas, como preditor de alterações histológicas naquele tecido, em modelo animal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados, para a presente pesquisa, quatro ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia*, *Mammalia*, da linhagem Wistar, clinicamente sadios, adultos, machos, pesando cerca de 210–260 g. Esses animais foram colocados em gaiolas individuais, medindo 20 cm × 30 cm × 13 cm e mantidos em condições ambientais de temperatura (22° C) e luminosidade (ciclo 12 horas dia/12 horas noite), umidade relativa de 50%, alimentados com ração comercial sólida sob forma de pelotas (Nuvi-lab[®] CR 1) e com água corrente *ad libitum*.

Todos os animais foram submetidos a anestesia geral por meio de injeção intraperitoneal de tiopental sódico, 0,2 ml a cada 100 g. Os ratos foram então tricotomizados na região coxo-femoral da perna traseira e imobilizados durante o procedimento radioterápico em um dispositivo de acrílico construído especialmente para esse procedimento, baseado no experimento de Machado⁽¹³⁾. Os animais foram submetidos a uma sessão única de radioterapia, tendo como fonte ionizante o cobalto 60, em que um total de 3.000 cGy foi aplicado a uma área de 2 cm × 2 cm da perna direita dos animais, utilizando apenas um campo de irradiação, de cima para baixo. O restante do corpo do animal ficou protegido por blocos de chumbo inseridos no aparelho de radioterapia. Os referidos animais foram sacrificados seis semanas após a radioterapia, e tanto as pernas irradiadas quanto as não-irradiadas, contralaterais, foram dissecadas.

As pernas dos animais foram colocadas diretamente sobre uma placa de imagem para radiografia cefalométrica do sistema radiográfico digital DenOptix[®] (300 dpi, *pixel* de 85 µm), de forma que a perna estivesse com sua superfície ventral voltada para a placa. Foi adicionado ao conjunto um penetrômetro de alumínio de cinco degraus com 1 mm de incremento. O aparelho radiográfico (Timex[®] – 70 kV e 7 mA) foi programado com um tempo de exposição de 0,06 s, distância focal de 1,20 cm e feixe perpendicular ao objeto.

Após a exposição radiográfica, a placa foi levada à unidade de leitura do sistema DenOptix[®], permitindo a obtenção das imagens digitais correspondentes. Estas

foram exportadas do sistema e armazenadas em formato *bitmap*. As imagens digitais foram abertas no programa Photoshop[®] e corrigidas em brilho a partir do penetrômetro e novamente salvas. Em seguida, as imagens foram abertas no programa Image Tool[®], e traçando-se um polígono na região irradiada de cada rato, através da ferramenta “histograma”, foi mensurada a média dos níveis de cinza daquela região. A partir daí, a média dos níveis de cinza mensurados em cada espécime foi comparada (teste *t* de Student).

As peças foram então incisadas longitudinalmente, de modo a expor todo o fêmur, cuja espessura foi aferida por intermédio de um paquímetro digital (Série 727 Starrett), com auxílio de uma lupa estereoscópica (Zeiss[®]).

O fêmur foi encaminhado para processamento histológico e coloração por hematoxilina-eosina e picrossírius. Nas lâminas histológicas foram analisados os seguintes parâmetros: presença de fibras colágenas; grau de atividade osteoblástica no periosteio; grau de reabsorção óssea na proximidade da medula; grau de tecido adiposo. Os três últimos itens foram avaliados quanto à sua intensidade, em que o grau 1 indicaria intensidade discreta, o grau 2, intensidade moderada, e o grau 3, intensidade severa. Os resultados foram analisados através do teste não-paramétrico qui-quadrado para uma probabilidade de erro de 5%. Além disso, foi realizada a contagem do número de osteócitos e do número de canais de Havers, em dez campos. Tais resultados foram analisados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, para uma probabilidade de erro de 5%.

RESULTADOS

Após a aferição da espessura do fêmur, foi observada menor espessura na perna irradiada (4,20 mm × 2,84 mm) quando comparada à perna não-irradiada (4,67 mm × 3,11 mm). Esse valor foi estatisticamente significativo (*p* < 0,05).

