



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

**FERNANDA HERRERA COSTA GODOI**

**CORRELAÇÃO ENTRE OS EFEITOS DA  
RADIOTERAPIA SOBRE A ATIVIDADE OSTEOGÊNICA  
DE CÉLULAS MESENQUIMAIS NA INSTALAÇÃO DE  
IMPLANTES**

2018

**FERNANDA HERRERA COSTA GODOI**

**CORRELAÇÃO ENTRE OS EFEITOS DA  
RADIOTERAPIA SOBRE A ATIVIDADE OSTEOGÊNICA  
DE CÉLULAS MESENQUIMAIS NA INSTALAÇÃO DE  
IMPLANTES**

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 Patologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Adj. Estela Kaminagakura Tango

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> 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).

Godoi, Fernanda Herrera Costa

Correlação entre os efeitos da radioterapia sobre a atividade osteogênica de células mesenquimais na instalação de implantes / Fernanda Herrera Costa Godoi. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.

90 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: Estela Kaminagakura Tango

Coorientadora: Renata Falchete Do Prado

1. Osseointegração. 2. Implantes de titânio. 3. Célula mesênquima. 4. Radioterapia. I. Tango, Estela Kaminagakura, 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**

**Prof<sup>a</sup> Adj Estela Kaminagakura Tango (Orientadora)**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof<sup>a</sup> Adj Luana Marotta Reis de Vasconcellos**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

**Prof Dr Eduardo Rodrigues Fregnani**

Hospital Sírio-Libanês

Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Sírio-Libanês (IEP-HSL)

São Paulo

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à Deus, que me dá uma página em branco a cada dia, para que eu possa escrever minha história segundo Sua vontade.*

*À minha mãe, que foi a minha primeira professora, me ensinou a ler e escrever e hoje te dedico meu título de mestre.*

*À minha amada avó, que sem ela simplesmente eu não seria a pessoa que sou hoje.*

*Ao meu marido, que é um exemplo de caráter, honestidade e perseverança e a pessoa mais serena que um dia poderia conhecer.*

## AGRADECIMENTOS

Aqui estou, chegando ao final de mais uma etapa na minha vida acadêmica, não a última, mas talvez a que mais exigiu de mim até agora. Acredito que o que eu mais queria nesses últimos dois anos era escrever os agradecimentos, e encontrei aqui algumas páginas em branco para tentar colocar no papel todas as pessoas que direta ou indiretamente estiveram comigo nesses anos de aprendizado e batalhas.

O mestrado, me proporcionou momentos, amigos, risadas, choros e memórias, que para mim valem muito mais que o título. Foram momentos muito bons, realizadores, no qual eu pude ver que realmente sou capaz de ser e fazer tudo que eu quiser. Amigos, que estarão comigo, não mais em uma convivência diária, mas eternizados. Risadas que fizeram tudo ficar mais leve. Choros, porque não há uma vitória sem obstáculos e memórias que são a única coisa que ninguém pode nos tirar.

Por isso, começo agradecendo à Deus, acredito que não existe um passo sem que Ele não tenha pensado antes, assim, agradeço imensamente a minha vida, por ter capacidade de me locomover, de ver, escutar, falar e aprender e de alguma forma poder retribuir ao próximo, acho que por isso ele me fez querer ser uma profissional de saúde.

Além disso, Ele me deu a oportunidade de nascer e crescer em uma família perfeita nas suas imperfeições, mas que sempre me apoiou e me deu toda a base e incentivo para que eu pudesse estudar por tantos anos. Assim agradeço, com toda minha alma, por ter tido a oportunidade de ter conhecido meus bisavós, ter meus quatro avós vivos e compartilhar com eles a minha conquista.

Mas dentro de uma família tão grande, queria agradecer principalmente, meu avô “Seu Zé Herrera” como Arapongas inteira o conhece, meu avô é a pessoa mais batalhadora que eu conheço, meu maior exemplo de pai de família. Ele foi engraxate, vendedor, caminhoneiro, empresário e construtor nunca desanimando e sempre mostrando que ele daria um jeito, mesmo nas piores crises que nós enfrentamos. Uma pessoa fechada, que hoje tem duas filhas professoras, mas é da neta que ele se enche de orgulho para falar que ele formou uma dentista, e realmente foi ele. Hoje te agradeço vô, por ser o melhor pai do mundo, tenho muito orgulho do senhor.

