

ESTUDO RADIOGRÁFICO DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM TÍBIAS DE RATOS ESTRESSADOS: DENSIDADE ÓPTICA POR MEIO DE RADIOGRAFIA DIGITAL

*RADIOGRAPHY STUDY OF THE BONE REPAIRING IN TIBIAS OF STRESS RATS:
OPTICAL DENSITY BY DIGITAL RADIOGRAPHY*

Moraes, Mari Eli Leonelli de*
Soares, Milton Gonçalves**
Takeshita, Wilton Mitsunari**
Moraes, Luis Cezar de***
Medici Filho, Edmundo***
Castilho, Julio Cezar de Melo*

RESUMO

O objetivo do presente trabalho de pesquisa foi avaliar a influência do estresse sobre a reparação óssea em ratos. Neste trabalho os autores realizaram um estudo radiográfico, por meio de radiografias digitais da reparação do tecido ósseo em tíbias de ratos estressados. Para tanto foram utilizados vinte ratos wistar adultos, nos quais foram submetidos a defeitos ósseos com broca esférica Carbide número 7004, o defeito correspondeu ao diâmetro da broca. Os ratos foram divididos em dois grupos: um controle e o outro grupo submetido ao estresse (estresse social agudo). Os animais foram radiografados no intervalo entre 7, 14 e 21 dias. Em vista disso foi realizada análise estatística aplicando o Teste Tukey, nível de 5% de significância e análise de variância ANOVA. De acordo com as condições e a metodologia empregada não foi verificada diferença estatística significativa entre os grupos, entretanto pode-se observar que os valores das médias para reparação foram sempre melhores para os ratos que não foram submetidos ao estresse.

UNITERMOS: radiografia digital; reparação óssea; densidade óptica; estresse.

SUMMARY

The objective of the present work was to evaluate the influence of stress it on the bone repair in rats. In this work the authors had carried through a radiography study, by means of digital X-rays of the repairing of the fabric bone in tibias of rats stress. Twenty rats had been used to wistar adult, submitted the bone defects with spherical drill Carbide number 7004. The rats had been divided in two groups: a control and the other group submitted to stress. Both had been radiographed in the interval between 7, 14 and 21 days In accordance with the conditions and the employed methodology were not verified difference significant statistics between the groups.

UNITERMS: digital; bone repair; optical density; stress.

* Professor Doutor de Radiologia da FOSJC – UNESP/SP

** Alunos de Mestrado e Doutorado do Programa em Biopatologia Bucal, área Radiologia Odontológica da FOSJC – UNESP/SP

*** Professor Titular de Radiologia da FOSJC – UNESP/SP

INTRODUÇÃO

Na literatura odontológica existem poucos relatos a respeito da influência do estresse no mecanismo de reparação óssea. Com a intenção de adquirir novos conhecimentos que possam auxiliar os estudos e pesquisas sobre a influência do estresse no processo de reparação óssea procuramos estabelecer um modelo experimental para tal estudo, visto ser, a reparação de defeitos ósseos um desafio para muitos profissionais da área de saúde.

Grandes doses de cortisol geram redução do nível de imunidade do organismo, podendo resultar em alterações na resposta às doenças, nos processos de inflamação e infecção. Levando em consideração que o estresse promove secreção de glicocorticóides Guyton¹¹ (1992), Junqueira e Carneiro¹³ (1990), Sonis et al.¹⁵ (1989), Raisz et al.¹⁸ (1983), acrescentaram que o efeito inibitório dos glicocorticóides poderia agir em precursores dos osteoblastos Canalis⁶ (1983). Segundo Lisboa et al.¹⁴ (1983), o estudo científico da influência do estresse sobre a fisiologia corporal teve início com Selye²² (1946), quando observou que diversos tipos de patologias, físicas ou psíquicas pareciam capazes de gerar lesões corporais. Desde então, o estresse e suas conseqüências têm sido estudados. Estes estudos apontam diversas alterações fisiológicas induzidas pelo estresse, tais como: retardos na aposição óssea com diminuição do tecido osteóide e osteoporose foram encontrados em experimentos por Gupta et al.¹⁰ (1959) e Shklar e Glickman²³ (1959) diminuição dos fatores de coagulação e ação fibrinolítica, ação supressora no sistema imunológico foram relatadas por Palmblad et al.¹⁶ (1977).

