

**ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E  
HISTOMORFOMÉTRICO DOS TECIDOS  
IRRADIADOS E TRATAMENTO DA  
OSTEORRADIONECROSE DE MANDÍBULA E  
MAXILA COM CIRURGIA E OXIGENAÇÃO  
HIPERBÁRICA ADJUVANTE**

**MARCOS MARTINS CURI**

**Tese de Doutorado apresentada à Fundação  
Antônio Prudente para obtenção do Grau de  
Doutor em Ciências.**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**

**Co-orientador: Dr. Gilles Landman**

**São Paulo  
2002**



#### FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa  
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Curi, Marcos Martins

**Estudo histopatológico e histomorfométrico dos tecidos irradiados e tratamento da osteorradionecrose de mandíbula e maxila com cirurgia e oxigenação hiperbárica adjuvante** / Marcos Martins Curi. -- São Paulo, 2002. 123p.

Tese(doutorado)–Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Luiz Paulo Kowalski.

Descritores: 1. OSTEORRADIONECROSE/patogênese/tratamento. 2. MANDÍBULA. 3. MAXILA. 4. OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA. 5. LESÕES TECIDUAIS DA RADIAÇÃO.

**Dedico este trabalho:**

**À ROBERTO JOSÉ CURI e FLORA  
LÚCIA MARTINS CURI**, meus pais, pela  
dedicação, carinho e por todos os sacrifícios  
durante minha formação.

**À FLÁVIA, ROBERTO E DANIELA**,  
meus irmãos pelo apoio e incentivo na minha  
profissão.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao **Prof. Dr. RICARDO RENZO BRENTANI**, Diretor do Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer e Presidente da Fundação Antônio Prudente, pela oportunidade e incentivo à pesquisa científica.

Ao **Dr. HUMBERTO TORLONI**, Diretor do Centro de Pesquisas da Fundação Antônio Prudente, por estar sempre presente para auxiliar a realização deste trabalho.

Os meus sinceros agradecimentos ao **Prof. Dr. LUIZ PAULO KOWALSKI**, Diretor do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, pela orientação prestada e pelo incentivo permanente na realização deste trabalho acadêmico.

Ao **Dr. LUIZ FERNANDO LIMA REIS**, Diretor da Pós-Graduação, pela oportunidade, incentivo e orientação durante todo o período de realização deste trabalho.

Ao **Dr. LUCIANO LAURIA DIB**, colega profissional e Diretor do Departamento de Estomatologia, pelo apoio na realização deste trabalho acadêmico.



À **Dra. MANOELA DOMINGUES MARTINS**, patologista bucal, Professora de Patologia Bucal das Universidades (UNIB, UBC, FMU e UNIMES) pela essencial colaboração na realização do estudo histopatológico deste trabalho.

Ao **Dr. MOACYR DOMINGOS NOVELLI**, chefe do Laboratório de Informática Desenvolvido para Odontologia da Disciplina de Patologia Geral da Faculdade de Odontologia - USP, pela oportunidade e orientação da metodologia histomorfométrica usada neste trabalho.

Ao **Dr. GILLES LANDMAN**, titular do Departamento de Anatomia Patológica, pela ajuda e orientação neste trabalho acadêmico.

À **Dra. KARINA DE CÁSSIA BRAGA RIBEIRO**, responsável pelo Registro Hospitalar de Câncer – Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer, pela orientação e realização das análises estatísticas deste trabalho.

À **Prof. Dra. MÁRCIA MARTINS MARQUES**, professora livre docente em Patologia Bucal e professora do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da USP, pelo auxílio na confecção das fotomicrografias.

Aos amigos e colegas profissionais, **MARCOA ANTÔNIO TREVIZANI MARTINS** e **LUÍS MARCELO SÊNEDA**, e funcionários da Clínica

Odontológica e Diagnóstico por Imagem, pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho.

À **Sra. ANA MARIA RODRIGUES ALVES KUNINARI**, Coordenadora da Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente, pela dedicação na solução dos problemas e revisão ortográfica deste trabalho.

À funcionária da pós-graduação, **Sra. MÁRCIA MIWA HIRATANI**, pela ajuda na elaboração gráfica deste trabalho e participação das atividades diárias da pós-graduação.

Aos funcionários do Arquivos de Anatomia Patológica, em especial ao **Sr. JAIME DOMINGUES OLIVEIRA SOBRINHO** e **Sr. SEVERINO DA SILVA FERREIRA**, pelo auxílio na busca de blocos de parafina e lâminas revisados neste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica do Instituto Ludwig, em especial à **Sra. SUELY NONOGAKI**, **Sr. CARLOS FERREIRA NASCIMENTO** e **Sra. MYUKI FUKUDA**, pelo auxílio na realização do estudo imunohistoquímico e confecção das lâminas deste trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca, em especial à **Sra. SUELY FRANCISCO** e à **Sra. ROSINÉIA AGUIAR CARNEIRO**, pelo auxílio no levantamento e revisão das referências bibliográficas deste trabalho.

À **Sra. HIRDE CONTESINI**, Responsável pelo Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer, pelo auxílio na coleta e estudos dos prontuários.

Aos colegas, residentes (**RAFAELA, MAURÍCIO, RICARDO E LÍGIA**) e funcionários do Departamento de Estomatologia, em especial à **Sra. MÁRCIA SIMÃO FERNANDES** e **Sr. JUSCELINO COSTA**, pelo apoio e paciência na realização deste trabalho.

Ao Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer – Fundação Antônio Prudente e seus pacientes, pela minha formação e elaboração deste trabalho.

Finalmente, a todos aqueles que diretamente ou indiretamente auxiliaram na realização desta tese, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

Curi MM. **Estudo histopatológico e histomorfométrico dos tecidos irradiados e tratamento da osteorradionecrose de mandíbula e maxila com cirurgia e oxigenação hiperbárica adjuvante.** São Paulo; 2002. [Tese de Doutorado – Fundação Antônio Prudente].

O manejo de pacientes irradiados para tratamento de carcinoma de cabeça e pescoço representa um desafio para as equipes multidisciplinares, pois a radioterapia resulta em lesões celulares e vasculares nos tecidos. Abordagem cirúrgica nos tecidos irradiados apresenta um índice elevado de complicações devido a presença de um tecido hipocelular, hipovascular e hipóxico. As alterações histomorfológicas do tecido irradiado são os principais aspectos que o cirurgião deve considerar no momento da manipulação de pacientes após a radioterapia. Informações a respeito da recuperação dos tecidos, quando e caso ocorra este fato, são importantes no planejamento do tratamento da osteorradionecrose e na própria proteção dos pacientes.

**Objetivos.** Este estudo tem como objetivos analisar a efetividade da cirurgia associada à oxigenação hiperbárica adjuvante no tratamento da ORN refratária de mandíbula e maxila, bem como avaliar as alterações



histopatológicas e histomorfométricas da radiação no osso mandibular e na mucosa bucal adjacente.

**Material e Métodos.** O presente estudo analisou 18 pacientes submetidos ao tratamento de cirurgia e oxigenação hiperbárica adjuvante, os quais mostraram-se refratários ao tratamento conservador para osteorradioneecrose. Para a análise histopatológica utilizou-se 55 amostras irradiadas de osso mandibular e mucosa bucal, resultantes de cirurgias de resgate em pacientes portadores de carcinoma de boca previamente irradiados, e de tratamento de osteorradioneecrose de mandíbula. Todas amostras foram coradas com hematoxilina-eosina para avaliações histopatológica e histomorfométrica. As análises histomorfométricas foram realizadas através de um programa de computador conectado a um microscópio. A avaliação das alterações vasculares foi feita por meio de técnica de imunohistoquímica com anticorpos monoclonais específicos (CD34) para células endoteliais. As lesões teciduais da radiação foram avaliadas de acordo com o intervalo após o tratamento radioterápico. Amostras não irradiadas de osso mandibular e mucosas bucais foram utilizadas como controle.

**Resultados.** O tratamento de cirurgia associada à oxigenação hiperbárica apresentou resposta satisfatória (cura) em 14 pacientes, resposta parcial (melhora dos sinais e sintomas) em 3 pacientes, e um paciente não apresentou nenhuma melhora. As análises histomorfométricas revelaram uma significativa redução de celularidade ( $p = 0,007$ ) e de densidade vascular ( $p < 0,001$ ) nas amostras irradiadas quando comparadas com amostras controle. Da mesma maneira, as amostras irradiadas também apresentaram um aumento significativo de fibrose em comparação às amostras controle ( $p < 0,001$ ).

**Conclusão.** Os resultados deste estudo mostram que a cirurgia associada à oxigenação hiperbárica é bastante efetiva no tratamento da osteorradioneecrose refratária de mandíbula e maxila. Os resultados histopatológicos mostram que as lesões teciduais da radiação afetam tanto o osso mandibular como também o tecido mole adjacente. Estas alterações foram observadas nas células, no tecido conjuntivo e no sistema vascular dos tecidos irradiados. Todas amostras irradiadas mostraram reduzida capacidade de recuperação tecidual após a radioterapia. As alterações teciduais da radiação parecem progressivas após a radioterapia.

## SUMMARY

Curi MM. **Estudo histopatológico e histomorfométrico dos tecidos irradiados e tratamento da osteorradionecrose de mandíbula e maxila com cirurgia e oxigenação hiperbárica adjuvante.** [Management of refractory osteoradionecrosis of the jaws with surgery and adjunctive hyperbaric oxygen therapy. Histopathologic and histomorphometric analysis of irradiation injury of bone and surrounding soft tissues of the jaws]. São Paulo (BR); 2002. [Tese de Doutorado – Fundação Antônio Prudente].

**Background.** Management of irradiated head and neck cancer patients remains a difficult and challenging problem. Radiotherapy leads to damage of tissue cells and vasculature. Surgery in such compromised tissue has an increased complication rate because development of hypovascular-hypocellular-hypoxic tissue. These histomorphological changes in irradiated bone are of major concern to oral and maxillofacial surgeons who must consider how to manage patients after therapeutic radiation. Information on whether or when the patient may recover from such changes is also important for the schedule of treatment of osteoradionecrosis and proper protection of the patient.

**Objectives.** This study aimed to determine the effectiveness of surgery and hyperbaric oxygen treatment in the management of refractory

osteoradionecrosis of the jaws. This study was also undertaken to histopathologically and histomorphometrically analyze the irradiation injury of bone and the surrounding soft tissues of the jaws.

**Material and Methods.** Eighteen patients who had been previously treated with conservative measures and failed to respond to this therapy, were submitted to surgery and hyperbaric oxygen treatment. Fifty-five human mandibular bone and soft tissues specimens obtained from surgical procedures for treatment of osteoradionecrosis of the jaws or during head and neck salvage surgery after radiotherapy were used in this study. All specimens were stained with hematoxylin and eosin for histomorphometric and histological evaluation. Histomorphometric analysis used a light microscope connected to a microcomputer and a software. The study analyzed also the expression of CD34 in all specimens by immunohistological technique using paraffin-embedded tissue and specific anti-human CD34 monoclonal antibody. Each histologic specimen was assessed as a function of time since treatment with radiation to develop a relative time course of radiation tissue injury. Normal human mandibular bone and oral mucosa were used as control specimens.



**Results.** Among 18 patients who had undergone this treatment, 14 patients had complete healing, 3 patients had improved and one patient did not show any improvement. Histomorphometric analysis revealed a significant hypocellularity in irradiated specimens compared to control specimens ( $p = 0.007$ ). Similarly, the fibrosis increased significantly after irradiation compared to control specimens ( $p < 0.001$ ). Loss of microvascular content (hypovascularity) was significantly in irradiated specimens than control specimens ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion.** In conclusion, surgery and hyperbaric oxygen therapy showed satisfactory results in the management of refractory osteoradionecrosis of the jaws. Our histopathologic results concluded that radiation injuries affects both the bone and the surrounding soft tissues. These radiation effects were observed on the bone cells, on the connective tissue and, on the fine vasculature in these tissues. All irradiated tissues showed reduced spontaneous capacity of recovering with time. Radiation tissue injury seems to be time progressive.

## ÍNDICE

|                                                                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                         | <b>1</b>  |
| 1.1 Osteorradionecrose.....                                                                                                       | 1         |
| 1.2 Oxigenação Hiperbárica.....                                                                                                   | 7         |
| 1.2.1 Informações Gerais .....                                                                                                    | 7         |
| 1.2.2 Estudos experimentais.....                                                                                                  | 12        |
| 1.2.3 Estudos clínicos.....                                                                                                       | 15        |
| 1.3 Efeitos Teciduais da Radiação .....                                                                                           | 22        |
| 1.3.1 Informações Gerais .....                                                                                                    | 22        |
| 1.3.2 Efeitos da radiação no tecido ósseo .....                                                                                   | 24        |
| 1.4 Metodologia e Análise histomorfométrica.....                                                                                  | 28        |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                                                                                                          | <b>31</b> |
| <b>3. ARTIGOS .....</b>                                                                                                           | <b>33</b> |
| <i>Artigo I – “Management of refractory osteoradionecrosis of the jaws with surgery and adjunctive hyperbaric oxygen therapy”</i> |           |
| 3.1 Abstract.....                                                                                                                 | 35        |
| 3.2 Introduction.....                                                                                                             | 36        |
| 3.3 Patients and Methods.....                                                                                                     | 38        |
| 3.4 Results .....                                                                                                                 | 39        |
| 3.5 Discussion .....                                                                                                              | 40        |
| 3.6 Tables.....                                                                                                                   | 44        |
| <i>Artigo II – “Histopathologic and histomorphometric analysis of irradiation injury of bone and soft tissue of the jaws”</i>     |           |
| 3.1 Abstract.....                                                                                                                 | 51        |

|                                        |        |
|----------------------------------------|--------|
| 3.2 Introduction.....                  | 53     |
| 3.3 Material and Methods.....          | 55     |
| 3.4 Results .....                      | 59     |
| 3.5 Discussion .....                   | 62     |
| 3.6 Legends .....                      | 72     |
| 3.8 Figures .....                      | 74     |
| <br>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....      | <br>83 |
| <br>5. CONCLUSÕES .....                | <br>89 |
| <br>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | <br>92 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Osteorradionecrose

A cirurgia combinada à radioterapia são modalidades terapêuticas bem estabelecidas no tratamento dos tumores avançados de cabeça e pescoço. Nas últimas décadas, a radioterapia tem apresentado avanços significativos, em razão da melhor adequação de suas técnicas e da introdução de novos aparelhos no tratamento destes tumores. Estes avanços das modalidades terapêuticas refletiram no aumento dos índices de sobrevida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço, mas não eliminaram a possibilidade de aparecimento de seqüelas.

Exceto a recorrência tumoral, a complicação bucal mais grave advinda do tratamento radioterápico dos tumores de cabeça e pescoço é a osteorradionecrose (BEDWINICK et al. 1976; MORRISH et al. 1981; KLUTH et al. 1988; KOKA et al. 1990; THORN et al. 2000). Esta seqüela é caracterizada pelo defeito de cicatrização induzida pelos efeitos teciduais da radiação.

Osteorradionecrose é uma seqüela caracterizada clinicamente pela perda da mucosa de revestimento e/ou do tecido cutâneo da região da boca, com conseqüente exposição do tecido ósseo necrótico por um determinado período de tempo (EPSTEIN et al. 1997). Esta exposição óssea é geralmente acompanhada de outros sinais e sintomas, como por exemplo, drenagem de secreção purulenta por fístulas orais e/ou cutâneas, trismo, algia, desconforto e dificuldades mastigatórias. O diagnóstico da osteorradionecrose é baseado na história médica pregressa do paciente,

associada aos aspectos clínicos e radiográficos. O exame histológico é indicado nos casos de dúvida no diagnóstico diferencial de recorrências tumorais, metástases e processos infecciosos crônicos (CURI et al. 2000).

Apesar dos avanços tecnológicos dos aparelhos de radioterapia e da melhoria das técnicas cirúrgicas, a incidência de osteorradionecrose não tem diminuído nas últimas décadas. Dependendo da instituição analisada, a incidência de osteorradionecrose tem variado de 1% a 40% (BEDWINICK et al. 1976; MORRISH et al. 1981; MARX 1983; EPSTEIN et al. 1987a e b; CLAYMAN 1997; THORN et al. 2000).

O comportamento clínico da osteorradionecrose é variável e dependente de uma série de fatores, mas principalmente da quantidade total de dose recebida pelos tecidos. Clinicamente, esta seqüela pode apresentar quadros crônicos, caracterizados por exposições ósseas pequenas, estáveis e assintomáticas, ou por quadros agudos, com exposições ósseas extensas, progressivas e sintomáticos, que muitas vezes evoluem com fratura patológica do osso afetado. Essa variação de comportamento clínico está relacionada com as amplitudes das lesões induzidas pela radiação nos tecidos.

Apesar da patogênese da osteorradionecrose não ser completamente compreendida, por muito tempo, a osteorradionecrose foi considerada uma osteomielite do osso irradiado, resultante da tríade de radiação, trauma e infecção. Vários termos foram utilizados para osteorradionecrose naquela época, como por exemplo, osteonecrose de radiação, osteíte de radiação, osteodisplasia de radiação, radio-necrose e radio-mielite. Autores da época também discutiram a inadequada



terminologia para casos de necrose óssea asséptica (“radio-osteonecrose”) e para casos infectados seguidos de seqüestração, denominados como radio-osteomielites (PAPPAS 1969). Estes autores também sugeriam a separação de duas condições induzidas pela radiação com diferentes aspectos histológicos, clínicos e radiográficos. A primeira condição, denominada de radio-necrose, caracterizada pela perda da vitalidade tecidual em razão das alterações vasculares e celulares; a segunda condição, o osso irradiado exposto era complicado por infecção (trauma-induzida) seguido da seqüestração, referido como radio-osteomielite. A partir da redefinição proposta por MARX (1983), osteorradionecrose passou a ser caracterizada como uma deficiência metabólica da homeostasia dos tecidos, devido às lesões vasculares e celulares induzidas pela radiação.

