

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E OFTALMOLOGIA

CLÁUDIO BELING GONÇALVES SOARES

**IMPACTO DA RADIAÇÃO IONIZANTE NA CONSOLIDAÇÃO DE
FRATURAS E EFETIVIDADE DO CENTRIFUGADO DE LÍQUIDO
AMNIÓTICO HUMANO COMO FATOR CONTRIBUINTE PARA A
CICATRIZAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO IRRADIADO.**

BELO HORIZONTE

2019

CLÁUDIO BELING GONÇALVES SOARES

**IMPACTO DA RADIAÇÃO IONIZANTE NA CONSOLIDAÇÃO DE
FRATURAS E EFETIVIDADE DO CENTRIFUGADO DE LÍQUIDO
AMNIÓTICO HUMANO COMO FATOR CONTRIBUINTE PARA A
CICATRIZAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO IRRADIADO.**

Tese apresentada ao Centro de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas em Cirurgia e oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, área de concentração em Cicatrização, na linha de pesquisa sobre Fatores Intervenientes na Cicatrização, como requisito para obtenção do Título de Doutor.

Orientadora: Profa. Ivana Duval de Araújo

Co-orientador: Prof. Luiz Eduardo Moreira Teixeira

BELO HORIZONTE

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que a fonte seja citada.

Ficha catalográfica:

SO676i Soares, Cláudio Beling Gonçalves.
Impacto da radiação ionizante na consolidação de fraturas e efetividade do centrifugado de líquido amniótico humano como fator contribuinte para a cicatrização do tecido ósseo irradiado [manuscrito]. / Cláudio Beling Gonçalves Soares. - - Belo Horizonte: 2019.
60f.: il.
Orientador (a): Ivana de Araújo Duval.
Coorientador (a): Luiz Eduardo Moreira Teixeira.
Área de concentração: Ciências Aplicadas a Cirurgia e Oftalmologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Radioterapia. 2. Efeitos da Radiação. 3. Fraturas Espontâneas. 4. Consolidação da Fratura. 5. Líquido Amniótico. 6. Dissertação Acadêmica. I. Duval, Ivana de Araújo. II. Teixeira, Luiz Eduardo Moreira. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WE 180

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



FOLHA DE APROVAÇÃO

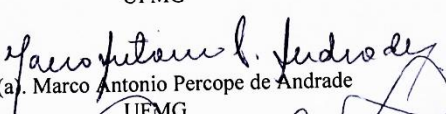
IMPACTO DA RADIAÇÃO IONIZANTE NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURAS E EFETIVIDADE DO CENTRIFUGADO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO COMO FATOR CONTRIBUINTE PARA A CICATRIZAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO IRRADIADO.

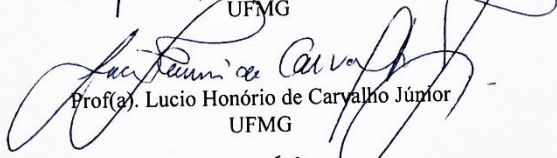
CLAUDIO BELING GONÇALVES SOARES

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, área de concentração CICATRIZAÇÃO, linha de pesquisa Fatores Intervenientes na Cicatrização.

Aprovada em 03 de dezembro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

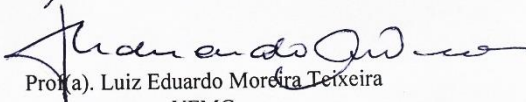

Prof(a). Ivana Duval de Araujo - Orientador
UFMG


Prof(a). Marco Antonio Percope de Andrade
UFMG


Prof(a). Lucio Honório de Carvalho Júnior
UFMG


Prof(a). Edgard Eduard Engel
USP - Ribeirão Preto


Prof(a). Alex Guedes
UFBA


Prof(a). Luiz Eduardo Moreira Teixeira
UFMG

Belo Horizonte, 3 de dezembro de 2019.

Agradeço às instituições envolvidas na realização desta pesquisa, a Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, ao Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, e ao Instituto de Pesquisa em Oncologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

Agradeço também aos professores envolvidos neste projeto, a doutora Ivana de Araújo Duval, o doutor Luiz Eduardo Moreira Teixeira, a doutora Márcia Antoniazi Michelin e o doutor Márcio Tadeu Pereira.

Agradeço ainda aos ortopedistas Rafael Lucas Rodrigo Domiciano de Oliveira e Rodrigo Henriques Reis Souza e à professora doutora Carla Jorge Machado pela ajuda inestimável na realização deste projeto.

Dedicado a Carla, Lucas e Rafael.

RESUMO

A radioterapia é ferramenta terapêutica importantíssima para o tratamento oncológico. Em contrapartida apresenta complicações de difícil resolução, entre elas a fratura patológica. Revendo sistematicamente a literatura científica sobre fraturas patológicas após radioterapia, os autores identificaram publicações de baixa qualidade. Os motivos pelos quais estas ocorrem e quais os melhores métodos para seu tratamento não estão claros. Em contrapartida, é definido que tem potencial para graves complicações e péssimos resultados.

Nesta pesquisa fizemos uma investigação experimental utilizando ratos fêmeas, dividindo-os em três grupos, com os objetivos de avaliar os reais impactos da radiação ionizante sobre a consolidação de fraturas femorais e a efetividade do líquido amniótico humano acelular como fator adjuvante na consolidação do tecido ósseo irradiado. Foi desenvolvido modelo experimental específico e eficiente, para reproduzir o efeito da exposição à radiação ionizante sobre a cicatrização do tecido ósseo.

O primeiro grupo (Controle positivo) é constituído de animais expostos à radiação ionizante, que receberam soro fisiológico no foco fraturário. No segundo (Estudo) os animais foram irradiados e receberam líquido amniótico humano no foco de fratura. Já o terceiro (Controle negativo) não foi exposto à radiação e recebeu soro fisiológico. Eles foram comparados, para avaliação da consolidação, por exames radiográficos e de imunofluorescência por microscopia confocal, sendo estudados os marcadores CD34, Ki-67 e interleucina 6, para avaliar a neo-angiogênese, a fibroplasia e a resposta inflamatória, respectivamente.

Os resultados permitiram que concluíssemos que a radiação ionizante interfere na consolidação de fraturas femorais em ratos, fazendo com que esta seja menos eficiente, impactando negativamente a proliferação celular e a atividade inflamatória no osso fraturado. Não há influência sobre a neo-angiogênese. Concluímos ainda que o centrifugado acelular de líquido amniótico humano não é fator indutor suficiente para que a consolidação de fraturas em ossos irradiados tenha a mesma eficiência que em ossos não expostos a irradiação ionizante.

Palavras-chave: RADIOTERAPIA. EFEITOS DA RADIAÇÃO. FRATURAS EXPONTÂNEAS. CONSOLIDAÇÃO DA FRATURA. LÍQUIDO AMNIÓTICO.

ABSTRACT

THE IMPACT OF RADIATION ON THE HEALING OF FRACTURES AND THE EFFECTIVENESS OF CENTRIFUGATED HUMAN AMNIOTIC FLUID ON THE HEALING OF IRRADIATED BONE TISSUE.

Radiotherapy is a very important therapeutic tool for the cancer treatment. However, it presents complications of difficult resolution, among them the pathological fracture. Systematically reviewing the scientific literature on pathological fractures after radiotherapy, the authors identified only poor quality publications. The reasons why it happens and which are the best methods for treatment are not clear in scientific literature. On the other hand, it is defined as having the potential for serious complications and poor results.

In this research, we performed an experimental investigation using female rats, dividing them into three groups, with the objective of evaluating the real impact of radiation on the healing of femoral fractures and the effectiveness of acellular human amniotic fluid as an adjuvant factor in the healing of the irradiated bone tissue. A specific and efficient experimental model was developed to reproduce the effect of exposure to ionizing radiation on bone tissue healing.

The first group (Positive Control) consists of animals exposed to radiation, receiving saline solution in the fracture focus. In the second (Study) the animals were irradiated and received human amniotic fluid at the fracture site. The third (Negative Control), which is the control group, was not exposed to radiation and received saline solution. The animals were evaluated using radiographic exams and immunofluorescence. CD34, Ki-67, and interleukins 1 and 6 markers were evaluated by confocal microscopy to evaluate the neo-angiogenesis, fibroplasia and inflammatory response, respectively.

The results allowed us to conclude that radiation interferes in the healing of femoral fractures in rats, making it less efficient, specially impacting cell proliferation and inflammatory activity in the fractured bone. There is no influence on neoangiogenesis. We also conclude that the acellular centrifugated human amniotic fluid is not a sufficient inducing factor for fracture healing in irradiated bones, to achieve the same efficiency as in bones not exposed to radiation.

Keywords: RADIO THERAPY. RADIATION EFFECTS. SPONTANEOUS FRACTURES. FRACTURE HEALING. AMNIOTIC FLUID.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Frequência de complicações da radioterapia no tecido esquelético.....	13
Figura 2 - Complicações da radioterapia no esqueleto	14
Figura 3 - Fatores de risco para fratura patológica após radioterapia	15
Figura 4 - Paciente com fratura patológica de úmero direito	19
Figura 5 - Características de cada grupo	23
Figura 6 - Cálculo do tamanho da amostra	24
Figura 7 – Método para irradiação	25
Figura 8 - Guilhotina desenvolvida para fraturas diafisárias de fêmur	27
Figura 9 - Exemplificação de procedimento cirúrgico realizado em animais	28
Figura 10 - Classificação radiográfica para consolidação de fraturas em ratos	30
Figura 11 - Exemplo radiográfico da consolidação	30
Figura 12 - Gráfico com a frequência da classificação radiográfica por grupo	32
Figura 13 - Exemplos de radiografias dos animais de cada grupo	33
Figura 14 - Gráfico de distribuição de CD34, medido em MFI	34
Figura 15 - Exemplos de imagens de lâminas, para o marcador CD34	35
Figura 16 - Gráfico com a distribuição de Ki-67, medido em MFI	35
Figura 17 - Exemplos de imagens de lâminas, para o marcador Ki-67	36
Figura 18 - Gráfico com a distribuição de IL-6, medido em MFI	37
Figura 19 - Exemplos de imagens de lâminas, para o marcador IL-6.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados e análise estatística dos dados referentes às classificações radiográficas	32
Tabela 2 - Avaliação estatística dos resultados de imunofluorescência	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA.....	10
1.1.1	<i>Efeitos da radioterapia no osso</i>	11
1.1.2	<i>Etiologia</i>	12
1.1.3	<i>Epidemiologia</i>	13
1.1.4	<i>Tratamento para fraturas pós radioterapia</i>	15
1.2	O POTENCIAL USO DO LÍQUIDO AMNIÓTICO PARA TRATAMENTO DE FRATURAS.....	17
1.3	RELEVÂNCIA.....	18
2	OBJETIVOS	20
3	MÉTODO	21
3.1	ÉTICA.....	21
3.2	INSTITUIÇÕES E FINANCIAMENTO.....	21
3.3	ANIMAIS.....	21
3.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	22
3.4.1	<i>Cálculo amostral</i>	23
3.5	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	24
3.5.1	<i>Radiação</i>	24
3.5.2	<i>Fratura diafisária femoral</i>	26
3.5.3	<i>Procedimento cirúrgico</i>	27
3.5.4	<i>Líquido amniótico humano</i>	28
3.6	ESTUDO DA CONSOLIDAÇÃO.....	29
3.6.1	<i>Radiografias digitais</i>	29
3.6.2	<i>Estudo por imunofluorescência</i>	30
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
4	RESULTADOS	32
4.1	AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA.....	32
4.2	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	33
4.2.1	<i>CD34</i>	34
4.2.2	<i>Ki-67</i>	35
4.2.3	<i>IL-6</i>	37
5	DISCUSSÃO	39
6	CONCLUSÕES	51
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
8	ANEXOS	58

1 INTRODUÇÃO

A radioterapia é um método de tratamento que utiliza a radiação ionizante, geralmente adjuvante ao tratamento oncológico, para controle local de células cancerosas. Ela tem importante papel na erradicação do foco primário canceroso e na prevenção da recidiva. Soma-se desta maneira à quimioterapia e à cirurgia como métodos terapêuticos nas mais diversas afecções oncológicas(1).

A radioterapia faz parte do arsenal terapêutico para vários tumores malignos. Os sarcomas(2), o câncer de pulmão(3), de próstata(4), de mama(5), assim como suas metástases(6), são exemplos de doenças tratadas por este método. É, portanto, método terapêutico frequentemente aplicado na prática clínica diária.

Apesar de tratar-se de importante ferramenta terapêutica para pacientes oncológicos, a radioterapia não é isenta de efeitos adversos. A radiação ionizante afeta também os tecidos sadios podendo resultar em complicações muitas vezes de difícil solução. Especificamente no tecido ósseo pode levar a osteonecrose, osteíte actínica, fraturas patológicas, falha de consolidação (fig. 1) e osteomielite(7).

A fratura patológica após a exposição óssea à radiação ionizante, apesar de relativamente infrequente, tem tratamento desafiador pela alta frequência de complicações, especialmente a falha de consolidação e infecção levando a resultados, muitas vezes, desastrosos(7).

Os motivos que levam à ocorrência de fraturas após a exposição óssea à radiação ionizante e qual a melhor maneira de abordar esta complicação ainda são incertos. As publicações relativas ao problema são de baixa qualidade, levando a dúvidas em todos os aspectos desta doença(7).

1.1 Revisão sistemática da literatura

Revedo sistematicamente a literatura sobre fraturas patológicas em ossos expostos à radiação ionizante, observamos que estas são relativamente pouco comuns. Contudo, desafiam o ortopedista e o oncologista pela sua difícil solução(7). Concluímos que o conhecimento a respeito do tema é insuficiente, com baixa evidência científica. Não há, portanto, consenso a respeito do melhor tratamento para

esta afecção. O que é comum à maioria das publicações é a alta taxa de complicações com desfecho, muitas vezes, catastrófico.

1.1.1 Efeitos da radioterapia no osso.

Qualquer tecido exposto à radiação ionizante está sujeito a morte celular(8). Esta morte pode ocorrer por formação de radicais livres ou pela quebra estrutural das cadeias de DNA. A formação de radicais livres ocorre quando um elemento químico, geralmente a água, é atingido pelo fóton radioativo. Ocorre a formação de radicais livres de oxigênio que levam a mutação do DNA celular. Os radicais livres podem ainda destruir organelas celulares, levando à apoptose(9).

Outro mecanismo de morte celular é a destruição direta do DNA celular pela radiação ionizante. Estes mecanismos são mais eficientes em células com maior taxa de reprodução, como as células tumorais, mas afetam também o tecido sadio que eventualmente estiver no campo de irradiação(9).