Quanto à análise radiográfica digital, foi possível observar que na perna irradiada a quantidade de tecido ósseo foi menor (média dos níveis de cinza igual a 118) quando comparada à perna não-irradiada (média dos níveis de cinza igual a 123,5), porém

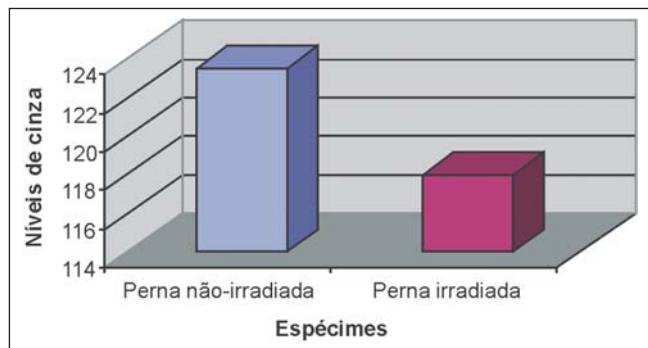


Figura 1. Média dos níveis de cinza do tecido ósseo avaliado.

essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Figura 1).

Histologicamente, na perna irradiada foi possível observar, na porção medular do osso, grande quantidade de tecido adiposo e, conseqüentemente, diminuição de tecido medular (Figura 2). Ocorreu baixo índice da atividade osteoblástica, atividade esta formada por um cordão de osteoblastos localizados no perioste. Além disso, foram observadas áreas de reabsorção óssea moderada. Tal atividade osteoclástica foi caracterizada pela presença de lacunas de reabsorção no osso cortical próximo à porção medular. Fibras colágenas estavam presentes em 50% dos espécimes. Após a contagem de osteócitos, pôde-se observar grande escassez em seu número. Tal fato também ocorreu com os canais de Havers. Na perna contralateral, não-irradiada, foi possível constatar também um baixo número de osteócitos, não havendo diferença significativa entre essa perna e aquela irradiada ($p > 0,05$). O mesmo fato ocorreu com a contagem de canais de Havers ($p > 0,05$). No entanto, no que diz respeito à proporção tecido adiposo/medular, foi observada discreta quantidade de células adiposas, com a presença moderada de tecido medular (Figura 3). Tal proporção foi estatisticamente significativa, quando comparada à perna irradiada ($p < 0,05$). Em relação à atividade osteoblástica, esta foi de moderada a intensa na perna não-irradiada (Figura 4), e essa diferença foi significativa ($p < 0,05$). Não foi evidenciada presença de fibras colágenas, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa quando comparada à perna irradiada ($p > 0,05$). Reabsorção óssea foi observada de grau leve a moderado, mas também sem diferença estatística ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

Neste estudo, o modelo animal escolhido foi o rato, já que é o mais utilizado nessa área de avaliação dos efeitos secundários da radioterapia e desenvolvido por diversos autores^(4,9,14,15).

Devido às dificuldades inerentes ao estudo com animais, os ratos foram expostos a uma única dose de irradiação, que foi suficiente para promover mudanças trabeculares do osso; além disso, essa dose única foi protocolada por estudos anteriores^(4,9,14-16), variando de 25 Gy a 35 Gy. O aparelho de cobalto-60 foi o escolhido por ser o mais acessível e sabidamente causar mais efeitos adversos do que outras fontes de radiação⁽¹⁷⁾.

Com os resultados da análise radiográfica digital, é possível inferir que o método apresentou boa sensibilidade, pois mesmo não havendo diferença estatisticamente significativa na média dos níveis de cinza entre a perna irradiada e a contralateral, esses resultados assemelham-se aos da análise histológica, na qual também não foram observadas diferenças estatísticas em algumas estruturas analisadas. A sensibilidade da avaliação dos níveis de cinza em imagens radiográficas digitais, no tecido ósseo, já foi avaliada em outros estudos, tanto *in vivo*⁽¹⁸⁾ quanto em modelo animal⁽¹⁹⁾.

A literatura tem demonstrado que as alterações ósseas observadas no osso irradiado são visíveis e estão diretamente relacionadas à escassez celular da estrutura óssea⁽¹⁵⁾. No entanto, tal assertiva foi apenas parcialmente comprovada com o presente trabalho, pois apesar de o osso irradiado ter-se mostrado menos celularizado, não é possível afirmar que isto ocorreu devido à radioterapia, já que a perna contra-

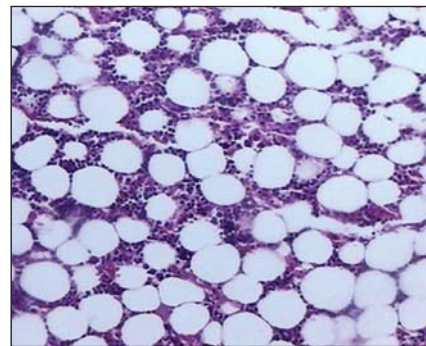


Figura 2. Fotomicrografia do espécime da perna irradiada, após seis semanas da radioterapia. Observar a presença exuberante de tecido adiposo na medula óssea. (Hematoxilina-eosina, aumento aproximado de 100 vezes).