Assim, a patogênese da osteorradionecrose passou a ser caracterizada por uma seqüência de radiação, formação de um tecido hipovascular-hipocelular-hipóxico, com o conseqüente rompimento da barreira protetora da mucosa bucal (de maneira espontânea ou traumática), resultando em um processo não cicatrizante (MARX 1983). Este mesmo autor também demonstrou que os microorganismos não apresentam um papel na patogênese da osteorradionecrose, mas apenas de contaminação do tecido ósseo exposto. O papel de determinados microorganismos na patogênese da osteorradionecrose ainda não é bem conhecido, mas podem influenciar na extensão do tratamento, caso não diagnosticados e tratados (CURI et al. 2000). Baseados nesses novos conceitos de patogênese da osteorradionecrose, seu tratamento tem sido consideravelmente modificado nos últimos anos (MAINOUS e HART 1975; MARX 1983; EPSTEIN et al. 1987a; FATTORE e STRAUSS 1987; KOKA et al.

1990; MERKESTEYN et al. 1995; SHAHA et al. 1996; CURI e DIB 1997; NEOVIOUS et al. 1997; WONG et al. 1997; AITASALO et al. 1998; LONDON et al. 1998; HAO et al. 1999; CURI et al. 2000; MAIER et al. 2000).

Existe um debate na literatura a respeito da capacidade de cicatrização, lenta e progressiva, ou não da osteorradionecrose (BEUMER et al. 1983a; EPSTEIN et al. 1987; CURI e DIB 1997; WONG et al. 1997). Vários fatores podem influenciar na capacidade de cicatrização ou não da osteorradionecrose, mas este aspecto parece estar diretamente relacionado com a intensidade das lesões teciduais da radiação. O comportamento clínico da osteorradionecrose pode ser considerado a expressão clínica destas alterações teciduais e, portanto, o conhecimento desta fisiopatologia é importante para o direcionamento do seu tratamento.

O tratamento da osteorradionecrose não pode ser estabelecido com um protocolo rígido para todos pacientes, mas avaliado individualmente em cada caso. Atualmente não existe uma padronização universalmente aceita por todas as instituições. Vários tipos de tratamento para osteorradionecrose de maxila e mandíbula são utilizados na literatura, variando entre manejos conservadores, cirurgias e terapias adjuvantes (MAINOUS e HART 1975; MARX 1983; EPSTEIN et al. 1987a; FATTORE e STRAUSS 1987; KOKA et al. 1990; GALLER et al. 1992; GRANSTROM et al. 1992; MERKESTEYN et al 1995; SHAHA et al. 1996; CURI e DIB 1997; NEOVIOUS et al. 1997; WONG et al. 1997; AITASALO et al. 1998; LONDON et al. 1998; HAO et al. 1999; CURI et al. 2000; MAIER et al. 2000). As terapias conservadoras, como sequestrectomia e decorticação, são indicadas para casos crônicos de pequenas exposições ósseas e que podem apresentar capacidade de

cicatrização espontânea. A abordagem cirúrgica é reservada para os casos agudos e refratários à terapia conservadora, e que não apresentam capacidade de cicatrização sem uma intervenção cirúrgica.

BEUMER et al. (1983a), reportaram que exposições ósseas limitadas à zona de gengiva inserida são particularmente responsivas ao tratamento conservador, sem existir necessidade de cirurgia e oxigenação hiperbárica. O tratamento conservador apresentou resolução (não exposição óssea e recobrimento por mucosa) em 15 (75%) de 20 pacientes tratados conservadoramente. Apenas 3 (15%) pacientes apresentaram evolução insatisfatória e necessitaram de tratamento cirúrgico associado à oxigenação hiperbárica. Esses mesmos autores destacaram que nenhuma diferença foi observada na resposta ao tratamento conservador em relação à osteorradionecrose trauma-induzidas e espontâneas.

BEUMER et al. (1983b), publicaram um outro estudo com 120 pacientes submetidos à exodontias pré-radioterapia, com o desenvolvimento de osteorradionecrose em 17 (14,1%) desses pacientes. Treze pacientes foram tratados com terapia conservadora, sendo que 11 pacientes responderam satisfatoriamente, com a resolução completa da osteorradionecrose. Os autores concluíram nesse estudo, que uma avaliação odontológica criteriosa e exodontias seletivas podem minimizar o risco de osteorradionecrose.

WONG et al. (1997), apresentaram um estudo retrospectivo com 32 pacientes portadores de osteorradionecrose de mandíbula, tratados de maneira conservadora. Três pacientes morreram antes da análise final do estudo. Dos 29 pacientes avaliados, 14 (48%) apresentaram resolução completa da



osteorradição. Além disso, 19 (69%) dos 29 pacientes não necessitaram de cirurgia e/ou oxigenação hiperbárica, devido à resolução e melhoria dos sinais e sintomas da osteorradição. Esses autores destacaram que os casos em que a resolução não foi obtida, o quadro permaneceu assintomático e com a função preservada, o que seria aceitável em pacientes com idade avançada ou aqueles que desejassem evitar novas cirurgias.

CURI e DIB (1997), avaliaram retrospectivamente 104 pacientes portadores de osteorradição em mandíbula e maxila tratados conservadoramente. Os critérios de resolução da osteorradição nesse estudo foram a não identificação de tecido ósseo necrótico exposto e o recobrimento por mucosa normal. Quarenta e quatro (42,3%) casos obtiveram cura, 34 (32,6%) casos permaneceram estáveis e assintomáticos, e 26 (25,1%) casos apresentaram quadro agudo e progressivo. Dez pacientes evoluíram com fratura patológica de mandíbula, entretanto, todos recusaram cirurgias reconstrutoras após a cura da osteorradição.

Um sinal clínico-radiográfico importante apontado na literatura para a opção por uma terapia conservadora no manejo da osteorradição, é a identificação da formação de sequestro ósseo (MARX 1983). Sequestro ósseo é uma porção de osso, que se separa do leito ósseo remanescente durante o processo de necrose, sendo indicativo de um processo de defesa do organismo através do isolamento da área necrótica. A grande quantidade de osso necrótico presente nos quadros de osteorradição impede que a reparação ocorra de maneira satisfatória. Portanto, pequenos procedimentos cirúrgicos (sequestrectomias) facilitam a epitelização e cicatrização da osteorradição. Outra consideração importante

recompressão do paciente em câmaras hiperbáricas ajuda a eliminação das bolhas intravasculares, por meio da diminuição de suas dimensões e a eliminação natural pela respiração.

A radioterapia utilizada freqüentemente no tratamento dos tumores de cabeça e pescoço, resulta em danos celulares e vasculares reversíveis e/ou irreversíveis aos tecidos irradiados. As lesões da radioterapia obedecem uma seqüência patológica caracterizada pela radiação, que induz a formação de um tecido hipóxico-hipocelular-hipovascular, que pode espontaneamente evoluir para necrose e perder grande parte da sua capacidade de cicatrização. Portanto, alterações de cicatrização são inerentes a todo tecido irradiado, em variado grau de intensidade em cada caso.

Apesar de não existir um protocolo de tratamento para a osteorradionecrose universalmente aceito em literatura, vários estudos experimentais e clínicos têm demonstrado a eficácia da oxigenação hiperbárica na prevenção e tratamento da osteorradionecrose, como também nas reconstruções dos defeitos ósseos e moles de tecidos irradiados (MARX 1984; MARX e JOHNSON 1987; FATTORE e STRAUSS 1987; KING et al. 1989; EPSTEIN et al. 1997; NEOVUIS et al. 1997; MAIER et al. 2000). Em 1975, MAINOUS e HART foram os primeiros autores a reportarem resultados satisfatórios da utilização de oxigenação hiperbárica no tratamento de 14 casos de osteorradionecroses refratárias de mandíbula.

A terapia com oxigenação hiperbárica tem a finalidade de aumentar a tensão de oxigênio nos tecidos, e com isto, promover e aumentar a capacidade de cicatrização do tecido hipóxico irradiado. O exato mecanismo desta ação ainda não é



completamente conhecido, mas os níveis aumentados de oxigênio induzem a angiogênese e a fibroplasia no tecido hipocelular-hipovascular-hipóxico induzido pela radiação ( MARX e JOHNSON 1987).

Atualmente existem protocolos bem estabelecidos de tratamento de osteorradionecrose com cirurgia e oxigenação hiperbárica adjuvante (FATTORE e STRAUSS 1987; MERKESTEYN et al. 1995; NEOVIUS et al. 1997; AITASALO et al. 1997; LAMBERT et al. 1997; CLAYMAN 1997; LONDON et al. 1998; HAO et al. 1999; MAIER et al. 2000). Nestes protocolos, são várias as razões da utilização da oxigenação hiperbárica. O principal motivo do seu uso é promover a revascularização do tecido irradiado e/ou infectado e estimular as atividades fibroblásticas. Portanto, o alvo principal não é o osso necrótico, mas sim, o osso e tecido mole viáveis que não foram completamente comprometidos pela radiação. O tecido ósseo necrótico somente pode ser removido através de cirurgia, portanto, a utilização de oxigenação hiperbárica deve ser feita de maneira adjuvante, com a finalidade de aumentar a capacidade de cicatrização do tecido irradiado, e prepará-lo para uma futura reconstrução.

A terapia de oxigenação hiperbárica é realizada com o paciente respirando oxigênio a 100%, com pressões elevadas ao redor de 2,0 – 3,0 pressões atmosféricas (equivalente a 15 - 20 mmHg), com duração de 60 minutos cada sessão, por meio de câmaras "*monoplace*" (capacidade de tratar 1 pessoa) ou "*multiplaces*" (capacidade de tratar várias pessoas simultaneamente). O oxigênio comporta-se como uma droga, caso seja utilizado doses muito baixas, apresentará um resultado terapêutico inadequado, e em altas doses, poderá tornar-se tóxico. No entanto, a

utilização do oxigênio em limites de doses bem conhecidos, torna o risco de toxicidade pelo oxigênio bastante remoto (em torno de 1,3/10.000 sessões) (MARX et al. 1990).

O principal meio de difusão do oxigênio para os tecidos é através do seu transporte pela hemoglobina presente nas hemáceas. Uma pequena fração de oxigênio é transportado, dissolvido, no plasma sangüíneo. A saturação de oxigênio na hemoglobina é quase completa (95% - 99%) na pressão atmosférica normal, sendo pequena a capacidade de aumentar a tensão de oxigênio para os tecidos através do transporte hemoglobina-dependente. Em contraste, a quantidade de oxigênio dissolvido no plasma sangüíneo pode ser aumentado muitas vezes com o uso da oxigenação hiperbárica. Outro ponto importante no tratamento com oxigenação hiperbárica é que, o aumento do oxigênio disponível a nível celular e dos tecidos parece não ser o estímulo para a indução da angiogênese propriamente dito. O estímulo está mais relacionado com a pressão atmosférica a qual o oxigênio é entregue nos tecidos (MARX et al. 1990).

O processo de reparo da osteorradionecrose, quando ocorre, é totalmente dependente da quantidade de oxigênio disponível nos tecidos. No entanto, a quantidade de oxigênio e outros nutrientes metabólicos necessários no processo reparacional é insuficiente nos quadros de osteorradionecrose. A tensão de oxigênio nos tecidos irradiados varia entre 5 mmHg a 15 mmHg. Em condições de hipóxia como da osteorradionecrose, os fibroblastos são capazes de sobreviver a este ambiente mas incapazes de sintetizar e secretar colágeno. A mesma dificuldade é observada pelos macrófagos dos tecidos, os quais são responsáveis pelo estímulo para o início da

angiogênese. Durante o tratamento do tecido irradiado com oxigenação hiperbárica, a tensão de oxigênio pode ser muito elevada e alcançar níveis entre 100 mmHg a 255 mmHg (LA VAN e HUNT 1990; MARX et al. 1990; ZHAO et al. 1994). Mesmo que os níveis de oxigênio nos tecidos retornem aos níveis preexistentes após cada sessão da terapia, os fibroblastos são suficientemente estimulados a sintetizarem colágeno, e os macrófagos a secretarem fatores quimiotáticos para a angiogênese durante as sessões (MARX et al. 1990). Assim, após sucessivas sessões de oxigenação hiperbárica, é observado um aumento significativo na quantidade de células e vasos sangüíneos. Terminado a terapia com oxigenação hiperbárica, a neovascularização pode alcançar níveis de oxigênio em torno de 80% do tecido normal (ao redor de 35 a 40 mmHg) (MARX e JOHNSON 1987; MARX et al. 1990). Esta terapia geralmente atinge sua estimulação máxima após 30 horas de exposição ao ambiente hiperbárico.

A teoria atualmente aceita do efeito da oxigenação hiperbárica nos tecidos foi resumida por PLAFKI et al. (1998). Esta teoria é baseada no aumento da solubilidade do oxigênio dentro do sangue promovido pela própria pressão. A respiração de oxigênio 100%, a 2,4 ATA [ATA = Pressão Atmosférica Absoluta, (1 ATA = 100kPa)] promove um aumento na pressão arterial de oxigênio em valores aproximados de 1800 mmHg (equivalente a 237kPa). Outro ponto é que, a capacidade de transporte da hemoglobina saturada é de aproximadamente 200 ml de oxigênio / litro de sangue, enquanto que durante o tratamento com oxigenação hiperbárica, este transporte no sangue apresenta um acréscimo de 60 - 70 ml oxigênio / litro. Outro aspecto interessante, é que a difusão do oxigênio é alterada, de acordo com o aumento do gradiente de concentração do capilar sangüíneo para as áreas periféricas. Nas



condições de pressões elevadas encontradas durante o tratamento com oxigenação hiperbárica, o gradiente de concentração é aumentado em aproximadamente 4 vezes quando comparado com condições normais de pressão, permitindo oxigenação suficiente para áreas de baixa densidade capilar.

### 1.2.1 Estudos experimentais de oxigenação hiperbárica

SHAW e BASSETT (1967), estudaram os efeitos de variadas concentrações de oxigênio na osteogênese *in vitro*. Baixas tensões de oxigênio afetaram negativamente a síntese de colágeno, sendo observado em algumas culturas a formação de cartilagem. Níveis intermediários de oxigênio resultaram na formação de tecido ósseo. Exposição excessiva a altas concentrações de oxigênio, causaram a destruição da cultura do tecido. Este estudo é freqüentemente citado como referência dos efeitos da oxigenação hiperbárica, no entanto, os autores não utilizaram oxigenação hiperbárica. Outros autores avaliaram a influência das concentrações de oxigênio nos osteoblastos *in vitro*. Baixas concentrações de oxigênio favoreceram a proliferação de osteoblastos, enquanto que, altos níveis de oxigênio estimularam síntese de macromoléculas (BRIGHTON et al. 1991; TUNCAY et al. 1994). Nenhum destes autores utilizaram oxigenação hiperbárica em seus estudos. No entanto, em razão da existência de hipóxia entre as sessões de oxigenação hiperbárica, os achados destes autores não estão conflitantes com o tratamento de oxigenação hiperbárica.

Vários estudos foram reportados sobre os efeitos da oxigenação hiperbárica no processo de cicatrização de fraturas ósseas em ratos (COULSON et al.

foi submetido ao tratamento com oxigenação hiperbárica (2,4 ATA, 90 minutos / sessão, 5 dias / semana para um total de 20 sessões). Todos animais foram sacrificados após o tratamento e analisados por histologia e micro-angiografia. Os resultados mostraram um aumento significativo da densidade vascular nos animais tratados com oxigenação hiperbárica em comparação aos animais tratados com oxigênio normobárico e ar atmosférico. Outro achado interessante foi que a resposta tecidual foi menos evidente na medula óssea que nos tecidos moles dos animais.

SIDDIQUI et al. (1997), mediram a tensão de oxigênio tecidual antes, durante e depois do tratamento com oxigenação hiperbárica, em um modelo experimental em orelhas de coelhos. A média de pressão parcial de oxigênio em orelhas não-isquêmicas de coelhos foi de aproximadamente 50 mmHg (6,6 kPa) no meio ambiente. A média de pressão parcial de oxigênio em orelhas isquêmicas de coelhos foi de aproximadamente 20 mmHg (2,6 kPa). Durante o tratamento com oxigenação hiperbárica, a pressão parcial de oxigênio foi elevado até 300 mmHg (40 kPa) em orelhas isquêmicas de coelhos. Neste estudo todas as pressões parciais de oxigênio retornaram aos níveis normais registrados antes do tratamento com oxigenação hiperbárica.

Baseado em estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*, conclui-se que o aumento da tensão de oxigênio pela oxigenação hiperbárica resulta em efeitos teciduais como: proliferação fibroblástica, aumento da formação de colágeno, angiogênese, aumento das atividades osteoblásticas e osteoclásticas, e aumento da mineralização e formação do calo ósseo (KETCHUM et al. 1970; HUNT e PAI 1972; WILCOX e KOLODNY 1976; MAINOUS 1982).



1966; YABLON e CRUESS 1968; WRAY e ROGERS 1968). Apesar da diferença dos modelos experimentais e dos protocolos de tratamento com oxigenação hiperbárica utilizado em cada um deles, foi observado uma melhora da cicatrização da fratura, por meio da maior deposição de cálcio e o aumento da formação do calo ósseo quando comparado com grupos controle.

NILSSON (1989) investigou os efeitos da oxigenação hiperbárica (2,8 ATA, 21 sessões, 120 minutos / sessão) no reparo ósseo, utilizando câmaras de titânio, colocados em ossos longos de coelhos, após a osteotomia destes ossos. Os resultados mostraram que os efeitos da oxigenação hiperbárica reduziram o trauma tecidual das osteotomias e aceleraram o crescimento ósseo no interior da câmara. Em contraste, WINET (1996) reportou resultados inconclusivos dos efeitos da oxigenação hiperbárica no reparo ósseo, utilizando o mesmo modelo experimental com coelhos. Os achados não apresentaram diferença com significância estatística entre os grupos controle e tratados com oxigenação hiperbárica, no que refere à osteogênese e angiogênese, apesar de apresentar uma tendência de maior vascularização. No entanto, o tratamento com oxigenação hiperbárica foi realizado a uma pressão de 0,18 ATA, pressão esta considerada mais baixa que a pressão do meio ambiente.