Especificamente no tecido ósseo, a lesão por radiação ionizante começa pela redução da perfusão tecidual. O passo inicial é o aumento da permeabilidade endotelial responsável pelo suprimento vascular local. Disto decorre edema perivascular e hemorragia de pequenos vasos, que levam à redução da perfusão tecidual. Com a contínua exposição do tecido, ocorre a oclusão vascular definitiva, levando a necrose local. Isto pode levar a osteonecrose, complicação importante da radiação sobre o tecido ósseo(10).

Ocorre também a redução de número de osteoblastos no tecido irradiado. Acrescenta-se a isto um aumento da atividade osteoclástica e redução da atividade osteoblástica, com conseqüente redução da massa óssea local e da densidade óssea global(10).

Baixas doses de radiação podem afetar o crescimento ósseo(11). A alta taxa de mitose dos condrócitos na placa de crescimento faz com que este tipo celular seja especialmente suscetível. Associa-se a isto a importante redução do número e atividade de osteoblastos recém-formados, fazendo com que o tecido produzido tenha ossificação lenta. O resultado final pode ser uma redução do crescimento ósseo permanente, especialmente quando a dose total é muito grande(11).

Pacientes submetidos a tratamento radioterápico tem risco aumentado a sofrerem fraturas por insuficiência(8).

1.1.2 Etiologia

Alguns estudos tentam explicar a razão pela qual a fratura em ossos irradiados tem maiores dificuldades para a consolidação. Estes estudos são experimentais em cobaias, principalmente em ratos.

Em estudo experimental em ratos, após exposição femoral a radiação ionizante, na dose de 18Gy (Gray), Nicholls e colaboradores(12) observaram a evolução de fraturas para falha de consolidação, avaliando-os em micro-CT. As imagens demonstraram ausência de formação de calo ósseo, com deficiência de produção de matriz osteoide e condroide. Contudo não foi avaliada a celularidade da amostra.

Em uma publicação sobre o tema, Maeda e colaboradores(13) demonstraram, em estudo experimental em ratos, a evolução histológica do osso irradiado, não-fraturado. Nas duas primeiras semanas ocorre um desaparecimento de células ósseas, uma redução da replicação celular no osso e redução da atividade hematopoiética, sem repercussão biomecânica. Entre seis e 18 semanas, as alterações histológicas são mantidas, com aumento gradual da reabsorção óssea, redução da espessura cortical e aumento da porosidade óssea. Após as 18 semanas observaram a melhora gradual da porosidade óssea, do número de osteócitos e aumento da formação óssea periosteal, levando o tecido ósseo ao estado fisiológico.

Avaliando a eficácia do uso de Amifostina para prevenção da morte de osteócitos em mandíbulas de ratos irradiadas e fraturadas, Donneys e colaboradores(14) observaram uma diminuição do número de osteócitos no foco fraturário e um aumento de lacunas na matriz. Estes achados demonstram que a morte celular de osteócitos no local da irradiação onde ocorreu a fratura é maior que quando a fratura ocorre em osso não irradiado. Este mesmo estudo demonstrou uma incapacidade do tecido ósseo em produzir nova matriz após a fratura em osso exposto a radiação ionizante.

De modo geral, classifica-se as falhas de consolidação em vasculares e avasculares. Esta diferenciação indica a presença ou ausência de estímulo biológico

para a consolidação óssea. Os estudos a respeito do tema demonstram a consequência biológica da radiação ionizante no osso normal, demonstrando a morte de osteócitos e a incapacidade tecidual para se regenerar, talvez por deficiência celular no foco fraturário(15). A literatura científica carece de dados a respeito da vascularização do foco fraturário em tecido ósseo irradiado, pois a fratura típica é repovoada de células trazidas por neovascularização. Este detalhe da cicatrização do osso necessita de estudos mais aprofundados para seu entendimento.

1.1.3 Epidemiologia

As fraturas por insuficiência secundárias a radioterapia, apesar de serem relativamente infrequentes, apresentam altas taxas de complicações. A incidência de fraturas após irradiação varia de 1,2% a 25%. Na maioria das publicações a incidência é de cerca de 3%. Contudo, são fraturas de difícil tratamento. A taxa de consolidação varia de 33% a 75%. Quando evolui para a falha de consolidação a infecção secundária está frequentemente presente. Destas, 43% tiveram a amputação requerida para resolução da complicação(16)(17)(18)(19). A figura 1 sumariza a frequência de complicações ósseas relacionadas a radioterapia.

Complicação	Frequência
Fraturas	1,2% a 25%
Atraso de consolidação	> 45%
Osteonecrose (Fig.2)	15%
Complicações de ferida operatória	10% a 28%
Distúrbio de crescimento fisário	60%

Figura 1: Frequência de complicações da radioterapia no tecido esquelético.

As fraturas podem ocorrer em qualquer osso previamente irradiado, sendo mais frequentes em costelas de pacientes irradiados para tratamento de câncer de mama, na pelve de pacientes tratados de câncer em órgãos abdominais e pélvicos, e no fêmur de pacientes tratados de sarcomas de partes moles. Destas fraturas, as que têm maior impacto funcional são as de fêmur, pois necessitam de tratamento cirúrgico e promovem maior repercussão mecânica(20)(21)(22).



Figura 2: Complicações da radioterapia no esqueleto. Imagem radiográfica de osteonecrose actínica em bacia esquerda de paciente submetido a radioterapia para tratamento de tumor pélvico.

Diversos trabalhos tentam relacionar a fratura patológica após radioterapia a fatores de risco. Avaliando 89 pacientes com sarcomas de coxa, tratados com ressecção cirúrgica e radioterapia, Blaes e colaboradores(23) identificaram como fatores de risco o descolamento periosteal realizado no momento da ressecção tumoral, a irradiação circunferencial do fêmur, e a localização tumoral no compartimento anterior da coxa. Outros fatores como idade, gênero, dose de radiação, associação com a quimioterapia, extensão do campo de irradiação e histologia não mostraram associação com a ocorrência de fraturas femorais. Um aspecto importante do trabalho foi o tempo de seguimento. O tempo decorrido entre a irradiação e a fratura foi muito relevante, já que a fratura ocorre muitos anos após a radioterapia.

Já Gortzak e colaboradores(19) em estudo de 22 pacientes que apresentaram fratura patológica de fêmur dentre 101 pacientes tratados pela associação de cirurgia e radioterapia para sarcomas de coxa, identificaram como

fatores de risco a idade, o gênero feminino, a localização tumoral no compartimento anterior da coxa, o tamanho tumoral, a dose de radiação utilizada, e o grau de descolamento periosteal.

Em sua publicação que avaliou fatores de risco para a fratura patológica, Lin e colaboradores(17) não observaram relevância da dose de radiação empregada no tratamento para a ocorrência da fratura. O fator relevante observado em seu trabalho foi o descolamento periosteal durante o tratamento cirúrgico. Em contrapartida, Holt e colaboradores(24), apesar de sua pequena série de casos, acharam evidência de que uma dose de radioterapia alta, definida com estando entre 60 e 66 Gy, era estatisticamente mais perigosa como fator de risco que uma baixa dose, definida como sendo de 50 Gy.

Não há, portanto, consenso na literatura sobre quais fatores de risco são realmente relacionados à ocorrência de fratura após o tratamento radioterápico. A figura 3 lista os fatores de risco observados com maior frequência nas maiores séries de casos publicadas.

- Idade maior que 50 anos.
- Gênero feminino.
- Localização da fratura: Costelas, pelve e fêmur.
- Tamanho tumoral: maior tamanho, maior a frequência.
- Descolamento periosteal.
- Irradiação femoral circunferencial.

Figura 3: Fatores de risco para fratura patológica após radioterapia. Fonte: arquivo pessoal do autor.

1.1.4 Tratamento para fraturas pós radioterapia

Em alguns estudos, avaliaram-se métodos para a prevenção de fraturas após o tratamento radioterápico, especialmente nos pacientes que tem tumores de membros inferiores. Em um trabalho onde se avaliam fatores de risco para fratura patológica femoral após tratamento de sarcomas de coxa, Gortzak e colaboradores(19) sugerem a fixação intramedular de pacientes que preenchem critérios de risco para fratura.

Outro estudo com 22 pacientes que apresentaram fratura patológica após radioterapia, Sternheim e colaboradores(25) demonstraram um alto grau de falha após afixação intramedular femoral. Foram relatados 86% de complicações, sendo 82% de falha de consolidação. Dos 22 pacientes, cinco apresentaram falha de material de síntese após a pseudoartrose e dois tiveram pseudoartrose infectada.

A artroplastia primária como tratamento da fratura patológica após radioterapia é defendida para as lesões que ocorrem em alguns locais específicos. Kim e colaboradores(26) avaliaram 36 casos de fraturas femorais, sendo 30 diafisárias e 6 trocantéricas. Das 36 fraturas, seis foram tratadas por artroplastias primárias e 30 por osteossíntese. Os pacientes submetidos à osteossíntese tiveram mais complicações e necessidade de re-operação com maior frequência que pacientes submetidos à artroplastia. O autor sugere aprofundamento na investigação da artroplastia primária como tratamento de fraturas femorais patológicas após radioterapia.

Tendo em vista o alto índice de complicação do tratamento de fraturas após radioterapia, alguns autores sugerem a introdução de fatores que possam colaborar com a consolidação. Duffy e colaboradores(27) trataram 17 pacientes com 18 fraturas de fêmur após radioterapia, com enxerto de fíbula vascularizada associada a enxerto autólogo, obtendo consolidação em 16 pacientes em um tempo médio de 9,4 meses. Estes resultados não foram reproduzidos em outros estudos(26).

Em estudo experimental, Nicholls e colaboradores(28) avaliaram a efetividade da proteína morfogenética 7 (BMP7, OP-1) na consolidação de fraturas após radioterapia. Não foi observada efetividade da proteína na consolidação das fraturas.

Em outro estudo experimental, Donneys e colaboradores(29) demonstraram que o Amifostina foi eficiente em evitar a morte de osteócitos no foco fraturário de fêmures expostos à radiação ionizante, não havendo estudos que comprovem sua eficácia em seres humanos para este fim.

Em nossa revisão sistemática não conseguimos determinar um método terapêutico seguro e eficaz para as fraturas patológicas secundárias à radioterapia.

1.2 O potencial uso do líquido amniótico para tratamento de fraturas.

No processo de cicatrização do tecido ósseo em condições fisiológicas, várias substâncias são necessárias e contributivas, podendo se supor ser viável o uso de elementos químicos, físicos e biológicos como promotores da consolidação de fraturas. O líquido amniótico humano tem grande potencial para este fim(30).

O líquido amniótico humano tem várias funções na gestação, como proteção, controle de temperatura e a promoção do crescimento harmônico fetal(31). Seus principais componentes encontram-se em suspensão ou diluídos em seu conteúdo líquido. Temos aí incluídos uma parte celular e outra acelular. A porção celular vem da esfoliação do âmnio e do feto, e apresenta importante concentração de células tronco embrionárias(32).

A porção acelular é formada por substâncias orgânicas e inorgânicas. As substâncias inorgânicas são os eletrólitos. Já as orgânicas são proteínas, aminoácidos, a alfa-fetoproteína, as substâncias nitrogenadas não-proteicas, os carboidratos, os lipídios, as vitaminas, as enzimas, as prostaglandinas, os hormônios e a bilirrubina.

Dos constituintes orgânicos do líquido amniótico, alguns são importantes no processo de consolidação do tecido ósseo(33). Destacam-se, com importância conhecida, os fatores de crescimento, o ácido hialurônico, o fator ativador de ácido hialurônico, sulfato de condroitina -4 e -6, dermatan sulfato e heparan sulfato(34,35). Os fatores de crescimento são o TGF- β , o FGF (fibroblast growth factor), o fator de crescimento derivado de plaquetas, as interleucinas 1 e 6. Destes fatores, o FGF sabidamente tem propriedades angiogênicas e é ativador mitogênico para osteoblastos(36).

Em um trabalho que avaliou o uso do líquido amniótico humano acelular para a cicatrização de defeitos ósseos na calota craniana de coelhos, Karaçal e cols. observaram efeito positivo(37). Ao centrifugar e congelar o líquido amniótico humano os pesquisadores tornaram-no acelular, pois tinham a intenção de avaliar o potencial de auxílio na consolidação óssea da matriz orgânica do líquido. Concluíram que o ácido hialurônico e a condroitina são importantes auxiliares na cicatrização do tecido ósseo.

Em outro trabalho publicado que avaliou o efeito do líquido amniótico humano na consolidação de fraturas, Kerimoglu e cols. observaram efeito positivo em sua utilização para a consolidação de fraturas em tíbias de ratos(35). Neste trabalho também foi utilizado líquido acelular centrifugado e congelado. Os autores determinaram também o segundo trimestre de gestação como o período ótimo para aquisição do líquido amniótico.

Os resultados de outro estudo experimental demonstraram ação promotora do líquido amniótico na consolidação de artrodese póstero-lateral da coluna, associada a enxerto ósseo, comparando a grupo controle, que utilizou apenas enxerto ósseo(38).

Até o momento, que tenhamos conhecimento, nenhum trabalho publicado avaliou a eficácia do líquido amniótico humano na consolidação de tecido ósseo irradiado

Na grande maioria das situações, especialmente as não complicadas por outros fatores, as fraturas evoluem para consolidação. Contudo, em situações especiais, como é o caso da fratura patológica que ocorre em osso irradiado, como nos pacientes submetidos à radioterapia, a esperada cura pode não ocorrer. Nestes casos específicos os componentes do líquido amniótico humano, celulares ou acelulares, têm potencial para auxiliar o processo natural de consolidação de fraturas.

Portanto, com o objetivo de avaliar uma possível ação do líquido amniótico acelular humano no estímulo à cicatrização de fraturas em ossos irradiados, realizou-se este estudo.

1.3 Relevância

Pacientes submetidos a tratamento radioterápico tem, além do benefício relacionado ao tratamento de sua doença de base, risco de desenvolver complicações relacionadas a esta terapêutica. No tecido ósseo, um potencial efeito colateral é o desenvolvimento de fratura patológica (Fig.4). Esta fratura tem grande dificuldade para consolidação, podendo evoluir com falha de consolidação. A pseudoartrose secundária a radioterapia é de tratamento difícil, podendo evoluir para infecção e necessitar de amputação do membro acometido(7).

Esta complicação desastrosa para o paciente, e temida pela equipe médica que cuida do paciente oncológico, leva a grandes frustrações. Não é raro o paciente ter seu câncer curado após tratamento que envolve a radioterapia e, após anos livre da doença, ter que ser submetido a uma cirurgia de amputação do membro para tratamento de pseudoartrose infectada que não é resolvida por qualquer outro método.



Figura 4: Radiografias de frente e lateral de paciente com fratura patológica de úmero direito. A fratura evoluiu com falha de consolidação, e decorreu de tratamento radioterápico para controle local de sarcoma pleomórfico. Fonte: arquivo pessoal do autor.