De acordo com Guyton¹¹ (1992), os benzodiazepínicos têm diversos efeitos sobre o SNC, principalmente o sedativo, ansiolítico, além de aumentar o limiar da dor. Dessa forma, os benzodiazepínicos, para exercerem sua ação ansiolítica, necessitam da liberação do ácido gama-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor endógeno específico. A liberação desse mediador químico tem por objetivo controlar as reações específicas somáticas e psíquicas aos estímulos geradores de estresse. Assim, o principal efeito dos benzodiazepínicos é o relaxamento, seguindo-se o relaxamento da musculatura volumétrica.

Nesta pesquisa avaliamos as possíveis alterações cronológicas que influenciam o processo de reparação óssea em ratos submetidos ao estresse.

É objetivo desse estudo verificar a influência do estresse na reparação óssea em defeitos provocados em tíbias de ratos, por meio da densidade óptica nos períodos imediatos, 7, 14 e 21 dias.

REVISÃO DE LITERATURA

Selye²² (1946), definiu o stress como sendo o denominador comum de todas as reações de adaptação do corpo, ademais, formulou uma teoria de resposta ao stress prolongado, como parte do mecanismo de adaptação individual que pode acarretar sinais e sintomas clínicos denominados Síndrome Geral de Adaptação.

Retardo na aposição óssea com diminuição do tecido osteóide e osteoporose do osso alveolar foi encontrados experimentalmente por Gupta et al.¹⁰ (1959) e Shklar et al.²³ (1959), em hamster e ratos albinos, respectivamente, após submetem tais animais a estímulos estressores. Em adição, observaram ainda diminuição significativa do número de osteoclastos, células e fibras do ligamento periodontal.

Gillman⁹ (1961), sugeriu que o termo reparo seja usado para um processo biológico pelo qual a continuidade do tecido lesado ou perdido é recuperado por novo tecido que não restaura a estrutura e a função. O termo regeneração seria usado para o processo biológico pelo qual a estrutura e a função do tecido lesado ou perdido sejam completamente restaurados.

Boulouard⁴ (1963), afirmou que o stress direta ou indiretamente, atua sobre o equilíbrio endócrino do organismo, podendo, de conformidade com sua intensidade, produzir marcantes alterações.

Storey²⁵ (1963), relatou importantes alterações na proliferação, maturação e formação de osteoblastos sob ação da cortisona, o que sugere um efeito direto desta sobre o metabolismo celular.

Roubicek²⁰ (1966), com relação ao desenvolvimento do organismo, admitiu-se também uma influência sensível do stress sobre o crescimento esquelético.

Para Cash et al.⁷ (1967), basicamente, o sistema plaminogênio-plasmina (sistema enzimático proteolítico do plasma circulante normal) sofre desequilíbrio de sua atividade durante o stress, por aumento dos níveis dos ativadores do plasminogênio.

Russo et al.²¹ (1969), observaram que após administração de paratormônio há discreto atraso na reparação de feridas de extração dental em ratos.

Palmblad et al.¹⁶ (1977), sugeriram uma ação fibrinolítica do stress por ação direta das prostaglandinas liberadas durante a atuação do agente estressor.

Guyton¹¹ (1992), afirmou que com o aumento dos níveis séricos de cortisol durante o stress induz a um desequilíbrio negativo na concentração de cálcio, com aumento da secreção de paratormônio, determinando aumento da absorção e redução da excreção do íon cálcio e conseqüentemente reabsorção óssea.

Demarest et al.⁸ (1985), demonstraram a ação inibitória da testosterona sobre a prolactina, na atividade basal dos neurônios tubero-infundibulares dopaminérgicos em ratos submetidos ao stress por imobilização forçada.

Alves et al.² (1989), concluíram que os estresses pré e pós exodônticos provocaram um atraso considerável na cronologia do processo de reparo alveolar em feridas de extração dental em ratos, sendo que no stress pós exodôntico provocaram maior atraso na reparação.

Hammerle et al.¹² (1996), consideraram que a transposição dos resultados obtidos em modelos experimentais realizados em animais deve ser feita com precaução, considerando-se as diferenças morfofisiológicas em humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados vinte ratos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Wistar*), machos com peso aproximado de 150 g. Os animais foram submetidos à anestesia perfundida por via intramuscular, com solução composta de 1,0 ml de cloridrato de tiazina* (0,02 g do sal) e 0,5 ml de Ketamina (0,05 g do sal), na dosagem de 0,1 ml para cada 100 g de massa corpórea.