MARX et al. (1990), analisaram os efeitos da oxigenação hiperbárica na angiogênese de tecidos irradiados em um modelo de coelhos. Utilizando uma fonte de radiação ( $\text{Co } ^{60}$ ), as mandíbulas dos coelhos receberam 3,2 Gy em 2 frações / semana, num total de 17 frações (equivalente 60 Gy, fracionado em 2 Gy, 5 dias / semana, 30 doses). Após seis meses do tratamento radioterápico, um grupo de animais

### 1.2.2 Estudos clínicos de oxigenação hiperbárica

A utilização de oxigenação hiperbárica para o tratamento da osteorradionecrose foi introduzida, na década de 1970 por dois estudos clínicos (GREENWOOD e GILCHRIST 1973; MAINOUS e HART 1975). Desde então, vários autores reportaram os benefícios da oxigenação hiperbárica no tratamento e prevenção da osteorradionecrose (HART e MANIOUS 1976; FARMER et al. 1978; MANSFIELD et al. 1981; MARX 1983; MARX et al. 1985; MARX e JOHNSON 1987; GRANSTROM et al. 1992; LARSEN 1997; AITASALO et al. 1998; LONDON et al. 1998; MAIER et al 2000). A utilização da terapia de oxigênio hiperbárico é criticada por outros autores devido aos custos, inconveniência, e problemas relacionados com claustrofobia. MCKENZIE et al. (1993), reportaram que 15% dos pacientes portadores de osteorradionecrose de mandíbula tratados com oxigenação hiperbárica, não concluíram a terapia pelas razões acima mencionadas. BARAK et al. (1988) e MAXYMIW et al. (1991), também relataram que oxigenação hiperbárica seria uma terapia com grande consumo de tempo e de alto custo. EPSTEIN et al. (1987a), publicaram que a utilização de oxigenação hiperbárica na profilaxia de exodontias pós-radioterápicas poderia não ter reais benefício em relação ao seu custo.

A razão da utilização da oxigenação hiperbárica no tratamento da osteorradionecrose é de alterar o quadro de hipóxia, hipocelularidade e hipovascularização do tecido irradiado (MARX 1983). O protocolo de tratamento com oxigenação hiperbárica mais comumente utilizado foi proposto por MARX (1983),

mas também outros protocolos menos agressivos foram propostos por AITASALO et al. (1998). Atualmente os protocolos de tratamento de oxigenação hiperbárica são todos baseados em informações empíricas. Na atual literatura, existe somente um estudo prospectivo randomizado do efeito da oxigenação hiperbárica no osso irradiado (MARX et al. 1985). Neste estudo, o tratamento com oxigenação hiperbárica foi utilizado em pacientes irradiados com alto risco para exodontias, sendo observado uma incidência de osteorradionecrose de 5,4%, quando comparado com uma incidência de 29,9% em pacientes tratados com antibióticos e sem oxigenação hiperbárica.

FARMER et al. (1978), publicaram um estudo piloto da efetividade do tratamento combinado de cirurgia e oxigenação hiperbárica (2,0 ppm; 120 minutos/sessão; 40 -80 sessões), em 13 pacientes portadores de osteorradionecrose refratárias ao tratamento conservador. Sete casos apresentaram resolução completa no período de 11 a 27 meses após o tratamento, sendo que todos os casos remanescentes em que não se observou cura, houve melhora clínica e radiográfica em relação ao quadro inicial.

DAVIDS et al. (1979), reportaram o manejo de complicações dos tecidos irradiados em cabeça e pescoço, em 23 casos de osteorradionecrose de mandíbula, tratados com cirurgia e oxigenação hiperbárica adjuvante (2,4 ppm; 90 minutos/sessão; total 45 sessões). Após um período de 2 anos de seguimento, 19 casos apresentaram cura da osteorradionecrose. Nesse mesmo trabalho e com o mesmo protocolo de tratamento, os autores relataram o tratamento de necrose de tecidos moles, com resposta satisfatória em 15 dos 16 casos avaliados.

MARX e JOHNSON (1987), estudaram os efeitos da oxigenação hiperbárica nos tecidos irradiados através de análises histológicas e de perfusão tecidual. A análise da perfusão tecidual foi realizada com 112 pacientes irradiados mas sem evidências de osteorradionecrose. Todos pacientes foram submetidos à uma avaliação da tensão de oxigênio na porção mais central do campo de irradiação e comparados com áreas excluídas da região irradiada. As alterações de tensão de oxigênio foram relacionadas com os intervalos de tempo após a irradiação. Intervalos mais extensos após a radioterapia, apresentaram um aumento proporcional de perda vascular e, portanto, uma diminuição da perfusão tecidual em relação ao tempo. O estudo histopatológico de 64 pacientes submetidos a 72 Gy de irradiação para o tratamento de tumores malignos de boca, revelou alterações teciduais que foram correlacionadas com o tempo após a radiação. Seis processos histopatológicos foram identificados nestas amostras. Em ordem cronológica de aparecimento em relação ao tempo após a radiação foram hiperemia, endarterite, trombose, perda celular, hipovascularização e fibrose. Em geral, hiperemia e endarterite foram efeitos teciduais iniciais, observados logo após a irradiação, que persistiram até os primeiros 6 meses. Perda celular, hipovascularização e fibrose foram processos de ocorrência mais tardia, sendo um estágio final deste processo. Os pacientes (50 casos) submetidos aos estudos de perfusão tecidual e de análise histopatológica foram reavaliados pelas mesmas metodologias após o tratamento com oxigenação hiperbárica (20 sessões, 2,4 ATA, 90 minutos / sessão). Os resultados mostraram um aumento da tensão de oxigênio nos tecidos, resultado da melhor perfusão tecidual e da angiogênese. A análise



histopatológica revelou um menor ritmo de evolução das alterações teciduais e um aumento dos vasos e fibroblastos (fibroplasia).

MARX e JOHNSON (1988), apresentaram uma nova revisão dos seus estudos e mostraram que a oxigenação hiperbárica não afeta a perfusão tecidual de tecidos não-irradiados, portanto, indicativo que o tecido normal não sofre alterações com esta terapia. A análise de perfusão tecidual no centro das áreas irradiadas mostrou 3 fases distintas dos efeitos da oxigenação hiperbárica. Na primeira fase (até a 8ª sessão), houve um aumento da tensão de oxigênio tecidual em aproximadamente 30 % em relação aos tecidos não-irradiados. Na segunda fase (entre a 8ª e 23ª sessões), foi observado um crescimento rápido da tensão de oxigênio de até 82% dos valores encontrados no tecido normal. Na terceira fase, os registros transcutâneos de oxigênio estabilizaram-se na faixa de 85% em relação ao tecido normal. Os autores concluem que a correção do quadro de hipóxia tecidual e a eliminação dos íons de hidrogênio e lactato, reduziriam o estímulo para angiogênese.

MERKESTEYN et al. (1995), publicaram um estudo clínico retrospectivo, com 29 pacientes portadores de osteorradionecrose de mandíbula, tratados com cirurgia e oxigenação hiperbárica. A resolução completa da osteorradionecrose ocorreu em 20 (69%) pacientes, sendo que em 31% dos casos a cirurgia consistiu de ressecção com defeito ósseo. Os autores concluem que o tratamento combinado de cirurgia e oxigenação hiperbárica apresenta resultados satisfatórios, especialmente quando utilizados nas fases iniciais da doença, o que pode resultar em um número limitado de pacientes submetidos à ressecção óssea.

THORN et al. (1997), avaliaram a tensão de oxigênio na mucosa bucal de pacientes portadores de osteorradionecrose. Os resultados mostraram uma tensão média de oxigênio de 40,5 mmHg (5,3 kPa) para o grupo controle e uma tensão média de oxigênio de 20,4 mmHg para pacientes com osteorradionecrose, previamente ao tratamento com oxigenação hiperbárica. A tensão de oxigênio na mucosa foi gradualmente aumentada durante o tratamento com oxigenação hiperbárica. Após 5 sessões, a tensão de oxigênio na mucosa atingiu aumentos significativos comparado aos valores prévios à oxigenação hiperbárica. Os resultados finais, mostraram um aumento significativo da média de tensão de oxigênio na mucosa de 86% em relação aos valores da mucosa normal.

NEOVIUS et al. (1997), reportaram um estudo retrospectivo em 15 pacientes de cabeça e pescoço com complicações de cicatrização em tecidos moles irradiados. Todos pacientes foram irradiados (média de 64 Gy). Os 15 pacientes foram tratados com oxigenação hiperbárica (100% oxigênio; 2,5 ppm; 75 minutos/sessão; total de 30 sessões) e comparados com um estudo prévio, sem o uso de oxigenação hiperbárica. No grupo tratado com oxigenação hiperbárica, 12 dos 15 pacientes evoluíram com cicatrização completa, 2 casos com cicatrização parcial e 1 sem nenhuma resposta. No grupo controle, apenas 7 dos 15 casos apresentaram sinais de cicatrização mas todos através de intervenções cirúrgicas, sendo que 2 casos tiveram hemorragias pós-operatórias, uma delas fatal.

Uma grande variedade de fatores pode influenciar o processo cicatricial, e a tensão de oxigênio é um destes fatores. Vários autores revisaram os efeitos do oxigênio nos processos cicatriciais (WALDORF e FEWKES 1995; LA

VAN e HUNT 1990; KINDWALL et al. 1991; TOMPACH et al. 1997). Os efeitos do tratamento com oxigenação hiperbárica nas complicações cicatriciais de cirurgia em tecidos irradiados foi apresentada por NEOVIUS et al. (1997). Neste estudo, os autores compararam a cicatrização cirúrgica nos tecidos moles irradiados de cabeça e pescoço, quando manipulados com ou sem oxigenação hiperbárica. Os autores concluíram que a cicatrização foi acelerada pela oxigenação hiperbárica e confirmaram achados de estudos prévios (GREENWOOD e GILCHRIST 1973).

LONDON et al. (1998), revisaram 16 pacientes com osteorradionecrose e 5 pacientes com condroradionecrose, tratados com cirurgia e oxigenação hiperbárica, baseando-se no protocolo proposto por MARX e JOHNSON (1987). As médias das doses totais de radiação dos pacientes com osteorradionecrose era de 63 Gy e com condroradionecrose era de 68 Gy. Quinze dos 16 pacientes com osteorradionecrose apresentaram cura da doença. Três de 4 pacientes que apresentavam fraturas patológicas prévias ao tratamento, evoluíram com união óssea após a oxigenação hiperbárica.

HAO et al. (1999), avaliaram prospectivamente 33 casos de osteorradionecrose dos ossos da face, crânio e pescoço, tratados com cirurgia e oxigenação hiperbárica. Sete pacientes apresentaram recorrência tumoral local e foram erroneamente diagnosticados como quadros de osteorradionecrose. Dos 26 casos de osteorradionecroses remanescentes, 22 foram tratados com limitadas sequestrectomias e 4 casos com sequestrectomias radicais, seguidas de reconstrução com retalhos vascularizados. Essa abordagem sistemática controlou a osteorradionecrose em 77% dos casos.

Estudos clínicos têm confirmado os conceitos experimentais de revascularização dos tecidos irradiados. O próprio MARX (1983, 1984) desenvolveu um protocolo de tratamento para osteorradionecrose de mandíbula e maxila, que consistia em selecionar os pacientes com capacidade de responder a cirurgias menos agressivas e, portanto, com menor necessidade do uso de oxigenação hiperbárica. Em 331 pacientes portadores de osteorradionecrose de mandíbula tratados com esse protocolo, a osteorradionecrose foi resolvida em 69% dos casos em fases avançadas. O tratamento consistia de 40 sessões de oxigenação hiperbárica associada à ressecções mandibulares. Somente em 13% dos casos, a osteorradionecrose foi resolvida em fases iniciais do protocolo, que consistia do uso exclusivo de oxigenação hiperbárica. Esse autor conclui que a associação de cirurgia e oxigenação hiperbárica pode ser necessária para o controle da osteorradionecrose.

A revisão de literatura mostra que o tratamento de pacientes irradiados com oxigenação hiperbárica adjuvante é baseada em estudos realizados em osso e tecidos moles. Apesar de várias instituições reportarem os benefícios clínicos da oxigenação hiperbárica em pacientes irradiados, existe uma quantidade menor de estudos, demonstrando os seus efeitos em ossos irradiados. No entanto, estes números limitados de estudos relatam seus benefícios no reparo ósseo do osso irradiado.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
Departamento de Pós-Graduação

FUNDAÇÃO ANTONIO  
PRUDENTE  
BIBLIOTECA



### 1.3 Efeitos Teciduais da Radiação

#### 1.3.1 Informações Gerais

Os efeitos teciduais da radiação ionizante representam a soma das lesões celulares no tecido, assim como, as lesões celulares refletem os efeitos cumulativos da radiação nas suas moléculas. A manutenção e a integridade tecidual são dependentes, não apenas da viabilidade celular, mas também da sua capacidade de manutenção do parênquima celular e do estroma ao seu redor. Portanto, lesões celulares e teciduais da radiação existem em todos tecidos irradiados, em variados graus de intensidade, podendo levar a inviabilização parcial e/ou total do tecido.

Sabemos que o ciclo celular é dividido em 4 fases. A fase de mitose pode ser considerada como o início do ciclo. A fase seguinte é a G1 [*Gap* 1: período entre a mitose e a fase de Síntese (S)], quando a célula apresenta atividades metabólicas para qual esta é especializada. Caso a célula seja destinada à divisão, esta entra na fase S, período o qual o DNA será sintetizado até o momento da sua duplicação. Após a fase S, a célula passa para a fase G2 (*Gap* 2: período entre S e o início da mitose), que é uma fase de curta preparação para sua divisão. Finalmente, a célula entra novamente na fase de Mitose, onde duas novas células filhas são criadas. O período entre mitoses (G1, S, G2) é denominado de interfase. A sensibilidade celular à radiação é maior durante G2, fase final de G1, começo de S e na mitose. Uma maior resistência celular é observada durante início de G1 e fim da fase S (MARX e JOHNSON 1987).

A radiação pode acarretar em morte celular de dois tipos: interfásica e reprodutiva. A morte interfásica não está restrita a células proliferativas. A morte reprodutiva é resultado de lesões celulares, que ocasionam falha e morte na mitose. A morte reprodutiva pode acontecer imediatamente após a mitose ou ocorrer anos após esta fase. Algumas células ainda são capazes de completar um número de divisões celulares após a radiação, enquanto outras permanecem viáveis porém, sem capacidade funcional e proliferativa. Em geral, quanto maior o potencial de proliferação celular, maior será sua sensibilidade à radiação (MARX e JOHNSON 1987).

Os principais tecidos relacionados com o risco de desenvolvimento de radionecrose através da manipulação do paciente irradiado são o osso, periósteo, tecido conjuntivo da mucosa e/ou pele, e o endotélio vascular. Estes tecidos apresentam uma radiosensibilidade intermediária, que varia entre células de rápida divisão, como células epiteliais de mucosa e células de medula, e células que não apresentam divisão, como as nervosas e musculares. A radiosensibilidade intermediária destes tecidos são responsáveis pela determinação da expressão clínica e o desenvolvimento dos efeitos colaterais provenientes da radiação. Células que se dividem regularmente são bastante sensíveis à radiação e apresentam uma morte reprodutiva imediatamente após a radioterapia. Clinicamente, este fato é notado nos quadros de mucosite e radiodermite, em razão da alta radiosensibilidade do epitélio da mucosa e/ou da pele (MARX e JOHNSON 1987).

No entanto, a patogênese da radiação nestes tecidos intermediários é ligeiramente diferente, em função das suas células apresentarem um ciclo de divisão

celular menor. Portanto, a expressão das lesões da radiação em função da morte reprodutiva nos tecidos, requer períodos mais longos e doses de radiação mais altas. Por outro lado, as alterações teciduais resultante de mortes interfásicas são bem freqüentes mas podem não ser expressas anos depois da radioterapia. Conclui-se que, em razão da resistência intermediária dos tecidos conjuntivos, o risco e o desenvolvimento da osteorradionecrose ocorre de maneira lenta e progressiva, estando relacionada com alterações estruturais e funcionais do tecido microvascular de suporte (MARX e JOHNSON 1987).

### **1.3.1 Estudos experimentais dos efeitos da radiação**

DARE et al. (1997), reportaram os efeitos da radiação na proliferação de diferentes osteoblastos. Dois tipos celulares foram usados; osteoblastos clonais e osteoblastos isolados da calvária de ratos recém-nascidos. Nenhuma alteração foi observada em baixas doses de radiação (4 Gy) nos diferentes tipos celulares. Altas doses de radiação inibiram a formação óssea em células irradiadas da calvária e aumentaram as atividades das células clonais quando comparadas com cultura de controle. Os resultados opostos sugerem que os efeitos de alta dose de radiação difere entre os tipos de células da linhagem osteoblástica.

Os efeitos da radiação foram relacionados com a indução na diferenciação prematura dos fibroblastos, resultando no aumento da síntese de colágeno intersticial (RODEMANN e BAMBERG 1995). A resposta celular às lesões da radiação é um processo complexo e ainda não completamente conhecido, que

envolve sistemas multi-celulares que se interagem através de citocinas específicas. RODEMANN e BAMBERG (1995), revisaram as bases celulares da fibrose induzida pela radiação.

EWING (1926), estudou ossos humanos irradiados, relatando as dificuldades de interpretação do significado das alterações do osso após a radioterapia. Altas doses de radiação produziram alterações na composição e estrutura do osso lamelar, caracterizado pelo aumento da sua fragilidade e tendência a fratura espontânea. Após a radiação, o osso apresentava uma sensível diminuição de circulação sangüínea e os vasos do periósteo apresentavam-se esclerosados. Este autor sugeriu que necrose da radiação era o resultado das lesões aos vasos sangüíneos do Sistema Haversiano, periósteo e tecidos adjacentes.

GOWGIEL (1960), investigou osteorradionecrose de mandíbula e maxila, em macacos submetidos às diferentes doses de radiação (45 a 110 Gy). A correlação entre doses de radiação e o tempo após a radioterapia, mostrou que doses mais altas desenvolveram quadros recentes e mais severos de necrose. A incidência de osteorradionecrose foi maior em mandíbula que na maxila, provavelmente em razão das diferenças anatômicas das estruturas ósseas e de seus suportes sangüíneos. O autor conclui que a osteorradionecrose parece ser o resultado do efeito direto da radiação nos osteócitos e no sistema vascular.

RISSANEN et al. (1969), estudaram os efeitos da radiação em doses únicas de 5, 10 e 40 Gy, nos ossos de cachorros. Após a completa radiação, os ossos encontravam-se completamente acelulares. Após dois meses, o osso esponjoso



apresentava alterações degenerativas, um aumento de tecido gorduroso e vasos sangüíneos com intensa trombose.

ROHRER et al. (1979), apresentaram um estudo histológico dos efeitos da radiação em mandíbula de macacos. Neste estudo, os animais receberam uma dose 45 Gy (10 frações / 12 dias) e foram feitas observações num período de 1 semana a 6 meses após a radiação. Os achados histopatológicos revelaram hipocelularidade e hipovascularização do periósteo, e alterações acentuadas no osso medular como, fibrose e endarterite obliterante dos vasos sangüíneos.

