



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de São José dos Campos  
Instituto de Ciência e Tecnologia

**BRUNO CÉSAR ALMEIDA COSTA**

**EFEITOS DA RADIOTERAPIA NO PROCESSO DE NEOFORMAÇÃO  
ÓSSEA NA INTERFACE OSSO/IMPLANTE E NA EXPRESSÃO DE  
CITOCINAS IL-6 E TGF- $\beta$ : estudo *in vivo***

2018

**BRUNO CÉSAR ALMEIDA COSTA**

**EFEITOS DA RADIOTERAPIA NO PROCESSO DE NEOFORMAÇÃO ÓSSEA NA  
INTERFACE OSSO/IMPLANTE E NA EXPRESSÃO DE CITOCINAS IL-6 E TGF- $\beta$ :  
estudo *in vivo***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Profa. Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientadora: Profa. Dra. Renata Falchete do Prado

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Costa, Bruno César Almeida

Efeitos da radioterapia no processo de neoformação óssea na interface osso/implante e na expressão de citocinas IL-6 e TGF- $\beta$ : estudo in vivo / Bruno César Almeida Costa. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.  
46 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientadora: Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientadora: Renata Falchete Do Prado

1. Osseointegração. 2. Implantes. 3. Neoformação óssea. 4. Citocinas. I. Vasconcellos, Luana Marotta Reis de , orient. II. Prado, Renata Falchete Do, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcelos** (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Profa. Dra. Vivian Cristina Costa Castilho Hyodo**

Universidade Paulista (Unip)

Instituto de Ciências da Saúde

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 02 de maio de 2018

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a **DEUS** a quem me sustenta todos os dias.

A minha namorada **Sarah Gueiros** que está comigo, sempre lutando pelo nosso futuro e esteve presente nos momentos mais difíceis do meu trabalho.

À minha mãe **Isabel Alves de Almeida**, pelo carinho e dedicação.

A minha Professora e orientadora, **Luana Marotta Reis de Vasconcellos**, que teve papel essencial e fundamental na minha formação, sempre se dedicando ao máximo do seu tempo aos saberes dos alunos.

À minha diretora e amiga **Iolene Lima**, que confiou e me deu oportunidade de fazer parte do seu excelente grupo de professores.

À minha Coordenadora e amiga **Cristiana Chieffi**, que nos últimos anos tem cominhado comigo e me ajuda em tudo que preciso, sou muito grato.

## AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, que é a base da minha vida.

À minha namorada **Sarah Gueiros**, por estar comigo nos maiores desafios.

A minha **família** que sempre me apoia em meus estudos.

Aos meus amigos **Fabiana Corrá** e **Felipe Wieira**, pela excelente amizade.

A minha professora **Vivian C. C. Hyodo** que está comigo desde o começo da minha carreira e me deu suporte e apoio para continuar a minha carreira acadêmica.

A docente **Yasmin Rodarte Carvalho** por disponibilizar seu tempo em prol da avaliação como banca do meu EGQ e defesa da dissertação.

Aos docentes **Estela Kaminagakura Tango** e **Rubens Nisie Tango** por desenvolver todo o trabalho junto à equipe.

A minha coorientadora **Renata Falchete do Prado**, por toda dedicação no desenvolvimento do trabalho.

A minha amiga **Pâmela Beatriz do Rosário Estevam dos Santos**, que me acompanha desde a época da graduação e me ajuda até hoje.

Ao meu amigo **Leonardo Silva Gomes Kamezawa**, que esteve comigo nas cirurgias e experimentos e me proporcionou aprender coisas novas.

As minhas amigas **Mariana Raquel da Cruz Vegian** e **Fernanda Herrera Costa Godoi** que esteve comigo no desenvolvimento do projeto.

*“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade”.*

*Albert Einstein*



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	08
RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 PROPOSIÇÃO.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivo específico.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Comitê de ética.....	16
3.2 Implantes.....	16
3.3 Procedimento cirúrgico.....	17
3.4 Radioterapia.....	19
3.5 Análise da neoformação óssea.....	20
3.5.1 Avaliação por microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT).....	20
3.6 Análise de citocinas presentes no soro.....	25
3.7 Análise estatística.....	26
4 RESULTADOS .....	27
4.1 Análise por microtomografia computadorizada.....	27
4.1.1 Volume ósseo (BV).....	28
4.1.2 Porcentagem do volume ósseo (BV/TV) .....	29
4.1.3 Número de trabéculas (Tb.N).....	30
4.1.4 Espessura das trabéculas (Tb.Th).....	30
4.1.5 Separação das trabéculas (Tb.Sp).....	32
4.2 Teste imunoenzimático ELISA .....	33
4.2.1 Citocina IL-6.....	33
4.2.2 Citocina TGF- $\beta$ .....	34
5 DISCUSSÃO.....	35
6 CONCLUSÃO.....	40
REFERÊNCIAS.....	41
ANEXO .....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al	Alumínio
BV	Volume ósseo
BV/TV	Percentual de volume ósseo
Cu	Cobre
g	Gramma
Gy	Unidade no Sistema Internacional de Unidades (SI) de dose absorvida.
Kv	Quilovolt
Micro CT	Microtomografia Computadorizada
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetros
nº	Número
Rpm	Rotações por minuto
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação entre as trabéculas
Tb.Th	Espessura trabecular
µA	Microampére
µm	Micrômetro

Costa BC. Efeitos da radioterapia no processo de neoformação óssea na interface osso/implante e na expressão de citocinas IL-6 e TGF- $\beta$ : estudo *in vivo* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

## RESUMO

No tecido ósseo, as injúrias decorrentes da radioterapia variam desde osteopenia até osteoradionecrose e devido a estas alterações, pacientes irradiados portadores de implantes vêm demonstrando maior taxa de insucesso. O objetivo neste estudo foi avaliar os efeitos da radioterapia, simulando uma dose total de um tratamento radioterápico convencional para pacientes oncológicos, na neoformação óssea ao redor de implantes instalados em fêmures de ratos, assim como na expressão de citocinas IL-6 e TGF- $\beta$ . Foram utilizados neste estudo 36 ratos que receberam implantes rosqueados de titânio grau V nos fêmures esquerdos. Os animais foram divididos em 3 grupos: a) Grupo controle (C): cirurgia de colocação dos implantes (tecido sadio sem irradiação); b) Grupo irradiação (I): irradiação e após 4 semanas cirurgia de colocação dos implantes c) Grupo irradiação imediata (IP): cirurgia de colocação dos implantes e depois de 24 horas irradiação. A irradiação foi realizada em duas etapas com doses de 15 Gy, totalizando ao final da segunda dose 30 Gy. Os animais foram eutanasiados nos períodos de 3 dias, 2 e 7 semanas após o tratamento. No momento da eutanásia, 0,5 ml de sangue foi coletado e os níveis séricos de IL-6 e TGF- $\beta$  foram mensurados pelo método imunoenzimático (ELISA). Em cada período 04 animais foram submetidos à microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT), visando avaliar a neoformação óssea na interface osso-implante. Os valores obtidos foram submetidos ao teste ANOVA um fator para análise estatística e quando necessário foi aplicado o teste de comparação múltipla de Tukey ( $p < 0,05$ ). Nos resultados obtidos por meio da análise de microtomografia em geral não foi observada diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Contudo, no parâmetro volume ósseo observou-se no período de 2 semanas, diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos C e IP e o parâmetro separação de trabéculas mostrou no período de 2 e 7 semanas, diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos C e IP e Na avaliação de IL-6 o grupo C exibiu o maior valor e foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre ele e os demais grupos em todos os períodos. Na avaliação de TGF- $\beta$  foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo I em comparação com os outros grupos nos períodos de 3 dias e 2 semanas, sendo o grupo I aquele que apresentou maior expressão. Concluiu-se que o osso irradiado recupera-se da irradiação com o decorrer do tempo, porém quando a irradiação ocorre imediata a cirurgia do implante o tecido ósseo exibe alterações mais significativas.

Palavras-chave: Osseointegração. Implantes de titânio. Radioterapia. Citocinas.

Costa BC. *Effects of radiotherapy on the process of bone neoformation at the bone/implant interface and on the expression of IL-6 and TGF- $\beta$  cytokines: in vivo study [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University, Institute of Science and Technology; 2018.*

## ABSTRACT

*In bone tissue, the injuries resulting from radiotherapy vary from osteopenia to osteoradionecrosis and due to these alterations, irradiated patients with implants have been showing a higher rate of failure. The objective of this study was to evaluate the effects of radiotherapy, simulating a total dose of a conventional radiotherapy treatment for cancer patients, in the new bone formation around implants in rat femurs, as well as in the expression of IL-6 and TGF- $\beta$  cytokines. Thirty-six rats receiving grade V titanium implants in the left femora were used in this study. The animals were divided into 3 groups: a) Control group (C): implant placement surgery (healthy tissue without irradiation); b) Group irradiation (I): irradiation and after 4 weeks implant placement surgery c) Immediate irradiation (IP) group: implant placement surgery and after 24 hours irradiation. Irradiation was performed in two steps with doses of 15 Gy, totaling at the end of the second dose 30 Gy. The animals were euthanized at 3 days, 2 and 7 weeks after treatment. At the time of euthanasia, 0.5 ml of blood was collected and serum levels of IL-6 and TGF- $\beta$  were measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In each period, 04 animals were submitted to computerized microtomography ( $\mu$ CT), aiming to evaluate the bone neoformation at the bone-implant interface. The obtained values were submitted to ANOVA a factor for statistical analysis and when necessary the Tukey multiple comparison test ( $p < 0.05$ ) was applied. In the results obtained through the microtomography analysis in general no statistical difference was observed between the groups ( $p > 0.05$ ). However, the parameter separation of trabeculae showed, in the period of 2 and 7 weeks, statistical difference ( $p < 0.05$ ) between groups C and PI and in the bone volume parameter showed in the period of 2 weeks, statistical difference ( $p < 0, 05$ ) between groups C and IP. In the evaluation of IL-6, group C showed the highest value and a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) was observed between him and the other groups in all periods. In the evaluation of TGF- $\beta$ , a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) was observed between group I in comparison with the other groups in the periods of 3 days and 2 weeks, with group I being the one with the highest expression. It was concluded that irradiated bone recovers from irradiation over time, but when irradiation occurs near implant surgery, the bone tissue exhibits more significant changes.*

Keywords: Osseointegration. Implants of titanium. Radiotherapy. Cytokines.

## 1 INTRODUÇÃO

A terapia com irradiação vem sendo utilizada há mais de 100 anos no tratamento do câncer (Ries et al., 2002), sendo aplicada em carcinomas de cabeça e pescoço (Mitchel, Logan, 1998). Cerca de 80% dos pacientes com câncer necessitam de radioterapia em algum momento do tratamento para obter a cura (Instituto Nacional do Câncer, 2008), mas 60% dos pacientes irradiados apresentam complicações (Haubner et al., 2012).

A radiação ionizante é uma onda eletromagnética, constituída de campos elétricos e magnéticos oscilantes, capaz de retirar um elétron de um átomo (Okuno, 2013). As ondas eletromagnéticas são constituídas de raios gama e apresentam energia suficiente para ionizar um átomo (Instituto Nacional do Câncer, 2008; Okuno, 2013). A radioterapia é um tratamento realizado utilizando uma fonte emissora de feixes de Radiação-Gama com uma distância padronizada do receptor radioativo (Instituto Nacional do Câncer, 2008).