Os animais após anestesia foram submetidos a uma incisão de aproximadamente 1,5 cm com divulsão da tela subcutânea e do tecido muscular com o objetivo de atingir a tíbia, após este procedimento foi realizada a osteotomia com broca esférica carbide número 7004, montada em caneta de alta rotação, sob refrigeração constante; o defeito ósseo será aproximadamente do mesmo diâmetro da broca. Após a osteotomia foi feita a lavagem do defeito produzido com cloreto de sódio estéril e sutura convencional com fio mononylon 4-0.

Após a tricotomia da coroa da coxa esquerda do animal, os mesmos foram divididos aleatoriamente em dois grupos de dez animais cada, a saber:

- Grupo I: Controle
- Grupo II: Estresse sem medicação

A reparação óssea será acompanhada nos tempos: imediatamente, sete, 14 e 21 dias pós-cirurgia. Nos tempos propostos, os animais foram encaminhados à disciplina de Radiologia para serem radiografados, estes, foram sacrificados no vigésimo primeiro dia.

As imagens radiográficas de cada tempo proposto foram obtidas utilizando-se o recurso da imagem digital direta pelo sistema Visualix Gx-S HDI. Este sistema consiste de um programa (Vixwin 1.4) que realiza a aquisição da imagem radiográfica por meio de um sensor CCD (*Charge – Coupled Device* ou dispositivo de carga acoplado) de dimensões 27,5 mm por 36,08 mm, e área ativa de 20,00 mm por 30 mm. O aparelho de raios X utilizado foi o Gendex 765DC, operando em 65 kVp, 7 mA, utilizando-se distância foco-sensor de 40 cm e tempo de exposição de 0,02 segundos com feixe central de raios X direcionado de forma a incidir perpendicularmente ao sensor. As imagens radiográficas digitais foram armazenadas em arquivo de formato TIFF.

As análises das densidades ópticas das imagens obtidas foram estabelecidas utilizando-se os recursos do software citado, por meio de histograma.

Os animais do grupo II foram submetidos a procedimentos estressores, os quais, em grupos de três serão colocados em caixa de madeira nas dimensões de 27,5 cm por 20 cm por 14 cm onde uma luz vermelha sob a tensão de 220 V e potência de 15 W permanecerá acesa por uma hora. Esse procedimento foi executado diariamente durante vinte dias e iniciou-se no segundo dia pós-operatório.

Esses animais após o estresse foram encaminhados à disciplina de Radiologia para serem radiografados sob as especificações citadas anteriormente.

Depois de colhidos os dados, os valores da densidade óptica foram submetidos à análise estatística para teste de t de Student e à análise de variância ANOVA.

RESULTADOS

De acordo com a metodologia empregada no presente trabalho de pesquisa, foram realizadas análises estatísticas. Análise de variância ANOVA e teste Tukey ao nível de significância de 5%, portanto obtivemos os seguintes resultados (Fig. 1):

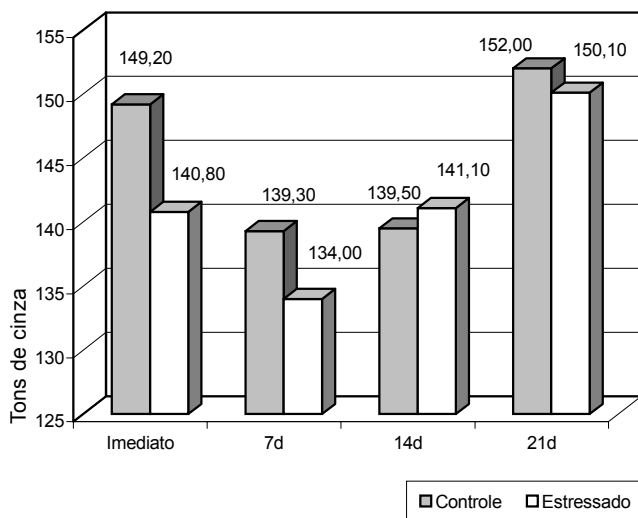


Figura 1 – Média da densidade óptica dos ratos do grupo controle e estressado.

Não ocorreu diferença estatística de forma significativa entre os grupos, entretanto pode se observar que as médias do grupo de ratos que foram submetidos ao estresse foram sempre menores, ou seja, menor grau de reparação óssea.

DISCUSSÃO

A reparação óssea sob a influência do estresse, ainda, constitui um verdadeiro desafio para profissionais da área de saúde. Este desafio tem levado muitos pesquisadores a trabalharem em busca de novas técnicas e dispositivos que auxiliem o processo de reparação óssea.