Os métodos de resolução do problema tentados até o momento mostraram-se ineficientes. O entendimento de quais aspectos da consolidação de fraturas estão comprometidos, e saber se o líquido amniótico acelular auxilia a cicatrização de tecido ósseo irradiado, podem abrir uma linha de pesquisa com potencial para sua resolução.

A relevância do estudo consiste na busca de uma solução para uma grave complicação clínica, de método terapêutico frequentemente utilizado, com sérias consequências para os indivíduos acometidos, que ainda não tem solução conhecida pela ciência(7).

2 OBJETIVOS

- Avaliar o impacto da radiação ionizante sobre a consolidação de fraturas no fêmur em ratos.
- Avaliar a efetividade do centrifugado acelular de líquido amniótico como fator contribuinte para a consolidação de fraturas em fêmur de ratos, após exposição à radiação ionizante.

3 MÉTODO

Para atingir os objetivos propostos, desenvolvemos um projeto experimental em animais, simulando fraturas em ossos expostos à radiação, com uso de líquido amniótico humano centrifugado.

3.1 Ética

O uso de animais foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso Animal da UFMG. Esta autorização está identificada pelo protocolo 40/2014. Já o uso do líquido amniótico humano foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. Esta autorização está identificada pelo CAAE – 47223015.2.0000.5149. A doadora do líquido amniótico foi orientada sobre sua utilização, permitindo seu uso através de assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2 Instituições e financiamento

O estudo foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em parceria com o Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear da Universidade Federal de Minas Gerais, e com o Instituto de Pesquisa em Oncologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

Esta pesquisa recebeu financiamento da Rede de Oncologia da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (REONCO-FAPEMIG). Não há conflitos de interesses na sua realização.

3.3 Animais

Foram utilizados 36 ratos Wistar, fêmeas, com aproximadamente três meses de vida e peso médio de 241,84 gramas. Os animais foram obtidos junto ao Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, irradiados no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia

Nuclear, e transportados para o biotério do Núcleo de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da UFMG.

Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com acomodação de até cinco animais por grupo, em local arejado, iluminado, com ciclos naturais dia-noite, com controle de temperatura e umidade, e livre demanda de água e alimentação. Estes permaneceram no biotério por duas semanas para aclimatação antes de iniciar os procedimentos experimentais.

Todos os procedimentos com potencial para sofrimento físico ou emocional para os animais foram realizados sob anestesia. A opção anestésica escolhida foi a aplicação intraperitoneal de quetamina e xilazina nas doses de 60mg/kg e 15mg/kg, respectivamente. Foram anestesiados, portanto, para a exposição à radiação ionizante, para a fratura e seu tratamento, e para o sacrifício dos animais.

3.4 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em três grupos distintos. Cada grupo composto por 12 animais.

O grupo **Controle Positivo** foi composto pelos animais expostos a radiação ionizante, mas que não receberam o centrifugado de líquido amniótico humano (LAH) durante o tratamento. Estes animais receberam dose de igual volume de solução salina no foco de fratura. O objetivo deste grupo foi servir de controle na avaliação da efetividade do LAH como método adjuvante na consolidação da fratura femoral, assim como estudar os efeitos da radiação sobre a consolidação do osso irradiado.

O grupo **Estudo** foi constituído de animais expostos à radiação ionizante, e que receberam o centrifugado de LAH. Estes animais foram comparados aos animais do grupo Controle Positivo com objetivo de avaliar a efetividade do LAH como método adjuvante na consolidação da fratura femoral.

No grupo **Controle Negativo** foram alocados os animais que não foram expostos à radiação ionizante e que não receberam o centrifugado de LAH no tratamento da fratura. Estes animais receberam igual dose de solução salina no foco fraturário. O objetivo deste grupo foi de, quando comparado ao grupo Controle

Positivo, avaliar os efeitos da radiação ionizante na consolidação das fraturas femorais. A figura 5 demonstra os grupos e a que foram submetidos.

Grupo	Radioterapia	Tratamento
Controle Positivo	+	SF0,9%
Estudo	+	LAH
Controle Negativo	-	SF0,9%

Figura 5: Características de cada grupo

3.4.1 Cálculo amostral

O cálculo da amostra para o estudo mostrou-se desafiador. Como publicado em revisão sistemática(7), os dados epidemiológico sobre a fratura patológica após radioterapia são pouco conhecidos, não existindo dados confiáveis sobre sua prevalência. Outra limitação foi estabelecida pelo ineditismo da metodologia para imunofluorescência por microscopia confocal para o osso. Portanto não conhecíamos a média e o desvio-padrão para este método, quando aplicado sobre o osso, utilizando os reagentes estudados.

Para realizarmos o experimento utilizamos o mesmo número de animais de outro estudo, realizado em ratos, com avaliação de consolidação em radiografias, como avaliação de desfecho(35). Utilizamos, portanto, 36 animais divididos em três grupos de 12.

Após conhecermos o desvio-padrão da amostra, recalculamos o tamanho da amostra. O desvio padrão dos testes de imunofluorescência variaram de 70,7 a 387 nos testes realizados. Definimos a diferença a ser detectada como sendo de um desvio-padrão. A figura 6 demonstra o cálculo amostral.

Estes cálculos confirmaram o tamanho da amostra como sendo de 36 animais, com 12 ratos por grupo.

Desvio padrão: 71.0000 Diferença a ser detectada: 71.0000 Nível de significância: 5% Poder do teste: 80% Teste de hipótese: monocaudal Tamanho da amostra calculado para cada grupo: 12			Desvio padrão: 387.0000 Diferença a ser detectada: 387.0000 Nível de significância: 5% Poder do teste: 80% Teste de hipótese: monocaudal Tamanho da amostra calculado para cada grupo: 12		
Para outros valores do nível de significância e poder do teste temos:			Para outros valores do nível de significância e poder do teste temos:		
Nív. de signif.	Poder do teste	Tam. amostra p/ grupo	Nív. de signif.	Poder do teste	Tam. amostra p/ grupo
5%	65%	8	5%	65%	8
5%	70%	9	5%	70%	9
5%	75%	11	5%	75%	11
5%	85%	14	5%	85%	14
5%	90%	17	5%	90%	17
5%	95%	22	5%	95%	22
0.1%	80%	31	0.1%	80%	31
1%	80%	20	1%	80%	20
10%	80%	9	10%	80%	9

Figura 6: Cálculo do tamanho da amostra para o maior e menor desvio-padrão obtido nos resultados. Fonte: <http://www.lee.dante.br>

Os procedimentos experimentais foram realizados após as autorizações dos devidos órgãos responsáveis, tendo sido encerrados até outubro de 2018.

3.5 Procedimentos experimentais

3.5.1 Radiação

Objetivando a reprodução dos efeitos da radiação ionizante no osso, e sua implicação na consolidação de fraturas femorais, desenvolvemos modelo experimental específico para este projeto. Em modelos experimentais prévios foram estabelecidos a dose de radiação e ser empregada(28), assim como o mecanismo de produção da fratura(39). Trata-se de padronização de metodologia eficiente e reprodutível para a produção de fraturas diafisárias femorais em ratos, expostos previamente à radiação ionizante.

A irradiação foi realizada no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear / Comissão Nacional de Energia Nuclear (LIG – CDTN/CNEN). O laboratório utiliza um irradiador panorâmico multipropósito de categoria II, fabricado pela MDS Nordion® (Canadá), Modelo/número de série IR-214 e tipo GB-127, equipado com uma fonte de Cobalto-60 (^{60}Co) estocada a seco com atividade máxima de 2.200 TeraBequerel (TBq) ou 60.000 Curio (Ci). (Fig.7)

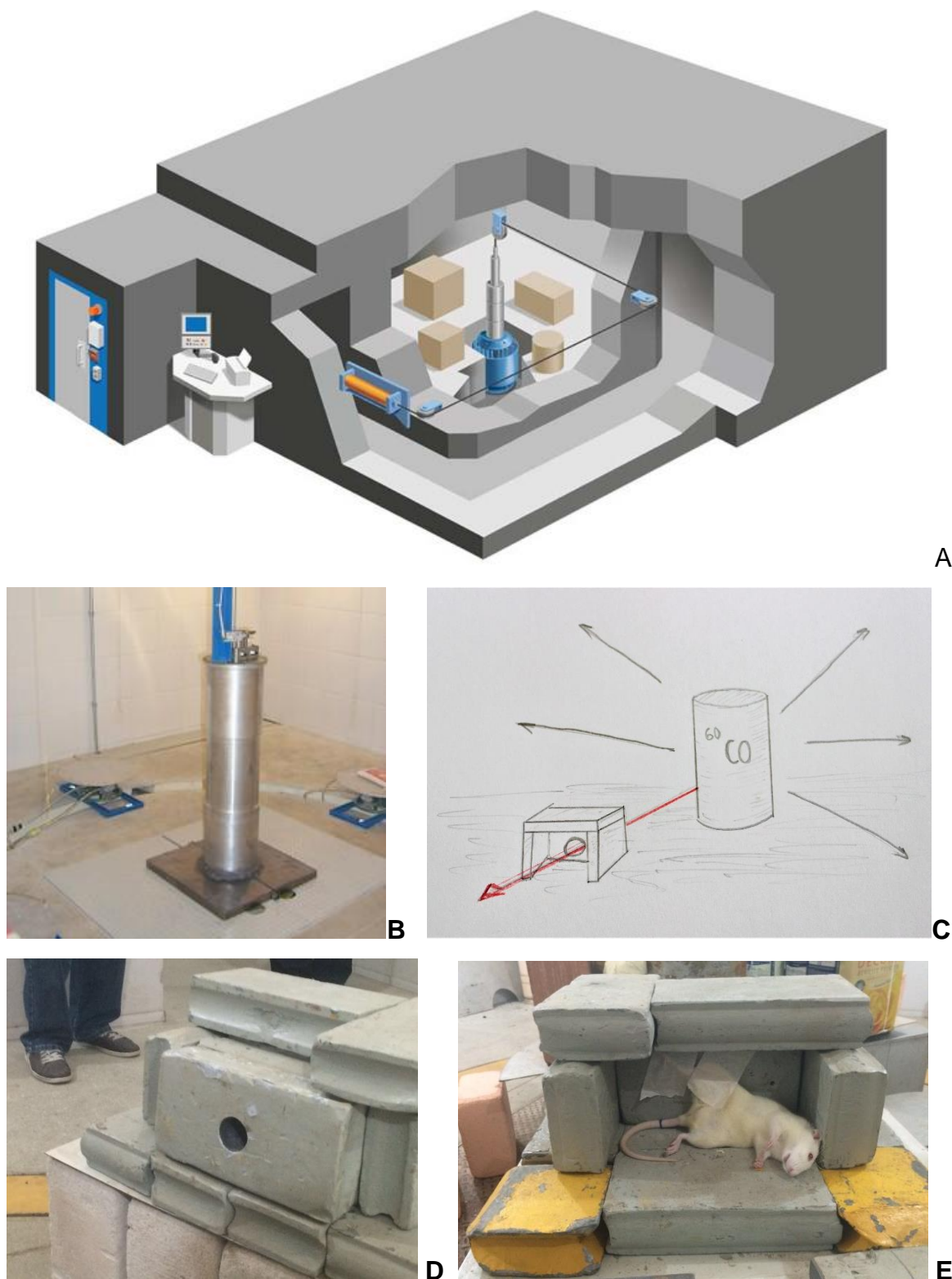


Figura 7: Método para irradiação. A: Planta em 3 D da sala do colimador; B: Fonte de Cobalto 60; C: Desenho esquemático do modelo de irradiação; D: Blocos de chumbo para direcionamento do feixe radioativo; E: Animal anestesiado, posicionado para procedimento.

O foco de administração do feixe radioativo foi direcionado para a área do fêmur direito. A dose de irradiação, com exposição da área a ser estudada a fonte de ^{60}Co na dosagem, foi de 18 Gy(40), em dose única a uma profundidade de 1,5 cm. Os animais foram posicionados a 30 centímetros de distância da fonte radioativa e expostos por 77 segundos.

Por tratar-se de um irradiador panorâmico, a radiação foi direcionada ao fêmur direito do rato através de anteparos de chumbo desenvolvidos especificamente para este propósito. Os anteparos de chumbo têm orifícios com cinco centímetros de diâmetro, que direcionaram a radiação exclusivamente para o fêmur direito dos animais. (Fig. 7)

Após a irradiação os animais foram levados ao Núcleo de Experimentação Animal da faculdade de Medicina da UFMG, para observação até a data dos procedimentos posteriores.

3.5.2 Fratura diafisária femoral

Duas semanas após a irradiação, os animais foram submetidos a fratura diafisária de fêmur direito. Para padronizar o tipo de fratura, utilizamos guilhotina desenvolvida especificamente para este fim(39), que produz uma fratura transversa ou oblíqua curta, diafisária, semelhante em todos os animais (Fig. 8)

A guilhotina é composta por um peso de aço inoxidável com 1,3 quilogramas, que corre por um trilho de 50 centímetros, acelerado pela força da gravidade. O impacto é amortecido por uma mola, também em aço inoxidável, com 6,0 centímetros de altura. O impacto é transmitido até o fêmur dos animais pela lâmina da guilhotina que tem ponta romba. O fêmur é posicionado em apoios, também em aço, com distância entre eles de 2,5 centímetros.



Figura 8: Guilhotina desenvolvida para fraturas diafisárias de fêmur. À esquerda observa-se toda a estrutura. Ao centro um detalhe do peso no fim do trilho. À direita, a ponta da guilhotina com simulação da produção da fratura.

3.5.3 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados e submetidos a redução cirúrgica da fratura diafisária do fêmur. Após a anestesia, foi realizada a tricotomia do sítio cirúrgico e assepsia de pele com solução alcoólica de Digliconato de Clorexidina a 5%. Realizado acesso cirúrgico longitudinal na face lateral da coxa com abertura de pele e de musculatura da coxa do animal. Com a abertura da musculatura, foi exposta a fratura.

A fratura foi fixada com fio de Kirschner com um milímetro de diâmetro e fechado por sutura por planos. Inicialmente foi fechado o plano muscular e depois a sutura de pele. Após o fechamento, realizou-se a infiltração com 0,3 ml de solução salina a 0,9% ou igual volume de líquido amniótico humano, conforme o grupo ao qual o animal pertencesse. A figura 8 demonstra esquematicamente o procedimento cirúrgico.