A radioterapia ou radiação ionizante é bastante eficaz no tratamento de tumores, porém sua dose é limitada pela tolerância à radiação dos tecidos sadios circunjacentes, uma vez que a irradiação pode promover efeitos agudos ou acumulativos nestes tecidos (Sonstevold et al., 2015). Tanto a destruição do tumor quanto a indução de lesões indesejáveis nos tecidos normais podem ocorrer por um mecanismo de interação com a radiação, que age sobre o DNA nuclear, causando morte celular ou dificuldade de multiplicação. Este mecanismo pode ser consequência de uma ação direta, quando a irradiação interfere clivando o DNA, e/ou ação indireta, quando há dissociação da água em íons ( $H^+$  e  $OH^-$ ) e este íon  $OH^-$  reage com as bases nitrogenadas do DNA, interferindo também na multiplicação celular (Caldas, 1970).

A interação entre as radiações ionizantes e as células depende da energia absorvida pelas moléculas. Os efeitos biológicos dessa interação estão relacionados à dose, transferência linear de energia, fracionamento e radiosensibilidade celular (Instituto Nacional do Câncer, 2008). A dose total a ser absorvida para o tratamento de neoplasias malignas pode ser fracionada em doses menores durante o tratamento (Russell, Connor 2014; Sonstevold et al., 2015;

Chandra et al., 2015). As células neoplásicas provavelmente serão destruídas se a dose absorvida for eficiente, mas o fator limitante para determinar tal dose é a taxa de dose absorvida que o tecido normal adjacente pode tolerar (Ainsbury et al., 2011). Estudos relatam que doses únicas de 20-30Gy estão associadas com alterações na morfologia e fibrose muscular, enquanto que doses fracionadas maiores que 14 Gy causam apoptoses em células endoteliais (Gallet et al., 2011), assim, observamos que em ambos os casos de aplicação, poderemos ter alterações morfológicas celulares.

Entretanto, a patofisiologia e as interações celulares que ocorrem após a irradiação incluem mecanismos complexos como liberação ou inibição de citocinas e fatores de crescimento, que são mencionados em alguns estudos (Haubner et al., 2012; Duplomb et al., 2008; Benedetti et al., 2006)

O sistema esquelético é um dos alvos mais relevantes que se correlaciona com a lesão induzida por radiação (Hu et al., 2010; Wang et al., 2015), sendo que a injúria causada no tecido ósseo varia desde osteopenia até osteoradionecrose (Willians, Davies, 2006), a qual é considerada uma das complicações clínicas mais severas da radioterapia (Mitchel, Logan, 1998). Os tumores de cabeça e pescoço apresentam uma sobrevida de 57% (Oral Cancer Foundation, 2012) e estes pacientes geralmente são submetidos a radioterapia durante o tratamento (De la Plata et al., 2012). Muitos destes pacientes necessitam de reabilitação oral, para repor dentes unitários ou múltiplos ou para o reestabelecimento de deformidades causadas por ressecção cirúrgica devido ao tumor.

Implantes osseointegrados são considerados efetivos como tratamento reabilitador, porém embora altamente previsíveis e com alto índice de sucesso (Klokkevold, Han, 2007), em alguns casos podem ocorrer falhas na reabilitação com implantes por diferentes razões (Chen et al., 2013). O sucesso da osseointegração está associada com a saúde do tecido peri-implantar e com o restabelecimento da função e estética (Faggion et al., 2011). Contudo, há condições específicas que podem estar associadas as falhas dos implantes tais como a radioterapia (Chambrone et al., 2013). Estudos recentes que revisaram os motivos de falha de implantes em pacientes, concluíram que a irradiação tem um papel fundamental no prognóstico dos pacientes tratados com implantes dentais, havendo uma relação

direta entre a radioterapia e o risco de perda dos implantes dentais (Chen et al., 2013; Chambone et al., 2013).

A osseointegração pode ser prejudicada devido a diminuição da vascularização e da vitalidade óssea (Verdonck et al., 2008b), além da radioterapia promover progressiva fibrose de vasos e tecidos moles (Pomba et al., 2015). Estes efeitos resultam em maior reabsorção peri-implantar no osso irradiado (Brogniez et al., 2002; Brausseau et al., 2006) e menor capacidade de cicatrização (Pomba et al., 2015). A radioterapia focal promove efeitos prejudiciais no tecido ósseo (Hu et al., 2010; Chandra et al., 2015) sendo que os sinais primários do dano ósseo incluem a perda da atividade funcional dos osteoblastos (Chandra et al., 2015), maior quantidade de tecido adiposo no osso medular e diminuição da microvascularização (Williams, Davies 2006). Esta perda funcional de osteoblastos foi confirmada recentemente no estudo de Chandra et al. (2014) no qual se observou maior quantidade de marcadores apoptóticos por meio da técnica de imunohistoquímica.

Entretanto, com o decorrer do tempo, a densidade mineral parece retornar a normalidade, permitindo a instalação de implantes nas áreas irradiadas (Brogniez et al., 2002; Brausseau et al., 2011; Verdonck et al., 2008a). Provavelmente este retorno se deve a característica do tecido ósseo de ser um órgão extremamente dinâmico que se remodela constantemente, havendo um balanço entre a atividade osteoblástica e osteoclástica que garante a homeostasia no tecido.

Os implantes dentários têm um papel crucial nesta terapia de reabilitação, entretanto, nesta situação pós-radioterapia, o tratamento reabilitador com implantes torna-se um desafio, uma vez que o osso no qual os implantes dentários serão inseridos foi irradiado (Pomba et al., 2015). Adicionalmente, os efeitos colaterais crônicos tais como o trismo tornou-se um problema grave devido ao elevado número de indivíduos tratados com radioterapia (Jham et al., 2006).

Em patologias associadas com perda óssea, tais como osteoporose pós-menopausa, doença de Paget, mieloma múltiplo, artrite reumatóide e hiperparatiroidismo, tem sido demonstrada uma elevação da expressão e secreção de IL-6 (Duplomb et al., 2008). Esta citocina parece estar associada à patogênese das erosões e destruições esqueléticas, além de ter um papel importante no aumento da atividade osteoclástica e da subsequente reabsorção óssea (Meguid et al., 2013). Autores verificaram a influência de IL-6 no aumento da osteoclastogênese

(Benedetti et al., 2006; Wu et al., 2017) e na inibição da função de osteoblastos, além de afetar o esqueleto em desenvolvimento, causando osteopenia e ossificação defeituosa (Benedetti et al., 2006). Por outro lado, recentemente, Huang et al. (2018) demonstraram que a IL-6 promove um aumento da osteogênese, aumentando o volume ósseo e a densidade mineral óssea dos nódulos minerais. Os autores relataram que essa citocina aumentou a regeneração óssea (Huang et al., 2018).

O fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) pode estar envolvido em vários processos celulares incluindo proliferação e diferenciação celular, angiogênese, mortalidade, apoptose e morte celular (Massague, 1998). Pesquisas com membros da super família TGF- $\beta$  têm demonstrado que a citocina TGF- $\beta$ 1 representa um dos importantes reguladores da osteoclastogênese (Koseki et al., 2002; Fenen et al., 2016). Esta citocina pode facilitar a reabsorção óssea pelo recrutamento de precursores de osteoclastos para o ambiente ósseo e promover a diferenciação osteoclástica na presença de RANKL (Fuller et al., 2000; Janssens et al., 2005; Quinn JM et al., 2001).

A hipótese da radiação causar desequilíbrio entre fatores osteoclastogênicos e osteogênicos justifica a avaliação tempo-dependente da osseointegração e de citocinas sanguíneas em ratos irradiados em distintos momentos, simulando diferentes situações clínicas de reabilitação com implantes.



## **2 PROPOSIÇÃO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da radioterapia sobre a osseointegração e a expressão de citocinas sanguíneas.

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

Os objetivos específicos foram avaliar:

- a) a neoformação óssea ao redor de implantes instalados em fêmur de ratos em situações associadas ou não a exposição à radiação ionizante;
- b) a quantidade de citocinas sanguíneas (IL-6 e TGF- $\beta$ ) presentes em ratos que receberam implantes em situações associadas ou não a exposição à radiação ionizante.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Comitê de Ética

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus de São José dos Campos/UNESP, sob o número 003/2016 (ANEXO A), e foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA).

#### 3.2 Implantes

Implantes de Ti grau V foram produzidos para este estudo pela empresa Emfils<sup>®</sup>, e exibiam 2,5 mm de diâmetro por 6,0 mm de comprimento (Figura 1). Após obtenção, os implantes foram inseridos nos fêmures dos animais.

Figura 1 – Implante Emfils<sup>®</sup>



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.3 Procedimento cirúrgico

Trinta e seis ratos com 90 dias e pesando cerca de 300 g, foram usados neste estudo. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Unesp, situado em Botucatu e permaneceram durante o experimento no Biotério do ICT/Unesp em gaiolas (n=4) onde receberam água e ração *ad libitum*.

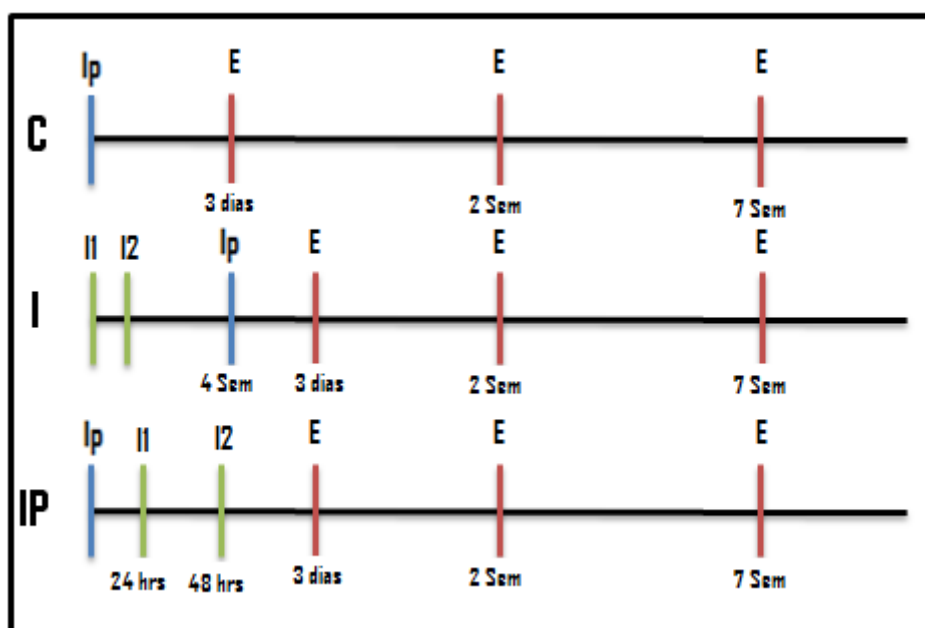
Após 30 dias de adaptação ao ambiente, com ciclos diários alternando 12 horas correspondentes ao período de luz e ao período noturno, foi iniciado este experimento. Os animais foram divididos de acordo com o tratamento (Figura 2):

- a) Grupo controle (C): cirurgia de colocação dos implantes (grupo controle - tecido sadio sem irradiação);
- b) Grupo irradiação (I): irradiação e após 4 semanas cirurgia de colocação dos implantes;
- c) Grupo irradiação imediata (IP): cirurgia de colocação dos implantes e depois de 24 horas irradiação.

Os procedimentos cirúrgicos para a colocação dos implantes nos fêmures esquerdos foram realizados de acordo com Vasconcellos et al. (2014) (Figura 3). Após as cirurgias, todos os animais receberam uma injeção subcutânea com 0.1 mg/kg de buprenorefrina a cada 12 horas por 3 dias.