KING et al. (1979), reportaram um modelo experimental com tíbias irradiadas de coelhos (17,5 Gy dose única). Neste estudo foi realizado uma avaliação histológica dos efeitos teciduais da radiação em diferentes períodos (1, 3, 6 e 12 meses). As avaliações iniciais (até 3 meses), mostraram um predomínio de reabsorção sobre a formação óssea e uma congestão dos vasos sangüíneos. Em períodos mais tardios (após 1 ano), houve uma significativa depressão vascular e do processo de remodelação óssea.

JACOBSSON et al. (1987), investigaram a viabilidade dos osteócitos após a irradiação, com técnicas de histoquímica. Doses únicas de 15, 25, e 40 Gy ( $\text{Co}^{60}$ ) foram aplicadas na tíbia de coelhos e avaliadas em períodos de 11 a 22 semanas após a irradiação. Os autores não identificaram morte celular e concluíram a relativa radio-resistência dos osteócitos.

MAEDA et al. (1988), analisaram biomecanicamente e histomorfometricamente os efeitos da radiação no osso cortical de ratos. Dose de 35 Gy foi aplicada na parte central da coxa dos ratos, através de acelerador linear (4

MeV). Os ratos foram avaliados 2, 6, 10, 14, 18 semanas após a irradiação. Os achados histológicos no fim deste período (18 semanas), revelaram uma baixa atividade celular na região medular do osso e um aumento significativo da quantidade de gordura. Em contraste, o periósteo recuperou as atividades de neoformação óssea.

SUGIMOTO et al. (1991), estudaram os efeitos da irradiação de altas doses em osso cortical de coelhos, com doses únicas de 50 Gy (14 MeV), em períodos de 4, 12, 24 e 52 semanas após a irradiação. A fragilidade óssea foi o primeiro sinal observado após 12 semanas da irradiação, devido ao aumento significativo da porosidade óssea intra-cortical que progrediu ao seu máximo na 24<sup>a</sup> semana. A neoformação óssea foi significativamente suprimida durante as 24 semanas iniciais, sendo que após 52 semanas houve ligeira recuperação da capacidade de formação óssea. Os osteócitos não apresentaram alterações e permaneceram intactos.

Desta revisão pode-se concluir que a irradiação afeta os ossos e tecidos moles adjacentes. Discute-se na literatura se os efeitos da irradiação ocorrem principalmente nas células ou no sistema vascular dos tecidos. No entanto, hoje é consenso entre os autores que ambos mecanismos são de vital importância nas lesões teciduais da radiação. Há uma grande variedade de modelos de estudos experimentais sobre os efeitos da radiação e os resultados são dependentes de vários parâmetros. No entanto, a maior parte dos estudos apontam uma influência negativa da radiação no processo de reparo dos tecidos.

#### 1.4 Metodologia e Análise Histomorfométrica

Existe um grande número de métodos experimentais e clínicos utilizados para a avaliação das lesões teciduais da radiação nos tecidos irradiados na literatura e a sua revisão completa não é objetivo na presente tese.

Os métodos de avaliações mais freqüentes combinam observações histológicas convencionais e microscopia óptica. Há uma dificuldade na avaliação dos efeitos teciduais da radiação em espécimens humanos, obtidos de cirurgias realizadas em intervalos pequenos após a irradiação. Este fato deve-se da dificuldade de interpretação de alterações teciduais, como por exemplo, hiperemia e trombose, resultantes do trauma cirúrgico e/ou da própria alteração da radiação. No caso específico de trombose, os trombos fibrosos são indicativos de um fenômeno mais antigo e muito provavelmente relacionado com efeito da radiação. Outro aspecto observado na interpretação dos quadros de trombose, é o fato de estar associada ou não a hemorragias no tecido (aspecto indicativo de trauma cirúrgico) (MARX e JOHNSON 1987).

Outros aspectos histológicos podem apresentar dificuldades de interpretação, como por exemplo, o fato da identificação de lacunas de osteócitos serem interpretadas como um sinal de inviabilidade do osso após a irradiação (KING et al. 1979; MAEDA et al. 1988). No entanto, KENZORA et al. (1978) reportaram resultados falso-negativos a respeito da interpretação de lacunas de osteócitos, em razão dos núcleos destas células permanecerem visíveis semanas após a interrupção da síntese de RNA.

Na presente tese, realizamos observações histológicas qualitativas e quantitativas. A análise histomorfométrica de variáveis, como celularidade e fibrose, utilizou um programa (IMAGELAB, São Paulo, Brasil) de computador, conectado a um microscópio óptico. Este é um método quantitativo, que baseia-se na diferenciação dos aspectos de coloração da área histológica analisada. Este método tem sido utilizado em trabalhos anteriores na análise de marcadores de proliferação celular em tumores benignos e malignos da boca (ROSA et al. 1997; MESQUITA et al. 1998; SAMPAIO et al. 1999; COSTA et al. 1999; PAULA et al. 2000).



## **OBJETIVOS**

## **Objetivos**

Os objetivos deste trabalho são:

- 2.1 Avaliar a eficácia do tratamento da osteorradionecrose refratária de mandíbula e maxila, através de cirurgia e oxigenação hiperbárica adjuvante;
- 2.2 Avaliar os efeitos teciduais induzidos pela radiação no osso mandibular e tecido mole adjacente, correlacionando estas lesões com o intervalo após a radioterapia, visando sugerir direções clínicas para o manejo de pacientes irradiados.

## **ARTIGOS/ PUBLICAÇÕES**

## ARTIGO I

... e a ...  
... e a ...  
... e a ...



**MANAGEMENT OF REFRACTORY OSTEORADIONECROSIS OF THE  
JAWS WITH SURGERY AND ADJUNCTIVE HYPERBARIC OXYGEN  
THERAPY**

**Marcos Martins Curi<sup>1</sup>**

**Luciano Lauria Dib<sup>1</sup>**

**Luiz Paulo Kowalski<sup>2</sup>**

**1** - Department of Stomatology, Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer, São Paulo, Brazil.

**2** - Department of Head and Neck Surgery, Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer, São Paulo, Brazil.

Publicado no:

International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery 2000;29:430-4.

**Running title:** Osteoradionecrosis of the jaws

**Key words:** Osteoradionecrosis. Hyperbaric oxygenation. Jaws.

### **ABSTRACT**

This retrospective study aimed to determine the effectiveness of surgery and hyperbaric oxygen (HBO) treatment in the management of refractory osteoradionecrosis (ORN) of the jaws. Of 18 patients who had undergone this treatment, 14 patients had complete healing, 3 patients had improved and one patient did not show any improvement. Of the 14 patients who had complete healing, only 4 still had a discontinuity defect of the mandible but they declined additional reconstructive surgery. In conclusion, surgery/HBO therapy showed satisfactory results in the management of refractory ORN of the jaws.

## INTRODUCTION

The combination of surgery and radiation is the standard treatment for oral squamous cell carcinoma. Long-term effects of radiotherapy, however, are well known and osteoradionecrosis (ORN) is one of the most serious late complications (BEDWINEK et al. 1976; MURRAY et al. 1980; MORRISH et al. 1981; SCHWEIRGER 1987; KLUTH et al. 1988; KOKA et al. 1990) Radiation injuries include hard and soft tissues because of damage to tissue cells and the vascular system. These changes are progressive and may result in gradual devitalization of bone tissue, which may lead to bone and/or soft tissue necrosis in a small percentage of patients (MARX 1983; EPSTEIN et al. 1987a e b).

The pathogenesis of ORN is still not completely understood, but according to Marx's concept this disease should be considered a nonhealing wound resulting from metabolic and tissue homeostatic disturbances. ORN is the result of hypoxic, hypovascular, and hypocellular tissue, followed by tissue breakdown leading to a nonhealing wound (MARX 1983). Healing may exist in such compromised tissue but takes place very slowly, requiring months or even years; however, it may still lead to repair in the end (WONG et al.1997).

There is no universally accepted treatment for ORN of the jaws. The management of ORN remains controversial, both radical and conservative treatment have been reported (MANIOUS e HART 1976; MURRAY et al. 1980; MARX e JOHNSON 1987; EPSTEIN et al. 1987b; FATTORE e STRAUSS 1987; KING et al.

1989; NEOVIUS et al. 1997; WONG et al. 1997; EPSTEIN et al. 1997). Conservative treatments, which consist of systemic antibiotics, rinsing with topical antiseptics and also removal of small sequestrums, seem ineffective in controlling acute and progressive ORN and are only indicated when small necrotic bone areas are involved (EPSTEIN et al. 1987b; MURRAY et al. 1980; WONG et al. 1997). Radical surgery is indicated in cases where conservative approaches are not successful and in symptomatic and rapidly progressive lesions. In recent years, treatment of ORN has focused on revascularization of irradiated tissues (MANIOUS e HART 1975, 1976; MARX 1984; MARX e JOHNSON 1987; EPSTEIN et al. 1987b; KING et al. 1989; NEOVIUS et al. 1997; EPSTEIN et al. 1997; MAIER et al. 2000). Hyperbaric oxygen therapy (HBO) has the capacity to increase the tissue oxygen tension levels and, thus, enhances wound healing in heavily irradiated tissues. Surgery in combination with HBO is denoted as being impractical by some authors because of costs and the time factor (EPSTEIN et al. 1987a; WONG et al. 1997). An important consideration in the treatment of ORN is the role of microorganisms that are not the causative factor, but they complicate the process and the extent of treatment (HAPPONEN et al. 1983). The general condition of the host, severity and location of the disease and availability of certain techniques such as HBO and microvascular free flaps are all factors that play an important role in the proper management of ORN.

In this study, we report on the treatment of ORN of the jaws using surgery and adjunctive HBO in 18 patients who failed to respond to conservative treatment, including antimicrobial therapy, rinsing with antiseptics and selective removal of small sequestrums.

## MATERIAL AND METHODS

The medical records of 18 patients with ORN of the jaws who received HBO in combination with surgery at the Stomatology Department, Hospital do Câncer – A. C. Camargo, São Paulo, Brazil, were reviewed. Only patients with a history of ORN with a duration of at least 3 months and a follow-up of at least 1 year were included in this study. The diagnosis of ORN was based on clinical and radiographic findings and the patient's history.

The primary tumor site, tumor stage and treatment given to the patients are shown in Tables 1 and 2. The time from radiotherapy until the onset of ORN varied from 3 months to 14.5 years with a mean of 27.9 months (Table 3). The factors believed to have caused ORN are shown in Table 4.

Radiotherapy consisted of external beam radiation and megavoltage delivery (linear accelerator 4 MeV) in all cases. Seven patients received preoperative radiotherapy and 11 patients received postoperative radiation. The total radiation dose ranged from 5.0 Gy to 7.2 Gy with a mean dose of 6.2 Gy. The dose rate/day varied from 0.12 Gy to 0.2 Gy with a mean 0.18 Gy.

All patients had been previously treated with conservative measures for a mean period of 15.4 months and had failed to respond to this therapy. This conservative treatment consisted of systemic antimicrobial therapy (clindamycin 300 mg orally four times a day) in acute infectious episodes, local debridement of the wound and rinsing with antiseptic solutions (digluconate chlorhexidine 0.12%) and selective removal of



small sequestrums when present. All sequestrectomies were carried out on an outpatient basis. The necrotic bone was removed by curetting and/or burring it out until normal bleeding bone appeared. If the patient did not respond and the ORN persisted, then radical surgery was carried out. This procedure aimed to eradicate the full extent of the disease by resecting all necrotic tissue, which usually resulted in a bone defect. Resection was carried out under general anesthesia through an extraoral or intraoral approach. All affected bone was removed by a Stryker drill under cooling with 0.9% NaCl solution.

HBO was given in a Sechrist monoplace chamber at 2.4 ATA (atmosphere absolute), with the patient breathing 100% oxygen for 120 minutes per dive. During this period, the first 10 minutes were used for successive compression up to 2.4 ATA. The pressure was then kept constant for 90 minutes and decompression lasted 20 minutes. The chamber temperature was kept at +23°C by water cooling system. The HBO treatment was performed once daily and a total of 30 consecutive dives were given in patients who were submitted to sequestrectomy (7 cases). A different protocol was used for patients submitted to radical resection (11 cases), that included HBO once daily, with a total of 20 dives preoperatively and 10 dives postoperatively.

## RESULTS

Between 1992 and 1997, 18 patients (14 men and 4 women) were submitted to surgery and adjunctive HBO therapy for treatment of ORN of the jaws (Table 5). The age of the patients varied from 40 to 77 years with a mean age of 55.6 years. Seventeen patients were Caucasian and one was Japanese. ORN was located in the

mandible in 16 cases and in the maxilla in 2 cases. Of the 18 patients, 2 cases had no obvious causative reason whereas 16 cases were induced by trauma.

Current follow-up of the patients ranges from 12 to 68 months with a mean of 24.8 months. After surgery/HBO therapy, 14 patients had complete healing, 3 patients had improved and one patient did not show any improvement. Of the 14 patients who had complete recovery, only four still had a discontinuity defect of the mandible but they declined additional reconstructive surgery.

## **DISCUSSION**

ORN is still a serious complication resulting from radiotherapy and its incidence has not decreased in the last years (BEDWINEK et al. 1976; MURRAY et al. 1980; MORRISH et al. 1981; MARX 1983; EPSTEIN et al. 1987a e b; SCHWEIRGER 1987; KLUTH et al. 1988; KOKA et al. 1990; GALLER et al. 1992). Because ORN may be considered a nonhealing wound resulting from metabolic and tissue homeostatic disturbances, it responds to different forms of treatment. Some authors have preferred conservative treatment to control small necrotic areas, but this therapy may be insufficient in refractory and acute ORN ( EPSTEIN et al. 1987b; WONG et al. 1997). The rational for the use of HBO in association with surgery in irradiated tissue is to increase the blood-to-tissue oxygen tension, which enhances the diffusion of oxygen into the tissues. This revascularizes the irradiated tissue and improves the fibroblastic cellular density, thus limiting the amount of nonviable tissue to be surgically removed (MARX 1984; MARX e JOHNSON 1987). Treatment of ORN should aim at local debridement

of the wound, removal of nonviable tissue, antimicrobial therapy and revascularization of the tissues (MANIOUS e HART 1975, 1976; MARX 1984; MARX e JOHNSON 1987; EPSTEIN et al. 1987b; KING et al. 1989; NEOVIUS et al. 1997; EPSTEIN et al. 1997; MAIER et al. 2000).

In 1973, GREENWOOD e GILCHRIST reported for the first time the benefits of HBO on wound healing in postradiation patients. Since then, several authors have reported the beneficial effects of HBO in the management of ORN of the jaws. In 1975, MAINOUS e HART, treated 14 cases of refractory osteoradionecrosis of the mandible with HBO and hemimandibulectomy, with complete resolution of all cases. In 1981, MANSFIELD et al. treated 12 patients with refractory ORN of the mandible with HBO therapy, resulting in complete healing in 11 cases.

The benefits of revascularization of irradiated tissues have been shown in many clinical and experimental studies (MARX 1984; MANIOUS e HART 1975, 1976; MARX e JOHNSON 1987; FATTORE et al. 1987; KING et al. 1989; NEOVIUS et al. 1997; EPSTEIN et al. 1997; MAIER et al. 2000). MARX (1984) treated successfully 58 cases of refractory ORN and developed a staging protocol for its treatment, considering the clinical aspects and the possibilities of hard / soft tissue reconstruction. MCKENZIE et al. (1993) published treatment with HBO of postradiation ORN of the mandible in 26 patients and concluded that resolution occurred in 69% (18 of 26) patients, improvement occurred in 12% (3 of 26) but 19% (5 of 26) of the patients did not show any improvement. MERKESTEYN et al. (1993) reported a combination of surgical debridement, antimicrobial therapy and HBO in 27 patients and concluded that 20 (69%) had completely healed after this treatment. EPSTEIN et al. (1997) reported the results of

a long-term follow-up study with the same group of patients previously published by MCKENZIE et al. (1993). Of the 20 patients followed, 12 had completely healed, improvement had occurred in two patients and five of the patients still had chronic persistent ORN. NEOVIUS et al. (1997) reported results on treatment with HBO after surgery in the irradiated head and neck in 15 consecutive patients and compared them with a group of patients treated without HBO. The authors concluded that 12 out of 15 patients treated with HBO had healed completely and that only seven of 15 patients with similar signs of ORN had healed after therapy without HBO.

In this study, complete healing was achieved in 14 of the 18 patients. This result is in agreement with other studies which shows the benefits of surgical / HBO treatment in ORN of the jaws (MANIOUS e HART 1975, 1976; MARX 1984; MARX e JOHNSON 1987; FATTORE et al. 1987; KING et al. 1989; NEOVIUS et al. 1997; EPSTEIN et al. 1997; MAIER et al. 2000). Although the benefits of adjunctive HBO therapy in irradiated tissues have been demonstrated in a series of reports, some authors do not agree with the use of HBO for treatment of ORN (EPSTEIN et al. 1987b; WONG et al. 1997). WONG et al. (1997), in a retrospective study of 28 patients with mandibular ORN managed by conservative measures only, showed that 14 patients had complete healing. A previous study (CURI e DIB 1997), in which 104 patients with ORN were treated with conservative approaches (local debridement / gentle sequestrum removal), supports this statement, because it resulted in healing of 42.3% of patients.

Serious complications resulting from HBO therapy are extremely rare, but toxic effects of oxygen may be observed in the central nervous system, eye, liver and tracheobronchial tree. Optic neuritis, active viral infection, malignant disease and forms



of chronic pulmonary disease have been pointed as contraindications to HBO therapy (FATTORE e STRAUSS 1987). In the current study, no signs of oxygen toxicity were observed in the patients under treatment.

