

RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor
(a), o texto completo desta tese será
disponibilizado a partir de

02/05/2020

MARIANA RAQUEL DA CRUZ VEGIAN

**EFEITO MODULADOR DA RADIAÇÃO IONIZANTE SOBRE CITOCINAS
SANGUÍNEAS E CÉLULAS DO TECIDO ÓSSEO
NA INTERFACE OSSO-IMPLANTE**

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

Orientadora: Prof^a Adj. Luana Marotta Reis de Vasconcellos
Coorientadora: Dra. Gabriela de Fátima Santana-Melo

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).

Vegian, Mariana Raquel da Cruz

Efeito modulador da radiação ionizante sobre citocinas sanguíneas e células do tecido ósseo na interface osso-implante / Mariana Raquel da Cruz Vegian. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
42 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.

Orientador: Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Coorientador: Gabriela de Fátima Santana- Melo

1. Remodelação óssea. 2. Implantes de titânio. 3. Citocinas. 4. Osseointegração. 5. Radiação ionizante. I. Vasconcellos, Luana Marotta Reis de , orient. II. Santana- Melo, Gabriela de Fátima, 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

Prof^a Adj. Luana Marotta Reis de Vascocellos (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Dra. Ritchelli Ricci

Universidade do Vale do Paraíba (Univap)

Campus de São José dos Campos

Prof^a Dra. Marianne Spalding

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 02 de maio de 2018.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a DEUS, por ter me colocado nesse caminho e ter me proporcionado experiências e aprendizados duradouros, assim como as amizades de pessoas especiais, sem as quais certamente não teria dado conta!

Aos meus pais, Teresinha e Antonio, e meu avô, Gumerindo, e a toda minha família que mesmo com tantos obstáculos me apoiaram no que eu escolhi para minha carreira e me ajudaram de tantas formas para que eu chegasse até aqui! Obrigada!

Ao meu querido esposo, Josiel, por ser tão importante em minha vida e sempre me apoiar em todos os momentos difíceis. Por me levantar quando eu precisava e estar sempre a meu lado com pensamentos positivos. Obrigada pelo companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio e amor. Obrigada por tornar possível esse momento!

Agradeço também a minha cunhada Priscila, por apoiar e incentivar essa nova fase em minha vida, e ao seu marido Ivan, que me apresentou ao curso e vivenciou grande parte do meu caminho até aqui. Aos meus sogros, Doracy e José Aparecido, que também sempre incentivaram e apoiaram, além de permitir que compartilhasse sua moradia para concretizar esse momento. Obrigada pelo carinho!

À minha orientadora, Prof^a Luana Vasconcellos, por ter me acolhido e me ensinado tantos caminhos, por lutar por mim e compreender as situações que são tão importantes em minha vida. À minha coorientadora e amiga, Gabriela Santana-Melo, que me apoiou em tantos momentos difíceis. Por tantos sorrisos, conversas, e, principalmente, compreensão e paciência com uma pessoa tão desastrada e cheia de reclamações como eu. Obrigada por estarem a meu lado e acreditarem tanto em mim!

Às minhas amigas de mestrado, Andresa Botan e Suelen Simões, por estarem ao meu lado e facilitarem os obstáculos e desafios. Pelas risadas quando necessário e momentos de alegria quando tudo parecia desabar. Conseguimos! Aos meus colegas e equipe, Fernanda Herrera, Leonardo Kamizawa e Bruno Costa, por terem proporcionado ótimos momentos, principalmente, na sala de espera durante sessões de irradiação, e por toda a ajuda durante a realização do projeto. Às alunas

de iniciação científica, Camila, Thais, Marília, Sarah e Bruna por ajudarem tantas vezes em procedimentos delicados mesmo com tantos a fazeres. Trabalho em equipe é sempre muito bem vindo!