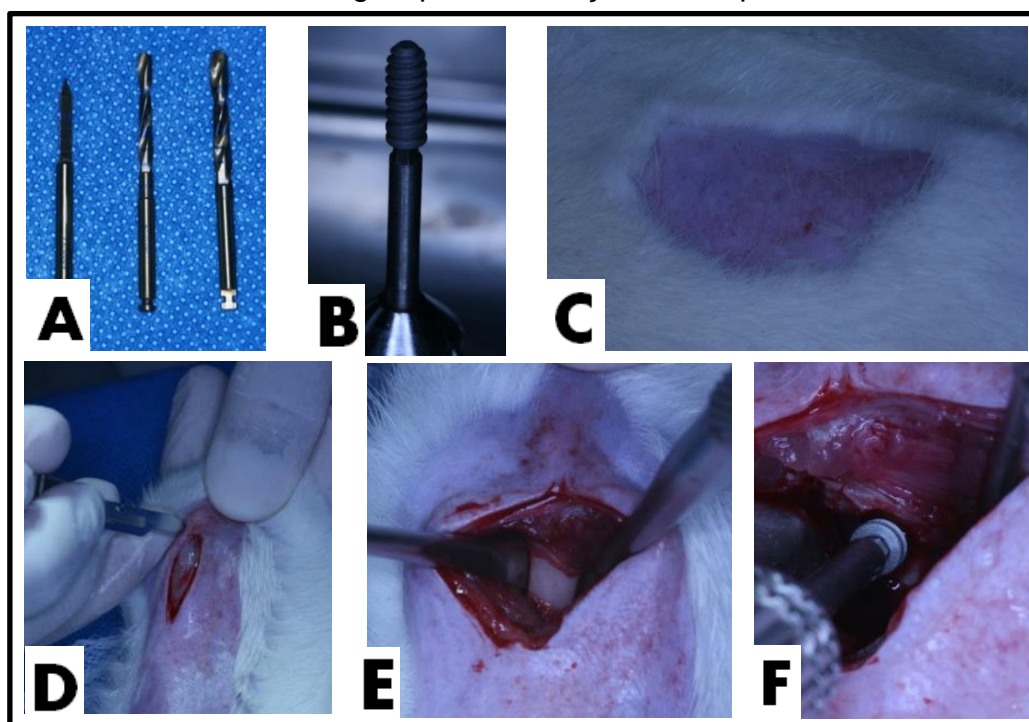
Após os procedimentos, os animais foram colocados nas gaiolas novamente com n=4 e monitorados até o prazo da eutanásia de 3 dias, 2 e 7 semanas.

Figura 2 - Distribuição do número total de animais entre os diferentes tratamentos e períodos de eutanásia



Legenda: C= controle; IP= radiação imediata; I= irradiação; I1/I2= Procedimento irradiação; Ip=Procedimento de colocação do implante; E=Eutanásia.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 – Procedimento cirúrgico para colocação dos implantes

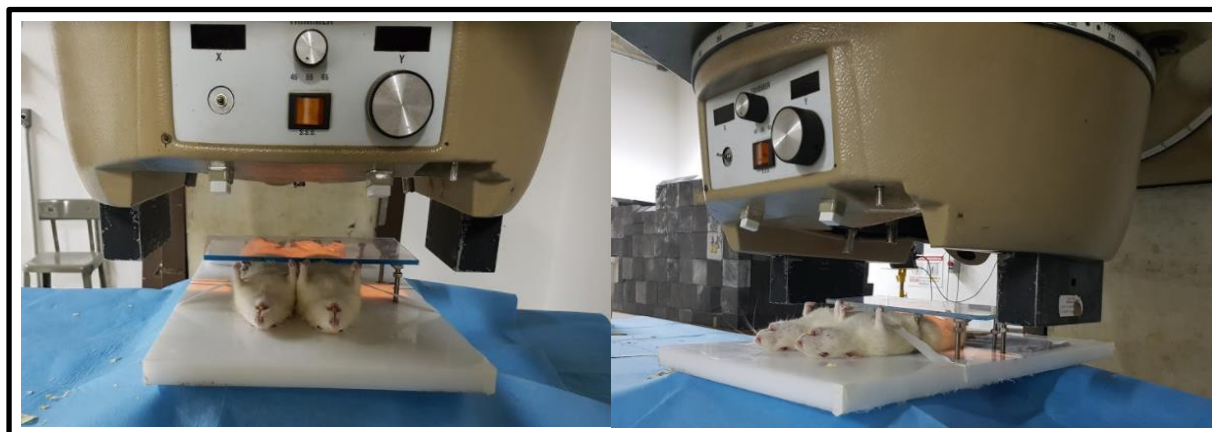


Legenda: A) Brocas, B) Implante, C) Tricotomia, D) Incisão, E) Exposição do fêmur, F) Colocação do implante.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.4 Radioterapia

Inicialmente os animais foram anestesiados e irradiados localmente no fêmur esquerdo. As irradiações visaram simular um tratamento radioterápico de dose máxima de uma lesão neoplásica. Para este procedimento foi utilizado um irradiador de teleterapia modelo Eldorado 78 da *Atomic Energy of Canadian Limited*, com uma fonte de radiação gama  $^{60}\text{Co}$ , localizada no Instituto de Estudos Avançados (IEAv) do Departamento de Ciência e Tecnologia Aeroespacial (DCTA), em São José dos Campos, São Paulo. As irradiações foram realizadas em duas etapas, com uma dose total de 30 Gy, sendo 15Gy cada uma, as quais duraram aproximadamente 1 hora e 18 minutos cada e foram realizadas com uma distância entre a fonte e os espécimes (n=2) de 0,9 metros (Figura 4). Para a irradiação os animais após anestesia foram imobilizados em um equipamento desenvolvido especialmente para este estudo, visando a padronização da aplicação em todos os animais.

Figura 4 – Eldorado 78 *Atomic Energy of Canadian Limited*, irradiando os ratos



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.5 Análise da neoformação óssea

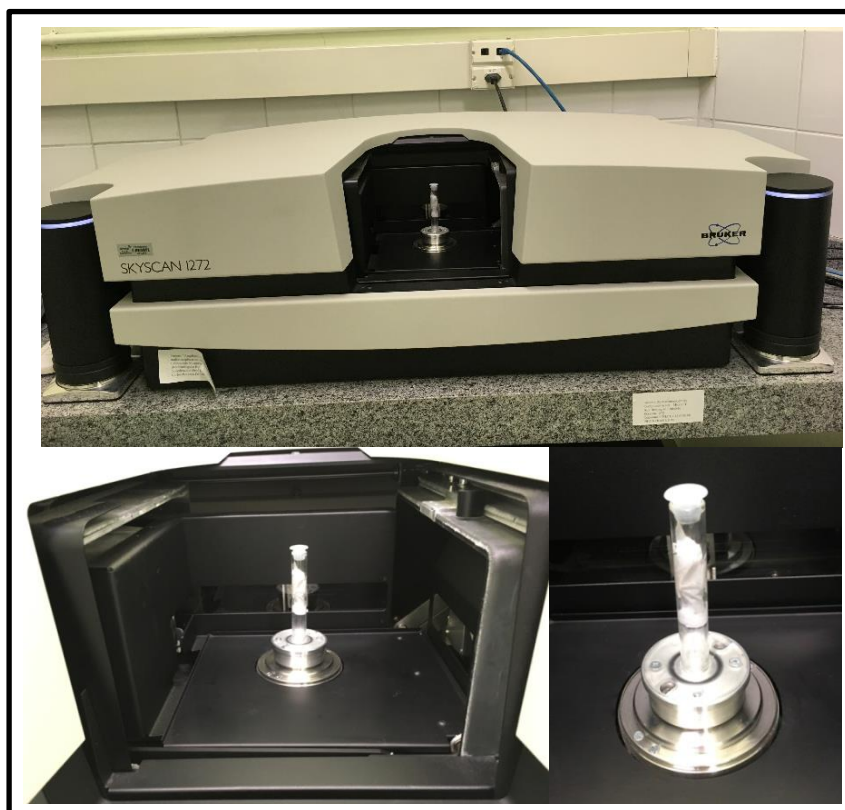
#### 3.5.1 Avaliação por microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT)

A tomografia computadorizada é uma técnica que nos proporciona a visualização de secções transversais da imagem em uma forma não destrutiva. A base de funcionamento do tomógrafo de raio-x é a absorção da radiação desses materiais de forma diferenciada dependendo de sua composição química e densidade. A TC realiza cortes virtuais dos objetos, dividindo-os em “fatias”, as quais são usadas para mapeamentos de parâmetros físicos como a porosidade e densidade de cada região interna do objeto, são apresentadas na forma de imagens bidimensionais que podem ser compostas a ponto de se obter objetos virtuais 3D.

Para a realização da análise não-destrutiva do osso neoformado na interface osso/implante, a peça de tecido ósseo contendo o implante foi submetida ao microtomógrafo SkyScan® 1272 Bruker MicroCT, Laboratório Multiusuário de Biotecnologia e Bioengenharia (MUBIO), localizado na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Figura 5). As peças foram escaneadas utilizando cortes de 12  $\mu$ m de espessura, com filtro de Al. 0,5 mm + Cu 0,038 e passo de rotação de 0,5 mm, tamanho do pixel de 1344x896  $\mu$ m e com tempo de aquisição de 1 hora e 28 minutos.

Após determinação dos parâmetros de aquisição, as peças foram submetidas à análise por imagem em 3D, e os valores avaliados foram volume ósseo (BV), proporção entre volume ósseo sobre volume total (BV/TV), números de trabéculas (Tb.N), análise de espessura de trabéculas (Tb.Th) e análise da separação das trabéculas (Tb.Sp).

Figura 5 – Microtomógrafo SkyScan® 1272



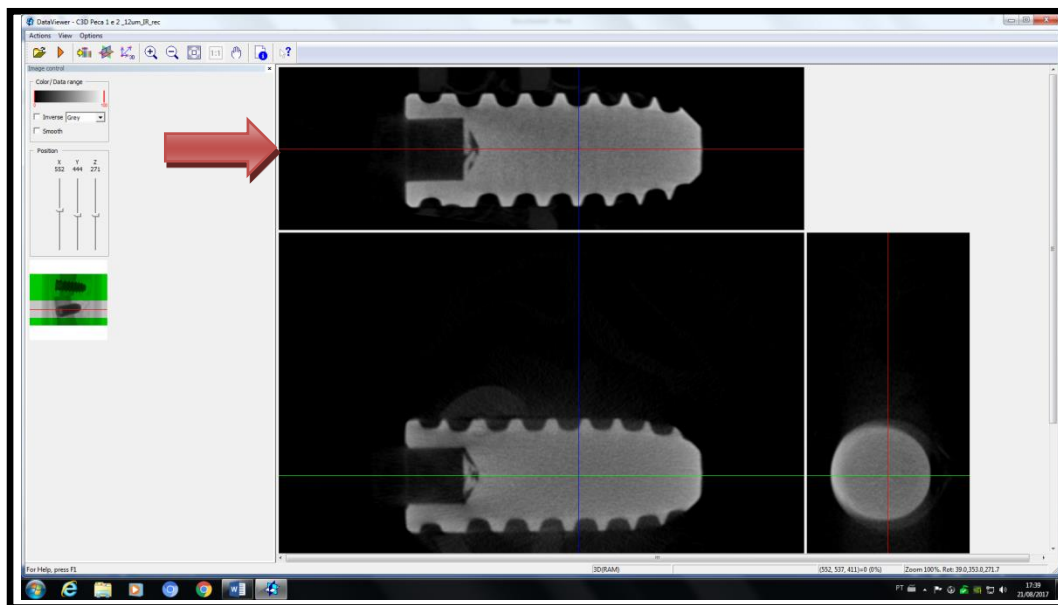
Fonte: Elaborado pelo autor.