O presente trabalho analisou, pelo método radiográfico digital, a densidade óptica das imagens radiográficas das tíbias de ratos submetidas a defeitos ósseos. Estes ratos foram submetidos ao estresse social atuando sobre a reparação óssea, nesse sentido procuramos mostrar a eficácia e uma correlação positiva entre métodos densitométricos radiográficos digitais, e histológicos, na avaliação do processo de reparação óssea. Portanto foi intuito do presente trabalho de pesquisa demonstrar que o método de avaliação da reparação óssea por meio da radiografia digital é eficaz e viável, mostrando a importância de nosso trabalho para contribuir com esse método de análise.

Segundo Nelvig et al.¹⁵ (1992), são dois conceitos no que diz respeito à formação de captação das imagens: o primeiro utiliza-se de um sensor um dispositivo, CCD (*charge couple device*), acoplado a um microcomputador e o outro sistema apresenta como fóton-detector uma placa óptica de sais de fósforo que possui similaridade em tamanho e

espessura com o filme periapical, necessitando de um scanner para o fornecimento da imagem após a exposição aos raios-X.

A reparação óssea segue os mesmos princípios da reparação no tecido conjuntivo ou em outros tecidos mesenquimais. Estas são ativadas pelos hormônios do crescimento, tireóideos e paratireóideos e inibidas pela calcitonina e cortisona. Uma interrupção temporária do suprimento sanguíneo com a associação de desvitalização e necrose do tecido ósseo resulta na ativação da reparação óssea, este processo pode ser interrompido por ação do estresse.

Os estudos de Selye²² (1946) trouxeram uma contribuição inigualável aos conceitos e pesquisas na área de estresse e ele definiu o estresse como sendo o denominador comum de todas as reações de adaptação do corpo, isto é, como o estado manifestado por uma síndrome específica, constituído por todas as alterações inespecíficas produzidas em um sistema biológico. Além do mais, formulou uma teoria de resposta ao estresse prolongado, como parte do mecanismo de adaptação individual que pode acarretar sinais e sintomas clínicos denominados síndrome geral de adaptação. Assim, o estresse atuaria justamente sobre este conjunto de eventos levando à diversas alterações fisiológicas no organismo, estimulando várias respostas hormonais, entre elas a secreção de glicocorticóides desencadeando um desequilíbrio endócrino do organismo produzindo marcantes alterações: interferência no processo de cicatrização, principalmente na inibição da atividade de osteoblastos e fibroblastos e aumento de atividade dos osteoclastos, retardando o processo de reparação óssea. Isto vem colaborar com nossos achados neste experimento, pois os animais que foram submetidos a agentes estressores, quando comparados com aos do grupo controle, apresentaram alterações, moderadas, no processo de reparação óssea, havendo atraso cronológico no processo de reparação óssea. Este atraso pode estar relacionado ao estresse que os ratos foram submetidos.

Foi constatado, também, por Alves et al.² (1989) que os estresses pré e pós-exodônticos provocaram um atraso considerável na cronologia do processo de reparo alveolar em feridas de extração dental em ratos, sendo que no estresse pós-exodônticos provocaram maior atraso na reparação.

Os estímulos estressores promovem aumentos dos níveis séricos de cortisol, de prolactina, testosterona e, dependendo da natureza do agente

estressor, aumento ou diminuição dos níveis de hormônio do crescimento, Guyton¹¹ (1992). A produção aumentada de cortisol tem efeito linfocitolítico, inibe a mobilização de macrófagos, a migração de polimorfonucleares e a síntese de anticorpos humorais Palmblad¹⁶ (1977).

Grandes doses de cortisol provocam redução do nível de imunidade do organismo o que pode resultar em alterações na resposta às doenças, nos processos de inflamação e infecção, Guyton¹¹ (1992). Os efeitos deste hormônio no organismo podem explicar a interferência do estresse sobre a reparação tecidual.

O atraso no processo de reparação óssea observada no grupo controle, do 14º, não é representativo quando comparado com o resultado final analisando-se os dois grupos. Há que se ressaltar que nossa metodologia não permitiu explicar esse evento.