Osteoradionecrosis of the jaws produces considerable morbidity and its management is still a matter of debate. The results of both a conservative approach and surgery / HBO treatment are well documented. Our results in 18 patients suggest that, in advanced conditions, the results of conservative treatment only are poor and under these circumstances, radical resection of the involved segment and adjuvant HBO is a satisfactory option in the management of ORN of the jaws



**Table 1** - Tumor clinical stage\* and site in 18 patients.

| <b>VARIABLE</b>       | <b>n</b> |
|-----------------------|----------|
| <b>Location</b>       |          |
| Lip                   | 1        |
| Tongue                | 5        |
| Gingiva               | 2        |
| Floor of the mouth    | 3        |
| Soft palate           | 1        |
| Retromolar area       | 1        |
| Oropharynx            | 2        |
| Tonsillar area        | 3        |
| <b>Clinical stage</b> |          |
| I                     | 6        |
| II                    | 2        |
| III                   | 7        |
| IV                    | 3        |

**Table 2-** Oncologic treatment in 18 patients with osteoradionecrosis.

| <b>Treatment</b>                    | <b>Cases</b> |
|-------------------------------------|--------------|
| Radiotherapy only                   | 4            |
| Radiotherapy + chemotherapy         | 1            |
| Radiotherapy + salvage surgery      | 5            |
| Postoperative radiotherapy          | 7            |
| Pre- and postoperative radiotherapy | 1            |

**Table 3-** Interval between radiotherapy and onset of osteoradionecrosis in 18 patients.

| Interval (months) | Cases |
|-------------------|-------|
| 0 – 12            | 9     |
| 12 - 24           | 3     |
| 24 - 36           | 2     |
| 36 - 48           | 1     |
| > 48              | 3     |

**Table 4-** Contributing causative factors in 18 patients.

| Factors                          | Cases |
|----------------------------------|-------|
| Salvage Surgery                  | 10    |
| Postradiation dental extractions | 3     |
| Periodontal disease              | 1     |
| Denture pressure                 | 2     |
| No obvious factor                | 2     |

**Table 5** – Treatment of osteradionecrosis in 18 patients

| Treatment ORN           | Cases |
|-------------------------|-------|
| HBO + sequestrectomy    | 7     |
| HBO + radical resection | 11    |



## ARTIGO II

**Histopathologic and histomorphometric analysis of irradiation injury of bone  
and the surrounding soft tissues of the jaws**

**Marcos Martins Curi, DDS, MDS<sup>1</sup>**

**Manoela Domingues-Martins, DDS, PhD<sup>2</sup>**

**Gilles Landman, MD, PhD<sup>3</sup>**

**Luiz Paulo Kowalski, MD, PhD<sup>4</sup>**

1. Department of Stomatology, Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer – A.C. Camargo, São Paulo, Brasil.

2. Department of Oral Pathology, Universidade Metropolitana Santos (UNIMES), São Paulo, Brasil.

3. Department of Pathology, Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer - A.C. Camargo, São Paulo, Brasil.

4. Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer - A.C. Camargo, São Paulo, Brasil.

Artigo submetido: Archives of Head and Neck and Otholaryngology

## ABSTRACT

**Background.** Management of irradiated head and neck cancer patients remains a difficult and challenging problem. Radiotherapy leads to damage of tissue cells and vasculature. Surgery in such compromised tissue has an increased complication rate because of the development of hypovascular-hypocellular-hypoxic tissue. These histomorphological changes in irradiated bone are of major concern to oral and maxillofacial surgeons, who must consider how to manage patients after therapeutic radiation. Information on whether or when the patient may recover from such changes is also important for the schedule of treatment and proper protection of the patient.

**Objective.** This study was undertaken to histopathologically and histomorphometrically analyze the irradiation tissue injury on bone and the surrounding soft tissues.

**Material and Methods.** Fifty-five human mandibular bone and the surrounding soft tissues specimens obtained from surgical procedures for treatment of osteoradionecrosis of the jaws or during head and neck salvage surgery after radiotherapy were used in this study. All specimens were stained with hematoxylin and eosin for histologic and histomorphometric evaluations. The study analyzed also the expression of CD34 in all specimens by immunohistological technique using paraffin-embedded tissue and specific anti-human CD34 monoclonal antibody. Each histologic specimen was assessed as a function of time since treatment with radiation to develop a relative time course of radiation tissue injury. Normal human mandibular bone and the surrounding soft tissues were used as control specimens.

**Results.** Histopathologic examination found seven processes in order of appearance: hyperemia, endarteritis, thrombosis, cellular loss, hypovascularity, increase of fat in bone-marrow cavity, and fibrosis. Histomorphometric analysis revealed a significant hypocellularity in irradiated specimens compared to control specimens ( $p = 0.007$ ). Similarly, the fibrosis increased significantly in irradiated specimens compared to control specimens ( $p < 0.001$ ). Irradiated specimens with longer interval after radiation had a significant increase of cellular loss (hypocellularity) ( $p = 0.042$ ) and a tendency to increase fibrosis ( $p = 0.072$ ) compared to those with shorter interval after radiation. Loss of microvascular content (hypovascularity) was significantly in irradiated specimens than in control specimens ( $p < 0.001$ ).

**Conclusion.** Our results concluded that radiation injuries affects both the bone and the surrounding soft tissues. These radiation effects were observed on the bone cells, on the connective tissue and, on the fine vasculature in these tissues. All irradiated tissues showed reduced spontaneous capacity of recovering with time. Radiation tissue injury seems to be time progressive.

**KEY-WORDS:** Radiation injury. Radiotherapy. Bone. Soft tissues. Jaws. Osteoradionecrosis.



## INTRODUCTION

Surgery and radiation have been the standard treatment of advanced cancers of the head and neck. Long-term effects of radiation therapy of the head and neck are well documented in the literature. Osteoradionecrosis (ORN) of the jaws is one of the most severe late complications of radiation therapy (BEDWINEK et al. 1976; MURRAY et al. 1980; MORRISH et al. 1981; SCHWEIRGER 1987; KLUTH et al. 1988; KOKA et al. 1990; CURI e DIB 1997; THORN et al. 2000; MAIER et al. 2000).

The specific pathophysiologic sequence of ORN is determined by a progressive obliterative endarteritis, development of hypovascular-hypocellular-hypoxic tissues, that can necrose spontaneously or in response to trauma (MARX 1983). On histopathologic evaluation, hyperemia, inflammation (endarteritis), thrombosis, cellular damage, hypovascularity, and fibrosis are observed after radiation exposure (MARX e JOHNSON 1987). ORN is a wound healing disorder resulted of the late effects from the radiation injury to tissues. In general, hyperemia, endarteritis, cellular damage and vascular thrombosis began early after radiation exposure and maintained for a further 6 months. Hypovascularization and fibrosis occur from 6 to 12 months after radiotherapy and present the end stage of radiation tissue injury (MARX e JOHNSON 1987).

Although specific treatments for ORN are still not well defined, surgical approaches are necessary in most of cases, varying from conservative



intervention to invasive surgery (SHAHA et al. 1996; CURI e DIB 1997; WONG et al. 1997). Hyperbaric oxygen therapy (HBO), aiming to increase tissue oxygenation and thus enhance neovascularization and wound healing, has demonstrated its efficacy in the treatment of soft tissue radionecrosis, prevention and treatment of ORN, and the reconstruction of hard and soft tissues defects within irradiated tissue (FATTORE e STRAUSS 1987; MERKESTEYN et al. 1995; NEOVIUS et al. 1997; AITASALO et al. 1997; LAMBERT et al. 1997; CLAYMAN 1997; LONDON et al. 1998; HAO et al. 1999; MAIER et al. 2000; CURI et al. 2000).

In spite of the better understanding of pathogenesis of ORN and advances in its treatment modalities, still exist some important clinical dilemmas. MARX e JOHNSON (1987) mentioned the uncertainty about the risk of ORN, as a function of time since radiation, and as result of oral surgical procedures. The data from their tissue biopsy study showed that after 6 months, the higher the radiation tissue injuries the greater is the risk for ORN. These authors have found evidence of progressive vascular damage causing endarteritis, thrombosis, and fibrosis in both animal and human histologic studies. The authors believe that vascular damage is responsible for much of the late effects observed in ORN tissues. However, this tissue biopsy study was based on qualitative histology.

Few studies thus far have undertaken to elucidate the importance of the relationship between radiation tissue injury and its relation to the risk for ORN and, creating clinical guidelines for irradiated patients. Studies in this field could improve the management of patients with head and neck cancer prior and after irradiation.

The purpose of this study was to histopathologically and histomorphometrically analyze the irradiation injury effects on mandibular bone and on the surrounding soft tissues.

## **MATERIAL AND METHODS**

The study subjects consisted of 94 bone and surrounding soft tissues specimens taken from 68 patients surgically treated for ORN of the jaws or for head and neck salvage surgery after radiotherapy. The specimens were retrieved from paraffin-embedded tissue from the files of the A. C. Camargo Cancer Hospital, São Paulo, Brazil. Normal human mandibular bone and the surrounding soft tissues obtained during oral and facial surgery were used as control specimens. Ethics and Human Subject Procedures followed the guidelines of the Research Advisory Committee of the Cancer Hospital Center. Of this total, 39 specimens were excluded, leaving 55 specimens for histologic evaluation. Reasons for exclusion were inappropriate material, cases in which the paraffin blocks could not be assessed or those without immunohistochemical reactivity. Individual cases were excluded if they had a history of local or systemic disorders related to arterial changes, such as diabetes mellitus, rheumatic fever, arterial vasculitis, and/or collagen diseases. Also patients who had suffered from local diseases of the mandible, such as tumours, tumour-like lesions, and cysts, were excluded by histopathological examination. Patient records and clinical follow-up provided the following information: age, gender, race, initial

tumor diagnosis and staging, treatment sequence, total radiation exposure, time period of radiation therapy, and date of specimens evaluation.

#### *Preparation of specimens and histopathologic examination*

All bone and soft tissues specimens had been fixed in formalin and embedded in paraffin. Bone specimens were decalcified in a solution of 10% buffered formalin (Sigma Chemie, Deisenhofen, Germany) with 10% (10g / 100ml) ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Merck, Darmstadt, Germany). Five-micrometer-thick sections were obtained from the original paraffin blocks and then stained with hematoxylin and eosin for light microscopic histopathologic and histomorphometric observations.

The histopathologic and histomorphometric examinations were performed in a blinded manner by two pathologists (GL, MDM). The amount of hyperemia, endarteritis (inflammation), thrombosis and fat in bone-marrow cavity were categorized as abundant, moderate, rare or none for each specimen. Serial sections were then used for immunohistochemistry evaluation.

#### *Histomorphometric measurements*

Histomorphometrical measurements were performed with a computer-supported histometric system consisting of a microcomputer and software program (IMAGELAB, São Paulo, Brazil) (Figure 8) for processing for microscopical

appearance. Measurements were performed using an objective of 10x and a zoom of 2.5. Histomorphometry of cellularity and fibrosis, were measured and calculated for the three areas with greater vascular density. The mean percentages for the mentioned parameters were calculated for each area on the irradiated specimens and compared to the mean for the control specimens. Areas of inflammation and necrosis were excluded.

#### *Immunohistochemistry protocol for CD34*

Immunostaining was performed using the streptavidin-biotin-immunoperoxidase (Dako, USA) method. Deparaffinized and rehydrated 5  $\mu$ m sections were incubated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in distilled water for 15 minutes to block endogenous peroxidase activity. Antigen retrieval was done with a pressure-cooking method in 0.1 M sodium citrate buffer, pH 6.0. After pretreatment, sections were blocked with 10% normal goat serum/TBS for 15 minutes and then incubated with monoclonal antibody QBEnd10 to CD34 (DAKO, Hamburg, Germany) at a 1:50 dilution for 1 hour at room temperature. The secondary biotinylated antibody and the streptavidin/peroxidase conjugate were applied according to the manufacturer's instructions (Super Sensitive System, BioGenex, San Ramon, CA). A chromogenic precipitate was obtained by immersing the sections for 10 minutes in a ready-to-use AEC substrate solution (DAKO, Hamburg, Germany). After counterstaining with Mayer's hematoxylin the sections were coverslipped with glycerolgelatine. All



incubations were performed at room temperature and all washings between incubations were performed in Tris-buffered saline.

#### *Evaluation of endothelial marker CD34 immunoreactivity*

Vessels were counted according to a standard technique modified from WEIDNER et al (1991). Briefly, three areas with dense vascularity were identified and selected in each tissue section, under low power magnification (100x). In each of these "hot spots", microvessels (capillaries and small venules) were counted at 400x magnification. Any brown-staining endothelial cell or endothelial-cell cluster that was clearly separate from adjacent microvessels and other connective-tissue elements was considered a single, countable microvessel. Vessel lumens, although usually present, were not necessary for a structure to be defined as a microvessel, and red cells were not used to define a vessel lumen. Areas of inflammation and necrosis were excluded.

The ratio of vascular area per bone or soft tissues areas was estimated by point vessel counting using an integrating 25-point eyepiece (integration plate, 10x, Carl Zeiss) on a 400x field (40x lens and 10x eyepiece –  $0.616 \text{ mm}^2$  / field area). Vessels coincident with the grid intersection points were counted. Three fields of higher vascular density previously identified in a 100x magnification were analyzed in each section, making up a total of 100 points. The percentage of vascular area was calculated from the equation:  $[(\text{number of coincidences} / \text{total of counted points}) \times 100]$ .



### *Statistical analysis*

All statistical analyses were performed with SPSS (Statistical Product and Service Solutions for Windows, v10.0, SPSS Inc, Chicago, IL) software. Ninety-five percent confidence limits have been calculated for specimens groups. Statistical differences between mean percentages of cellularity, fibrosis and, vascular density were determined by Student's t-test for unpaired observations. Pearson correlation test was used to evaluate linear correlation between the mentioned parameters and time from radiotherapy in irradiated specimens with and without ORN. All tests alpha error was equal to 5%.

## **RESULTS**

From a sample of 40 irradiated specimens, 14 were obtained from head and neck salvage surgery after radiotherapy and were without ORN and, 26 were obtained from surgery for treatment of ORN. Irradiated and control specimens were similar with regard to age, gender, race, and there were no significant differences between both.

Radiation therapy consisted of external beam radiation in all irradiated specimens. These specimens received megavoltage delivery (linear accelerator 4 MeV). The average total dose of radiation for these specimens was 5942 cGy (range, 5040 - 7040 cGy). The average dose rate per day for these specimens was 174 cGy

(range, 109 - 200 cGy). The average time of specimens evaluation following completion of radiation treatment was 22.1 months (range, 2 - 108 months).

The histopathologic examination identified seven processes: hyperemia, endarteritis, thrombosis, hypocellularity, loss of vascular content (hypovascularity), increase of fat in bone-marrow cavity and fibrosis. In general, hyperemia and endarteritis were early effects of radiation and observed for up to 6 months after radiotherapy (Figures 1A and B). Thrombosis was only seen years later after radiation and thrombi were dense fibrous (Figure 1C). Cellular loss happened rapidly just after radiation and kept progressive through the years. Loss of vascular content, increase of fat in bone-marrow cavity and, fibrosis showed a linear relationship with time after radiation and were considered the end stage of radiation tissue injury (Figures 1D, 1E and 1F).

Student *t* - test revealed a significant difference between the mean values of cellularity of irradiated specimens and control specimens ( $p = 0.007$ ). The mean cellularity of irradiated specimen was 1.9%, with a range of 0.3% to 5.2%. The mean cellularity of control specimens was 7.8%, with a range of 1.7% to 30.5% (Fig. 3). Among irradiated specimens, those without ORN exhibited a slight tendency of increased cellularity in relation with time after radiation compared to specimens with ORN, but this was not statistically significant ( $p = 0.208$ ) (Fig. 6). Cellular loss was more significant in bone than in the soft tissues. When only evaluating the bone tissue, there was a significant decrease of mean cellularity in the irradiated specimens (1.6%) when compared with the control specimens (8.1%) ( $p = 0.003$ ). When only evaluating the soft tissues, there was a decrease of cellular loss in irradiated specimens (2.4%)

when compared with control soft tissues specimens (7.6%), but this was not statistically significant ( $p = 0.168$ ).

Student  $t$  - test revealed a significant difference between the mean values of fibrosis of irradiated specimens and control specimens ( $p = 0.027$ ). The mean fibrosis of irradiated specimens was 72.7%, with a range of 57.4% to 83.7%. The mean fibrosis of control specimens was 65.7%, with a range of 42.0% to 88.0% (Fig. 4). Among irradiated specimens, those without ORN exhibited a significant increase of fibrosis in relation with time after radiation compared to specimens with ORN ( $p = 0.048$ ) (Fig. 7). Similarly, fibrosis was more evident in bone than in the soft tissues. When only evaluating the bone tissue, there was a significant increase of fibrosis in the irradiated specimens (74.9%) when compared with the control specimens (62.4%) ( $p = 0.007$ ). No significant difference was found in soft tissues between both irradiated and control specimens ( $p = 0.796$ ).

Regarding time dependent irradiation tissue injury, irradiated specimens observed after 6 months from radiotherapy exhibited a significant cellular loss compared to irradiated specimens in the first 6 months after irradiation ( $p = 0.049$ ). Similarly, examination of irradiated specimens after 6 months from irradiation showed a significant decrease of mean vascular density compared to irradiated specimens in the first 6 months after irradiation ( $p < 0.001$ ). There was a tendency to statistic significant of an increase of fibrosis in irradiated specimens after 6 months from irradiation compared to irradiated specimens in the first 6 months after irradiation ( $p = 0.072$ ).

Student *t* - test revealed a significant difference between the mean values of vascular density of irradiated specimens and control specimens ( $p < 0.001$ ). The mean vascular density of irradiated specimen was 3.0%, with a range of 1.7% to 4.7%. The mean vascular density of control specimens was 15.1%, with a range of 10.3% to 24.0% (Fig. 5). Six months after radiation, all specimens showed significant hypovascularity. However, no significant differences in means vascular density were found between both in irradiated bone and in surrounding soft tissues. Sample of CD34 immunohistochemical staining of irradiated specimen is shown in Figure 2.

## DISCUSSION

Uncertainty still exist about the pathophysiologic of irradiated tissue injury. The exact nature of this process is still not fully understood. The basic pathophysiology of irradiation tissue injury is normal tissue cellular death and normal tissue sublethal cellular damage leading to a wound healing defect (MARX e JOHNSON 1987). A better understanding of the nature of the radiation tissue injury is essential in assessing the risk for ORN and creating clinical guidelines of management for irradiated patients.

The radiation tissue injuries are progressive and related to both structural and functional alterations in the supporting microvascular and cells (MARX e JOHNSON 1987). Experimental studies on radiation tissue injury have been reported basically in animal models. The first study on the effect of irradiation on human bone was reported by EWING (1926). In this study, the author mentioned the

great difficulty in interpreting the significance of the irradiation bone damage. The author observed a progressive productive osteitis after heavy irradiation which showed increased fragility and tendency to spontaneous fracture. The author suggested that ORN may be a result of injury of vascular system in the periosteum and in the surrounding soft tissues.