Previamente a aquisição, as peças foram posicionadas e fixadas no porta-amostra apropriado para o equipamento, presas no tubo cilíndrico apropriado para o tamanho da amostra e envolta por papel úmido, assim estabilizando a amostra, a fim de prevenir qualquer tipo de movimentação durante o escaneamento e evitando o ressecamento da peça.

O parâmetro para reconstrução da imagem em  $\mu$ CT foi o escaneamento com rotação das peças em  $360^\circ$ , utilizado raios-x monocromático com 90 keV e 111  $\mu$ A. Os *softwares* NRecon® e Dataviewer® foram utilizados para a reconstrução das imagens e os *softwares* CT-Analyzer®, CT-Vol® para a quantificação da formação óssea. As projeções tomográficas foram construídas a partir do programa NRecon®, que gerou imagens em 3D. Em seguida, foi utilizado o programa Dataviewer® para visualização e avaliação em 2D, sendo que neste momento foi realizada a escolha do eixo a ser avaliado, eixos coronal, transaxial e sagital.

O eixo transaxial (A) foi escolhido para se realizar a medição volumétrica (Figura 6).

Figura 6 – Escolha do eixo transaxial no DataViewer®.

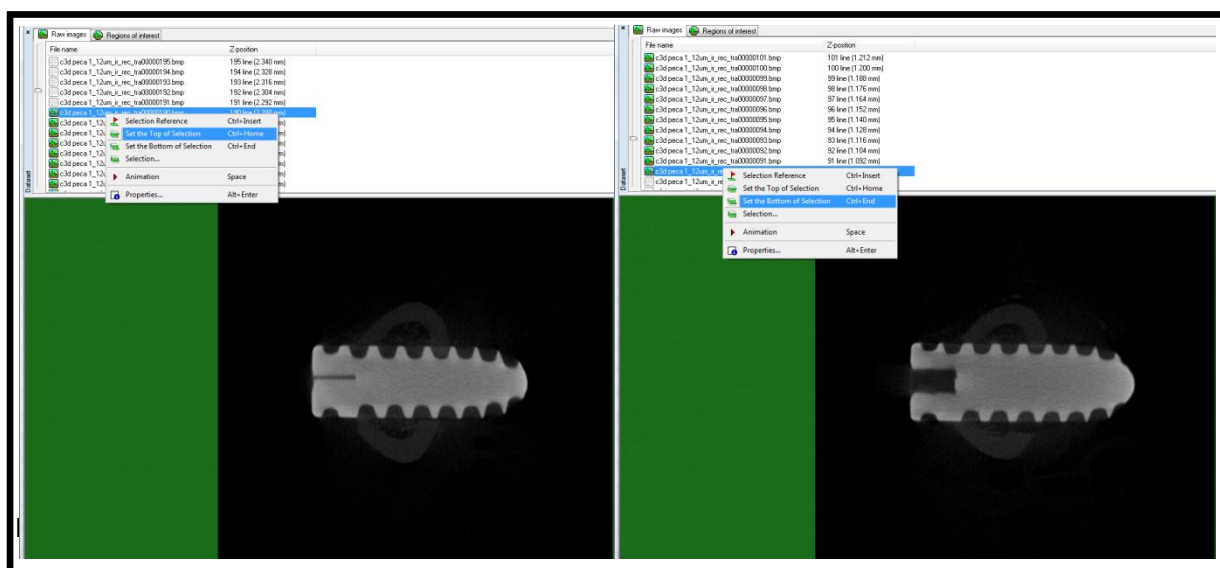


Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a escolha do eixo transaxial, foi utilizado o *software* CTAnalyser® para a escolha das ferramentas que auxiliaram na construção dos parâmetros morfométricos do volume ósseo. Inicialmente foram selecionadas as 100 fatias (*slices*) utilizadas para a região de interesse (ROI), nas quais era possível enxergar o implante completo até que ele desaparecesse. Na seleção das imagens utilizou-se a ferramenta “top” e “bottom” (Figura 7).



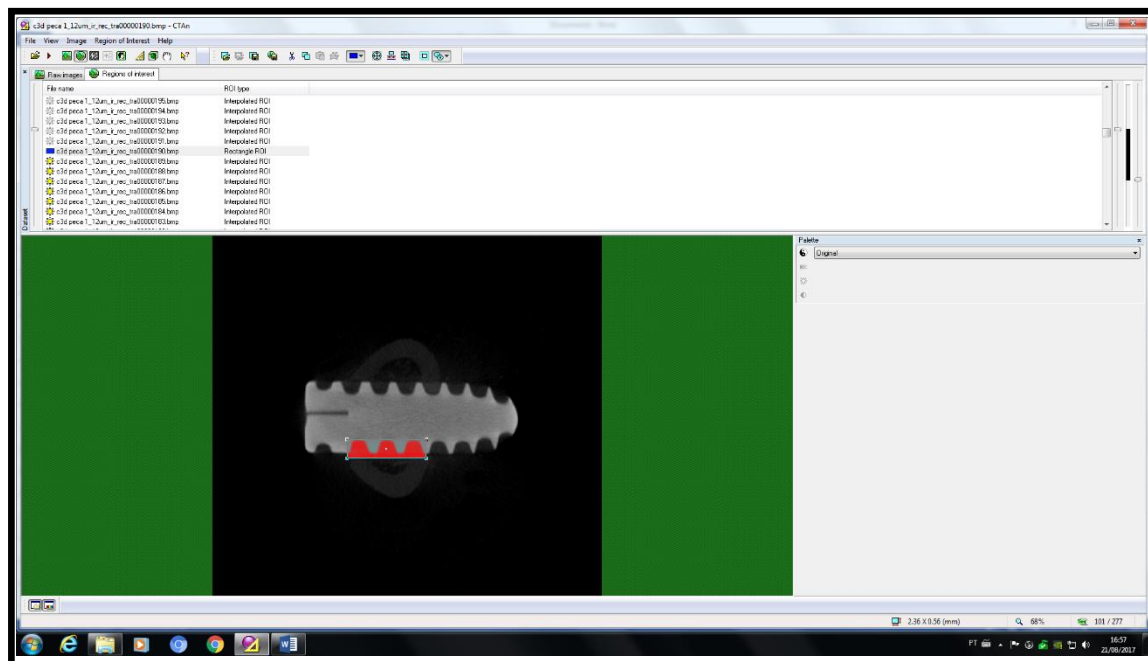
Figura 7 – Imagem da tela inicial do *software* CTAnalyser para seleção do “top” e “bottom” durante a criação do ROI



Fonte: Elaborado pelo autor.

As análises volumétricas (3D) tiveram por objetivo quantificar o volume ósseo, referente a neoformação óssea, nos diferentes períodos e grupos, sendo que a área determinada para mensuração compreendeu três roscas do implante. A “região de interesse” ou ROI (Figura 8) foi selecionada utilizando uma figura geométrica retangular, que se adequa por interpolação à área a ser medida e obtivemos o volume de interesse (VOI). O ROI se refere a região selecionada das três roscas do implante, porém em uma única imagem de seção transversal, já o “volume de interesse” refere-se a soma de todos os ROIs presentes nos cortes selecionados, representando o volume 3D requerido para análise (VOI).

Figura 8 – Delimitação do ROI



Fonte: Elaborado pelo autor.

Logo após a delimitação do ROI, a binarização (que é a formação de uma imagem utilizando somente as cores preto e branco), foi utilizada como uma ferramenta para diferenciar o osso do restante do tecido. Inicialmente foi necessário um ajuste e posteriormente a padronização deste valor limiar para os pixels (“*threshold*”), que foi aplicado a todas as imagens avaliadas. O limite inferior determinado correspondeu ao valor de 65 e o limite superior foi o valor de 25, a mesma binarização foi usada para todas as amostras como método de padronização.

Cada imagem obtida no momento do processamento pelo microtomógrafo deve ser considerada como representativa de uma porção volumétrica da amostra. As imagens sobrepostas formaram um sólido tridimensional representativo da amostra de osso.

Após esta seleção, foi realizada a interpolação do ROI sobre as 100 imagens escolhidas, para permitir o cálculo em 3D dos índices de volume ósseo (BV), proporção entre volume ósseo sobre volume total (BV/TV), números de trabéculas (Tb.N), análise de espessura de trabéculas (Tb.Th) e análise da separação das trabéculas (Tb.Sp). Os volumes em 3D foram visualizados com o programa CTVol<sup>®</sup>.

### 3.5.2 Análise das citocinas presentes no sangue

Inicialmente foram coletados 5 ml de sangue por punção cardíaca de todos os animais, previamente à eutanásia nos três períodos mencionados. O sangue coletado com seringas foi imediatamente transferido para tubos à vácuo com gel separador de coágulo (Labor Import, Osasco, SP, Brasil), e permaneceram imóveis por 30 minutos visando sedimentação. Posteriormente, os tubos foram colocados na centrífuga (Labnet Z400, Edison, NJ, EUA) por 5 minutos com rotações de 4000 rpm, para separação do soro. A seguir, o soro foi retirado dos tubos à vácuo com micropipetas e armazenado em microtubos, devidamente identificados, a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da realização dos testes.

Os níveis da interleucina (IL-6) foram mensurados utilizando o método imunoenzimático (ELISA). Para tanto, placas de microtitulação de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpos de captura anti-IL-6, de rato (R&D Systems, NE). As placas foram mantidas overnight em temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas com tampão (PBS com 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com 300  $\mu\text{L}$  de tampão de bloqueio (PBS com 1% de soro albumina bovina) por 1 hora a temperatura ambiente. Após, foram lavadas e receberam 100  $\mu\text{L}$  de cada uma das concentrações dos dos padrões analisados (IL-6), para a confecção da curva-padrão. Os testes foram realizados em duplicata e as placas foram mantidas 2 horas à temperatura ambiente. A seguir, as placas foram lavadas e foi acrescentado 100  $\mu\text{L}$  de anticorpos de detecção anti-IL-6 de rato, marcados com biotina. Após 2 horas, foi acrescentada estreptoavidina (100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ) e as placas foram mantidas por 20 minutos cobertas com papel alumínio para evitar luz direta. Após lavagem, a reação foi revelada com 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$  de solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio. Após 20 minutos, foram adicionados em cada poço 50  $\mu\text{L}$  de solução stop (ácido sulfúrico 2 N) e as densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas com comprimento de onda de 450 nm.

A análise de TGF- $\beta$  foi realizada também utilizando o método imunoenzimático (ELISA), porém o kit comercial adquirido já possuía a placa pré-sensibilizada. As amostras foram adicionadas (100  $\mu\text{L}/\text{poço}$ ) e incubadas por 90 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após esse período, o líquido foi removido e imediatamente foi

adicionada a solução de detecção com anticorpo biotilado (100  $\mu\text{L}$ /poço), deixada por 1 hora a 37°C. A placa foi, então, lavada com 300  $\mu\text{L}$ /poço de tampão de lavagem por três vezes e, em seguida, incubada com o com a enzima peroxidase conjugada (100  $\mu\text{L}$ /poço) por 30 minutos a 37°C. Após esse procedimento, a placa foi lavada por mais cinco vezes e, logo em seguida, deixada por 15 minutos a 37°C com o substrato reagente (90  $\mu\text{L}$ /poço), protegida da luz direta. Para paralisar a reação foram adicionados 50  $\mu\text{L}$ /poço de solução *stop* e a DO foi determinada no leitor de microplacas Elx808 a 450 nm.