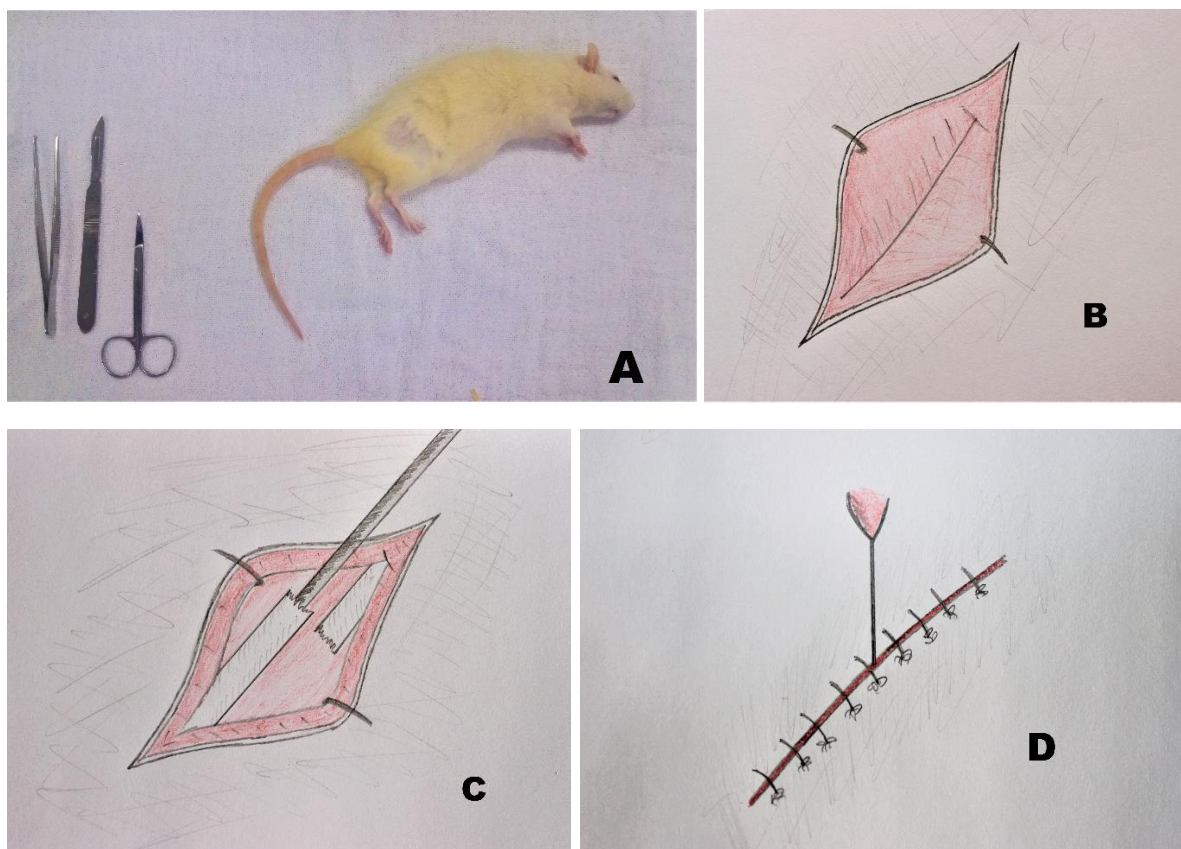


Figura 9: Demonstração de procedimento cirúrgico realizado em animais. A:Animal anestesiado, e após tricotomia, preparado para procedimento cirúrgico. B: Representação esquemática de acesso cirúrgico em planos cutâneo e muscular. C: Representação esquemática com foco de fratura aberto, sendo fixado com fio intramedular liso. D: Representação esquemática de ferida após fechamento recebendo tratamento seja com líquido amniótico, seja com solução salina.

3.5.4 Líquido amniótico humano

Para realização do presente estudo, obteve-se o líquido amniótico humano acelular.

O líquido amniótico humano (LAH) foi doado por gestante atendida no ambulatório de medicina fetal do Hospital das Clínicas da UFMG, obtido por amniocentese de alívio em pacientes com polidrâmnio. o líquido amniótico foi obtido durante o segundo trimestre de gestação, em paciente sem sinais clínicos ou laboratoriais de infecção.

O LAH foi centrifugado em alta rotação por 20 segundos. Retirou-se a porção mais superficial da amostra, com objetivo obter-se uma amostra acelular. Foi congelado e conservado a -20 °C até sua utilização.

3.6 Estudo da consolidação

Três semanas após a fratura os animais foram sacrificados e tiveram o fêmur direito retirado. Realizou-se exames de imagem por radiografias digitais e avaliação histológica por imunofluorescência por microscopia confocal.

O fêmur direito foi retirado e acondicionado em solução de formol tamponado a 10% por cinco dias, quando foram radiografados. No sexto dia as amostras foram seccionadas com preservação do foco fraturário com seu calo ósseo. Em seguida foram descalcificadas, colocadas em bloco de parafina, e enviadas para histologia. A descalcificação das amostras foi realizada pelo uso de solução de 100mL de ácido nítrico (HNO₃) em 900mL de formol tamponado a 10%, durante seis dias.

3.6.1 Radiografias digitais

As radiografias digitais foram realizadas no quinto dia após acondicionamento dos ossos em solução de formol a 10%. Foi utilizado aparelho radiográfico (Raiotécnica, modelo 30X60, série 2577) acoplado a uma processadora AGFA (modelo CR30X). As imagens foram impressas por uma impressora OKI (modelo C911 MDI). As radiografias foram executadas com dose de 40 quilovolts (kV), 2mAs a 1 metro de distância da fonte de raios x, em ambiente climatizado a 20° C.

Nas radiografias avaliou-se a presença da fratura, o grau de cominuição da fratura, a localização da fratura, e sua evolução para consolidação óssea. Foram excluídas as fraturas cominutivas ou segmentares, sendo incluído no trabalho apenas animais com fraturas simples, transversas ou oblíquas curtas.

Para medir o grau de consolidação das fraturas à radiografia, utilizamos a classificação de Lane–Sandhu(41)(42): (0) a ausência completa de consolidação; (1) para a formação inicial de calo; (2) para uma ossificação inicial; (3) para um desaparecimento inicial da linha de fratura; (4) Consolidação completa da fratura. A figura 10 discrimina a classificação utilizada.

Lane – Sandhu Scoring System		
Tipo	Descrição	Consolidação
0	Ausência completa de consolidação	Insuficiente
1	Formação inicial de calo	Insuficiente
2	Ossificação inicial	Suficiente
3	Desaparecimento inicial de linha de fratura	Suficiente
4	Consolidação completa da fratura	Suficiente

Figura 10: Classificação radiográfica para consolidação de fraturas em ratos.

Para efeito de cálculo estatístico, agrupou-se os tipos 0 e 1 em “Consolidação Insuficiente” e os tipos 2, 3 e 4 em “Consolidação Suficiente”. A figura 11 exemplifica a avaliação radiográfica da consolidação.

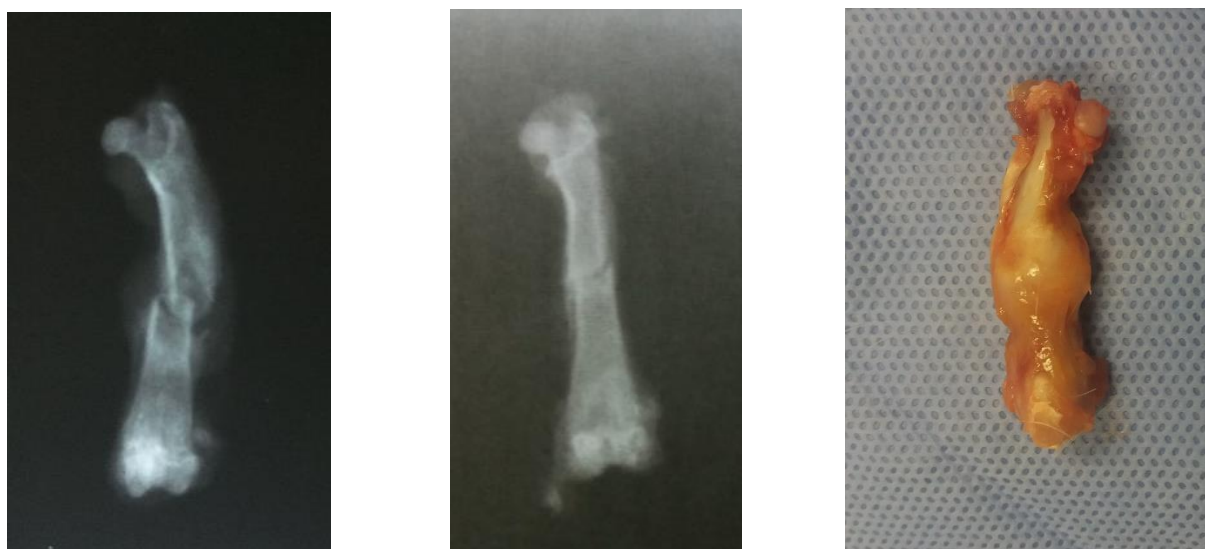


Figura 11: Exemplo radiográfico da consolidação. A esquerda a radiografia do animal número 20, classificado como tipo “1”, ou seja, consolidação Insuficiente. Ao centro a radiografia do animal número 4, classificado como tipo “3”, ou seja, consolidação Suficiente. A direita a peça anatômica no momento da radiografia.

3.6.2 Estudo por imunofluorescência

A imunofluorescência baseia-se na especificidade entre o anticorpo e o seu antígeno(43). Este anticorpo incorpora corantes fluorescentes, em alvos teciduais específicos, que serão o objeto do estudo. Dependendo do grau de concentração do

antígeno no tecido, maior será a fluorescência, que será medida pelo microscópio confocal. O grau de fluorescência é expresso em MFI (mean fluorescence intensity).

Neste estudo utilizou-se microscópio confocal Nikon (Inverted microscope Eclipse Ti-E/Ti-E/B – IPON/UFTM) e avaliou-se a expressão, por imunofluorescência, dos antígenos CD34, Ki-67 e interleucina 6.

3.7 Análise estatística

A comparação de dados foi realizada utilizando o software IBM SPSS Statistics ® versão 22(Chicago, EUA). Os dados quantitativos foram comparados entre os grupos através do teste t de student. Os dados qualitativos foram comparados pelo teste do qui-quadrado com correção de Fisher.

Estabelecemos um poder do teste de 80%, com intervalo de confiança de 5%. Consideramos diferenças para valor-p < 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação Radiográfica

O parâmetro “Avaliação radiográfica” apresentou o seguinte resultado (Tab.1, fig.12 e 13):

Classificação radiográfica	Controle +	Estudo	Controle -	Valor-p
Consolidação Insuficiente	10 (83,3%)	06 (50,0%)	03 (25,0%)	0,020
Consolidação Suficiente	02 (16,7%)	06 (50,0%)	09 (75,0%)	

Tabela 1: Resultados e análise estatística dos dados referentes à classificação radiográfica.

Em uma visão geral, a classificação radiográfica simplificada demonstrou diferença entre os grupos estudados (valor de $p = 0,02$). Este resultado mostrou uma consolidação menos eficiente para o grupo Controle positivo, mais eficiente para o grupo Controle negativo, e com eficiência intermediária para o grupo Estudo.

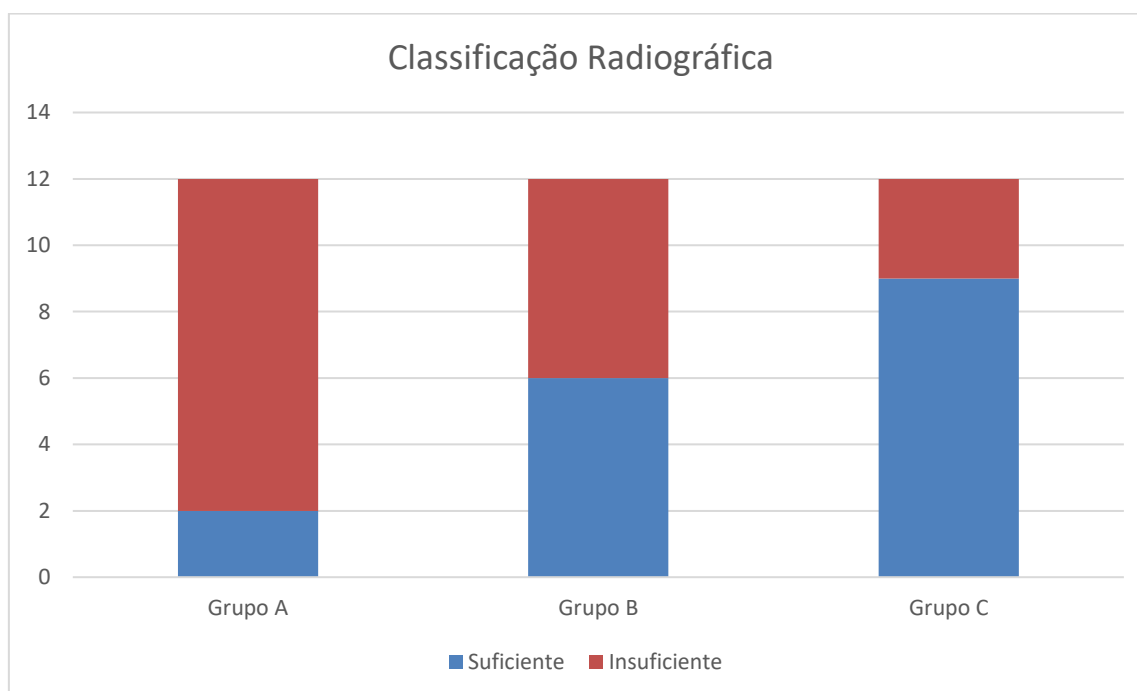


Figura 12: Gráfico com a frequência da classificação radiográfica por grupo.