A review of bone changes in ORN was made by PAPPAS (1969). Until this date, some experimental studies suggest that ORN may be a direct effect of irradiation on osteocyte, and changes in the blood vessels would play a role in the aggravation and prolongation of these effects (EWING 1926; GOWGIEL 1960).

Another experimental study on long-term effects of radiation on the vascularity of rat bone, using a technique of measurement with chromium-51 was reported by CUTRIGHT e BRADY (1971). The authors analyzed the radiation-induced depression in the humerus of 62 rats at 2 and 8 months after irradiation with a 250 kVp x-ray unit. Vascularity decreased in the irradiated humerus to 28% of the unirradiated bone at 4000 cGy 2 months after irradiation. At 8 months after irradiation, there was no recovery of vascularity at any of the doses studied (2000, 4000, 6000, 8000, and 10,000 cGy). NIEBEL e NEENAN (1957) reported on three cases in which part of the mandible had received over 6000 cGy and was subsequently excised. The authors observed that there was little microscopic evidence of complete obliterative endarteritis and the most predominant change observed was the presence of a diffuse fibrosis.

Vital microscopic studies on the vascular and cellular reaction of living bone submitted to irradiation have been reported by some authors. Experimental



studies by JACOBSSON et al. (1987a), who used a bone chamber in the tibia of rabbits, showed a reduction of up 71% in bone healing after a single dose of 15Gy given with a telecobalt machine. Clear recovery mechanisms were observed with increasing intervals after irradiation. Nevertheless, a reduction of up 28.9% in myelopoiesis was observed even after a 12-month interval. The authors noted that this recovery may be attributable to repair of damaged cells as they are reproduced in future generations. They noted in this animal model that a 1-year recovery phase is advised before bone surgery (exodontia, implant placement, reconstructive surgery).

ALBREKTSSON et al. (1980), evaluated the effect of irradiation on bone tissue on rabbits by a vital microscopic method using a titanium bone chamber that allowed tissue observation in different intervals after irradiation. The authors concluded that at 6 weeks after irradiation, the vascularity started to change, bone resorption began, and most of the original bone was resorbed at the end of 10 weeks.

Vital microscopic study of the vascular response to radiation was reported by JACOBSSON et al. (1987b), where they documented vascular injury after a single dose of 25 Gy cobalt. The authors showed that vessels more affected were capillaries and venules, whereas the arterioles were least affected. The authors noted also that central blood supply to the cancellous bone of the mandible through the inferior alveolar artery may be less affected by radiation than the periosteal blood supply to the cortical bone.

The effects of high-dose irradiation on the biomechanical and morphological properties of cortical bone and their time-related changes were studied in Sprague-Dawley rats by MAEDA et al. (1988). Two weeks after a single fraction of

3500 cGy, the animals had lost weight and disappearance of bone cells were noted. The bone marrow showed reduced hematopoietic elements and sinusoids with increased fat.

In the literature there is a paucity of clinical studies on the evaluation of radiation tissue injury in humans. Since MARX e JOHNSON (1987) study, on radiobiology of ORN, no clinical study has been reported on irradiation tissue injury in humans. The authors demonstrated that hyperemia and endarteritis begin early in the radiation sequence and persisted for up to 6 months after radiotherapy. Thrombosis appears to be a late effect in the radiation sequence, and becomes a fibrous thrombi in later years when compared with the early thrombi, which are basically blood clots. Hypovascularity and fibrosis began at about 6 months after radiation and progressively worsened with time. Similar histological findings were reported in other bone tissue locations (EL-NAGGAR et al. 1980; ROSENTHAL e MARVIN 1959; SIMMONS e HOLTZMAN 1983; MARX e JOHNSON 1987). Beyond these mentioned histopathologic processes, our histologic examination also identified an increase in fat of the bone-marrow cavity in irradiated bone specimens. This phenomenon may be related to retardation of the normal process of turnover of bone, since the mandible would be considered skeletally mature in this period. Although there is a tendency to recover from this event, bone formation appears to take a longer time to do so than does bone resorption. This large and fat bone-marrow cavity would be considered an end stage of radiation tissue injury. Similar findings have been reported in studies of radiation in skeletally mature animals (ROSENTHAL et al. 1957; MARLBOROUGH 1972; KING et al. 1979; MAEDA et al. 1988).

MARX e JOHNSON (1987) have proposed the concept of a hypovascular-hypocellular-hypoxic tissue formation as the major problem related to irradiated wounds. Our results with regard to the measurements of irradiation tissue effects confirm the findings of this previous study. In the present study, the measurement of cellular loss (hypocellularity) in irradiated specimens indicate a significant decrease compared with the control specimens ( $p = 0.007$ ). It seems that cellular loss begins to a small degree just after radiation therapy and then progressively worsens throughout the years (MARX e JOHNSON 1987). This phenomenon was also observed in our study, which showed an increase of cellular loss in irradiated specimens after 6 months from radiation (1.8%) compared to irradiated specimens in the first 6 months after radiation (2.4%), and this was statistically significant ( $p = 0.049$ ). There has been a debate whether the effect of irradiation is mainly on the bone or on the soft tissues. Regarding to cellular loss, bone specimens showed more significant hypocellularity than the soft tissues. In considering the radiosensitivity of bone tissue, the particular physical condition with respect to the absorption of ionizing radiation must be considered. Because of its high calcium content, bone may absorb 30 to 40 per cent more radiation than the surrounding soft tissues, and this factor may account for an increase in secondary radiation produced under certain conditions in bone. Thus, the actual absorption of a given dose of irradiation is considerably greater in bone than in the overlying mucous membrane. So bone cells would receive both primary radiation and the maximum effect of the secondary rays. Another point related to this fact, is the importance of recognizing the differences in the quality of radiation (Kilovolt or megavolt



irradiation), because of the difference in absorption of radiation energy between bone and soft tissues. When using high-energy photons, the absorbed dose is approximately the same in bone and soft tissues (PARKER e BERRY 1976). Similarly, HOWLAND et al. (1975) demonstrated that bone changes were frequently more severe following equivalent exposure to kilovolt than megavolt irradiation in a retrospective study of patients who had received irradiation to the shoulder region.

Hypocellularity is frequently present in irradiated tissue and is often associated with disproportionate accumulation of collagen (MARX e JOHNSON 1987; SHAHA et al. 1996). Our results with regard to the measurement of fibrosis in irradiated specimens indicate a significant increase compared to the control specimens ( $p = 0.027$ ). Similarly, fibrosis is also noted to appear at about 6 months and to then progressively worsen, being an end stage of radiation tissue injury (MARX e JOHNSON 1987). In our study, fibrosis showed a great tendency to statistic significance in irradiated specimens after 6 months from radiation therapy (67.3%) compared to irradiated specimens in the first 6 months after radiotherapy (60.1%) ( $p = 0.072$ ). Fibrosis was also more evident in bone than in the surrounding soft tissues. Here again, the same explanation for such fact that may be bone receives more radiation because of secondary rays, and recover from this process appears to take a much longer time to do so than does soft tissues.

The inability of oxygen to diffuse well in the radiated tissues may be the dense fibrosis formation and hypovascularity. Some authors have shown radiation-induced hypovascularity to be the dominant phenomenon in end stage of radiation tissue injury (MARX e JOHNSON 1987). So, hypovascularity is a critical event in

radiation tissue injury. The CD34 antigen is a sensitive marker of vascular endothelium and angiogenesis. The examination of CD34 is reported in several physiological and pathological events (RAVI et al. 1998, 2001; YOSHIDA et al. 1999; MAKRIS et al. 1999; ARIAS e SOARES 2000; FOROOTAN et al. 2000; SEMBA et al. 2001; SEZER et al. 2001). However, the present study is the first to report on radiation-induced hypovascularity using anti-human CD34 monoclonal antibody. Our results with regard to the measurement of vascular density in irradiated specimens indicate a significant decreased vascular density compare to the control specimens ( $p < 0.001$ ). Previous study (MARX e JOHNSON 1987) had shown the inverse index of vascular density in the irradiated tissue and a direct risk for osteoradionecrosis. The same study shows a linear relationship with time indicating loss of vascular component, and, therefore, loss of oxygen tension perfusion with time. In the present study, there was no evidence of spontaneous revascularization with time.

Regarding to the difference between irradiated specimens with and without osteoradionecrosis, this study shows each to have different time course and radiation injuries. Figures 6 and 7 show radiation tissue injuries (hypocellularity and fibrosis) versus time and, illustrate distinctions between irradiated specimens with and without osteoradionecrosis. Specimens with osteoradionecrosis represented a great cellular loss of normal tissue. The attempts of repair could not support the demand for replacement of cellular and structural elements rendered nonviable by the radiation. As time progresses, there was a continuation of tissue injury from the radiation observed histologically as hypocellular fibrosis of tissue, that in spite of recovery and



repair attempts, these effects reduce its repair capacity. In other hands, specimens without osteoradionecrosis showed a mixture of cell death and cell injury. In this situation, there was a great amount of sublethal cellular injury and a smaller amount of cellular death to normal cells. As radiation therapy is completed, initial attempts at cellular recovery begin and reduce the degree of radiation tissue injury. So, there was fewer deaths of normal cells and those injured by radiation had better recovery capability. However, after years from radiation, the fibrosis is greater and the tissue perfusion is less, turning to a greater risk for osteoradionecrosis.

It is important to remember that many factors make comparisons of studies difficult, and the results of studies can be difficult to translate into clinical practice. The choice of animal model, irradiation dose, dose rate / day, and period of time after irradiation are among these factors. However, extrapolation of results to human should be made with caution, since no experimental study is exactly comparable to humans.

The findings in this study support earlier findings that irradiation affects bone and the surrounding soft tissues. Although, there has been a debate whether the effect of irradiation is mainly on the bone or on the soft tissues, our findings show that irradiation affects more bone than the surrounding soft tissues. There has also been a discussion whether the effect of irradiation is mainly on the cells or on the fine vasculature in irradiated tissue. Our results show that both mechanisms are evident and play an important role on the pathologic process of irradiation tissue injury. From the data of this study, we can recommend clinical guidelines in the management of irradiated patients.

Dental extractions have been pointed as a factor for causing osteoradionecrosis. Extractions to be done before radiation therapy should be done with at least sufficient time for healing of the overlying mucosa. Teeth removed at longer period before radiation therapy have a reduced risk for osteoradionecrosis in comparison to those removed closer to radiation. It is important the role of skilled dentists in removing teeth of head and neck cancer patients, who can competently manage critical parameters to reduce osteoradionecrosis after extractions. However, any extractions require a gentle technique, minimal mucoperiosteal flap elevation, minor alveoloplasty and, primary mucosal closure.

The tooth extraction, dental implants or other surgical wounding during radiation therapy is not advised. The surgical wounding and irradiation tissue injury are synergic and will present a high risk of osteoradionecrosis. These surgical procedures should be delayed until radiation therapy is finished. At this time, strong consideration should be done to the use of hyperbaric oxygen before any surgical approach.

The dilemma of surgery and period of time since radiation therapy continues a debate. Surgical procedures in already irradiated tissue, whenever feasible, should always be done after previous hyperbaric oxygen therapy. Practitioners should not delay surgical procedures in irradiated tissue expecting to take advantage of spontaneous capacity of recovering with time. Hyperbaric oxygen has shown to increase angiogenesis in irradiated tissue and a capacity to clinically reduce complications of healing in wounded irradiated tissue.

Finally, osteoradionecrosis is a serious complication associated with head and neck radiation. Irradiation therapy produces consistent injuries to bone and the surrounding soft tissues. This data may provide additional information for clinicians to assist in management decisions for patients who are at risk of osteoradionecrosis of the jaw.

## LEGENDS

**FIGURE 1.** Photomicrographs of irradiated specimens stained with hematoxylin-eosin showing the radiation tissue injuries.

**FIGURE 1A.** Early histologic effects of radiation. Hyperemia and endarteritis (inflammation). (Original magnification X 200.)

**FIGURE 1B and 1C.** Early histologic effects of radiation. Hyperemia, endarteritis (inflammation) and, cellular thrombosis formation. Note inflammatory cells inside the lumen of vessels. (Original magnification X 200.)

**FIGURE 1D.** Late histologic effect of radiation. Note the large and fatty bone-marrow cavity. (Original magnification X 200.)

**FIGURE 1E and 1F.** Late histologic effects of radiation. Note the characteristic hypovascular and hypocellular fibrosis in bone specimens. (Original magnifications X 40 and X100, respectively.)

**FIGURE 2.** Photomicrograph of an irradiated specimen. CD34 expression is scarce in the walls of blood capillaries in the bone tissue. (Original magnification X 400.)

**FIGURE 3.** Comparison of cellularity in irradiated and control specimens. Irradiated specimens show a significant cellular loss (mean, 1.9%) when compared with control specimens (mean, 7.8%) ( $p = 0.007$ ).

**FIGURE 4.** Comparison of fibrosis in irradiated and control specimens. Irradiated specimens show a significant increase of fibrosis (mean, 72.7%) when compared with control specimens (mean, 65.7%) ( $p = 0.007$ ).

**FIGURE 5.** Comparison of vascular density in irradiated and control specimens. Irradiated specimens show a significant decrease of vascular density (mean, 3.0%) when compared with control specimens (mean, 15.1%) ( $p < 0.001$ ).

**FIGURE 6.** Scatter plot showing correlation between cellularity in relation to time in irradiated specimens with and without ORN.

**FIGURE 7.** Scatter plot showing correlation between fibrosis in relation to time in irradiated specimens with and without ORN.