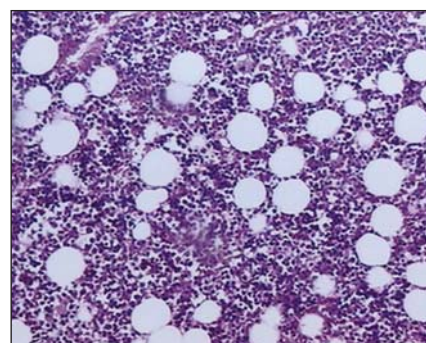


Figura 3. Fotomicrografia do espécime da perna contralateral, após seis semanas da radioterapia. Observar proporção tecido medular/tecido adiposo. (Hematoxilina-eosina, aumento aproximado de 100 vezes).

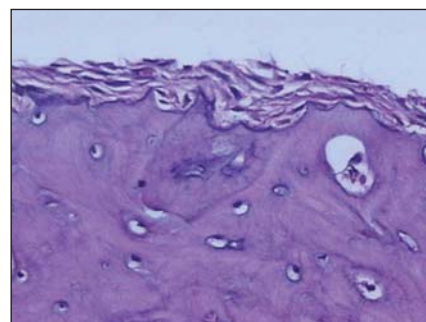


Figura 4. Fotomicrografia do espécime da perna contralateral, após seis semanas da radioterapia. Observar presença de atividade osteoblástica, com neoformação óssea. (Hematoxilina-eosina, aumento aproximado de 200 vezes).

lateral não demonstrou diferença estatisticamente significativa quanto ao número de osteócitos.

O mesmo fato ocorreu quanto ao número de canais de Havers. Foi observada, na perna irradiada, uma pequena quantidade

de canais de Havers, mas que não foi estatisticamente significativa quando comparada à perna contralateral. Pesquisas de Morales et al.⁽²⁰⁾ verificaram uma diminuição da vascularização local após a exposição de mandíbulas de coelhos à radiação ionizante. No entanto, esses pesquisadores utilizaram como meio de comparação mandíbulas de animais que não foram submetidas a nenhum tipo de radioterapia.

Além desses efeitos, foi possível constatar, na perna irradiada, uma baixa atividade osteoblástica. Esses achados são consistentes em estudos de Matsumura et al.⁽²¹⁾, Dare et al.⁽²²⁾ e Dudziak et al.⁽²³⁾, que encontraram diminuição da proliferação osteoblástica, levando a crer que a radiação ionizante implica diferenciação terminal das células precursoras ósseas e osteoblastos. O mesmo fato não ocorreu na perna não-irradiada. A produção de colágeno, no entanto, não foi alterada, sendo visível em 50% das pernas irradiadas, embora esse achado não tenha sido estatisticamente significativo quando comparado à perna contralateral, que não apresentou colágeno.

Zonas de reabsorção óssea foram visíveis, mas não na intensidade esperada. Mais uma vez não houve diferença significativa entre as pernas irradiada e não-irradiada. Tais achados contrariam os de Kiyohara et al.⁽⁴⁾, que encontraram reabsorção óssea nas pernas irradiadas a partir da quarta semana após a radioterapia, com afinamento das trabéculas ósseas. No entanto, a espessura óssea encontrada na perna irradiada foi estatisticamente menor do que na perna não-irradiada, contradizendo os achados histológicos. Isto sugere que um possível processo de reabsorção óssea tenha acontecido em algum momento. Nas pernas irradiadas foi ainda encontrado aumento expressivo de tecido adiposo, com conseqüente diminuição do tecido medular. Tal fato já havia sido documentado anteriormente^(4,15).

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a radioterapia, na dose aplicada, determinou diminuição da atividade de remodelação óssea, que pôde ser detectada, radiograficamente, por meio da mensuração dos níveis de cinza do tecido ósseo, nas imagens radiográficas digitais, na maioria dos espécimes avaliados.