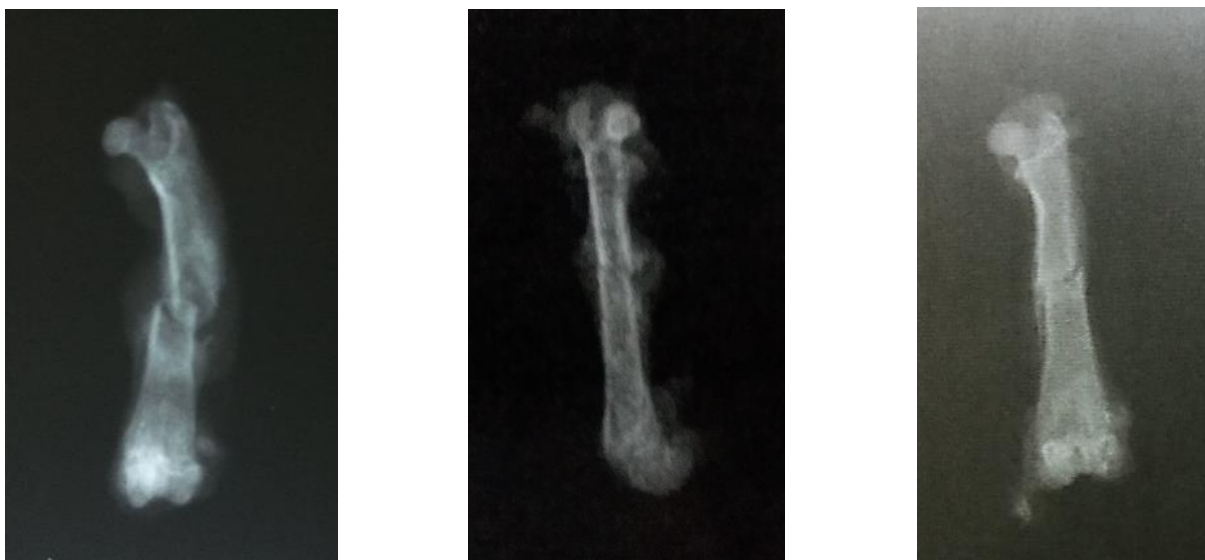


Figura 13: Exemplos de radiografias dos animais de cada grupo. A esquerda temos uma radiografia típica de animais do grupo A. Ela é classificada como tipo “0” – Insuficiente. Ao centro um animal típico do grupo B, classificado como tipo “2” – Suficiente. A direita um exemplo de imagem típica do grupo C, classificada como tipo “3” – Suficiente.

Ao compararmos os grupos Controle positivo e Controle negativo, o primeiro teve consolidação radiográfica menos eficiente (valor de $p = 0,012$), quando utilizamos a classificação simplificada. As comparações que envolvem o grupo Estudo não demonstraram relevância do ponto de vista estatístico (valor de $p > 0,05$)

4.2 Imunofluorescência

Os resultados de imunofluorescência, obtidos por microscopia confocal estão sumarizados na tabela 2. Nela estão discriminados os valores obtidos para cada marcador, suas médias, mediana e desvio padrão, assim como as comparações entre os grupos estudados. O grau de fluorescência é expresso em MFI (*mean fluorescence intensity*). O resultado é obtido pela média dos campos avaliados pelo microscópio para cada amostra. Ele reflete diretamente a intensidade de fluorescência da amostra estudada.

Reagente	Estatística	Controle +	Estudo	Controle -
CD34 ^c	Média	803,9 ± 164,5	842,2 ± 163,9	941,7 ± 300,8
	Mediana	762,4 ± 227,1	845,7 ± 340,3	921,9 ± 368,5
Ki67 ^d	Média	637,6 ± 156,1	737,4 ± 154,5	806,6 ± 122,8
	Mediana	619,1 ± 172,9	742,6 ± 246,1	827,9 ± 167,1
IL6 ^e	Média ^a	638,4 ± 70,7	772,9 ± 177,9	833,5 ± 146,2
	Mediana ^b	617,2 ± 115,7	789,2 ± 268,8	839,9 ± 249,4

a - p = 0,013 b - p = 0,016

c - p > 0,05

d - p = 0,061 / 0,026 (A x C)

e - p = 0,015 / 0,004 (A x C); 0,098 / 0,078 (A x B)

Tabela 2: Avaliação estatística dos resultados de imunofluorescência.

A metodologia empregada para a imunofluorescência mostrou-se falha para a obtenção de resultados para algumas amostras, fazendo com que o número de amostras fosse menor para alguns grupos. Isto ocorreu para os marcadores Ki-67 e Interleucina – 6. Nestes, foram obtidos resultados em 11 fraturas para os grupos Controle positivo e Estudo e de 10 para o grupo Controle negativo, em um total de 12 animais estudados por grupo.

4.2.1 CD34

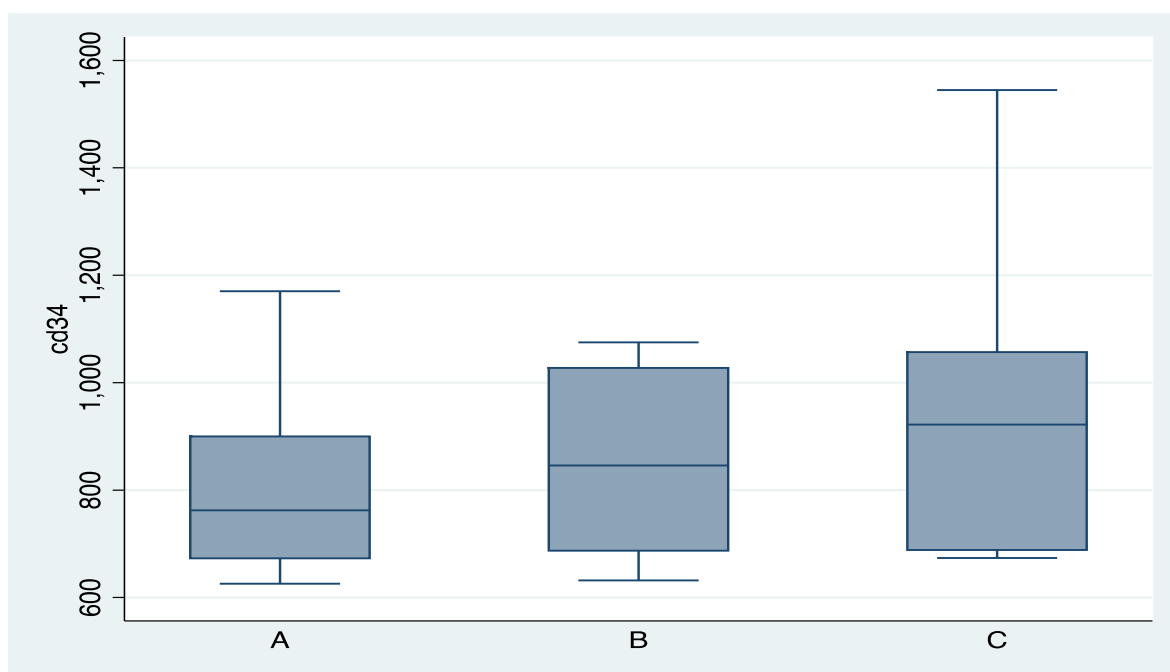


Figura 14: Gráfico de distribuição de CD34, medido em MFI, nos grupos Controle positivo (A), Estudo (B) e Controle negativo (C).

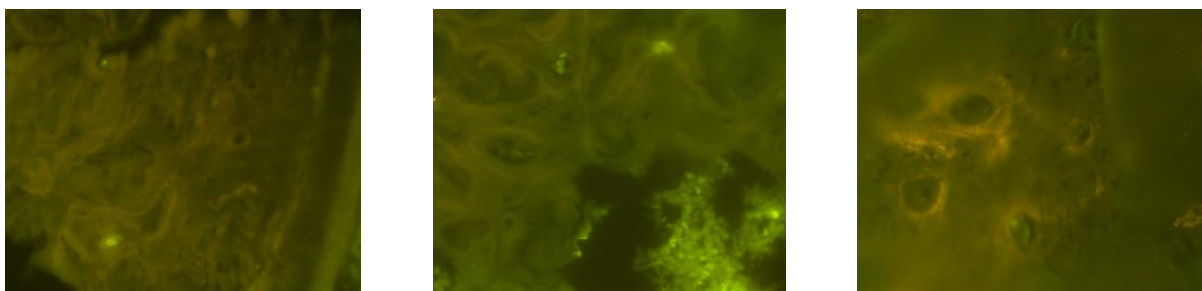


Figura 15: Exemplos de imagens de lâminas, para o marcador CD34. As imagens são dos grupos Controle positivo (A), Estudo (B) e Controle negativo (C), respectivamente.

Os valores para o CD34 apresentaram média de 801,9; 842,2 e 941,7 para os grupos Controle positivo (A), Estudo (B) e Controle negativo (C), respectivamente (Fig.14). Ele foi mais alto no grupo de animais não irradiados, e menor no que foram submetidos à irradiação, mas que não receberam líquido amniótico humano (LAH). Foi intermediário nos que receberam o LAH. Contudo não há diferença estatística (valor de $p > 0,05$). A imunofluorescência para CD34 pode ser vista na figura 15.

4.2.2 Ki-67

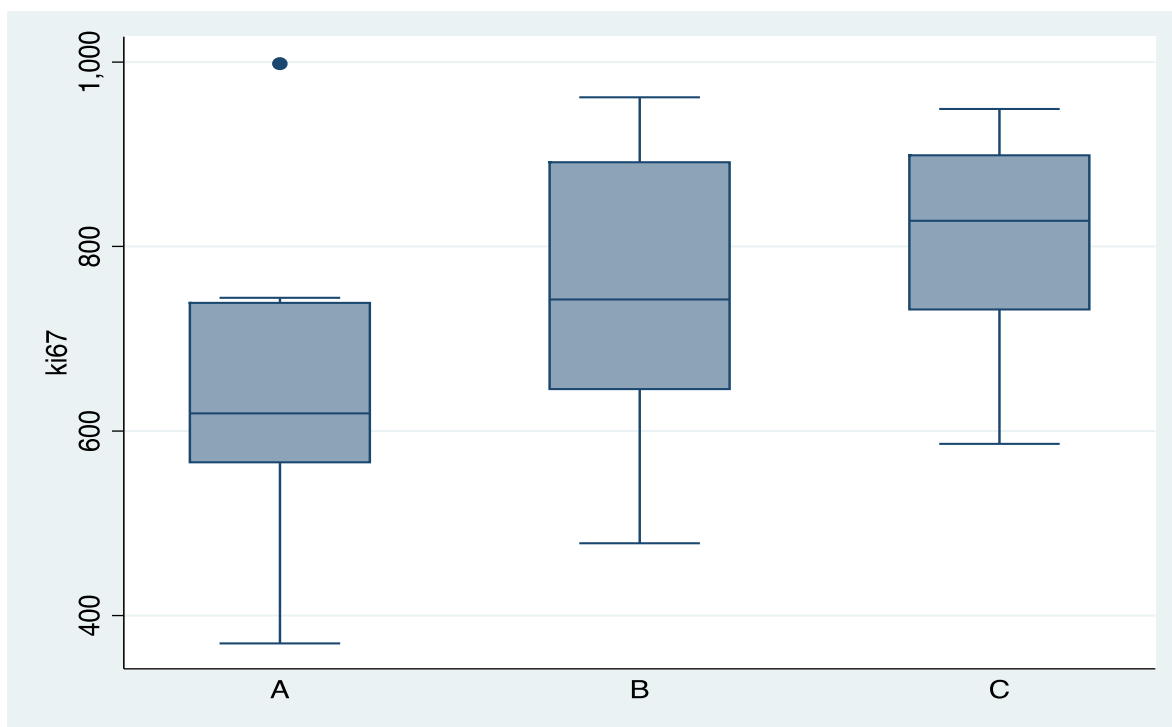


Figura 16: Gráfico com a distribuição de Ki-67, medido em MFI, nos grupos Controle positivo (A), Estudo (B) e Controle negativo (C).

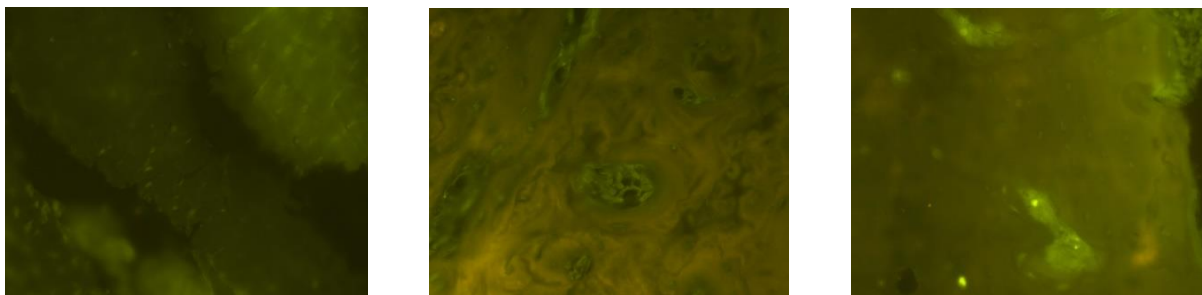


Figura 17: Exemplos de imagens de lâminas, para o marcador Ki-67. As imagens são dos grupos Controle positivo (A), Estudo (B) e Controle negativo (C), respectivamente.

Os resultados obtidos para o Ki-67 apresentaram média de 637,6; 737,4 e 806,6 para os grupos Controle positivo, Estudo e Controle negativo, respectivamente (Fig.16). Estes foram maiores no grupo Controle negativo, menor no grupo Controle positivo e com valor intermediário no grupo Estudo (valor de $p = 0,059$). Quando comparamos os grupos Controle positivo e negativo, observamos que a diferença entre estes apresenta relevância estatística (valor de $p = 0,061$ e $0,026$, respectivamente, para média e mediana). Nas comparações que envolvem o grupo Estudo, os resultados não evidenciaram diferenças com relevância estatística (valor de $p > 0,05$). A figura 17 exemplifica a imunofluorescência para os grupos estudados. É relevante ressaltar que este marcador teve sua amostra minorada pela ausência de resultado de algumas amostras.