**FIGURE 1**

**FIGURE 2**

FIGURE 3

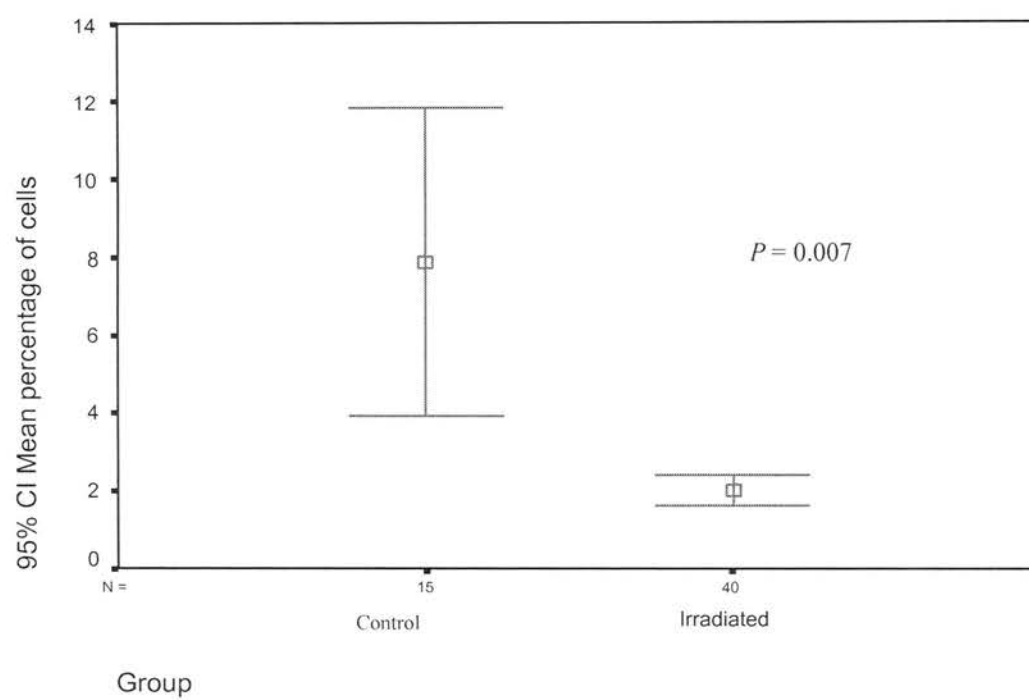


FIGURE 4

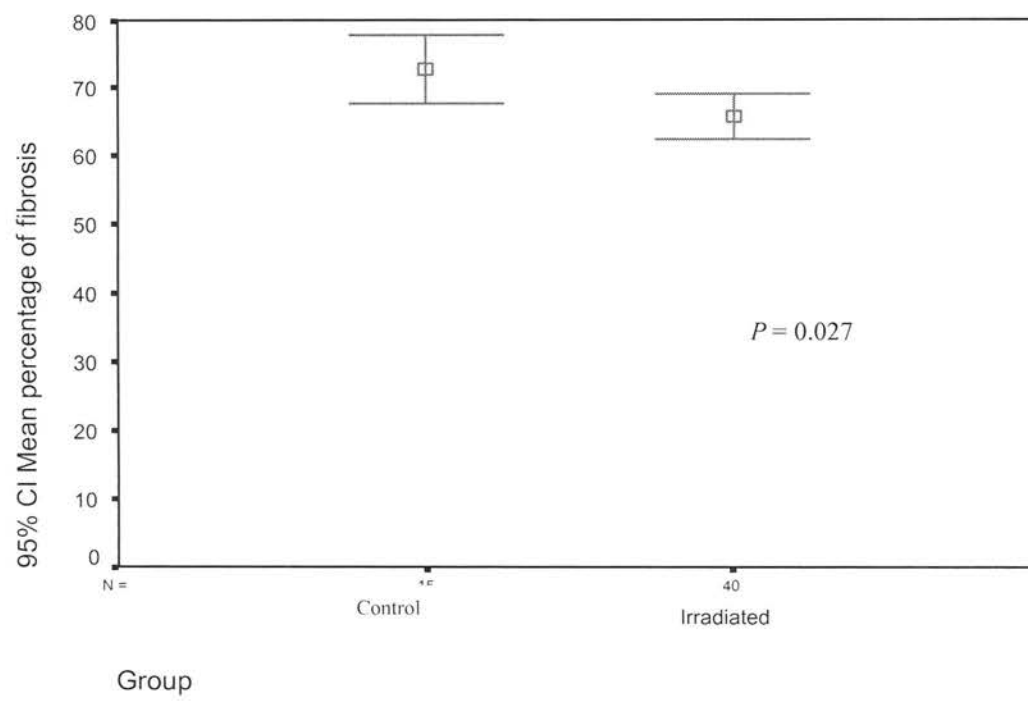


FIGURE 5

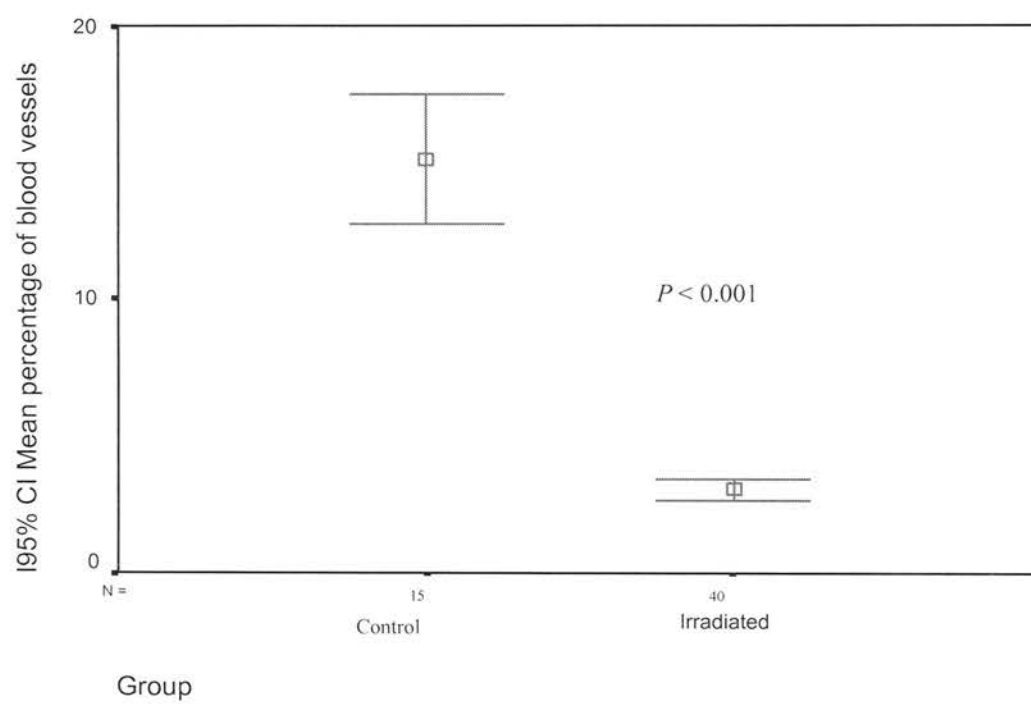




FIGURE 6

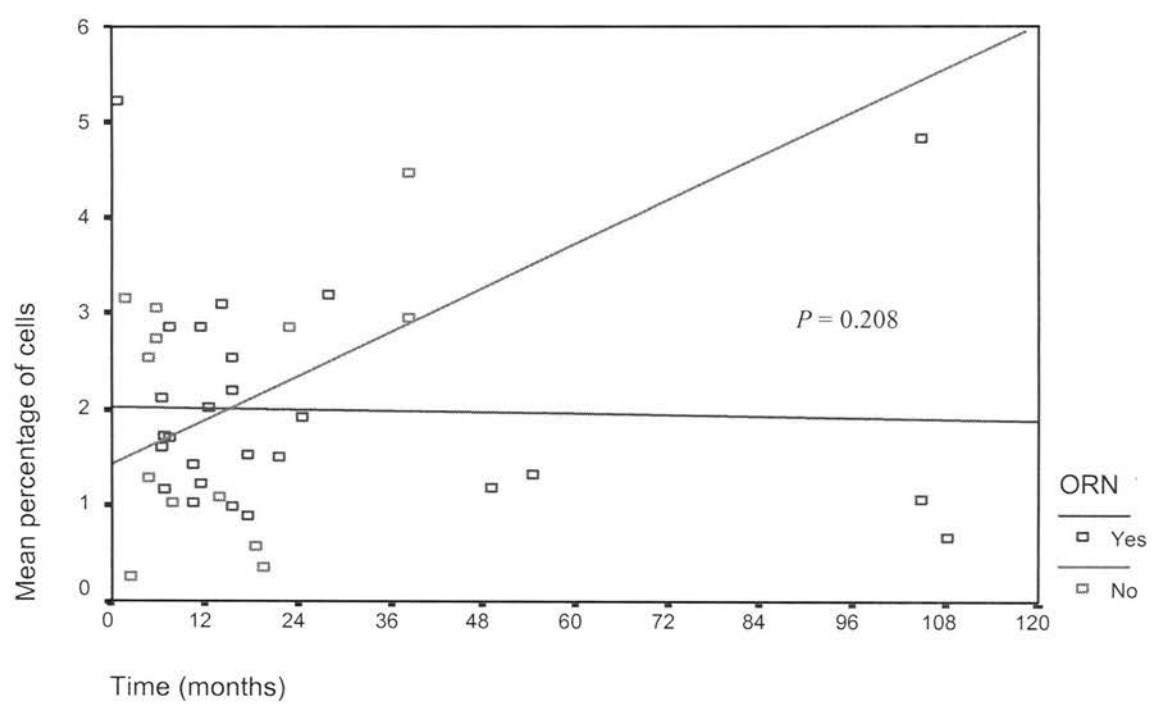
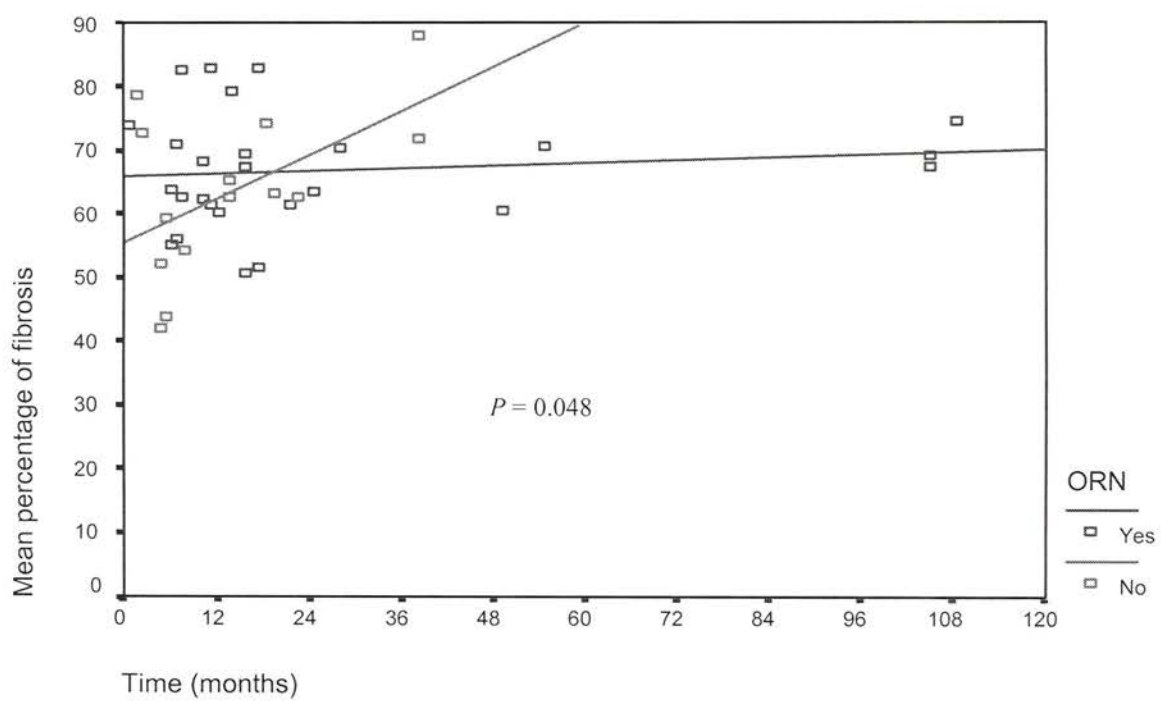


FIGURE 7



**FIGURE 8**

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento adequado e eficiente de qualquer doença requer inicialmente o seu correto diagnóstico. Os critérios utilizados para o diagnóstico de osteorradionecrose variam muito entre os autores, sendo curioso observar que em períodos diversos há discordância do mesmo autor (MARX 1983; MARX e JOHNSON 1987; EPSTEIN et al. 1987a e b; WIDMARK et al. 1989; KOKA et al. 1990; MERKESTEYN et al. 1995). Alguns autores (MARX e JOHNSON 1987) têm atribuído os problemas de conceituação da osteorradionecrose à simplificação do seu diagnóstico, como por exemplo, realizar diagnóstico de osteorradionecrose em casos de necroses de tecidos moles auto-cicatrizantes, e portanto, creditado casos de manejo satisfatório com "falsas osteorradionecroses".

Portanto, alguns detalhes devem ser comentados à respeito do diagnóstico de osteorradionecrose: 1) Exposição óssea após a radioterapia não é necessariamente causada por necrose isquêmica do tecido ósseo, pois pode ser observada e associada com regressão tumoral, recorrência, ou metástase. Nessas situações o diagnóstico final não é baseado somente nos aspectos clínicos, radiográficos e história médica pregressa, mas principalmente no exame histológico. 2) O diagnóstico de osteorradionecrose é tradicionalmente feito através da observação de exposição óssea por um período mínimo de 3 meses. Apesar do tempo considerado, não há bases fisiopatológicas para diferenciação entre exposições ósseas de 2,9 – 3,1 meses de duração. 3) Alguns sinais, como por exemplo, fístulas, celulites e fratura patológica,



não são critérios necessários para o diagnóstico de osteorradionecrose. 4) Apesar de todas exposições ósseas de osteorradionecrose dividirem a mesma base fisiopatológica, essas exposições não representam necessariamente os mesmos graus de lesão de radiação e, portanto, não necessitam das mesmas modalidades terapêuticas para suas resoluções (MORRISH et al. 1981; MARX 1983, 1984; EPSTEIN et al. 1987a).

O tratamento da osteorradionecrose é um tema de contínuo debate em literatura devido a sua patogênese não ser ainda completamente compreendida. Osteorradionecrose foi considerada por muitos anos como, uma osteomielite do osso necrótico irradiado. A partir da redefinição proposta por MARX e JOHNSON (1987), osteorradionecrose é caracterizada por uma seqüência de radiação, formação de um tecido hipóxico-hipocelular-hipovascular, rompimento da mucosa oral protetora e conseqüente desenvolvimento de uma ferida não-cicatrizante. Em vista do grau de agressão da radiação ser extremamente variável de indivíduo para indivíduo, a osteorradionecrose pode apresentar capacidade de cicatrização espontânea ou necessitar de intervenções cirúrgicas associadas à revascularização do tecido. Em vista dos resultados satisfatórios com o uso de oxigenação hiperbárica adjuvante e a introdução de novas técnicas de reconstrução microcirúrgica, o debate a respeito do tratamento da osteorradionecrose acentuou-se na última década. Mesmo assim, entre as equipes multidisciplinares é consenso que a manipulação das seqüelas advindas dos efeitos teciduais da radiação continua um grande desafio a ser superado. Nesse contexto, consideramos que todos pacientes irradiados apresentam efeitos teciduais da radiação em variada intensidades. Estes efeitos teciduais apresentam uma relação

Imagem 1. Osteorradionecrose. Foto 128  
Imagem 2. Osteorradionecrose. Foto 129  
Imagem 3. Osteorradionecrose. Foto 130

linear com o risco de desenvolvimento de osteorradionecrose, ou seja, quanto mais intensas são as lesões teciduais da radiação maior é o risco de desencadeamento da osteorradionecrose. Isto posto, concluímos que o comportamento da osteorradionecrose é a manifestação clínica das variadas intensidades de lesões teciduais da radiação no osso.

Tradicionalmente, o tratamento envolve a abordagem cirúrgica, conservadora (sequestrectomias) ou radical (ressecções), e ocasionalmente o uso da oxigenação hiperbárica adjuvante. A utilização da oxigenação hiperbárica tem como objetivo aumentar a tensão de oxigênio nos tecidos e aumentar sua capacidade de cicatrização. Nas últimas décadas, nossa experiência no tratamento da osteorradionecrose tem demonstrado que os protocolos de abordagem variam conforme o comportamento clínico da osteorradionecrose. Até meados da década de 1990, nossa experiência no tratamento da osteorradionecrose era exclusivamente ambulatorial (cuidados clínicos locais) e cirúrgica (sequestrectomia). Os resultados desta experiência conservadora foram publicados em 1997, e evidenciaram um número limitado de casos com resposta satisfatória (42.3%), sendo que a maioria permaneceu refratária a este tipo de tratamento. Naquela época iniciamos também a utilização da oxigenação hiperbárica de forma adjuvante à cirurgia nos casos refratários àquela terapia conservadora. Os resultados desta abordagem apresentados nesta tese são da nossa experiência até 1999, e mostram um índice bastante satisfatório de cura (14/18 casos) da osteorradionecrose.

Estes protocolos de tratamento para a osteorradionecrose são bastante eficazes na maioria dos casos. No entanto, continua um desafio para as equipes

multidisciplinares o tratamento de extensas osteorradionecroses. Estes casos são caracterizados por amplas áreas de necroses ósseas e de tecidos moles, trismo severo, algias intensas, e incapacidade de fala e mastigação. Nesta condição, a abordagem tradicional apresenta resultados insatisfatórios e desanimadores, tanto para o paciente como para os profissionais. Atualmente, o tratamento destes casos é feito com a associação de ressecções cirúrgicas e reconstruções microcirúrgicas (SHAHA et al. 1996; AITASALO et al. 1997). O objetivo desta abordagem, além da ressecção do tecido ósseo necrótico, é o restabelecimento da continuidade mandibular, a manutenção do contorno facial e a promoção das funções de fala e mastigação. A opção pela reconstrução mandibular microcirúrgica à reconstrução com enxertos convencionais, é o fato do local irradiado a ser reconstruído não apresentar condições ideais e propícias de uma área receptora, em razão dos efeitos teciduais da radiação. Nesta situação, a extensa perda tecidual causada pela osteorradionecrose e a presença de um tecido hipóxico e hipovascularizado, não favorecem o uso de técnicas reconstrutoras convencionais. Assim, os enxertos microcirúrgicos são uma excelente alternativa pois apresentam vasos e suportes sanguíneos próprios, que também possibilitam a reconstrução de tecido mole perdido na osteorradionecrose.

Nossa experiência com reconstruções microcirúrgicas para o tratamento de osteorradionecrose severas é recente, e resume-se a 4 casos. Em todos casos, a reconstrução microcirúrgica foi feita em osteorradionecroses extensas de mandíbula e utilizamos a fíbula como área doadora. Os resultados desta abordagem foram bastantes satisfatórios e promissores na eliminação dos tecidos necróticos, manutenção do contorno facial e melhoria da qualidade de vida dos pacientes. No

entanto, acreditamos que o melhor tratamento para a osteorradionecrose continua sendo sua prevenção, baseada no melhor conhecimento da fisiopatologia da radiação e na eliminação de fatores de risco para a osteorradionecrose, através do atendimento odontológico prévio a radioterapia.

Na literatura atual existe uma falta de estudos prospectivos e randomizados, sendo que a maior parte das informações das lesões teciduais da radiação são baseadas em estudos experimentais usando diferentes tipos de modelos animais. Estudos clínicos em humanos por meio de avaliações histopatológicas e de perfusão de oxigênio nos tecidos continuam sendo importantes para o direcionamento do manejo de pacientes irradiados. Recentes estudos experimentais indicam que as alterações da reparação óssea induzidas pela radiação podem ser revertidas através da aplicação de proteínas morfogenéticas do osso humano (rBMP-2) (WURZLER et al. 1998; HOWARD et al. 1998). Nossa opinião é que se deve considerar a possibilidade de estudos multicêntricos, prospectivos e randomizados, em relação a diferentes protocolos de tratamento para estes pacientes.

## **CONCLUSÕES**



## 5. Conclusões

1. O tratamento de osteorradionecrose refratárias de mandíbula e maxila com cirurgia e oxigenação hiperbárica adjuvante apresentou resultados satisfatórios de cura da osteorradionecrose (14 / 18 casos);
2. O osso e o tecido mole adjacente apresentaram lesões teciduais da radiação;
3. As lesões teciduais da radiação foram mais evidentes nos ossos que nos tecidos moles adjacentes. Ossos irradiados apresentaram uma diminuição da celularidade e aumento de fibrose, sendo estes significativos;
4. As lesões teciduais da radiação, como hipocelularidade e hipovascularização, apresentaram um aumento linear com o intervalo após a radiação, sendo estes progressivos;
5. Os tecidos irradiados são hipocelularizados, hipovascularizados, fibrosos e hipóxicos;
6. A abordagem cirúrgica prévia à radioterapia deve ser feita, sempre que possível, com tempo suficiente para cicatrização das mucosas adjacentes. Cirurgias realizadas mais próximas do momento da irradiação apresentam um

risco maior de desenvolvimento de osteorradionecrose do que cirurgias realizadas com períodos mais longos de cicatrização;

7. A abordagem cirúrgica nos tecidos irradiados pode apresentar um risco elevado de complicações, e portanto, deve-se considerar o uso de oxigenação hiperbárica prévia ao ato cirúrgico.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aitasalo K, Niinikoski J, Grénman R, Virolainen E. A modified protocol for early treatment of osteomyelitis and osteoradionecrosis of the mandible. **Head Neck** 1998; 20:411-7.
2. Albrektsson T, Jacobsson M, Turesson I. Irradiation injury of bone tissue: a vital microscopic method. **Acta Radiol Oncol** 1980; 19:235-9.
3. Arias V, Soares FA. Vascular density (tumor angiogenesis) in non-Hodgkin's lymphomas and florid follicular hyperplasia: a morphometric study. **Leuk Lymphoma** 2000; 40:1-10.
4. Barak S, Rosenblum I, Czerniak P, Arieli J. Treatment of osteoradionecrosis combined with pathologic fracture and osteomyelitis of the mandible with electromagnetic stimulation. **Int J Oral Maxillofac Surg** 1988; 17:253-6.
5. Bedwinick JM, Shukowsky LJ, Fletcher GH, Daley TE. Osteoradionecrosis in patients treated with definitive radiotherapy for squamous cell carcinomas of the oral cavity and naso- and oropharynx. **Radiology** 1976; 119:665-7.