A todos os alunos, professores e funcionários do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Patologia, especialmente aos professores Estela Kaminagakura Tango e Rubens Nisie Tango pela idealização desse trabalho, que abriu portas para tantos outros. Às professoras Luciane Dias de Oliveira, Renata Falchete do Prado, que se dispuseram a me ajudar em várias situações e dúvidas. Também agradeço a professora Marianne Spalding, por ajudar passivamente neste projeto, com sua simpatia, incentivando sempre, e por permitir participações incríveis em projetos inesperados. Vocês foram muito importantes!

Aos funcionários da Pós-graduação, especialmente ao técnico Walter, por ter sido tão solícito e simpático, ajudando e ensinando sempre. Obrigado por ser tão eficiente no que faz e conseguir tornar esse projeto uma realidade!

A todos os funcionários do Instituto de Ciência e Tecnologia e por toda equipe de apoio que deram condições para a realização de todo o trabalho. Obrigada!

Agradeço, também, à FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro (Processo 2015/24986-8) e pela concessão de bolsa (Processo 2016/19707-5), à todos os funcionários do Instituto de Estudos Avançados e aos professores Cláudio Antonio Federico e Odair Lelis Gonzalez pelo auxílio, acompanhamento e orientação durante os procedimentos com irradiação. Obrigada a todos pelo apoio!

Por fim, gostaria de agradecer ao Instituto de Ciência e Tecnologia por abrirem as portas e permitirem minha busca pelo conhecimento técnico e científico.

Gratidão!

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1 INTRODUÇÃO.....	8
2 PROPOSIÇÃO.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Comitê de Ética.....	14
3.2 Implantes e procedimento cirúrgico.....	14
3.3 Procedimentos de irradiação.....	16
3.4 Coleta e armazenamento do soro.....	17
3.5 Análise das citocinas.....	18
3.6 Processamento histológico dos espécimes.....	19
3.7 Análise imuno-histoquímica.....	20
3.8 Análise estatística.....	23
4 RESULTADOS.....	24
4.1 Análise das citocinas.....	24
4.2 Análise imuno-histoquímica.....	26
5 DISCUSSÃO.....	29
6 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	37
ANEXO.....	42

Vegian MRC. Efeito modulador da radiação ionizante sobre citocinas sanguíneas e células do tecido ósseo na interface osso-implante [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

Implantes osseointegrados são considerados efetivos como tratamento reabilitador. Contudo, vários fatores podem prejudicar o sítio receptor, entre eles, a radiação ionizante. Entretanto, os mecanismos pelos quais estes eventos acontecem ainda não foram completamente esclarecidos. O objetivo neste estudo foi avaliar o efeito modulador da radiação ionizante, simulando uma dose total de um tratamento radioterápico convencional para pacientes oncológicos, nos níveis de citocinas sanguíneas e na remodelação óssea da interface ao redor do implante. Foram utilizados 45 ratos que receberam implantes rosqueados de titânio grau V nos fêmures direito. Os animais foram divididos em 3 grupos: a) Grupo Sem-Irradiação (S-Ir): grupo controle apenas com implante. b) Grupo Irradiação Posterior (IrPos): implante + irradiação; c) Grupo Irradiação Prévia (IrPrev): irradiação + implante. Os animais dos grupos IrPos e IrPrev foram submetidos a irradiação em 2 etapas fracionadas de 15 Gy. Nos períodos de 3 dias, 2 semanas e 7 semanas após o último procedimento, 05 animais foram eutanasiados aleatoriamente por grupo. Os níveis séricos de TNF- α , IL-1 β e IL-10 foram mensurados a partir do sangue coletado previamente ao momento da eutanásia pelo método imunoenzimático (ELISA). As peças contendo os implantes foram submetidos à marcação imuno-histoquímica utilizando os marcadores para TRAP e osteocalcina (OC). O teste ANOVA foi utilizado para análise estatística e quando necessário foi aplicado o teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$). O grupo IrPos exibiu diferença estatística ($p < 0,05$) com S-Ir e IrPrev nos valores de TNF- α em 2 e 7 semanas, enquanto IrPrev diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) de S-Ir nos valores de IL-10, em 3 dias. A análise imuno-histoquímica da interface osso-implante, demonstrou valores mais altos de TRAP e OC nos grupos irradiados, com diferença estatística ($p < 0,05$), entre os valores de TRAP de S-Ir e IrPos em 3 dias e entre S-Ir e IrPrev em todos os períodos, e de OC entre S-Ir e IrPos em 3 dias e entre S-Ir e IrPrev em 2 semanas. Em suma, os resultados desse estudo indicaram que a radiação ionizante alterou produções de citocinas sanguíneas pró e anti-inflamatórias após lesão cirúrgica de colocação do implante e influenciou na expressão de proteínas envolvidas na remodelação óssea.