Agradecimentos

Agradeço ao apoio dado pelo Hospital Santa Izabel, pelo empréstimo das suas dependências e manuseio dos aparelhos.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Cancer home. Acessado em: 5/7/2005. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>
2. Hyderley LJ, Maddock PG. Noções gerais da radioterapia. In: Manual de enfermagem oncológica. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 1996;91-97.
3. Calhoun KH, Shapiro RD, Stienberg CM, Calhoun JH, Mader JT. Osteomyelitis of the mandible. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1988; 114:1157-1162.
4. Kiyohara S, Sakurai T, Kashima I. Early detection of radiation-induced structural changes in rat trabecular bone. Dentomaxillofac Radiol 2003;32: 30-38.
5. Bras J, De Jonge HK, van Merkesteyn JP. Osteoradionecrosis of the mandible: pathogenesis. Am J Otolaryngol 1990;11:244-250.
6. Vissink A, Jansma J, Spijkervet FKL, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. Crit Rev Oral Biol Med 2003;14:199-212.
7. Aitasalo K. Bone tissue response to irradiation and treatment model of mandibular irradiation injury. An experimental and clinical study. Acta Otolaryngol Suppl 1986;428:1-54.
8. Mitchell MJ, Logan PM. Radiation-induced changes in bone. RadioGraphics 1998;18:1125-1136.
9. 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 Craniofac Surg 1998; 9:131-137.
10. Németh Z, Somogyi A, Takácsi-Nagy Z, Barabás J, Németh G, Szabó G. Possibilities of preventing osteoradionecrosis during complex therapy of tumors of the oral cavity. Pathol Oncol Res 2000; 6:53-58.

11. Carlson ER, Zak MJ. Osteoradionecrosis and hyperbaric oxygen. Proceedings of the First International Congress on Maxillofacial Prosthetics 1996;184-191.
12. Jereczek-Fossa BA, Orecchia R. Radiotherapy-induced mandibular bone complications. Cancer Treat Rev 2002;28:65-74.
13. Machado RCL. Avaliação do efeito protetor da glutamina na resposta inflamatória do intestino delgado à radioterapia abdominal: estudo experimental em ratos. (Dissertação de Mestrado em Farmácia). Salvador, BA: Universidade Federal da Bahia, 2002.
14. Arnold M, Stas P, 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;48:259-265.
15. Maeda M, Bryant MH, Yamagata M, Li G, Earle JD, Chao EY. Effects of irradiation on cortical bone and their time-related changes. A biomechanical and histomorphological study. J Bone Joint Surg Am 1988;70:392-399.
16. Jacobsson M, Jonsson A, Albrektsson T, Turesson I. Dose-response for bone regeneration after single doses of ⁶⁰Co irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1985;11:1963-1969.
17. Pachigolla R, Pou A, Quinn F. The principles of radiation oncology. Grand Rounds Presentation, UTMB, Dept. of Otolaryngology, 2000. Acessado em: 10/11/2005. Disponível em: <http://www.utmb.edu/otoref/Grnds/Radiation-Oncology-200001/Radiation-Oncology-200001.htm>
18. Sarmiento VA, Rubira IRF. Mensuração da densidade óptica apical – uma proposta para diagnóstico diferencial em endodontia. J Bras Odontol Clín, Curitiba 1998;12:65-68.
19. Sarmiento VA, Pretto SM. Diagnóstico radiográfico de alterações periapicais de origem endodôntica através da determinação do nível de cinza em imagens digitais – estudo experimental em ratos. Rev Pós-Grad Fac Odontol Univ São Paulo 2003; 10:333-345.
20. Morales MJ, Marx RE, Gottlieb CF. Effects of pre- and postoperative irradiation on the healing of bone grafts in the rabbit. J Oral Maxillofac Surg 1987;45:34-41.
21. Matsumura S, Jikko A, Hiranuma H, Deguchi A, Fuchihata H. Effect of x-ray irradiation on proliferation and differentiation of osteoblast. Calcif Tissue Int 1996;59:307-308.
22. Dare A, Hachisu R, Yamaguchi A, Yokose S, Yoshiki S, Okano T. Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. J Dent Res 1997;76:658-664.
23. Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, et al. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. Plast Reconstr Surg 2000;106: 1049-1061.