### **3.7 Análise estatística**

O *software GraphPad Prism 7* (San Diego, CA, USA) foi usado para realizar as análises estatísticas. O teste estatístico utilizado para avaliar as diferenças os parâmetros da microtomografia após a aplicação do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foi o teste estatístico ANOVA um fator e quando necessário foi utilizado o teste de comparação múltipla de Tukey. O nível de significância adotado de  $p < 0,05$ .

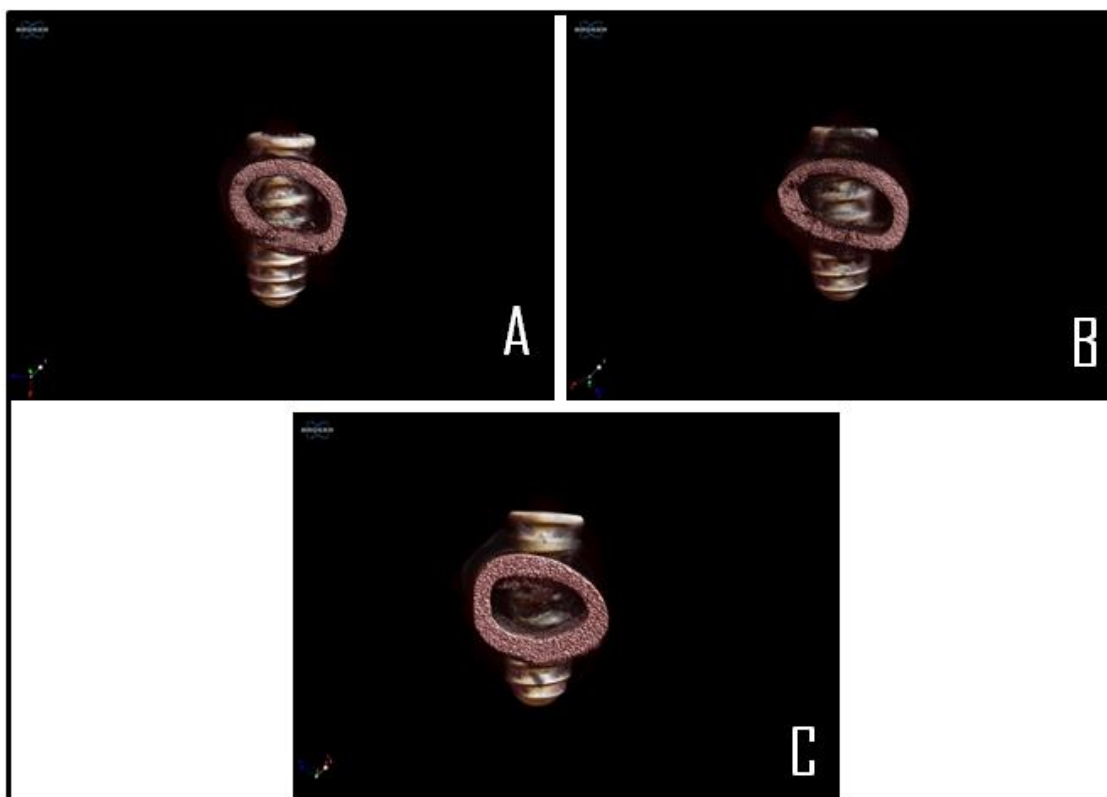
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise por microtomografia computadorizada

As peças foram submetidas à análise por imagem em 3D (Figura 9), utilizando o método da microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT) para quantificar a proliferação de tecido ósseo. Foram avaliados os parâmetros de volume ósseo (BV), proporção entre volume ósseo sobre volume total (BV/TV), números de trabéculas (Tb.N), análise de espessura de trabéculas (Tb.Th) e análise da separação das trabéculas (Tb.Sp).

Os resultados estatísticos descritivos e inferenciais estão apresentados abaixo, conforme o parâmetro, grupo e o tempo analisado.

Figura 9 – Reconstrução dos cortes em imagens 3D

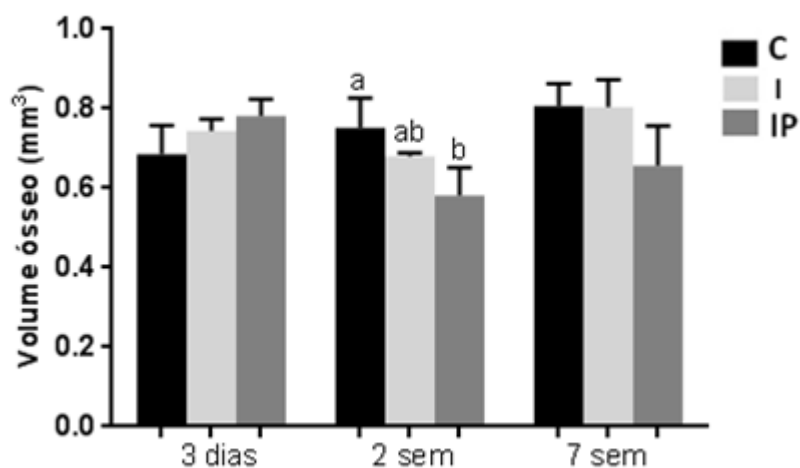


Legenda: Período de 2 semanas: A) Grupo C; B) Grupo I; C) Grupo IP.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.1.1 Volume ósseo (BV)

Os dados da estatística descritiva relativa ao BV obtido por meio da  $\mu$ TC estão representados na figura 10, referentes aos períodos de 3 dias, 2 e 7 semanas respectivamente.

Figura 10 – Gráficos da análise estatística BV



Legenda: (C) Grupo controle: cirurgia de colocação dos implantes (tecido sadio sem irradiação); (I) Grupo irradiação: irradiação e após 4 semanas cirurgia de colocação dos implantes; (Ip) Grupo irradiação imediata: cirurgia de colocação dos implantes e depois de 24 horas irradiação; sem=semanas.

Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

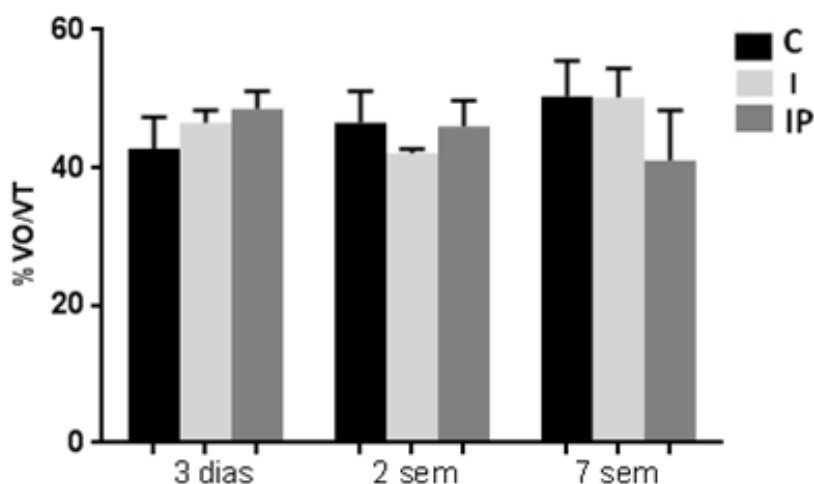
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados de cada período separadamente foram submetidos ao teste ANOVA um fator e não foi observada diferença estatisticamente significativa no período de 3 dias e 7 semanas ( $p > 0,05$ ). Entretanto, no período de 2 foi observada diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos C e Ip, sendo que o maior BV foi verificado no grupo controle.

#### 4.1.2 Porcentagem do volume ósseo sobre o volume total (BV/TV)

Os dados da estatística descritiva relativa ao BV/TV obtido por meio da  $\mu$ TC estão representados na figura 11, referentes aos períodos de 3 dias, 2 e 7 semanas respectivamente.

Figura 11 – Gráficos da análise estatística BV/TV



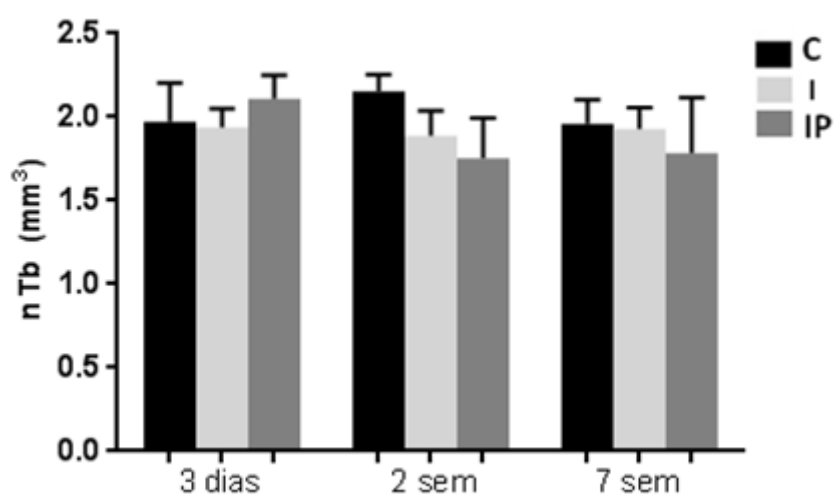
Legenda: (C) Grupo controle; (I) Grupo irradiação; (IP) Grupo irradiação imediata; sem=semanas.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados de cada período separadamente foram submetidos ao teste ANOVA um fator e não foi observada diferença estatisticamente significativa em nenhum dos períodos avaliados ( $p > 0,05$ ). Entretanto observou-se que no grupo controle a porcentagem de BV/TV aumentou com o tempo enquanto que no grupo IP esta porcentagem diminuiu.

### 4.1.3 Número de trabéculas (Tb.N)

Os dados da estatística descritiva relativa ao Tb.N obtido por meio da  $\mu$ TC estão representados nas figura 12, referentes aos períodos de 3 dias, 2 e 7 semanas respectivamente.

Figura 12 – Gráficos da análise estatística Tb.N



Legenda: (C) Grupo controle; (I) Grupo irradiação; (IP) Grupo irradiação imediata; sem=semanas.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

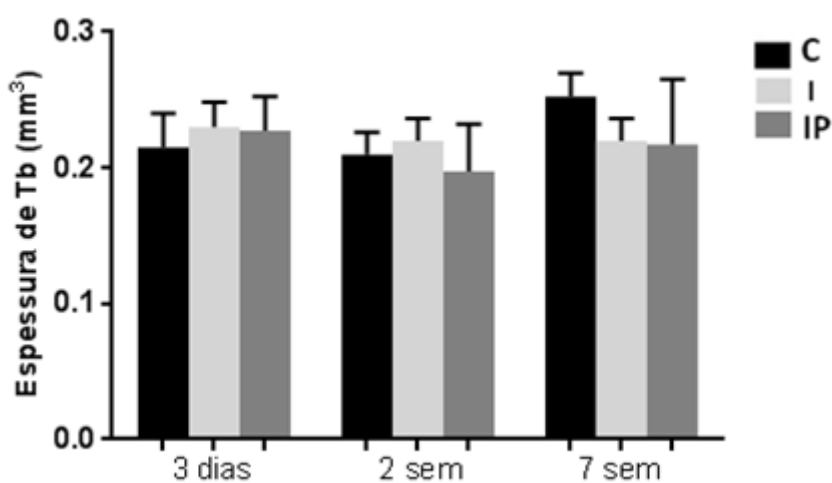
Os dados de cada período separadamente foram submetidos ao teste ANOVA um fator e não foi observada diferença estatisticamente significativa em nenhum dos períodos avaliados ( $p > 0,05$ ). Contudo, nota-se uma diminuição do número de trabéculas no grupo IP.