Palavras-chave: Remodelação óssea. Implantes de titânio. Citocinas. Osseointegração. Radiação ionizante. Imuno-histoquímica.

Vegian MRC. *Modulating effect of ionizing radiation on blood cytokines and bone tissue cells in bone-implant interface [dissertation]*. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

Osseointegrated implants are considered effective as a rehabilitative treatment. However, several factors may impair the receptor site, including ionizing radiation. However, the mechanisms by which these events occur have not yet been fully elucidated. The objective of this study was to evaluate the modulating effect of radiotherapy, simulating a total dose of a conventional ionizing radiation treatment for cancer patients, blood cytokine levels and bone remodeling of the interface around the implant. Forty-five rats were submitted to grade V titanium implants in the right femurs. The animals were divided into three groups: a) No Irradiation group (N-Ir): control group with only the implant b) Previous irradiation group (Prev-Ir): implant + irradiation; c) Posterior Irradiation group (Pos-Ir): irradiation + implant. Pos-Ir and Prev-Ir groups were irradiated in 2 fractional stages of 15 Gy. At 3 days, 2 weeks and 7 weeks after the last procedure, 05 animals were randomly euthanized per group. Serum levels of TNF- α , IL-1 β and IL-10 were measured from blood collected prior to euthanasia using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The pieces containing the implants were subjected to immunohistochemical labeling using the markers for TRAP and osteocalcin (OC). The ANOVA test was used for statistical analysis and when necessary the Tukey multiple comparison test ($p < 0.05$) was applied. The Pos-Ir group exhibited a statistical difference ($p < 0.05$) with N-Ir and Prev-Ir in TNF- α values at 2 and 7 weeks, whereas Prev-Ir differed statistically ($p < 0.05$) from N-Ir in IL-10 values, in 3 days. The immunohistochemical analysis of the bone-implant interface demonstrated higher values of TRAP and OC in the irradiated groups, with a statistical difference ($p < 0.05$) between the values of TRAP of N-Ir and Pos-Ir in 3 days and between N-Ir and Prev-Ir in all periods, and OC between N-Ir and Pos-Ir in 3 days and between N-Ir and Prev-Ir in 2 weeks. In summary, the results of this study indicated that irradiation altered productions of pro and anti-inflammatory blood cytokines after surgical lesion of implant placement and influenced the expression of proteins involved in bone remodeling.

Keywords: Bone remodeling. Implants of titanium. Cytokines. Osseointegration. Ionizing radiation. Immunohistochemistry.

1 INTRODUÇÃO

Implantes osseointegrados são considerados efetivos como tratamento reabilitador. Embora altamente previsíveis e com alto índice de sucesso (Klokkevold, Han, 2007), ainda são registradas 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., 2013). Contudo, há condições específicas que podem ser associadas à falha 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 radiação 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 (Chambrone et al., 2013; Chen et al., 2013).

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., 2016), sendo que a injúria causada no tecido ósseo varia desde osteopenia até osteoradionecrose (Williams, Davies, 2006). Os pacientes portadores de tumores de cabeça e pescoço, geralmente são submetidos à radioterapia durante o tratamento (Mancha De La Plata et al., 2012). Contudo, posteriormente ao tratamento radioterápico, muitos destes pacientes necessitam de reabilitação oral, para repor perdas dentárias ou ainda para o restabelecimento de deformidades causadas por ressecção cirúrgica devido ao tumor. Os implantes dentários têm um papel crucial nesta reabilitação, entretanto, nesta situação o tratamento com implantes torna-se um desafio, uma vez que o osso, no qual os implantes serão inseridos, foi irradiado (Pompa et al., 2015).