4.2.3 IL-6

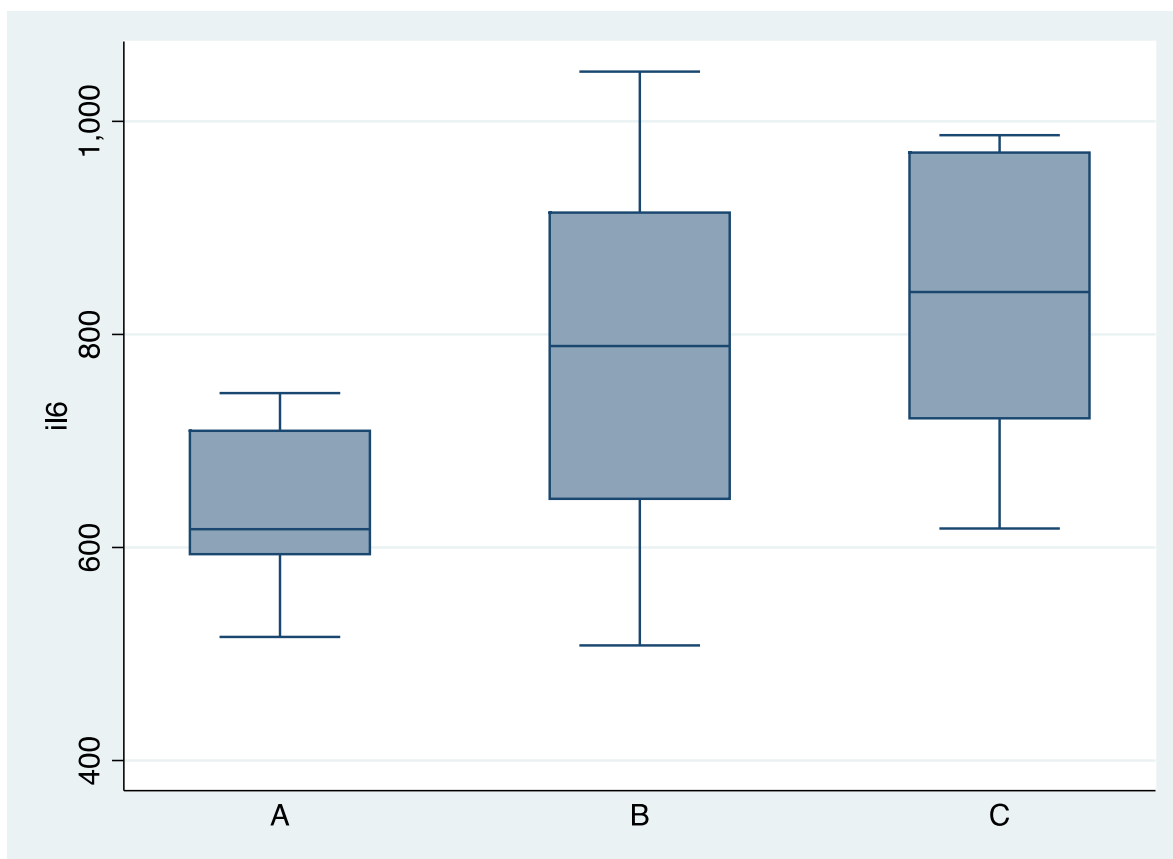


Figura 18: Gráfico com a distribuição de IL-6, medido em MFI, nos grupos Controle positivo (A), Estudo (B) e Controle negativo (C).

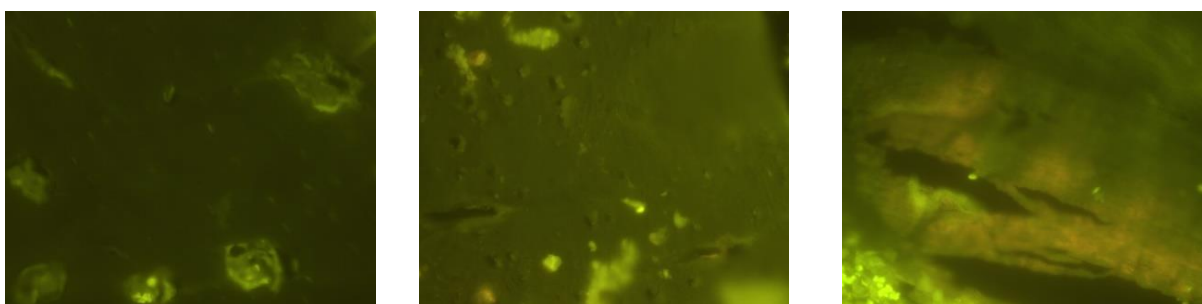


Figura 19: Exemplos de imagens de lâminas, para o marcador IL-6. As imagens são dos grupos Controle positivo (A), Estudo (B) e Controle negativo (C), respectivamente.

Para o marcador, as médias dos grupos Controle positivo, Estudo e Controle negativo foram, respectivamente, 638,4; 772,9 e 833,5 (Fig.18). Esta diferença, com maior valor para o grupo sem irradiação, mostrou-se relevante do ponto de vista estatístico (valor de $p = 0,013$). Quando comparamos o grupo Controle

negativo (não irradiado) com o grupo Controle positivo (irradiado que não recebeu líquido amniótico) tivemos diferença com relevância estatística (valor de $p = 0,015$ e $0,004$ para médias e medianas, respectivamente). Quando comparamos os grupos Controle positivo e Estudo (irradiado e tratado com LAH) temos valores maiores para o grupo Estudo, contudo sem relevância estatística (valor de $p = 0,098$ e $0,078$ para médias e medianas, respectivamente). Na comparação dos grupos Estudo e Controle negativo também não houve diferença (valor de $p > 0,1$). A figura 19 exemplifica o exame de imunofluorescência para os grupos estudados.

5 DISCUSSÃO

A radioterapia é modalidade terapêutica essencial no tratamento oncológico. Atua no tratamento de diversas afecções, especialmente quando é necessário um incremento no controle local da doença. Entretanto, é consenso na literatura que a radioterapia interfere negativamente na fisiologia dos diversos tecidos expostos a este tratamento(1). Especificamente no tecido ósseo, estas complicações são frequentemente observadas, e muitas vezes, de resolução desconhecida(7).

O tecido ósseo irradiado está sujeito a inúmeras complicações locais após o tratamento radioterápico. Osteonecrose, distúrbios de crescimento fisário, transformação maligna e fraturas patológicas estão entre as mais impactantes complicações deste tratamento. Destas podem decorrer dor crônica e incapacidade funcional importante. Os pacientes podem até mesmo necessitar de intervenções agressivas como múltiplas cirurgias e amputação de membros(7).

A fratura patológica após radioterapia não tem sua etiologia ainda bem esclarecida, e seu tratamento está longe de ser satisfatório. Infelizmente, a literatura sobre o tema é escassa, insuficiente e de baixa relevância. Não há consenso sobre como abordá-la, apesar do conhecimento sobre suas consequências.

Foi, portanto, objetivo deste estudo compreender algumas alterações histológicas nas fraturas patológicas e avaliar uma terapêutica que possa auxiliar na sua resolução. Certamente que não se trata de encontrar uma solução definitiva para o problema, especialmente por ser este um trabalho experimental em animais, mas pode-se ter a expectativa do início de uma linha de estudo que tem potencial para auxiliar na sua resolução.

Para estudarmos a cicatrização do osso exposto a radiação ionizante, criamos um modelo experimental reprodutível. Com ele, conseguimos padronizar a exposição do animal a radiação, o tipo de fratura, o uso do biomaterial a ser utilizado em cada grupo e o desfecho a ser estudado. Existem outros modelos desenvolvidos com esta mesma finalidade, sendo que a maioria deles apresentam resultados baseados em exames radiográficos(35)(37)(40). Uma peculiaridade de nosso projeto foi o uso de parâmetro que avaliou a resposta bioquímica, acrescentando um outro fator a ser ponderado na avaliação, ao lado dos exames radiográficos.

Nicholls e colaboradores(40) estudaram o uso da proteína morfogenética óssea como fator adjuvante positivo na consolidação de fraturas patológicas após tratamento de sarcomas em extremidades em ratos. Assim como nosso estudo, os animais foram submetidos a dose única de radiação de 18 Gy para simular o tratamento radioterápico. O método de padronização da fratura, assim como a forma de direcionamento do feixe radioativo ao fêmur do animal são omitidos no artigo. Para avaliação de resultados, foi utilizado um aparelho de Microtomografia computadorizada, realizada histomorfometria, e avaliação da densidade mineral óssea.

Este estudo apresenta como vantagem uma avaliação mais acurada da consolidação quando comparada a nossa, baseada na imagem radiográfica. Além disso, inclui também a observação da morfologia celular, algo não realizado em nosso modelo. Contudo, ele negligencia a função bioquímica na consolidação de tecido ósseo. Ao investigarmos a expressão de marcadores de imunofluorescência acrescentamos um aspecto diferente nesta abordagem.

Para compreensão do processo de cicatrização tecidual óssea, a avaliação dos diversos atores bioquímicos atuantes nos principais determinantes da consolidação de fraturas, nos parece extremamente importante. Para atender a este propósito, estudamos a consolidação pela expressão dos antígenos CD34, Ki-67, e Interleucina 6. Desta forma avaliamos, respectivamente, a neo-angiogênese, a proliferação celular, e a resposta inflamatória local(44).

Em condições fisiológicas, a ocorrência de uma fratura desencadeia uma série de eventos bioquímicos que visam a cicatrização do tecido ósseo e a consolidação da fratura. Diferentemente de outros tecidos, que produzem uma cicatriz, o osso é capaz de regenerar-se, recriando a estrutura original pois a consolidação assemelha-se ao processo de desenvolvimento do esqueleto. Contudo, este processo não está isento de intercorrências, podendo evoluir para atraso ou falha da regeneração do tecido ósseo(45).

A cicatrização de qualquer tecido necessita de atividade biológica para que ocorra, e no osso isto não é diferente(44). Um fator possivelmente associado à falha de consolidação de fraturas em ossos expostos a radiação é a necrose tecidual. A radioterapia leva a morte celular por ação direta sobre a célula e por prejudicar a

perfusão tecidual(8). A efetividade geral da consolidação foi avaliada neste estudo pelo desfecho radiográfico. Não fizemos a observação direta da celularidade, como observado em outros estudos.

A consolidação é normalmente dividida em três fases distintas: a inflamatória, a reparativa e a de remodelação. Estas fases se sobrepõem, não havendo limite de tempo preciso entre elas. Este processo cicatricial como um todo, tem alguns fatores determinantes, do ponto de vista bioquímico, importantes para que a cicatrização ocorra(44).

Estes determinantes são a fase inflamatória, a reconstituição celular, a revascularização, e a remodelação óssea. Os fatores bioquímicos envolvidos em cada um deles são essenciais para a devida consolidação da fratura. Destacamos, para fins de estudo dos fatores intervenientes na cicatrização do tecido ósseo a neoangiogênese, a proliferação celular e a resposta inflamatória local. A remodelação óssea é também importante, contudo, esta é presente após a fase de consolidação, com objetivo de reconstituição histológica e aumento de estabilidade mecânica local.

O antígeno CD34 é uma fosfoglicoproteína, com importante função de adesão intercelular. Normalmente encontrado em células do cordão umbilical e medula óssea como células hematopoiéticas, e células endoteliais(46). O utilizamos em nosso estudo para quantificar a neoangiogênese necessária para vascularização do foco fraturário.

Já o antígeno Ki-67 está ligado à proliferação celular(47). Sua expressão é observada em núcleos celulares em todas as fases de mitose, e nas fases G1, S e G2. Células quiescentes ou em repouso não expressam o antígeno Ki-67 em seu núcleo. Por este motivo, este é relacionado à fibroplasia na cicatrização tecidual. Especificamente para o nosso estudo, optamos pela utilização do anticorpo Ki-67 na imunofluorescência para avaliar a consolidação óssea sob o ponto de vista da proliferação celular.

As interleucinas são citocinas pró-inflamatórias, ativas nos mais diversos tecidos do corpo humano. Trata-se de um potente agente inflamatório, atuando na modulação da defesa contra agentes infecciosos e na cicatrização tecidual(48). A interleucina 6 é uma importante citocina pró-inflamatória. Em uma fratura, é ela que regula o recrutamento e proliferação de células tronco mesenquimais, assim como sua

diferenciação para a linhagem osteogênica(49). Pode ainda induzir a diferenciação de monócitos presentes no sangue periférico em osteoclastos. Especificamente neste estudo, sua utilização visa a avaliação da eficiência inflamatória nos diversos cenários avaliados.

Estudos experimentais sobre a consolidação de fraturas necessitam de padronização na forma com que estas são produzidas. As publicações disponíveis sobre o tema não deixam claro como estas foram padronizadas(35)(40). Utilizamos, para cumprir este objetivo, guilhotina produzida para este fim(39). Com isso reduzimos a variabilidade das fraturas, para atingirmos o objetivo de produzir fraturas diafisárias, transversas, simples e fechadas.

Liu e colaboradores(50) estudaram o impacto da osteossíntese por cerclagem na consolidação do rádio de coelhos. Para isto utilizaram a microscopia confocal por imunofluorescência para avaliar a expressão de cálcio e fosfatase alcalina. Os autores não descreveram dificuldades com a obtenção de resultados em quaisquer amostras. Zhou e colaboradores(51) também não relataram dificuldades no processamento de imagens em estudo que utilizou a microscopia confocal para avaliar a consolidação de fraturas expostas a baixas doses de raios-X.

Em algumas de nossas amostras não conseguimos os resultados para imunofluorescência pela microscopia confocal. Isto fez com que os resultados, para alguns marcadores tivesse o número de animais estudados reduzidos. Não achamos descrição semelhante nos estudos que utilizaram método semelhante para avaliar o desfecho. Suspeitamos que esta falha pode relacionar-se ao processo de preparação da amostra, quando o tecido ósseo é estudado. Outra possibilidade é que esta esteja relacionada aos marcadores utilizados, visto que nenhum outro estudo realizado no tecido ósseo os utilizou.

A microscopia confocal é um método de obtenção de imagens de alta resolução, capaz de ser usado em tecidos frescos ou em peças anatômicas(52,53). Ele processa imagens obtidas por varredura a laser, processando vários campos simultaneamente, em lateralidade e profundidade. O resultado são imagens bidimensionais, que podem ser montadas tridimensionalmente.

Quando aplicada em tecidos frescos, baseia-se na diferença natural de refração dos tecidos, sendo chamada de microscopia confocal refrativa. Quando se

emprega a fluorescência para magnificação do contraste tecidual, esta é chamada de microscopia confocal por fluorescência.

No tecido ósseo, há duas peculiaridades para sua utilização. As peças precisam passar por processo de descalcificação, e necessitam ser cortadas em finas secções teciduais. Por isso, o método ideal para estudo do tecido ósseo é a microscopia confocal por imunofluorescência(54). Esta é capaz de produzir boas imagens da arquitetura celular, assim como detalhes teciduais.

A classificação radiográfica foi obtida para todos os animais. Contudo, nem todos os animais tiveram informação completa para todos os marcadores estudados, nos estudos de imunofluorescência por microscopia confocal. Por este motivo algumas amostras específicas tem um número de animais menor que o total de 12 por grupo calculado como suficiente para que tivéssemos amostra representativa. Caso tivéssemos optado por um nível de significância de 10%, a amostra necessária seria de nove animais por grupo. Nosso grupo com número menor de amostras obtidas foi de 10.

Por este motivo, ao avaliarmos os resultados dos marcadores da imunofluorescência, optamos por os estratificar de acordo com o nível de significância. Resultados foram analisados com base no valor de p de 0,05 como proposto no início do projeto, mas também discutidos levando em conta um valor de p próximo de 0,05 aceitando um resultado marginalmente significativo. Nos pareceu mais ético com os princípios dos estudos experimentais não acrescentar novos animais ao projeto para atingirmos o número de amostras calculado(55)(56)(57).

O líquido amniótico é um biomaterial com grande potencial para auxiliar a consolidação de fraturas(35)(37)(38). Tanto sua porção celular, quanto sua porção acelular tem potencial para indução da cicatrização do tecido ósseo. Em nosso estudo, utilizamos líquido amniótico humano doado por paciente submetida a amniocentese de alívio para tratamento de polidrâmnio. Este nos pareceu o método menos invasivo de obtê-lo, pois a doadora não foi exposta a risco adicional para coleta do material, e este é semelhante ao presente em gestações típicas, com a mesma concentração de componentes(58)(59)(60). Para isto, sugerimos a obtenção de líquido doado no segundo trimestre de gestação por portadoras de polidrâmnio relacionado a

deficiência na absorção do líquido amniótico pelo feto, especialmente relacionado a defeitos congênitos do trato gastrointestinal fetal.