#### 4.1.4 Espessura das trabéculas (Tb.Th)

Os dados da estatística descritiva relativa ao Tb.Th obtido por meio da  $\mu$ TC estão representados na figura 13, referentes aos períodos de 3 dias, 2 e 7 semanas respectivamente.

Figura 13 – Gráficos da análise estatística Tb.Th



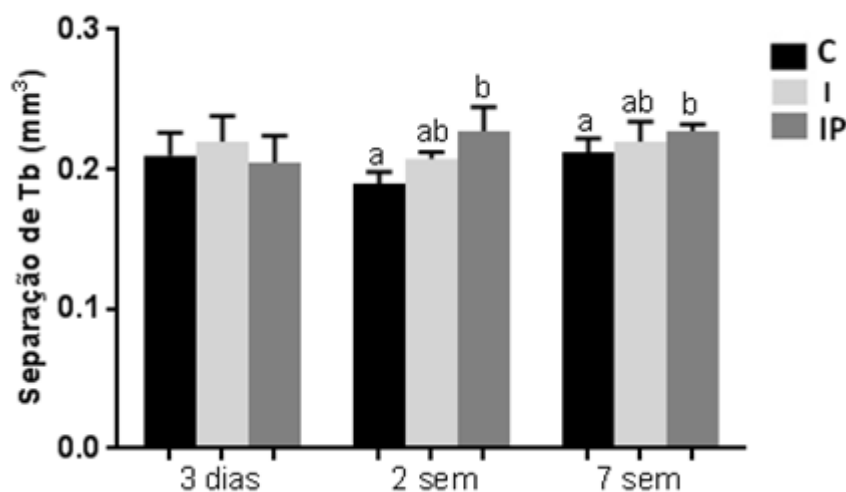
Legenda: (C) Grupo controle; (I) Grupo irradiação; (IP) Grupo irradiação imediata; sem=semanas.  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados de cada período separadamente foram submetidos ao teste ANOVA um fator e não foi observada diferença estatisticamente significativa em nenhum dos períodos avaliados ( $p > 0,05$ ). No entanto, o grupo C exibiu um aumento na espessura com o passar do tempo, diferindo do comportamento dos outros grupos.

#### 4.1.5 Separação das trabéculas (Tb.Sp)

Os dados da estatística descritiva relativa ao Tp.Sp btido por meio da  $\mu$ TC estão representados nas figura 14, referentes aos períodos de 3 dias, 2 e 7 semanas respectivamente.

Figura 14 – Gráficos da análise estatística Tb.Sp



Legenda: (C) Grupo controle; (I) Grupo irradiação; (IP) Grupo irradiação imediata; sem=semanas. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).  
Fonte: Elaborado pelo autor.

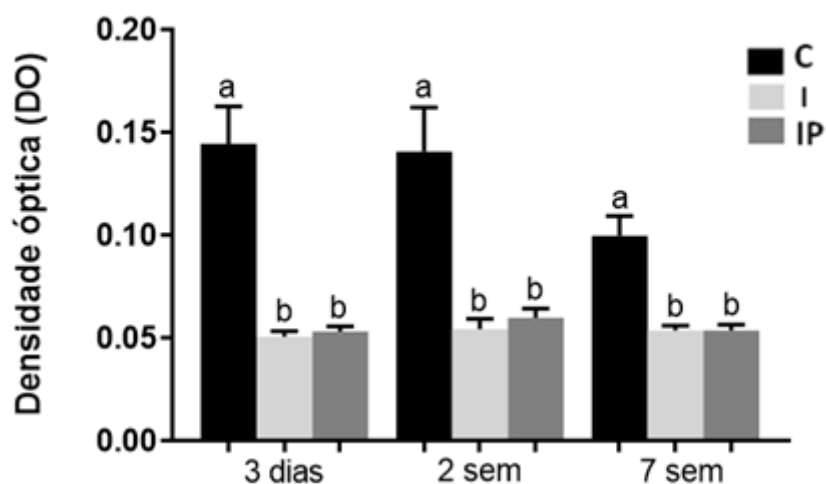
Os dados de cada período separadamente foram submetidos ao teste ANOVA um fator e não foi observada diferença estatisticamente significativa no período de 3 dias ( $p > 0,05$ ). Entretanto, no período de 2 e 7 semanas foi observada diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos C e Ip, sendo que em ambos os períodos a maior separação entre as trabéculas foi verificada no grupo IP.

## 4.2 Teste imunoenzimático ELISA

### 4.2.1 Análise da citocina IL-6

Os dados da estatística descritiva relativa a densidade óptica referente a IL-6 está representada na figura 15, referente aos períodos dos grupos C, I e Ip respectivamente.

Figura 15 – Gráfico da análise da citocina IL-6



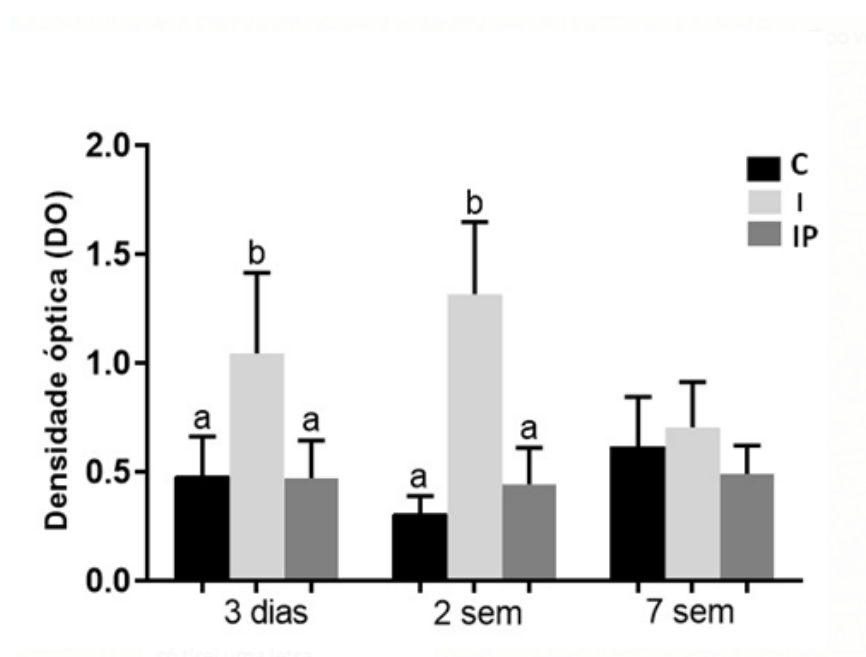
Legenda: (C) Grupo controle; (I) Grupo irradiação; (IP) Grupo irradiação imediata; sem=semanas.  
Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados de cada grupo separadamente foram submetidos ao teste ANOVA um fator e foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo C e os demais em todos os períodos. O grupo C exibiu os maiores valores de expressão de IL-6 em todos os períodos.

#### 4.2.2 Análise da citocina TGF- $\beta$

Os dados da estatística descritiva relativa densidade óptica referente a TGF- $\beta$  estão representados na figura 16, referentes aos períodos dos grupos C, I e IP respectivamente.

Figura 16 – Gráfico da análise da citocina TGF- $\beta$



Legenda: (C) Grupo controle; (I) Grupo irradiação; (IP) Grupo irradiação imediata; sem=semanas. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).  
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados de cada grupo separadamente foram submetidos ao teste ANOVA um fator e foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo I e os outros grupos, em todos nos períodos de 3 dias e 2 semanas. O grupo I foi aquele que apresentou maior expressão de TGF- $\beta$ .

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo, foi realizado para avaliar a neoformação óssea nos fêmures de ratos que foram submetidos ou não a radioterapia e também para quantificar as citocinas IL-6 e TGF- $\beta$  que podem estar ligadas a diferenciação ou proliferação celular de diferentes tipos a fim de contribuir com pesquisas que avaliam a neoformação óssea em pacientes submetidos ao procedimento de radioterapia decorrente de tumores. Inicialmente os animais foram divididos em três grupos (C, I e IP) e três períodos, a fim de avaliar diferentes situações clínicas e variados tempos de cicatrização, respectivamente. Os grupos foram submetidos a testes específicos visando responder a cada objetivo, e forma observados resultados relevantes.

O grupo I representou a tentativa de simular a situação clínica de pacientes irradiados que após dois anos do tratamento oncológico finalizado, necessitam de reabilitação por meio de implantes. Para tanto, a irradiação dos animais neste grupo foi realizada quatro semanas antes do procedimento cirúrgico. Os períodos de eutanásia e de irradiação foram determinados baseados no estudo prévio de Quinn R (2005) que correlacionou a idade dos ratos com a do homem. Já no grupo IP, os animais foram submetidos à irradiação e quase imediata cirurgia de implante. O objetivo neste grupo foi avaliar o efeito da irradiação no processo de osseointegração, uma vez que o procedimento cirúrgico foi subsequente à irradiação. Neste momento a situação clínica relaciona-se com pacientes que foram submetidos a cirurgia de implantes e em curto tempo foram submetidos a radioterapia.

A realização da coleta sanguínea por punção cardíaca permitiu avaliar a dosagem de duas importantes citocinas envolvidas na remodelação óssea, com finalidade de correlacioná-las ao fenômeno de maior porcentagem de falha na osseointegração e de perda dos implantes nos pacientes irradiados, conforme relatado na literatura (Cao, Weischer, 2003; Liddelow, Klineberg, 2011; Mancha De La Plata et al., 2012).

No presente estudo, embora não tenha sido observada significância estatística com relação aos parâmetros de fração do volume ósseo (BV/TV), número de trabéculas e espessura das trabéculas na superfície de contato osso-implante,

verificou-se menores valores nos grupos irradiados (I e Ip), tanto no período de sete semanas após a cirurgia do implante. Estes resultados mostram a tendência de menor neoformação óssea ao longo do tempo nos grupos submetidos a irradiação concordando com estudos prévios (Renou et al., 2001; Doh et al., 2016; Ocaña et al., 2017) que relatou interferência negativa da irradiação (700cGy) na osseointegração. Os dados relatados acima são corroborados pela separação entre as trabéculas que foram maiores nos grupos irradiados quando comparado ao controle, sendo observada diferença estatística com o grupo Ip nos períodos de 2 e 7 semanas.

Esta comprovação explicita a necessidade de utilização de terapias alternativas direcionadas a esta classe de pacientes. Shah et al. (2017) reportaram a utilização de Oxigenoterapia em Câmara Hiperbárica melhorando consideravelmente a situação de reparo de pacientes irradiados na região de cabeça e pescoço, submetidos à terapia com implantes dentários (Shah et al., 2017). Doh et al. (2016) encontraram menor superfície de contato osso implante nos animais irradiados, mas, como no presente estudo, sem significância estatística, e destacaram a importância do planejamento personalizado da reabilitação por prótese, já que tal condição exige maior tempo para o implante ser submetido à carga mastigatória.

Nos estudos de Swift et al. (2015), foi observado um aumento de células da formação do tecido ósseo de três a trinta dias após irradiação de camundongos com 8 Gy. Entretanto, eles observaram menor volume ósseo e número de trabéculas inicialmente em sete dias. Estes resultados estão de acordo com o presente estudo que também observou aumento do volume ósseo com o decorrer do tempo. Contudo, no período de 2 semanas do presente estudo, a maior quantidade de volume ósseo foi observada no grupo C quando comparado aos grupos irradiados, sendo verificada diferença estatística entre o grupo C e o grupo IP.