A osseointegração pode ser prejudicada devido à diminuição da vascularização e da vitalidade óssea decorrentes da radioterapia (Verdonck et al., 2008). Também é descrita a progressiva fibrose de vasos e tecidos moles (Pompa et al., 2015). Estes efeitos resultam em maior reabsorção peri-implantar no osso irradiado (Brasseur et al., 2006; Brogniez et al., 2002) e menor capacidade de cicatrização (Pompa et al., 2015). A radioterapia focal promove efeitos prejudiciais no tecido ósseo quando ele está no campo irradiado (Chandra et al., 2015; Hu et al., 2010), e 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). Além disso, Zou et al. (2016) demonstraram que o dano causado na região óssea, que recebe radiação, é dependente do tempo após a exposição, bem como da quantidade de osso e qualidade (força e microarquitetura) do esqueleto circunjacente que não foi exposto à radiação.

A radiação ionizante é uma forma de energia transmitida por uma fonte com capacidade de ionizar o meio que atravessa pela retirada de elétrons dos átomos desse material. A ionização ocorre por um processo de deposição de energia pela radiação no meio que atravessa. Esse processo caracteriza a dose absorvida, e a interação da ionização nesse meio é o que provoca os efeitos biológicos nos seres vivos. A radioterapia é o uso terapêutico da radiação ionizante para tratamento de alguma enfermidade do corpo do paciente com uma dose máxima estabelecida na região da lesão, com mínimo de comprometimento dos tecidos sadios ao redor (Okuno, Yoshimura, 2010).

Umas das formas de tratamento com radiação ionizante é um tratamento realizado utilizando uma fonte emissora de feixes de radiação-gamma com uma distância padronizada do receptor radioativo (Instituto Nacional do Câncer, 2008). Este tratamento é considerado bastante eficaz contra tumores, porém sua dose é limitada pela tolerância à radiação dos tecidos sadios circunjacentes, uma vez que as doses necessárias para erradicar o tumor costumam ser muito elevadas, o que dificulta a preservação desses tecidos (Okuno, Yoshimura, 2010; Sonstevold et al., 2015).

Tanto a destruição do tumor como a indução de lesões indesejáveis nos tecidos normais podem ocorrer por um mecanismo de interação que age sobre o DNA nuclear, causando morte celular ou dificuldade de multiplicação. Este mecanismo pode ser consequência tanto de uma ação direta, quando a radiação atua na clivagem do DNA, quanto de uma ação indireta, na qual 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 et al., 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 necessária para tratamentos neoplásicos, baseia-se na localização e no tipo de malignidade, e se a radioterapia será utilizada unicamente ou em combinação com outras modalidades de tratamentos. A maioria dos pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço recebem uma dose total entre 50 e 70 Gy (Vissink et al., 2003). Doses únicas de 20-30 Gy estão associadas a alterações na morfologia e fibrose muscular, enquanto que doses fracionadas maiores que 14 Gy causam apoptoses em células endoteliais (Gallet et al., 2011). Recentemente, Chandra et al. (2014) verificaram maior perda funcional de osteoblastos após radioterapia com dose total de 16 Gy, devido ao maior número de apoptose destas células.

É importante também avaliar a influência da radiação na atividade celular, uma vez que os efeitos da radioterapia resultam em alterações no sistema de remodelação óssea, afetando, principalmente, osteoblastos por serem mais radiosensíveis que os osteoclastos (Vissink et al., 2003). Chang et al. (2014) avaliaram a estrutura e a composição do osso, de maxilas de ratos irradiados com doses de 10 e 20 Gy, através de microtomografia computadorizada e marcadores imuno-histoquímicos. Os autores verificaram que houve aumento no espaço da medula óssea associado a um aumento significativo de células marcadas com fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), marcador de osteoclastos, sugerindo, que mesmo em baixas doses como 10 Gy, a radiação provocou alterações no metabolismo ósseo.