CONCLUSÃO

Apesar do resultado do trabalho não apresentar diferença estatística significativa, nosso estudo, comprovou que o estresse influenciou no processo de reparação óssea, confirmando as pesquisas de Alves e Okamoto² (1989) que relataram a influência do estresse sobre a cronologia da reparação óssea. Portanto, concluímos que, De acordo com a metodologia empregada em nosso trabalho podemos afirmar que o estresse, realmente, tem ação retardadora sobre o processo de reparação óssea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida JDA, Carvalho YR, Rocha RF, Arisawa EALA. Estudo da reparação óssea em mandíbula de ratos. Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos. 2000;3:49-53.
2. Alves MCR, Okamoto T. Influência do stress no processo de reparo em feridas de extração dental. Estudo histológico em ratos. Rev Odontol Unesp 1989;18:119-30.
3. Arisawa EALA, Rocha RF, Carvalho YR, Moraes E, Almeida JD. Influência da calcitonina na reparação óssea de tíbias de ratas ovariectomizadas. Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos. 2000;3:54-8.
4. Boulouard R. Influence of the application of hypothermia and reheating on the titer of plasma adrenocortical hormones in the rat. Ann Endocrinol. 1963;24:57-67.
5. Brooks SL, Miles DA. Advances in diagnostic imaging in dentistry. Den Clin North Am. 1993; 37:91-111.
6. Canalis E. The hormonal and local regulation of bone formation. Endocr Rev 1983;4:62-7.

7. Cash JD, Woodfield DG. Fibrinolytic response to moderate, exhaustive and prolonged exercise in normal subjects. Nature. 1967;215.
8. Demarest KT, Moore KE, Riegle GD. Acute restraint stress decreases tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity: evidence for a differential response in male versus female rats. Neuroendocrinology. 1985;41:504-10.
9. Gillman T. Inhibiting effect of 2:4 - Dinitrophenol on calciferol-induced metastatic calcification in the rat. Nature. 1961;189-317.
10. Gupta O. Effects of stress on the periodontium of the hamster. J Dent Res. 1959;38:724.
11. Guyton HC. Fisiologia: Tratado de fisiologia médica. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992.
12. Hämmerle CH, Schmid J, Olah AJ, Lang NP. A novel model system for the study of experimental guided bone formation in humans. Clin Oral Implants Res. 1996;7(1):38-47.
13. Junqueira LC, Carneiro C. Histologia: Histologia básica. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan; 1990.
14. Lisboa SM, Costa-cruz, TA, Sarsur Neto JM. Possíveis alterações fisiológicas induzidas pelo estresse em ratos. Rev Farm e Bioq. 1983;2:123-34.
15. Nelvig P, Wing K, Welander U, Sen-A-Ray. A new system for direct digital intraoral radiography. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1992;74(6):818-23.
16. Palmblad J, Blomback M, Egberg N. Experimentally induced stress in man: effects of blood coagulation and fibrinolyses. J Psychosom Res. 1997;21(87).
17. Potash MS. Stress and distress in dental practice. In: Jong A. Dental public health and community dentistry. USA; 1981. p.240-61.
18. Raisz LG, Kream BE. Regulation of bone formation (second of two parts). N Engl J Med. 1983;309(2): 83-9.
19. Rezende MCRA, Okamoto T. Influência do "stress" no processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. Rev odontol Unesp. 1989;18(1/2):119-30.
20. Roubicek CB. Stress adaptation in the rat as measured by postweaning growth. Growth. 1966; 30:79-85.
21. Russo MC, Okamoto T, Santos-Pinto R. Parathormone effect on the healing of extraction wounds in rat. Histological Study. Bull. Tokyo Dent Coll. 1969;10:12-8.
22. Selye H. The alarm reaction and diseases of adaptation. Ann Int Med. 1946;26.
23. Shklar G, Glickman I. The effects of cold as a stressor agent upon the periodontium of albino rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1959;12: 1311-20.
24. Sonis ST, Fazio RC, Fang L. Medicina oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1989.
25. Storey E. The influence of adrenal cortical hormones on bone formation and resorption chin. Orthoped. 1963;30:197-217.

Recebido para publicação em: 06/06/2005; aceito em: 03/08/2005.

Endereço para correspondência:

MILTON GONÇALVES SOARES
Faculdade de Odontologia do Campus de
São José dos Campos – UNESP
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia – Disciplina de Radiologia
Av. Engenheiro Francisco José Longo, 777 – Jardim São Dimas
CEP 12245-000, São José dos Campos, SP, Brasil
Fone: (11) 3947-9054
E-mail: milton-goncalves@ig.com.br