O presente estudo mostrou a recuperação do tecido ósseo no decorrer do tempo subsequente à irradiação, já que o volume ósseo, a fração de volume ósseo, o número de trabéculas, a espessura de trabéculas e separação das trabéculas estiveram, em valores absolutos, bem pareados com o grupo controle. Este fato corrobora com os resultados descritos por Hu et al. (2010) que submeteram os ratos à irradiação duas semanas antes da cirurgia de confecção de defeito ósseo e implante de enxerto indutor de formação óssea. Os defeitos tratados com irradiação

pré-operatória também regeneraram com sucesso e não houve diferenças entre os parâmetros avaliados por  $\mu$ CT (Hu et al., 2010).

Ocaña et al. (2017) reportaram utilização de metodologia semelhante à aplicada no presente estudo, já que irradiaram tíbias de coelhos e efetuaram eutanásia decorridos quarenta dias após a cirurgia de implante (aproximadamente seis semanas). A análise da superfície de contato osso-implante, que foi realizada por meio de exame histológico, não mostrou diferenças entre os grupos controle e irradiado, concordando com nossos resultados. Os autores ainda apontam para a possibilidade de realizar implantes em ossos irradiados, aguardando um período de recuperação óssea, que ainda precisa ser melhor investigado em humanos. No presente estudo observa-se que no período de 3 dias o grupo C exibia menor volume ósseo.

O tempo ideal para a cirurgia de implante, em pacientes submetidos a radioterapia, foi alvo do estudo de Stramandinoli-Zanicotti et al. (2014), que tiveram grupos irradiados quinze dias antes e três meses após a cirurgia de implantes em mandíbulas de mini-pigs. Os autores destacaram que a osseointegração avaliada por meio de processamento histológico, foi melhor nos animais que receberam os implantes previamente a irradiação. Assim, afirmaram que a pacientes reabilitados com implantes podem ser submetidos a irradiação, inclusive até concomitante à cirurgia de ressecção do tumor (Stramandinoli-Zanicotti et al., 2014). Ressalta-se que os autores empregaram a irradiação total de 24 Gy para cada lado da mandíbula, em três doses locais de 8 Gy, com um intervalo de sete dias para cada dose, diferindo da metodologia do presente estudo tanto quanto à espécie animal, quanto do osso receptor. Nos estudos de Sawajiri e Mizoe (2003) foram realizadas análises histológicas e morfométricas de tecido ósseo de ratos, após irradiação com 30 Gy e foi observado que a irradiação induz a modulação diferencial da expressão do fator de crescimento dos osteoclastos.

A resposta inflamatória foi relatada se apresentar exacerbada em modelo experimental em ratos quando os animais foram irradiados duas semanas subseqüentes à cirurgia de implante (Brożyna et al., 2015). Doses mais altas que 30 Gy, como o grupo de 42 Gy apresentaram maior intensidade inflamatória (Brożyna et al., 2015). A resposta inflamatória induzida pela cirurgia de implante, bem como pela radiação, é controlada pela liberação de citocinas inflamatórias. Tais substâncias

podem ser encontradas localmente nas áreas inflamadas, bem como podem alcançar a circulação sanguínea e gerar efeitos sistêmicos (Brożyna et al., 2015). Assim, no presente estudo buscou-se avaliar alterações séricas na dosagem de IL-6 e TGF- $\beta$ , já que a IL-6 pode estar associada ao estímulo de osteoclastos ou associada a doenças com perda óssea (Duplomb et al., 2008; Benedetti et al., 2006; Meguid et al., 2013; Wu et al., 2017). Liu et al. (2014) realizaram pesquisa com camundongos IL-6 *knockout* (IL-6<sup>-/-</sup>), ou seja, deficientes em IL-6, e compararam ao grupo controle com animais selvagens. Os autores avaliaram o osso da tíbia destes camundongos por meio de teste histoquímico e demonstraram que os camundongos deficientes em IL-6 apresentaram significativamente mais osso trabecular e placa de crescimento mais ampla do que os selvagens. Também verificaram que o número de células apoptóticas osteoclásticas apresentou-se elevado no grupo experimental, deficiente em IL-6 (Liu et al., 2014). Baseado nos achados de Brożyna et al. (2015) e Liu et al. (2014) esperava-se obter maior dosagem de IL-6 nos grupos irradiados.

Entretanto, os dados obtidos no presente estudo demonstraram níveis significativamente menores de IL-6 nos grupos experimentais (com radiação) em comparação ao grupo controle ( $p < 0.05$ ). Recentemente, Huang et al. (2018) demonstraram que a IL-6 promove um aumento da osteogênese, aumentando o volume ósseo e a densidade mineral óssea dos nódulos minerais. Os autores relataram que essa citocina aumentou a regeneração óssea (Huang et al., 2018). Baseado nos valores de IL-6 obtidos no presente estudo, sugere-se que o grupo controle teve uma resposta mais efetiva e sobre a remodelação tecidual óssea, assim respondeu adequadamente aos estímulos, considerando que a liberação de IL-6 é essencial para atrair novas citocinas que estimularão a resposta imune e concordando com o estudo atual de Huang et al. (2018).

Outra citocina relevante nos processos corpóreos é o fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), o qual pode estar envolvido em vários processos celulares incluindo proliferação e diferenciação celular, angiogênese, mortalidade, apoptose e morte celular (Massague, 1998). Por essa razão sua avaliação é importante, já que considerou-se que a irradiação utilizada no nosso trabalho, poderia causar danos em processos celulares (Iyer, Balasubramanian, 2012). No presente estudo o grupo I demonstrou altos níveis de TGF- $\beta$ , principalmente no período de três dias e duas



semanas, nos quais observou-se diferença estatística com o grupo controle ( $p < 0.05$ ).

No estudo de Terra et al. (2018) os níveis de TGF- $\beta$ 1 começaram a aumentar nas primeiras duas semanas após o procedimento de radioterapia em células tumorais de camundongos e tornou-se significativamente maior na sexta semana quando avaliados por meio do teste de Elisa. Nos resultados do presente estudo, também observamos que os níveis foram maiores no grupo I no período de duas semanas, concordando com Terra et al. (2018) já que a irradiação havia sido realizada 04 semanas previamente a cirurgia, e assim a somatória destas 04 semanas com o período de eutanásia de 02 semanas totaliza 06 semanas. Li et al. (2017) descreveram resultados positivos em relação ao aumento de citocina TGF- $\beta$  em seus estudos de regeneração de células nervosas, evidenciando a importância dessa citocina na proliferação celular. Com isso, os níveis apresentados em nosso trabalho podem se referir a uma possível tentativa de regeneração do tecido ósseo, que foi prejudicado pela radiação absorvida na radioterapia, com variações dos grupos e períodos. Esta hipótese se sustenta no fato que no período mais longo de análise, todos os grupos se equilibraram na expressão desta citocina.

## 6 CONCLUSÃO

Baseado nos nossos resultados, conclui-se que no osso irradiado recupera-se da irradiação com o decorrer do tempo, tornam-se apto à receber implantes posteriormente. Entretanto, quando a irradiação ocorre imediata a cirurgia do implante o tecido ósseo exhibe alterações mais significativas. Destaca-se, no entanto que, os resultados em modelos animais não podem ser diretamente extrapolados para humanos e outras pesquisas clínicas são necessárias para a confirmação de nossas descobertas.

## REFERÊNCIAS\*

Ainsbury EA, Bakhanova E, Barquinero JF, Brai M, Chumak V, Correcher V, et al. Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposures. *Radiat Prot Dosimetry*. 2011 Nov;147(4):573-92. doi: 10.1093/rpd/ncq499. Epub 2010 Dec 23. Review. PubMed PMID: 21183550.

Benedetti F, Rucci N, Del Fattore A, Peruzzi B, Paro R, Longo M, et al. Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: a model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum*. 2006 Nov;54(11):3551-63. PubMed PMID: 17075861.

Brasseur M, Brogniez V, Grégoire V, Reychler H, Lengelé B, D'Hoore W, et al. Effects of irradiation on bone remodelling around mandibular implants: an experimental study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006 Sep;35(9):850-5. Epub 2006 May 11. PubMed PMID: 16697145.

Brożyna B, Szymańska H, Ptaszyński K, Woszczyński M, Lechowska-Piskorowska J, et al. Tissue response after implantation of pure titanium and bioresorbable screws in scapula with postoperative irradiation: an experimental study on rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015 Oct;120(4):443-52. doi: 10.1016/j.oooo.2015.06.036. Epub 2015 Jul 8. PubMed PMID: 26346909.

Brogniez V, Nyssen-Behets C, Grégoire V, Reychler H, Lengelé B. Implant osseointegration in the irradiated mandible. A comparative study in dogs with a microradiographic and histologic assessment. *Clin Oral Implants Res*. 2002 Jun;13(3):234-42. PubMed PMID: 12010153.

Cao Y, Weischer T. Comparison of maxillary implant-supported prosthesis in irradiated and non-irradiated patients. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2003;23(2):209-12. PubMed PMID: 12973954.

Caldas LR. Bases radiobiológicas. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência Médica. Rio de Janeiro, Divisão Nacional de Cancer; 1970.

Chandra A, Lin T, Tribble MB, Zhu J, Altman AR, Tseng WJ, et al. PTH1-34 alleviates radiotherapy-induced local bone loss by improving osteoblast and osteocyte survival. *Bone*. 2014 Oct;67:33-40. doi: 10.1016/j.bone.2014.06.030. Epub 2014 Jul 1. PubMed PMID: 24998454; PubMed Central PMCID: PMC4154509.

Chandra A, Lin T, Zhu J, Tong W, Huo Y, Jia H, et al. PTH1-34 blocks radiation-induced osteoblast apoptosis by enhancing DNA repair through canonical Wnt pathway. *J Biol Chem*. 2015 Jan 2;290(1):157-67. doi: 10.1074/jbc.M114.608158. Epub 2014 Oct 21. PubMed PMID: 25336648; PubMed Central PMCID: PMC4281718.

---

\* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Chambrone L, Mandia J Jr, Shibli JA, Romito GA, Abrahao M. Dental implants installed in irradiated jaws: a systematic review. *J Dent Res*. 2013 Dec;92(12 Suppl):119S-30S. doi: 10.1177/0022034513504947. Epub 2013 Oct 24. Review. PubMed PMID: 24158336; PubMed Central PMCID: PMC3860067.

Chen H, Liu N, Xu X, Qu X, Lu E. Smoking, radiotherapy, diabetes and osteoporosis as risk factors for dental implant failure: a meta-analysis. *PLoS One*. 2013 Aug 5;8(8):e71955. doi: 10.1371/journal.pone.0071955. Print 2013. PubMed PMID: 23940794; PubMed Central PMCID: PMC3733795.

De la Plata M, Gías LN, Díez PM, Muñoz-Guerra M, González-García R, Lee GY, et al. Osseointegrated implant rehabilitation of irradiated oral cancer patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012 May;70(5):1052-63. doi: 10.1016/j.joms.2011.03.032. Epub 2011 Jul 22. PubMed PMID: 21778009.

Doh RM, Kim S, Keum KC, Kim JW, Shim JS, Jung HS, et al. Postoperative irradiation after implant placement: A pilot study for prosthetic reconstruction. *J Adv Prosthodont*. 2016 Oct;8(5):363-371. Epub 2016 Oct 21. PubMed PMID: 27826386; PubMed Central PMCID: PMC5099128.

Duplomb L, Baud'huin M, Charrier C, Berreur M, Trichet V, Blanchard F, et al. Interleukin-6 inhibits receptor activator of nuclear factor kappaB ligand-induced osteoclastogenesis by diverting cells into the macrophage lineage: key role of Serine727 phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3. *Endocrinology*. 2008 Jul;149(7):3688-97. doi: 10.1210/en.2007-1719. Epub 2008 Apr 10. PubMed PMID: 18403479.