Da mesma forma, ao expor ratos a uma dose de 20 Gy de radiação-gamma, Zou et al. (2016) verificaram o aumento no nível de TRAP no soro, o aumento no número de osteoclastos e a diminuição de osteoblastos no osso trabecular, duas semanas pós-irradiação. Além disso, Wenxi et al. (2015) relataram também uma densidade mineral 85,7% menor em camundongos irradiados em comparação com a de camundongos não irradiados e associaram a níveis elevados de precursores de osteoclastos em reparo ósseo.

A patofisiologia e as interações celulares que ocorrem após a exposição à radiação incluem também mecanismos complexos como a liberação ou a inibição de proteínas, como citocinas e fatores de crescimento, que ainda não estão completamente esclarecidos (Haubner et al., 2012). A ativação ou repressão dessas

proteínas, quando as células são expostas à radiação ionizante, seria, principalmente, uma resposta aos danos causados no DNA, provocados pela radiação, para modular comportamentos e fenótipos celulares, facilitando o reparo do DNA e prevenindo a proliferação de células danificadas (Barcellos-Hoff et al., 2005). Além disso, citocinas inflamatórias são indispensáveis e benéficas para processos de cicatrização de defeitos ósseos, porém, sinais inflamatórios em excesso, alteram o equilíbrio da remodelação óssea em direção a processos osteolíticos (Lin et al., 2017). Durante a colocação de um implante, em resposta à agressão tecidual, células sentinelas do sistema de imunidade inata iniciam a cascata inflamatória através da liberação de fatores pró-inflamatórios e pró-osteoclásticos, que incluem inúmeras etapas biológicas iniciadas pela migração sistêmica de precursores de monócitos/macrófagos para o local (Nich et al., 2014).

Algumas citocinas pró-inflamatórias estão diretamente envolvidas na diferenciação e atividade de osteoclastos originados de linhagens de células hematopoiéticas mononucleadas (Katagiri, Takahashi, 2002). Wenxi et al. (2015) verificaram aumento nos níveis de IFN- γ , TNF- α , IL-6, e IL-17, e diminuição dos níveis de IL-10, após a exposição à radiação. Esta última é considerada um inibidor da reabsorção óssea por regular negativamente cascatas inflamatórias (Hong et al., 2000). Alguns autores demonstraram que TNF- α e IL-1 β estão, também, relacionadas com a sobrevivência de osteoclastos (Morony et al., 1999) e sugeriram sua atuação na diferenciação dessas células (Kobayashi et al., 2000; Shiratori et al., 2017; Wijekoon et al., 2017).

Dessa forma, situações com implantes cirúrgicos podem ser prejudicados em um ambiente pró-inflamatório, pois ao favorecer a geração de células de reabsorção óssea, a perda de osso pode provocar afrouxamento do implante, causar dor e diminuir a função local (Dapunt et al., 2014). Assim, os efeitos colaterais da radioterapia no tecido ósseo tornaram-se um problema grave devido ao elevado número de indivíduos tratados com radiação ionizante e submetidos à reabilitação com implantes. Contudo, faltam estudos sobre os efeitos sistêmicos dessa radiação, relacionados à osseointegração, principalmente, em tecidos com implantes já osseointegrados, para elucidar mecanismos pelos quais ocorrem as falhas na osseointegração que conduzem ao maior número de perdas de implantes em

pacientes irradiados. Muitas dúvidas ainda precisam ser esclarecidas para que haja uma segura e efetiva reabilitação por implantes.

6 CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo indicaram que a radiação ionizante alterou a produção de citocinas séricas pró e anti-inflamatórias após lesão cirúrgica de colocação do implante e influenciou na expressão de proteínas envolvidas na remodelação óssea, sugerindo modificações na osseointegração. A situação de colocação do implante também modificou os resultados, com diferentes valores quando o implante foi instalado antes ou depois da exposição à radiação, assim como tempo que a radiação estava atuando no tecido. A partir desses resultados, mais estudos são necessários para se determinar o período e situação mais adequados para a colocação de um implante diante de situações que envolvem radiação ionizante, permitindo melhor recuperação e reparação celular para evitar falhas na osseointegração.