Para fazer com que nossa amostra seja acelular, centrifugamos o líquido amniótico humano em alta rotação e o congelamos a -20° C. Esta metodologia é semelhante a utilizada em outros estudos que utilizaram este material em estudos da consolidação de fraturas(35)(37)(38). Caso a intenção do estudo fosse avaliar a efetividade do líquido amniótico completo, rico em células mesenquimais, este modelo não seria eficiente. Necessitaríamos de uma técnica de congelamento diferente da utilizada, que mantivesse as células viáveis. Outra limitação é a possível incompatibilidade celular do líquido amniótico humano para cicatrização do tecido ósseo de outra espécie, no caso o rato.

Um importante fator a ser ponderado sobre o método utilizado é o tempo decorrido entre a exposição do osso a radiação e a fratura. Esta ocorre, em seres humanos, em média quatro anos após o tratamento radioterápico(7). Em nosso método utilizamos um intervalo de duas semanas. Este tempo é semelhante ao utilizado em outros estudos sobre a consolidação de fraturas em ossos expostos a radiação ionizante, que variou de duas a três semanas(12)(14)(40). Por este motivo não denominamos as fraturas estudadas experimentalmente com fraturas patológicas, mas sim como fraturas em ossos irradiados.

Um dos objetivos desta pesquisa é entender os impactos da radiação ionizante sobre a cicatrização do tecido ósseo. Para atingí-lo desenvolvemos um modelo experimental com animais em laboratório. Avaliamos o desfecho final da consolidação das fraturas por meio de exames radiográficos digitais, e estudamos o impacto específico sobre três aspectos importantes na cicatrização das fraturas: a neo-angiogênese, a proliferação celular, e a resposta inflamatória local.

Utilizamos dois grupos, um no qual os animais tiveram seu fêmur exposto a radiação ionizante – grupo Controle positivo, e um grupo Controle negativo, não exposto a radiação. Estes foram comparados por características radiográficas, estratificadas em classificação específica, e por expressão de marcadores em imunofluorescência avaliados em microscópio confocal. Estes marcadores foram o CD34, o Ki-67, e a interleucina 6, que avaliaram a neo-angiogênese, a proliferação celular, e a resposta inflamatória local, respectivamente.

Os exames radiográficos demonstraram um impacto importante da radiação ionizante sobre a consolidação de fraturas femorais em ratos (valor de $p = 0,012$). Os animais do grupo Controle negativo tiveram consolidação mais eficiente de sua fratura quando comparados ao grupo Controle positivo. Isto corrobora a expectativa de que esta interfere negativamente sobre a cicatrização de quaisquer tecidos, incluindo o tecido esquelético. Entretanto é ainda não explicado na literatura médica como ocorre esta interferência, e, mais especificamente, qual aspecto da cicatrização está prejudicada.

Para ajudar nesta compreensão fizemos o estudo por imunofluorescência dos ossos fraturados. Nossos resultados indicam que o impacto ocorre na proliferação celular e na resposta inflamatória local, não havendo interferência na neo-angiogênese. Os valores de CD34 não apresentam variação com significância estatística ao compararmos os grupos irradiados e controle. Já os valores de Ki-67 e Interleucina 6 foram significativamente menores para o grupo Controle positivo, quando comparados ao grupo Controle negativo.

A neo-angiogênese, estudada aqui pela expressão de CD34 na imunofluorescência, é aspecto importante na consolidação óssea. Isto é determinado na literatura ortopédica com tanta clareza, que as falhas de consolidação são classificadas em vasculares e avasculares(15). Vale lembrar que na primeira fase da consolidação de fraturas temos uma necrose tecidual importante, com lesão vascular endosteal e periosteal. Para ocorrer a consolidação da fratura é necessário a neoformação vascular.

Em seu artigo de revisão, Pacheco e Stock(8) apontam que a lesão por radiação ionizante no osso inicia-se por redução da perfusão tecidual e culmina com a necrose local. Esta revisão não aborda fraturas, mas os impactos da radioterapia sobre o osso. Esta afirmação corrobora a importância da revascularização na cicatrização de fraturas, incluindo aí as fraturas que ocorrem no osso exposto à radiação ionizante.

Contudo, nossos resultados não corroboram que a neo-angiogênese seja fator importante na falha de consolidação em fraturas que ocorram em ossos irradiados. As expressões do marcador CD34 são semelhantes nos animais irradiados e nos não-irradiados. Isto não indica que a neo-angiogênese não tenha importância

na consolidação de fraturas após radioterapia, mas sim que a maior frequência de complicações neste grupo específico não está relacionada a este fator.

O marcador Ki-67 é muito útil para avaliar a proliferação celular. Sabemos que a necrose tecidual e a morte celular são resultados conhecidos da exposição tecidual à radiação ionizante(8). Estes ocorrem também no tecido ósseo, como complicação da radioterapia. Apesar de não ter sido descrito nas fraturas que ocorrem no osso irradiado, é razoável pensar que estão presentes no osso antes que esse frature.

Em nossos resultados observamos importante redução dos valores de Ki-67 no grupo Controle positivo quando comparamos ao grupo Controle negativo. O valor de p para a comparação das medianas foi de 0,026. Para a comparação das médias este foi de 0,061, acima do nível de significância de 5%, contudo marginalmente significativo.

Isto sugere que a proliferação celular nas fraturas dos animais expostos à radiação é menor que nas fraturas dos não expostos, sugerindo que uma das causas para a piora na eficiência da cicatrização tecidual possa estar relacionada a menor atividade de reprodução celular como efeito da radiação ionizante.

Sabemos que o tecido ósseo é edificado e mantido por células específicas. Estas células são importantes também na reconstrução tecidual quando ocorre uma fratura. A exposição à radiação ionizante leva a necrose tecidual local e a morte celular. Nossos resultados sugerem que a baixa proliferação celular no foco da fratura é fator relevante para a frequente falha de consolidação das fraturas em ossos irradiados.

Outro fator que identificamos como relevante para a maior ineficiência da consolidação do tecido esquelético foi a resposta inflamatória local. Nossos resultados para o marcador Interleucina 6 mostram uma menor resposta inflamatória nos animais irradiados.

Nas lesões teciduais o primeiro evento para que ocorra a cicatrização é inflamatório local. Este passo inicial é crucial para a boa evolução do processo. Isto não é diferente para o osso, como exposto anteriormente. Sabemos, por exemplo, que o uso de medicação anti-inflamatória interfere negativamente na consolidação óssea(61). Sabemos ainda que em uma fratura que ocorra no osso não irradiado, a

Interleucina 6 regula o recrutamento, a proliferação e a diferenciação celular para células ósseas (49). Portanto a redução na expressão deste marcador na fratura do osso irradiado pode indicar, tanto uma menor eficiência da resposta inflamatória, quanto um menor estímulo ao desenvolvimento da linhagem celular óssea.

Nossos resultados evidenciaram redução importante redução na expressão de interleucina 6 nos animais que compõe o grupo Controle positivo quando comparados ao grupo Controle negativo. O valor de p foi de 0,004 e 0,015 para a comparação entre medianas e médias, respectivamente.

Estes resultados sugerem que a exposição do osso a radiação ionizante leva a uma menor resposta inflamatória local, com menor expressão da interleucina 6. Como consequência esperamos uma menor eficiência na cicatrização tecidual também motivada pelo ineficiente desenvolvimento da linhagem celular óssea.

Concluimos, portanto, que a radiação ionizante torna a consolidação de fraturas femorais em ratos menos eficiente. Há um importante atraso na cicatrização observada em exames radiográficos. Isto decorre, dentre outros possíveis fatores, de menor proliferação celular, menor diferenciação celular na linhagem óssea e menor reação inflamatória no foco fraturário. Não há interferência sobre a neo-angiogênese, quando estes fatores são avaliados por imunofluorescência em microscopia confocal.

O segundo objetivo deste trabalho é avaliar a efetividade do líquido amniótico humano centrifugado como fator contribuinte para a cicatrização do tecido ósseo irradiado. Utilizamos para cumprir este objetivo o mesmo método para avaliar o efeito da radiação sobre a consolidação das fraturas, acrescentando um terceiro grupo de animais expostos à radiação e que receberam o líquido amniótico no foco fraturário. Nossos resultados sugerem que este fator é contribuinte, mas não suficiente para a cicatrização do tecido ósseo irradiado.

Nos parâmetros de comparação utilizados, os grupos Estudo, animais irradiados que receberam líquido amniótico, e Controle negativo, animais não irradiados, não apresentaram quaisquer diferenças. Apesar das médias e medianas serem sistematicamente menores no grupo Estudo, não tivemos qualquer resultado em que esta diferença se mostrou estatisticamente relevante. Concluimos, portanto, que os grupos Estudo e Controle negativo são iguais, fato que sugere a eficiência do líquido amniótico como auxiliar na consolidação das fraturas em ossos de ratos

expostos à radiação ionizante, pois os animais do grupo Controle negativo e Controle positivo tiveram resultados com diferença relevante.

Comparando os animais expostos à radiação, os grupos Controle positivo, animais que receberam soro fisiológico, e Estudo, animais que receberam líquido amniótico, também não observamos diferenças relevantes. Em valores absolutos, as médias e medianas são maiores no grupo Estudo que no grupo Controle positivo, contudo, sem relevância estatística (valor de $p > 0,05$).

A literatura disponível sobre o tema é escassa e não nos leva a conclusões definitivas. Inúmeras tentativas diferentes de resolver satisfatoriamente fraturas que ocorrem no osso irradiado mostraram-se ineficientes. Isto é válido tanto para tentativas que utilizaram soluções mecânicas, quanto para soluções biológicas.

A tentativa preventiva de fixar o osso irradiado com osteossíntese, com objetivo de prover uma maior resistência mecânica ao osso irradiado, em situações de alto risco para fratura patológica após radioterapia, mostrou-se ineficaz. Em seu trabalho que aborda a fratura patológica femoral após tratamento de sarcomas de coxa, Gortzak e colaboradores(19) sugerem a fixação intramedular de pacientes que preencham critérios de risco para fratura. Contudo, Sternheim e colaboradores(25) demonstraram um alto grau de falha após a fixação intramedular femoral. Isto está em concordância com nossos achados, já que a fixação preventiva não levará a um incremento da resposta biológica local, fator relacionado ao problema, identificado pela menor expressão de Ki-67.

O uso da artroplastia primária como tratamento da fratura patológica após radioterapia pode ser uma solução viável, para alguns casos específicos, como defendem Kim e colaboradores(26). Certamente que o tratamento é mais agressivo, e mais eficiente para lesões das extremidades do osso. Contudo não necessitam da cicatrização tecidual, retirando da equação a necessidade de proliferação tecidual com base em uma eficiente resposta biológica local. Em contrapartida, deixam os pacientes expostos às complicações inerentes a um procedimento de grande porte, em um local com cicatrização prejudicada pela exposição prévia à radiação ionizante.

A utilização de enxerto de fíbula vascularizada teoricamente seria uma boa opção para a resolução do problema. Este tem a capacidade de prover alguma estabilidade mecânica e suporte biológico para a cicatrização tecidual, conforme o

relatado por Duffy e colaboradores(27). Infelizmente estudos clínicos não conseguiram corroborar esta expectativa, com resultados ruins reportados por outros autores(26). Acreditamos que a utilização de enxerto de fíbula vascularizada deva ser melhor estudada, talvez como método adjuvante no tratamento da fratura do osso irradiado.

Alguns poucos estudos utilizaram LAH para a consolidação de fraturas, em ossos não-irradiados(35,37). Estes estudos, assim como o nosso, utilizaram o líquido centrifugado e congelado a 20 °C negativos para torna-lo acelular. A resposta foi satisfatória e, assim como nós, recomendam o aprofundamento de estudos sobre o tema, pois se trata de uma linha de pesquisa que tem potencial para ser adjuvante na cicatrização do tecido ósseo.

Nicholls e colaboradores(28) avaliaram a efetividade da BMP-7 na consolidação de fraturas após radioterapia. A este composto, assim como o LAH acelular, falha ao não prover estímulo biológico celular direto. Não foi observada efetividade da BMP-7 na consolidação das fraturas. Sabemos que a BMP é importante para as fases mais terminais da consolidação de fraturas. Sua diferença do líquido utilizado em nosso estudo é que o estímulo provido pelo uso do LAH ocorre com desde a fase inflamatória inicial, até a fase de proliferação celular.

De forma geral, os resultados obtidos para a classificação radiográfica, CD34, Ki-67 e Interleucina 6 mostraram uma cicatrização mais eficiente no grupo controle negativo, menos eficiente no grupo de animais irradiados que receberam solução salina, e intermediária no grupo irradiado que recebeu líquido amniótico humano centrifugado. Isto é especialmente observável para a avaliação radiográfica, e para os marcadores Ki-67 e Interleucina 6, que demonstraram algumas diferenças relevantes. Nossos resultados sugerem que o líquido amniótico humano centrifugado auxilia parcialmente a consolidação do fêmur irradiado em ratos, sendo fator contribuinte para a consolidação, especialmente nos aspectos proliferação celular e resposta inflamatória local.

Certamente são necessários estudos mais aprofundados sobre o tema. A devida elucidação do papel de cada composto do LAH acelular na consolidação de fraturas que ocorrem no osso irradiado é crucial para que talvez possamos, no futuro, propor uma resolução mais efetiva para este problema que é ainda de difícil resolução.

Os resultados obtidos demonstram que as fraturas do grupo estudo não tem consolidação com eficiência diferente do grupo Controle positivo, não sendo, portanto, o líquido amniótico humano acelular fator suficiente para a resolução do problema. Contudo esta também não é diferente do grupo Controle negativo, sugerindo que há algum estímulo a cicatrização tecidual.

Uma possível avaliação a ser feita futuramente é a necessidade de estímulo biológico direto como fator de estímulo a consolidação. O uso de um biomaterial que possa prover células tronco, como o líquido amniótico celular, é uma possibilidade ainda não testada que pode ser promissora.

6 CONCLUSÕES

Na amostra avaliada, a radiação ionizante interfere na consolidação de fraturas femorais em ratos, fazendo com que esta seja menos eficiente. Esta afeta a proliferação celular e a resposta inflamatória local, não interferindo na neoangiogênese.