6. Beumer III J, Harrison R, Sanders B, Kurrasch M. Postradiation dental extractions: a review of the literature and a report of 72 episodes. **Head Neck Surg** 1983b; 6:581-6.
7. Beumer III J, Harrison R, Sanders B, Kurrasch M. Preradiation dental extractions and the incidence of bone necrosis. **Head Neck Surg** 1983a; 5:514-21.
8. Brighton C, Schaffer J, Shapiro D, Tang J, Clark C. Proliferation and macromolecular synthesis by rat calvarial bone cells grown in various oxygen tensions. **J Orthop Res** 1991; 9:847-54.
9. Clayman L. Management of dental extractions in irradiated jaws: a protocol without hyperbaric oxygen therapy. **J Oral Maxillofac Surg** 1997; 55:275-9.
10. Costa AL, de Araujo NS, Pinto DS, de Araujo VC. PCNA/AgNOR and Ki-67/AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 1999; 28:438-41.
11. Coulson D, Ferguson A, Diehl R. Effect of hyperbaric oxygen on the healing femur of the rat. **Surg Forum** 1966; 17:449-50.



12. Curi MM, Dib LL. Osteoradionecrosis of the jaws: a retrospective study of the background factors and treatment in 104 cases. **J Oral Maxillofac Surg** 1997; 55:540-4.
13. Curi MM, Dib LL, Kowalski LP, Landman G. Opportunistic actinomycosis in osteoradionecrosis of the jaws in patients affected by head and neck cancer: incidence and clinical significance. **Oral Oncol** 2000; 36:294-9.
14. Cutright DE, Brady JM. Long-term effects of radiation on the vascularity of rat bone: quantitative measurements with a new technique. **Radiat Res** 1971; 48:402-8.
15. Dare A, Hachisu R, Yamaguchi A, Yokose S, Yoshiki S, Okano T. Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. **J Dent Res** 1997; 76:658-64.
16. Davis JC, Dunn JM, Gates GA, Heimbach RD. Hyperbaric oxygen: a new adjunct in the management of radiation necrosis. **Arch Otolaryngol** 1979; 105:58-61.
17. El-Naggar AM, Hanna IRA, Chanana AD, Carsten AL, Cronkite EP. Bone marrow changes after localized acute and fractionated X irradiation. **Radiat Res** 1980; 84:46-52.

18. Epstein JB, Rea G, Wong FLW, Spinelli J, Stevenson-Moore P.  
Osteoradionecrosis: study of the relationship of dental extractions in patients receiving radiotherapy. **Head Neck Surg** 1987a; 10:48-54.
19. Epstein JB, Wong FLW, Stevenson-Moore P. Osteoradionecrosis: clinical experience and a proposal for classification. **J Oral Maxillofac Surg** 1987b; 45: 104-10.
20. Epstein J, Meij E, Mckenzie M, Wong F, Lepawsky M, Stevenson-Moore P.  
Postradiation osteoradionecrosis of the mandible. a long-term follow-up study.  
**Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1997; 83:657-62.
21. Ewing J. Radiation osteitis. **Acta Radiol** 1926; 6:399-409.
22. Farmer J, Shelton D, Angelillo J, Bennet P, Hudson W. Treatment of radiation-induced tissue injury by hyperbaric oxygen. **Ann Otolaryngol** 1978; 87:707-15.
23. Fattore L, Strauss RA. Hyperbaric oxygen in the treatment of osteoradionecrosis: a review of its use and efficacy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1987; 63:280-6.
24. Forootan SS, Ke Y, Jones AS, Helliwell TR. Basic fibroblast growth factor and angiogenesis in squamous carcinoma of the tongue. **Oral Oncology** 2000; 36:437-43.

25. Galler C, Epstein JB, Guze KA, Buckles D, Stevenson-Moore P. The development of osteoradionecrosis from sites of periodontal disease activity: report of 3 cases. **J Periodontol** 1992; 63:310-6.
26. Gowgiel JM. Experimental radio-osteonecrosis of the jaws. **J Dent Res** 1960; 39:176-97.
27. Granstrom G, Fagerberg-Mohlin B, Fornander J, Lindstrom J, Mercke C. Aspects on the management of patients with osteoradionecrosis after therapy of head and neck cancer. **XVIII<sup>th</sup> Annual Meeting of EUBS**; 1992.
28. Greenwood T, Gilchrist A. Hyperbaric oxygen and wound healing in post-irradiation head and neck surgery. **Br J Surg** 1973; 60:394-7.
29. Greenwood T, Gilchrist A. The effects of HBO on wound healing following ionizing radiation. Trapp WC, ed. **Fifth International Hyperbaric Conference**; 1974. Mês dia; Barnaby, British Columbia; Simon Fraser University; 1974. 253-63.
30. Hao SP, Chen HC, Wei FC, Chen CY, Yeh ARM. Systematic mangement of osteoradionecrosis in the head and neck. **Laryngoscope** 1999; 109:1324-8.

31. Happonen RP, Viander M, Pelliniemi L, Aitasalo K. Actinomyces israelii in osteoradionecrosis of the jaws: histopathologic and immunocytochemical study of five cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1983; 55:580-8.
32. Howard B, Brow K, Leach J, Chang CH, Rosenthal D. Osteoinduction using bone morphogenetic protein in irradiated tissue. **Arch Otolaryngol Head Neck** 1998; 124:985-8.
33. Howland W, Loeffler K, Starchman DE, Johnsson RE. Post-irradiation atrophic changes of bone and related complications. **Radiology** 1975; 117:667-85.
34. Hunt T, Pai M. The effect of varying ambient oxygen tensions on wound healing metabolism and collagen synthesis. **Surg Gynecol Obstet** 1972; 135:561-7.
35. Jacobsson M, Kalebo P, Tjellstrom A, Turesson I. Bone cell viability after irradiation: an enzyme histochemical study. **Acta Oncol** 1987; 26:463-5.
36. Kenzora J, Steele R, Yosipovitch Z, Glimcher M. Experimental osteonecrosis of the femoral head in adult rabbits. **Clin Orthop Rel Res** 1978; 130:8-46.
37. Ketchum S, Thomas A, Hall A. Angiographic studies of the effect of hyperbaric oxygen on burn wound revascularization. In: Iwa JW&T, ed. **Proceedings of the**

**4<sup>th</sup> International congress on Hyperbaric Medicine. Baltimore: William & Wilkins, 1970; 388-94.**

38. Kindwall E, Gottlieb L, Larsson D. Hyperbaric oxygen therapy in plastic surgery: a review article. **Plast Reconstr Surg** 1991; 88:898-908.
39. King GE, Scheetz J, Jacob RF, Martin JW. Electrotherapy and hyperbaric oxygen: promising treatments for postradiation complications. **J Prosthet Dent** 1989; 62: 331-4.
40. King M, Casarett G, Weber D. A study of irradiated bone:I. histopathologic and physiologic changes. **J Nucl Med** 1979; 20:1142-9.
41. Kluth EV, Jain PR, Stuchell RN, Frich JC. A study of factors contributing to the development of osteoradionecrosis of the jaws. **J Prosthet Dent** 1988; 59:194-201.
42. Koka VN, Lusinchi A, Roland J, Schwaab G. Osteoradionecrosis of the mandible: study of 104 cases treated by hemimandibulectomy. **J Laryngol Otology** 1990; 104:305-7.



43. Lambert PM, Intriere N, Eichstaedt R. Management of dental extractions in irradiated jaws: a protocol with hyperbaric oxygen therapy. **J Oral Maxillofac Surg** 1997; 55:268-74.
44. La Van F, Hunt T. Oxygen and wound healing . **Clin Plast Surg** 1990; 17:463-72.
45. Larsen P. Placement of dental implants in the irradiated mandible: a protocol involving adjunctive hyperbaric oxygen. **J Oral Maxillofac Surg** 1997; 55:967-71.
46. London SD, Park SS, Gampper TJ, Hoard MA. Hyperbaric oxygen for the management of radionecrosis of bone and cartilage. **Laryngoscope** 1998; 108:1291-8.
47. Maeda M, Bryant MH, Yamagata M, Li G, Earle JD, Chao EYS. Effects of irradiation on cortical bone and their time-related changes: a biomechanical and histomorphological study. **J Bone Joint Surg** 1988; 70:392-9.
48. Maier A, Gaggl A, Santler G, Anegg U, Fell B, Karcher H, Friehs GB. Review of severe osteoradionecrosis treated by surgery alone or surgery with postoperative hyperbaric oxygenation. **Br J Oral Maxillofac Surg** 2000; 38:173-6.

49. Mainous E. Osteogenesis enhancement utilizing hyperbaric oxygen therapy. **Hyperbaric Oxygen Review** 1982; 3:181-5.
50. Mainous EG, Hart GB. Osteoradionecrosis of the mandible treatment with hyperbaric oxygen. **Arch Otolaryngol** 1975; 101:173-8.
51. Mainous EG, Hart GB. The treatment of radiation necrosis with hyperbaric oxygen. **Cancer** 1976; 37:2580-5.
52. Makris A, Powles TJ, Kakolyris S, Dowsett M, Ashley SE, Harris AL. Reduction in angiogenesis after neoadjuvant chemoendocrine therapy in patients with operable breast carcinoma. **Cancer** 1999; 85:1996-2000.
53. Mansfield M, Sanders D, Heimbach R, Marx R. Hyperbaric oxygen as an adjunct in the treatment of osteoradionecrosis of the mandible. **J Oral Maxillofac Surg** 1981; 39:585-9.
54. Marlborough M. Late radiation changes in bone. **Br J Radiol** 1972; 45:394.
55. Marx RE. Osteoradionecrosis of the jaws: review and update. **Hyperbaric Oxygen Review** 1984; 5:78-126.

56. Marx RE. Osteoradionecrosis. a new concept of its pathophysiology. **J Oral Maxillofac Surg** 1983; 41: 283-8.
57. Marx RE, Johnson RP. Studies in the radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1987; 64:379-90.
58. Marx RE, Johnson RP. Problem wounds in oral and maxillofacial surgery: the role of hyperbaric oxygen. In: Davis J, Hunt T, editors. **Problem wounds in oral and maxillofacial surgery: the role of oxygen**. New York: Elsevier; 1988: p.65-123.
59. Marx R, Johnson R, Kline S. Prevention of osteoradionecrosis: a randomized prospective clinical trial of hyperbaric oxygen versus penicilin. **J Am Dent Assoc** 1985; 111:49-54.
60. Marx RE, Ehler WJ, Tayapongsak P, Pierce LW. Relationship of oxygen dose to angiogenesis induction in irradiated tissue. **Am J Surg** 1990; 160:519-24.
61. Maxymiw W, Wood R, Liu F. Postradiation dental extractions without hyperbaric oxygen . **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1991; 72:270-4.
62. McKenzie M, Wong F, Epstein J, Lepawsky M. Hyperbaric oxygen and postradiation osteonecrosis of the mandible. **Eur J Cancer** 1993; 29B:201-7.

63. Merkesteyn JPR, Bakker DJ, Borgmeijer-Hoelen AMMJ. Hyperbaric oxygen treatment of osteoradionecrosis of the mandible: experience in 29 patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1995; 80:12-6.
64. Mesquita RA, Orsini SC, Sousa M, de Araujo NS. Proliferative activity in peripheral ossifying fibroma and ossifying fibroma. **J Oral Pathol Med** 1998; 27:64-7.
65. Morrish RB, Chan E, Silverman S, Meyer J, Fu KK, Greenspan D. Osteoradionecrosis in patients irradiated for head and neck carcinoma. **Cancer** 1981; 47:1980-3.
66. Morton M, Simpson W. The management of osteoradionecrosis of the jaws. **Br J Oral Maxillofac Surg** 1986; 24:332-41.
67. Murray CG, Herson J, Daly TE, Zimmerman S. Radiation necrosis of the mandible: A 10 year study. Part I. Factors influencing the onset of necrosis. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1980; 6:543-8.
68. Neovius EB, Lind MG, Lind FG. Hyperbaric oxygen therapy for wound complications after surgery in the irradiated head and neck: a review of the literature and a report of 15 consecutive patients. **Head Neck** 1997; 19:315-22.

69. Niebel HH, Neenan EW. Dental aspects of osteoradionecrosis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1957; 10:1011.
70. Nilsson P. Effect of hyperbaric oxygen treatment on bone healing. an experimental study in the rat mandible and the rat tibia. **Swed Dent J Suppl** 1989; 64:1-33.
71. Pappas GC. Bone changes in osteoradionecrosis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1969; 27:622-30.
72. Parker R, Berry H. Late effects of therapeutic irradiation on the skeleton and bone marrow. **Cancer** 1976; 37:1162-71.
73. Paula AM, Carvalhais JN, Domingues MG, Barreto DC, Mesquita RA. Cell proliferation markers in the odontogenic keratocyst: effect of inflammation. **J Oral Pathol Med** 2000; 29:477-82.
74. Plafki C, Carl U, Glag M, Hartmann K. The treatment of late radiation effects with hyperbaric oxygenation (HBO). [Abstract] **Strahlenther Onkol** 1998;174 Suppl 3:66-8
75. Ravi D, Ramadas K, Mathew BS, Nalinakumari KR, Nair MK, Pillai MR. Angiogenesis during tumor progression in the oral cavity is related to reduced apoptosis and high tumor cell proliferation. **Oral Oncology** 1998; 34:543-8.



76. Ravi D, Ramadas K, Mathew BS, Panikkar KR, Nair MK, Pillai MR. Apoptosis, angiogenesis and proliferation: trifunctional measure of tumour response to radiotherapy for oral cancer. **Oral Oncology** 2001; 37:164-71.
77. Rissanen P, Rokkanen P, Paatsama S. The effect of Co 60 irradiation on bone in dogs. Part I. Mature bone. **Strahlenther** 1969; 137:162-9.
78. Rodemann H, Bamberg M. Cellular basis of radiation-induced fibrosis. **Radiother Oncol** 1995; 35:83-90.
79. Rohrer M, Kim Y, Fayos J. The effect of cobalt-60 irradiation on monkey mandibles. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1979; 48:424-40.
80. Rohrer M, Boulard R, Patterson M. Maxillary and mandibular titanium implants 1 year after surgery: histologic examination in a cadaver. . **Int J Oral Maxillofac Implants** 1995; 10:466-73.
81. Rosa LE, Jaeger MM, Jaeger RG. Morphometric study of nucleolar organiser regions in ameloblastoma and basal cell carcinoma. **Oral Oncol** 1997; 33:209-14.
82. Rosenthal L, Marvin JF. The effect of roentgen-ray quality on bone growth and cortical bone damage. **Am J Roentgenol** 1959; 82:206-16.

83. Sampaio HC, Loyola AM, Gomez RS, Mesquita RA. AgNOR count in exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. **Acta Cytol** 1999; 43:117-20.
84. Schweirger JN. Oral complications following radiation therapy: a five year retrospective report. **J Prosthet Dent** 1987; 58:78-82.
85. Semba I, Funakoshi K, Kitano M. Histomorphometric analysis of age changes in the human inferior alveolar artery. **Arch Oral Biol** 2001; 46:13-21.
86. Sezer O, Niemoller K, Kaufmann O, Eucker J, Jakob C, Zavrski I, Possinger K. Decrease of bone marrow angiogenesis in myeloma patients achieving a remission after chemotherapy. **Eur J Haematol** 2001; 66:238-44.
87. Shaha AR, Cordeiro PG, Hidalgo DA, et al. Resection and immediate microvascular reconstruction in the management of osteoradionecrosis of the mandible. **Head Neck** 1996; 19: 406-411.
88. Shaw J, Bassett C. The effects of varying oxygen concentrations on osteogenesis and embryonic cartilage in vitro. **J Bone Joint Surg** 1967; 49-A:73-80.

89. Siddiqui A, Davidson J, Mustoe T. Ischemic tissue oxygen capacitance after hyperbaric oxygen therapy: a new physiologic concept. **Plast Reconstr Surg** 1997; 99:148-55.
90. Simmons DJ, Holtzman RB. Plugged Haversian canals and local dose in radium cases. **Health Phys** 1983; 44 Suppl 1:179-86.
91. Sugimoto M, Takahashi S, Kotoura Y, et al. Changes in bone after high-dose irradiation. **J Bone Joint Surg** 1991; 73:492-7.
92. Sugimoto M, Takahashi S, Kotoura Y, et al. Osteocyte viability after high-dose irradiation in the rabbit. **Clin Orthop Rel Res** 1993; 297:247-52.
93. Thorn JJ, Kallehave F, Westergaard P, Hansen EH, Gottrup F. The effect of hyperbaric oxygen on irradiated oral tissues: transmucosal oxygen tension measurements. **J Oral Maxillofac Surg** 1997; 55:1103-7.
94. Thorn JJ, Hansen HS, Specht L, Bastholt L. Osteoradionecrosis of the jaws: clinical characteristics and relation to the field of radiation. **J Oral Maxillofac Surg** 2000; 58:1088-93.
95. Tompach PC, Lew D, Stoll JL. Cell response to hyperbaric oxygen treatment. **Int J Oral Maxillofac Surg** 1997; 26:82-6.

96. Tuncay O, Ho D, Barker M. Oxygen tension regulates osteoblast function. **Am J Orthod Dentofac Orthop** 1994; 105:457-63.
97. Waldorf H, Fewkes J. Wound healing. **Adv Dermatol** 1995; 10:77-96.
98. Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. **N Engl J Med** 1991; 324:1-8.
99. Widmark G, Sagne S, Heikel P. Osteoradionecrosis of the jaws. **Int J Oral Maxillofac Surg** 1989; 18: 302-6.
100. Wilcox J, Kolodny S. Acceleration of healing of maxillary and mandibular osteotomies by use of hyperbaric oxygen. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1976; 41:423-9.
101. Winet H. The role of microvasculature in normal and perturbed bone healing as revealed by intravital microscopy. **Bone** 1996; 19(1 Suppl):39S-57S.
102. Wong JK, Wood RE, Mclean M. Conservative management of osteoradionecrosis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1997; 84:16-21.

103. Wray J, Rogers L. Effect of hyperbaric oxygenation upon fracture healing in the rat. **J Surg Res** 1968; 8:373-8.
104. Wurzler K, De Weese T, Sebald W, Reddi A. Radiation-induced impairment of bone healing can be overcome by recombinant human bone morphogenetic protein-2. **J Craniofac Surg** 1998; 9:131-7.
105. Yablon I, Cruess R. The effect of hyperbaric oxygen on fracture healing in rats. **J Trauma** 1968; 8:186-202.
106. Yoshida H, Fujita S, Nishida M, Lizuka T. Angiogenesis in the human temporomandibular joint studied by immunohistochemistry for CD34 antigen. **J Oral Pathol Med** 1999; 28:289-92.
107. Zhao LL, Davidson JD, Wee SC, Roth SI, Mustoe TA. Effect of hyperbaric oxygen and growth factors on rabbit ear ischemic ulcers. **Arch Surg** 1994; 129:1043-9.