REFERÊNCIAS*

Abbas AK, Lichtman AH, Pilai S. *Imunologia celular e molecular*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier 2015.

Augustin NH, Kim SW, Uhlig A, Hanser C, Henke M, Schumacher M. A flexible multivariate random effects proportional odds model with application to adverse effects during radiation therapy. *Biometrical J*. 2017;59(6):1339–51. doi: 10.1002/bimj.201600142

Barcellos-Hoff MH, Park C, Wright EG. Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(11):867–75. doi: 10.1038/nrc1735

Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(3):251–62. doi:10.1034/j.1600-0501.2003.00972.x

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;35(9):850–5. doi: 10.1016/j.ijom.2006.03.016

Brogniez V, Nyssen-behets C, Grégoire V, Reychler H, Lengelé B. Implant osseointegration in the irradiated mandible microradiographic and histologic assessment. *Clin Oral Implants Res*. 2002;13:234–42.

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

Chambrone L, Mandia J, Shibli JA, Romito GA, Abrahao M. Dental implants installed in irradiated jaws: a systematic review. *J Dent Res*. 2013;92(12 Suppl):119–30. doi: 10.1177/0022034513504947

Chandra A, Lin T, Tribble MB, Zhu J, Altman AR, Tseng W, et al. PTH1-34 alleviates radiotherapy-induced local bone loss by improving osteoblast and osteocyte survival. *Bone*. 2014;67:33–40. doi: 10.1016/j.bone.2014.06.030

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;290(1):157–67. doi: 10.1074/jbc.M114.608158

Chang PC, Wang CY, Sheng-Chueh T. Combination of LED light and platelet-derived growth factor to accelerate dentoalveolar osteogenesis. *J Clin Periodontol*. 2014;41(10):999–1006. doi: 10.1111/jcpe.12301

* 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

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;8(8):e71955. doi:10.1371/journal.pone.0071955.

Contassot E, Beer HD, French LE. Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. *Swiss Med Wkly*. 2012;142(M):1–10. doi: 10.4414/smw.2012.13590

Cunha S da, Sarmento V, Ramalho L, Freitas A de, Almeida D de, Tavares M, et al. Effects of radiotherapy on bone tissue. *Radiol Bras*. 2007;40(3):189–92. doi: 10.1590/S0100-39842007000300011

Dapunt U, Giese T, Lasitschka F, Reinders J, Lehner B, Kretzer JP, et al. On the inflammatory response in metal-on-metal implants. *J Transl Med*. 2014;12:74. doi: 10.1186/1479-5876-12-74

Dos Santos P, de Molon RS, Queiroz TP, Okamoto R, de Souza Faloni AP, Gulinelli JL, et al. Evaluation of bone substitutes for treatment of peri-implant bone defects: biomechanical, histological, and immunohistochemical analyses in the rabbit tibia. *J Periodontal Implant Sci*. 2016;46(3):176–96. doi: 10.5051/jpis.2016.46.3.176.

Dos Santos PL, Queiroz TP, Margonar R, Gomes de Souza Carvalho AC, Okamoto R, de Souza Faloni AP, et al. Guided implant surgery: what is the influence of this new technique on bone cell viability? *J Oral Maxillofac Surg*. 2013;71(3):505–12. doi: 10.1016/j.joms.2012.10.017

Esteves J, Marcantonio Jr E, Faloni A, Rocha F, Marcantonio R, Wilk K, et al. Dynamics of bone healing after osteotomy with piezosurgery or conventional drilling – histomorphometrical, immunohistochemical, and molecular analysis. *J Transl Med*. 2013;11:221. doi: 10.1186/1479-5876-11-221.