Faggion CM Jr, Chambrone L, Listl S, Tu YK. Network meta-analysis for evaluating interventions in implant dentistry: the case of peri-implantitis treatment. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013 Aug;15(4):576-88. doi: 10.1111/j.1708-8208.2011.00384.x. Epub 2011 Aug 11. Review. PubMed PMID: 21834862.

Feng LR, Suy S, Collins SP, Saligan LN. The role of TRAIL in fatigue induced by repeated stress from radiotherapy. *J Psychiatr Res*. 2017 Aug;91:130-138. doi: 10.1016/j.jpsychires.2017.03.012. Epub 2017 Mar 20. PubMed PMID: 28343068; PubMed Central PMCID: PMC5473507.

Fuller K, Lean JM, Bayley KE, Wani MR, Chambers TJ. A role for TGFbeta(1) in osteoclast differentiation and survival. *J Cell Sci*. 2000 Jul;113 ( Pt 13):2445-53. PubMed PMID: 10852823.

Gallet P, Phulpin B, Merlin JL, Leroux A, Bravetti P, Mecellem H, et al. Long-term alterations of cytokines and growth factors expression in irradiated tissues and relation with histological severity scoring. *PLoS One*. 2011;6(12):e29399. doi: 10.1371/journal.pone.0029399. Epub 2011 Dec 22. PubMed PMID: 22216271; PubMed Central PMCID: PMC3245280.

Haubner F, Ohmann E, Pohl F, Strutz J, Gassner HG. Wound healing after radiation therapy: review of the literature. *Radiat Oncol*. 2012 Sep 24;7:162. doi: 10.1186/1748-717X-7-162. Review. PubMed PMID: 23006548; PubMed Central PMCID: PMC3504517.

Hu WW, Ward BB, Wang Z, Krebsbach PH. Bone regeneration in defects compromised by radiotherapy. *J Dent Res*. 2010 Jan;89(1):77-81. doi: 10.1177/0022034509352151. PubMed PMID: 19966040; PubMed Central PMCID: PMC2798583.

Huang RL, Sun Y, Ho CK, Liu K, Tang QQ, Xie Y, Li Q. IL-6 potentiates BMP-2-induced osteogenesis and adipogenesis via two different BMPR1A-mediated pathways. *Cell Death Dis*. 2018 Feb 2;9(2):144. doi: 10.1038/s41419-017-0126-0. PubMed PMID: 29396550; PubMed Central PMCID: PMC5833364.

Iyer S, Balasubramanian D. Management of radiation wounds. *Indian J Plast Surg*. 2012 May;45(2):325-31. doi: 10.4103/0970-0358.101311. PubMed PMID: 23162232; PubMed Central PMCID: PMC3495383.

Instituto Nacional do Câncer (INCA) 2008. Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. / Instituto Nacional do Câncer. Rio de Janeiro.

Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev*. 2005 Oct;26(6):743-74. Epub 2005 May 18. Review. PubMed PMID: 15901668.

Klokkevold PR, Han TJ. How do smoking, diabetes, and periodontitis affect outcomes of implant treatment? *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007;22 Suppl:173-202. Review. Erratum in: *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008 Jan-Feb;23(1):56. PubMed PMID: 18437796.

Liddelow G, Klineberg I. Patient-related risk factors for implant therapy. A critique of pertinent literature. *Aust Dent J*. 2011 Dec;56(4):417-26; quiz 441. doi: 10.1111/j.1834-7819.2011.01367.x. Review. PubMed PMID: 22126353.

Liu H, Feng W, Yimin, Cui J, Lv S, Hasegawa T, et al. Histological Evidence of Increased Osteoclast Cell Number and Asymmetric Bone Resorption Activity in the Tibiae of Interleukin-6-Deficient Mice. *J Histochem Cytochem*. 2014 Aug;62(8):556-64. doi: 10.1369/0022155414537830. Epub 2014 May 14. PubMed PMID: 24828512.

Mancha de la Plata M, Gías LN, Díez PM, Muñoz-Guerra M, González-García R, Lee GY, et al. Osseointegrated implant rehabilitation of irradiated oral cancer patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012 May;70(5):1052-63. doi: 10.1016/j.joms.2011.03.032. Epub 2011 Jul 22. PubMed PMID: 21778009.

Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:753-91. Review. PubMed PMID: 9759503.

Meguid MH, Hamad YH, Swilam RS, Barakat MS. Relation of interleukin-6 in rheumatoid arthritis patients to systemic bone loss and structural bone damage. *Rheumatol Int*. 2013 Mar;33(3):697-703. doi: 10.1007/s00296-012-2375-7. Epub 2012 Apr 25. PubMed PMID: 22531887.

Mitchell MJ, Logan PM. Radiation-induced changes in bone. *Radiographics*. 1998 Sep-Oct;18(5):1125-36; quiz 1242-3. Review. PubMed PMID: 9747611.

Okuno E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes. Acidente radiológico de Goiânia. *Estudos avançados*. 2013 Jan;27(77): 187-199.

Ocaña RP, Rabelo GD, Sassi LM, Rodrigues VP, Alves FA. Implant osseointegration in irradiated bone: an experimental study. *J Periodontal Res*. 2017 Jun;52(3):505-511. doi: 10.1111/jre.12416. Epub 2016 Sep 13. PubMed PMID: 27624290.

Pompa G, Saccucci M, Di Carlo G, Brauner E, Valentini V, Di Carlo S, et al. Survival of dental implants in patients with oral cancer treated by surgery and radiotherapy: a retrospective study. *BMC Oral Health*. 2015 Jan 20;15:5. doi: 10.1186/1472-6831-15-5. PubMed PMID: 25599761; PubMed Central PMCID: PMC4324417.

Quinn JM, Itoh K, Udagawa N, Hausler K, Yasuda H, Shima N, et al. Transforming growth factor beta affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. *J Bone Miner Res*. 2001 Oct;16(10):1787-94. PubMed PMID: 11585342.

Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005 Jun;21(6):775-7. PubMed PMID: 15925305.

Renou SJ, Guglielmotti MB, de la Torre A, Cabrini RL. Effect of total body irradiation on peri-implant tissue reaction: an experimental study. *Clin Oral Implants Res*. 2001 Oct;12(5):468-72. PubMed PMID: 11564106.

Ries LAG; Eisner MP; Kosary CL; et al. SEER Cancer Statistics Review, 1973-1999. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2002.

Russell JA, Connor NP. Effects of age and radiation treatment on function of extrinsic tongue muscles. *Radiat Oncol*. 2014 Dec 4;9:254. doi: 10.1186/s13014-014-0254-y. PubMed PMID: 25472556; PubMed Central PMCID: PMC4269095.

Sawajiri M, Mizoe J. Changes in bone volume after irradiation with carbon ions. *Radiat Environ Biophys*. 2003 Jul;42(2):101-6. Epub 2003 May 24. PubMed PMID: 12768291.

Sønstevold T, Johannessen AC, Stuhr L. A rat model of radiation injury in the mandibular area. *Radiat Oncol*. 2015 Jun 9;10:129. doi: 10.1186/s13014-015-0432-6. PubMed PMID: 26050968; PubMed Central PMCID: PMC4464243.

Shah DN, Chauhan CJ, Solanki JS. Effectiveness of hyperbaric oxygen therapy in irradiated maxillofacial dental implant patients: A systematic review with meta-analysis. *J Indian Prosthodont Soc*. 2017 Apr-Jun;17(2):109-119. doi: 10.4103/0972-4052.203193. Review. PubMed PMID: 28584411; PubMed Central PMCID: PMC5450897.

Stramandinoli-Zanicotti RT, Sassi LM, Schussel JL, Torres MF, Matos Ferreira SA, Carvalho AL. Effect of radiotherapy on osseointegration of dental implants immediately placed in postextraction sites of minipigs mandibles. *Implant Dent*.

2014 Oct;23(5):560-4. doi: 10.1097/ID.0000000000000150. PubMed PMID: 25192164.

Swift JM, Swift SN, Smith JT, Kiang JG, Allen MR. Skin wound trauma, following high-dose radiation exposure, amplifies and prolongs skeletal tissue loss. *Bone*. 2015 Dec;81:487-494. doi: 10.1016/j.bone.2015.08.022. Epub 2015 Sep 1. PubMed PMID: 26335157.

Terra M, Oberkamp M, Fayolle C, Rosenbaum P, Guillerey C, Dadaglio G, et al. Tumor-derived TGF- $\beta$  alters the ability of plasmacytoid dendritic cells to respond to innate immune signaling. *Cancer Res*. 2018 Mar 9. pii: canres.2719.2017. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2719. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29523540.

Vasconcellos LM, Barbara MA, Deco CP, Junqueira JC, do Prado RF, Anbinder AL, et al. Healing of normal and osteopenic bone with titanium implant and low-level laser therapy (GaAIs): a histomorphometric study in rats. *Lasers Med Sci*. 2014 Mar;29(2):575-80. doi: 10.1007/s10103-013-1326-1. Epub 2013 Apr 28. PubMed PMID: 23624654.

Verdonck HW, Meijer GJ, Nieman FH, Stoll C, Riediger D, de Baat C. Quantitative computed tomography bone mineral density measurements in irradiated and non-irradiated minipig alveolar bone: an experimental study. *Clin Oral Implants Res*. 2008 May;19(5):465-8. doi: 0.1111/j.16000501.2007.01496.x. Epub 2008 Mar 26. PubMed PMID: 18371103.

Verdonck HW, Meijer GJ, Laurin T, Nieman FH, Stoll C, Riediger D, Stoelinga PJ, de Baat C. Implant stability during osseointegration in irradiated and non-irradiated minipig alveolar bone: an experimental study. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Feb;19(2):201-6. Epub 2007 Dec 6. PubMed PMID: 18067600.

Wang Y, Zhu G, Wang J, Chen J. Irradiation alters the differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep*. 2016 Jan;13(1):213-23. doi: 10.3892/mmr.2015.4539. Epub 2015 Nov 10. PubMed PMID: 26572960; PubMed Central PMCID: PMC4686093.

Williams HJ, Davies AM. The effect of X-rays on bone: a pictorial review. *Eur Radiol*. 2006 Mar;16(3):619-33. Epub 2005 Oct 20. Review. PubMed PMID: 16237551.

Wu Q, Zhou X, Huang D, Ji Y, Kang F. IL-6 Enhances Osteocyte-Mediated Osteoclastogenesis by Promoting JAK2 and RANKL Activity In Vitro. *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(4):1360-1369. doi: 10.1159/000465455. Epub 2017 Mar 9. PubMed PMID: 28278513.

## ANEXO A – Certificado de Comitê de Ética em Pesquisa.



CERTIFICAMOS, que a proposta intitulada "Efeitos da radioterapia na neoformação óssea da interface osso/implante nos tecidos circunjacentes e na microbiota local" registrada com o nº 003 /2016, sob a responsabilidade de **LUANA MAROTA REIS DE VASCONCELLOS**, tendo como colaborador Bruno César Almeida Costa e que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP)**, em reunião de 11/03/2016.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/08/2016 a 30/07/2018
Espécie/inhagem/raça	Rato/heterogênico Wistar
Nº de Animais	96
Peso/idade	400 grs / 90 dias
Sexo	MACHO
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 11 de março de 2016

  
**Prof. Dra. CRISTIANE YUMI KOGA ITO**  
 Vice-Coordenadora em exercício