Na amostra avaliada, o centrifugado acelular de líquido amniótico humano não é fator indutor suficiente para que a consolidação de fraturas em ossos irradiados tenha a mesma eficiência que em ossos não expostos a irradiação ionizante.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schae D, McBride W. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(9):527–40.
2. Larrier N, Czito B, Kirsch D. Radiation Therapy for Soft Tissue Sarcoma: Indications and Controversies for Neoadjuvant Therapy, Adjuvant Therapy, Intraoperative Radiation Therapy, and Brachytherapy. *Surg Oncol Clin N Am*. 2016;25(4):841–60.
3. Baker S, Dahele M, Lagerwaard F, Senan S. A critical review of recent developments in radiotherapy for non-small cell lung cancer. *Radiat Oncol*. 2016;11(1):115.
4. Wallis C, Saskin R, Choo R, Herschorn S, Kodama R, Satkunasivam R, et al. Surgery Versus Radiotherapy for Clinically-localized Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol*. 2016;70(1):21–30.
5. Castaneda S, Strasser J. Updates in the Treatment of Breast Cancer with Radiotherapy. *Surg Oncol Clin N Am*. 2017;26(3):371–82.
6. Chow R, Hoskin P, Hollenberg D, Lam M, Dennis K, Lutz S, et al. Efficacy of single fraction conventional radiation therapy for painful uncomplicated bone metastases: a systematic review and meta-analysis. *Ann Palliat Med*. 2017;6(2):125–42.
7. Soares C, Araújo I, Pádua B, Vilela C, Souza R, Teixeira L. Fratura patológica após radioterapia: Revisão sistemática da literatura. *J Brazilian Med Assoc*. 2019;65(6):902–8.
8. Pacheco R, Stock H. Effects of radiation on bone. *Curr Osteoporos Rep*. 2013;11:299–304.
9. Robbins M, Zhao W. Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review. *Int J Radiat Biol*. 2004;80(4):251–9.
10. Pitkanen M, Hopewell J. Functional changes in the vascularity of the irradiated rat femur. Implications for late effects. *Acta Radiol Oncol*. 1983;22(3):253–6.

11. Eifel P, Donaldson S, Thomas P. Response of growing bone to irradiation: a proposed late effects scoring system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995;31(5):1301–7.
12. Nicholls F, Janic K, Filomeno P, Willett T, Grynepas M, Ferguson P. Effects of Radiation and Surgery on Healing of Femoral Fractures in a rat model. *J Orthop Res.* 2013;31:1323–31.
13. Maeda M, Bryant M, Yamagata M, Li G, Earle J, Chao E. Effects of irradiation on cortical bone and their time-related changes: a biochemical and histomorphological study. *J Bone Jt Surg.* 1988;70(3):392–9.
14. Donneys A, Tchanque-Fossuo C, Blough J, Nelson N, Deshpande S, Buchman S. Amifostine Preserves osteocyte number and osteoid formation in fracture healing following radiotherapy. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72:559–66.
15. Panagiotis M. Classification of non-union. *Injury.* 2005;36S:S30–7.
16. Helmstedter CS, Goebel M, Zlotecki R, Scarborough MT. Pathologic fractures after surgery and radiation for soft tissue tumors. *Clin Orthop Relat Res.* 2001 Aug;(389):165–72.
17. Lin PP, Schupak KD, Boland PJ, Brennan MF, Healey JH. Pathologic femoral fracture after periosteal excision and radiation for the treatment of soft tissue sarcoma. *Cancer.* 1998 Jun;82(12):2356–65.
18. Hatano H, Morita T, Kobayashi H, Ito T, Segawa H, Saito M. Pathological fracture of the femur ten years after successful radiation therapy for metastatic breast cancer. *Breast Cancer.* 2004;11:313–7.
19. Gortzak Y, Lockwood GA, Mahendra A, Wang Y, Chung PWM, Catton CN, et al. Prediction of pathologic fracture risk of the femur after combined modality treatment of soft tissue sarcoma of the thigh. *Cancer.* 2010 Mar;116(6):1553–9.
20. Inoue Y, Miki C, Ojima E, Nomoto Y, Kusunoki M. Pelvic insufficiency fractures after preoperative radiotherapy for rectal carcinoma. *Int J Clin Oncol.* 2003 Oct;8(5):336–9.
21. Oh D, Huh SJ, Nam H, Park W, Han Y, Lim DH, et al. Pelvic insufficiency fracture after pelvic radiotherapy for cervical cancer: analysis of risk factors. *Int J Radiat*

- Oncol Biol Phys. 2008 Mar;70(4):1183–8.
22. Ogino I, Okamoto N, Ono Y, Kitamura T, Nakayama H. Pelvic insufficiency fractures in postmenopausal woman with advanced cervical cancer treated by radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2003 Jul;68(1):61–7.
 23. Blaes AH, Lindgren B, Mulrooney DA, Willson L, Cho LC. Pathologic femur fractures after limb-sparing treatment of soft-tissue sarcomas. *J Cancer Surviv*. 2010;4(4):399–404.
 24. Holt GE, Griffin AM, Pintilie M, Wunder JS, Catton C, O’Sullivan B, et al. Fracture Following Radiotherapy and Limb-Salvage Surgery for lower extremity soft-tissue sarcomas: a comparison of high-dose and low-dose radiotherapy. *J bone Jt surgery*. 2005;87-A(2):315–9.
 25. Sternheim A, Saidi K, Lochab J, O’Donnell PW, Eward WC, Griffin A, et al. Internal fixation of radiation-induced pathological fractures of the femur has a high rate of failure. *Bone Joint J*. 2013 Aug;95-B(8):1144–8.
 26. Kim HJ, Healey JH, Morris CD, Boland PJ. Site-dependent replacement or internal fixation for postradiation femur fractures after soft tissue sarcoma resection. *Clin Orthop Relat Res*. 2010 Nov;468(11):3035–40.
 27. Duffy GP, Wood MB, Rock MG, Sim FH. Vascularized free fibular transfer combined with autografting for the management of fracture nonunions associated with radiation therapy. *J Bone Joint Surg Am*. 2000 Apr;82(4):544–54.
 28. Nicholls F, Ng A, Hu S, Janic K, Fallis C, Willett T, et al. Can OP-1 Stimulate Union in a Rat Model of Pathological Fracture Post Treatment for Soft Tissue Sarcoma? *J Orthop Res*. 2014;32:1252–63.
 29. Donneys A, Ahsan S, Perosky JE, Deshpande SS, Tchanque-Fossuo CN, Levi B, et al. Deferoxamine restores callus size, mineralization, and mechanical strength in fracture healing after radiotherapy. *Plast Reconstr Surg*. 2013 May;131(5):711e-9e.
 30. Einhorn T. Enhancement of fracture healing. *J Bone Jt Surg Am*. 1995;77:940.
 31. Campana S, Chávez J, Haas P. Diagnóstico laboratorial do líquido amniótico. *J*

- Bras Patol e Med Lab. 2003;39(3):215–8.
32. Mitka M. Amniotic cells show promise for fetal tissue engineering. *JAMA*. 2001;286(17):2083.
 33. Adzick N, Lorenz H. Cells, matrix, growth factors, and the surgeon: the biology of scarless fetal wound repair. *Ann Surg*. 1994;1:10–8.
 34. Dahl L, Hopwood J, Laurent U. The concentration of hyaluronate in amniotic fluid. *Biochem Med*. 1983;30:280.
 35. Kerimoglu S, Livaoglu M, Sönmez B, Yulug E, Aynacı O, Topbas M, et al. Effects of Human Amniotic Fluid on Fracture Healing in Rat Tibia. *J Surg Res*. 2009;152:281–7.
 36. Bostrom M, Saleh K, Einhorn T. Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models. *Orthop Clin North Am*. 1999;30:647.
 37. Karaçal N, Koşucu P, Cobanglu U, Kutlu N. Effect of human amniotic fluid on bone healing. *J Surg Res*. 2005;129(2):283–7.
 38. Aydın H, Saraçoğlu M, Kerimoğlu G, Kerimoğlu S, Topbaş M. Effects of human amniotic fluid on posterolateral spinal fusion: an experimental preliminary study. *Eklem Hast Cerrahisi*. 2011;22(3):166–71.
 39. Costa P, Teixeira L, Lima G, Ferreira M, Andrade M, Vidigal P, et al. Effectiveness of Chitosan Films Impregnated With Ciprofloxacin for the Prophylaxis of Osteomyelitis in Open Fractures: An Experimental Study in Rats. *Arch Trauma Res*. 2016;5(3):e36952.
 40. Nicholls F, Ng A, Hu S, Janic K, Fallis C, Willett T, et al. Can OP-1 Stimulate Union in a Rat Model of Pathological Fracture Post Treatment for Soft Tissue Sarcoma? *J Orthop Res*. 2014;32(10):1252–63.
 41. Lane J, Sandhu H. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am*. 1987;18(2):213–25.
 42. Dokmeci M, Kalender A, Sevimli R, Korkmaz M, Bilal O. The effect of ibandronate on fracture healing in rat tibia model. *SM J Orthop*. 2016;2(4):1041.
 43. Leung B, Chuo K. Review of super-resolution fluorescence microscopy for

- biology. *Appl Spectrosc.* 2011;65(9):967–80.
44. Einhorn T. The science of fracture healing. *J Orthop Trauma.* 2005;19(10 Suppl):4–6.
 45. Marsell R, Einhorn T. The Biology of Fracture Healing. *Injury.* 2011;46(2):551–5.
 46. Sidney L, Branch M, Dunphy S, Dua H, Hopkinson A. Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells.* 2014;32(6):1380–9.
 47. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182:311–22.
 48. Dinarello A. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997;8(4):253–65.
 49. Ding Z, Lin Y, Gan Y, Tang T. Molecular pathogenesis of fracture nonunion. *J Orthop Transl.* 2018;14:45–56.
 50. Liu F, Li B, Wang H, Han Q, Shao G, Gao Y, et al. Retardation of fracture healing by cerclage wire near the elbow in radius fracture models. *Res Vet Sci.* 2016;104:58–63.
 51. Zhou X, Zhang G, Qin Q, Ling C, Chang C, Liu C. Low-dose X-irradiation promotes mineralization of fracture callus in a rat model. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2009;129:125–32.
 52. Cinotti E, Lobeille B, Cambazard F, Perrot J-L. Confocal microscopy for special sites and special uses. *Dermatol Clin.* 2016;34:477–85.
 53. Ragazzi M, Piana S, Long C, Castagnetti F, Ferrari G, Gardini G, et al. Fluorescence confocal microscopy for pathologists. *Mod Pathol.* 2014;27:460–71.
 54. Jones C, Smolinski D, Keogh A, Kirk T, Zheng M. Confocal laser scanning microscopy in orthopaedic research. *Prog Histochem Cytochem.* 2005;40(1):1–71.
 55. Sneddon L, Halsey L, Bury N. Considering aspects of the 3Rs principles within experimental animal biology. *J Exp Biol.* 2017;220:3007–16.

56. Fitts D. Ethics and Animal Numbers: Informal Analyses, Uncertain Sample Sizes, Inefficient Replications, and Type I Errors. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2011;50(4):445–453.
57. Shaw R, Festing M, Peers I, Furlong L. Use of factorial designs to optimize animal experiments and reduce animal use. *ILAR J.* 2002;43(4):223–32.
58. Allaf B, Dreux S, Schmitz T, Czerkiewicz I, Vaillant C, Benachi A, et al. Amniotic fluid biochemistry in isolated polyhydramnios: a series of 464 cases. *Prenat Diagn.* 2015;35:1331–5.
59. Brace R. Physiology of amniotic fluid volume regulation. *Clin Obs Gynecol.* 1997;40:280.
60. Abramovich D. Fetal factors influencing the volume and composition of liquor amnii. *J Obs Gynaecol Br Commonw.* 1970;77:865.
61. Lisowska B, Kosson D, Domaracka K. Positives and negatives of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in bone healing: the effects of these drugs on bone repair. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:1809–14.

8 Anexos

Anexo 1 – Autorização do CEUA – UFMG para realização do estudo.

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CERTIFICADO Certificamos que o Protocolo nº. 40 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Efeito do líquido amniótico humano na consolidação das fraturas de ossos longos expostos à radiação: estudo experimental em ratos.", que tem como responsável Ivana Duval de Araujo, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 20/05/2014. Este certificado espira-se em 20/05/2019.	
CERTIFICATE We hereby certify that the Protocol nº. 40 / 2014, related to the Project entitled "Effect of human amniotic fluid in fractures healing of long bones exposed to radiation: experimental study in rats.", under the supervision of Ivana Duval de Araujo, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 20/05/2014. This certificates expires in 20/05/2019.	
Jacqueline Isaura Alvarez Leite Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 20/05/2014.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpp.ufmg.br	

Anexo 2 – Autorização do CEP – UFMG para realização do estudo



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 47223015.2.0000.5149

Interessado(a): Prof. Luiz Eduardo Moreira Teixeira
Departamento de Aparelho Locomotor
Faculdade de Medicina

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 10 de setembro de 2015, o projeto de pesquisa intitulado " **Efeito do líquido amniótico humano na consolidação das fraturas de ossos longos pós-radioterapia: estudo experimental em ratos**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG

Anexo 3 – Tabela com a estatística geral do trabalho

Variáveis e comparações	Estatísticas	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Valor de p
CD34	Média (DP)	803,9(164,5)	842,2(163,9)	941,7(300,8)	0,375
	Mediana(IIQ)	762,4(227,1)	845,7(340,3)	921,9(368,5)	0,527
	Min; Máximo	625,5;1170,1	631,9;1075,1	673,6;1544,7	
-----Comparações duas a duas entre grupos-----					
A X B	Média				>0,999
	Mediana				0,468
A X C	Média				0,503
	Mediana				0,311
B X C	Média				0,995
	Mediana				0,558
Ki67	Média (DP)	637,6(156,1)	737,4(154,5)	806,6(122,8)	0,059*
	Mediana(IIQ)	619,1(172,9)	742,6(246,1)	827,9(167,1)	0,059*
	Min; Máximo	369,6;998,2	478,3(961,7)	586,1; 949,2	
-----Comparações duas a duas entre grupos-----					
A X B	Média				0,399
	Mediana				0,121
A X C	Média				0,061*
	Mediana				0,026**
B X C	Média				0,993
	Mediana				0,328
IL6	Média (DP)	638,4(70,7)	772,9(177,9)	833,5(146,2)	0,013**
	Mediana(IIQ)	617,2(115,7)	789,2(268,8)	839,9(249,4)	0,016**
	Min; Máximo	516,1; 745,0	508,2;1046,8	617,8; 987,0	
-----Comparações duas a duas entre grupos-----					
A X B	Entre Médias				0,098*
	Entre Medianas				0,078*
A X C	Entre Médias				0,015**
	Entre Medianas				0,004***
B X C	Entre Médias				>0,999
	Entre Medianas				0,374