Faggion CM, 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;15(4):576–88. doi: 10.1111/j.1708-8208.2011.00384

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):1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0029399

Ghandhi SA, Turner HC, Shuryak I, Dugan GO, Bourland JD, Olson JD, et al. Whole thorax irradiation of non-human primates induces persistent nuclear damage and gene expression changes in peripheral blood cells. *PLoS One* 2018;13:1–24. doi: 10.1371/journal.pone.0191402

Haubner F, Ohmann E, Pohl F, Strutz J, Gassner HG. Wound healing after radiation therapy: review of the literature. *Radiat Oncol*. 2012;7(1):162. doi: 10.1186/1748-717X-7-162

Hong MH, Williams H, Jin CH, Pike JW. The inhibitory effect of interleukin-10 on mouse osteoclast formation involves novel tyrosine-phosphorylated proteins. *J Bone Miner Res*. 2000;15(5):911–8. doi: 10.1359/jbmr.2000.15.5.911

Hu W-W, Ward BB, Wang Z, Krebsbach PH. Bone regeneration in defects compromised by radiotherapy. *J Dent Res*. 2010;89(1):77–81. doi: 10.1177/0022034509352151

Intituto Nacional do Câncer (INCA). Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 3. ed. Rio de Janeiro: INCA. 2008.

Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis*. 2002;8(Mar):147–59.

Kielbassa AM, Hinkelbein W, Hellwig E, Meyer-Lückel H. Radiation-related damage to dentition. *Lancet Oncol*. 2006;7(4):326–35. doi: 10.1016/S1470-2045(06)70658-1

Kirstein B, Chambers TJ, Fuller K. Secretion of tartrate-resistant acid phosphatase by osteoclasts correlates with resorptive behavior. *J Cell Biochem*. 2006;98(5):1085–94. doi: 10.1002/jcb.20835

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.

Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor necrosis factor α stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL–RANK interaction. *J Exp Med*. 2000;191(2):275–85.

Kondo H, Searby ND, Mojarrab R, Phillips J, Alwood J, Yumoto K, et al. Total-body irradiation of postpubertal mice with (137)Cs acutely compromises the microarchitecture of cancellous bone and increases osteoclasts. *Radiat Res*. 2009;171(3):283–9. doi: 10.1667/RR1463.1

Lampiasi N, Russo R, Zito F. The alternative faces of macrophage generate osteoclasts. *Biomed Res Int*. 2016;2016(9089610):9. doi: 10.1155/2016/9089610

Lin T, Pajarinen J, Lu L, Nabeshima A, Cordova L, Yao Z, et al. NF- κ B as therapeutic target in inflammatory-associated bone diseases. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2017;107:117–54. doi: 10.1016/bs.apcsb.2016.11.002

Malhotra P, Singh D, Kumar R. In vitro stimulatory effect of N-acetyl tryptophan-glucopyranoside against gamma radiation induced immunosuppression. *Environ Toxicol*. 2017;1–10. doi: 10.1002/tox.22517

Mancha De La Plata M, Gas LN, Dez PM, Muoz-Guerra M, Gonzalez-Garca R, Lee GYC, et al. Osseointegrated implant rehabilitation of irradiated oral cancer patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 2012;70(5):1052–63. doi: 10.1016/j.joms.2011.03.032

Maridas DE, Rendina-Ruedy E, Le PT, Rosen CJ. Isolation, culture, and differentiation of bone marrow stromal cells and osteoclast progenitors from mice. *J Vis Exp*. 2018;(131):e56750. doi:10.3791/56750 (2018).

Moghaddam AS, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili S-A, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization and function in health and disease. *J Cell Physiol*. 2018. doi:10.1002/jcp.26429

Morony S, Capparelli C, Lee R, Shimamoto G, Boone T, Lacey DL, et al. A Chimeric form of osteoprotegerin inhibits hypercalcemia and bone resorption induced by IL-1 β , TNF- α , PTH, PTHrP, and 1,25(OH) $_2$ D $_3$. *J Bone Miner Res*. 1999;14(9):1478–85. doi: 10.1359/jbmr.1999.14.9.1478

Nich C, Goodman SB, Hospital T. The role of macrophages in the biological reaction to wear debris from joint replacements. *J Long Term Eff Med Implant*. 2014;24(4):259–65.

Nourshargh S, Alon R. Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*. 2014;694–707. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.008

Okamoto K, Nakashima T, Shinohara M, Negishi-Koga T, Komatsu N, Terashima A, et al. Osteoimmunology: the conceptual framework unifying the immune and skeletal systems. *Physiol Rev*. 2017;97(4):1295–349, doi: 10.1152/physrev.00036.2016

Okuno E, Yoshimura E. Física das radiações. São Paulo:Oficina de Textos; 2010.

Plowman PN. Portal radiotherapy on the human peripheral. 1983;9(Jan):829–39.

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;15(1):5. doi: 10.1186/1472-6831-15-5

Queiroz TP, Souza FÁ, Okamoto R, Margonar R, Pereira-Filho VA, Garcia IR, et al. Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66(6):1233–40. doi: 10.1016/j.joms.2007.12.037

Quinn R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005;21(6):775–7. doi: 10.1016/j.nut.2005.04.002

Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem*. 2010;285(33):25103–8. doi: 10.1074/jbc.R109.041087

Saraiva GL, Lazaretti-Castro M. Biochemical bone markers in clinical practice. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002;46:72–8. doi: 10.1590/S0004-27302002000100010

Sawajiri M, Mizoe J. Changes in bone volume after irradiation with carbon ions. *Radiat Environ Biophys*. 2003;42(2):101–6. doi: 10.1007/s00411-003-0191-x

Shiratori T, Kyumoto-Nakamura Y, Kukita A, Uehara N, Zhang J, Koda K, et al. IL-1 β Induces pathologically activated osteoclasts bearing extremely high levels of resorbing activity: a possible pathological subpopulation of osteoclasts, accompanied by suppressed expression of Kindlin-3 and Talin-1. *J Immunol*. 2018;200(1):218–28. doi: 10.4049/jimmunol.1602035

- Sonstevold T, Johannessen A, Stuhr L. A rat model of radiation injury in the mandibular area. *Radiat Oncol*. 2015;10:129. doi: 10.1186/s13014-015-0432-6
- 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;81:487–94. doi:10.1016/j.bone.2015.08.022.
- Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140:805–20. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022
- Terheyden H, Lang NP, Bierbaum S, Stadlinger B. Osseointegration-communication of cells. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(10):1127–35. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02327.x
- Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T Cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol*. 2002;20(1):795–823; doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064753.
- Vatner RE, Formenti SC. Myeloid-derived cells in tumors: effects of radiation. *Semin Radiat Oncol*. 2014;25:18–27. doi: 10.1016/j.semradonc.2014.07.008
- Verdonck HWD, 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;19(5):465–8. doi: 10.1111/j.1600-0501.2007.01496.x
- Vissink A, Jansma J, Spijkervet F, Burlage F, Coppes R. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(3):199–212. doi:10.1177/154411130301400305.
- Wang Y, Zhu G, Wang J, Chen J. Irradiation alters the differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep*. 2016;13(1):213–23. doi: 10.3892/mmr.2015.4539
- Wenxi D, Shufang D, Xiaoling Y, Liming Y. Panax notoginseng saponins suppress radiation-induced osteoporosis by regulating bone formation and resorption. *Phytomedicine*; 2015;22(9):813–9. doi:10.1016/j.phymed.2015.05.056
- Wijekoon S, Bwalya E, Fang J, Kim S, Hosoya K, Okumura M. Chronological differential effects of pro-inflammatory cytokines on RANKL-induced osteoclast differentiation of canine bone marrow-derived macrophages. *J Vet Med. Sci*. 2017 Dec 22;79(12):2030-5. doi: 10.1292/jvms.17-0393.
- Williams HJ, Davies AM. The effect of X-rays on bone: a pictorial review. *Eur Radiol* 2006;16(3):619–33. doi: 10.1007/s00330-005-0010-7
- Zou Q, Hong W, Zhou Y, Ding Q, Wang J, Jin W, et al. Bone marrow stem cell dysfunction in radiation-induced abscopal bone loss. *J Orthop Surg Res*. 2016;11(1):3. doi:10.1186/s13018-015-0339-9

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética



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/linhagem/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