Minha vózinha Helena agradeço por ter cuidado de mim, por ser o abraço mais carinhoso quando o coração chora.

À minha mãe, não tenho palavras para dizer o quanto eu sou grata, apenas agradecer por ter os ombros mais gigantes que eu conheço, por ter dado sua vida pela nossa.

Ao meu irmão Rodrigo, por ter me ensinado a rezar, acreditar realmente em Deus, e por confiar sempre em mim.

À minha tia Renata, que sempre foi para mim a irmã mais velha e sempre torceu muito pelo meu sucesso profissional. Foi vendo ela crescer e se tornar hoje uma professora universitária que minha vontade de fazer mestrado surgiu.

Ao Renan, meu amigo, companheiro e marido (nessa ordem). Obrigada pelos quase 14 anos da melhor parceria que Deus poderia ter me dado. Tenho muita sorte em ter você, que faz tudo se tornar menos difícil, por me apoiar tanto, e fazer eu querer ir cada vez mais longe em busca dos nossos sonhos. Obrigada por olhar na mesma direção que eu, te amo muito!

Aos meus sogros Lílian e Osmar, meu cunhado Ádrian e minha cunhada Yasmin, que me receberam na família deles de braços abertos. Sei que com eles posso contar sempre.

Aos professores da minha casa UEL. Principalmente aos professores da residência (Glaykon, Cecília, Lígia, Hedelson, José Roberto e Ricardo), que me fizeram cirurgiã buco-maxilo-facial. Foi através deles que conheci a cirurgia já na graduação, e me inspirando na professora Lígia que quis me tornar uma cirurgiã, obrigada professora.

Mas foi o Glaykon que acreditou em mim, abriu um estágio que na época não existia, me ensinou a pesquisar, estudar, preparou meu currículo, me preparaou para enfrentar as provas tão concorridas da residência. Depois de tudo, me deu a técnica, segurando literalmente na minha mão, e a Cecília com todo amor à docência e aos pacientes, que ela mostra com os olhos brilhando toda vez que entra em campo, que me fez amar essa especialidade linda. Hoje vocês são minha referência de honestidade na profissão, agradeço por ter me tornado amiga de vocês, sinto muita saudade.

Aos amigos que Londrina me deu, que mesmo longe sei que posso contar com vocês. Principalmente à Fernanda Boos, pela parceria de gordices, de viagens, de profissão, minha salvação quando as dúvidas batem e uma das maiores incentivadoras, hoje não tão perto mas sei que torce por mim, obrigada amiga. À Bruna Barcelos, que está sempre presente pelos inúmeros áudios semanais no whats, por ter sido meu ombro amigo nos últimos 6 anos, amo você amiga, obrigada por tudo

Ao professor Fábio Ito, por ter apoiado minha decisão de iniciar o mestrado em patologia, por ter intermediado o contato com a professora Estela.

À professora Estela, uma das professoras mais dedicadas e corretas que tive o prazer de conviver, que me mostrou o início de um longo caminho na docência e na pesquisa científica, que teve a idéia desse trabalho e que confiou em mim para executá-lo. Obrigada professora pela sua disponibilidade, ajuda, conselhos e exemplos. Obrigada pela oportunidade

de ter aprendido tanto com a senhora. A senhora realmente ama o que faz e é nítido que torce por seus alunos, afinal onde nós florecermos você vai estar lá.

À professora Luana, que elaborou essa pesquisa junto com a professora Estela. Professora obrigada por quebrar a cabeça comigo tantas vezes durante a execução dessa pesquisa, obrigada por enfrentar o biotério e o laboratório, seja me ajudando quando faltou mão ou me ensinando algum experimento novo. Obrigada pelos inúmeros conselhos e disponibilidade, se todos professores fossem iguais a senhora a educação do Brasil seria outra.

À co-orientadora desse trabalho, professora Renata, obrigada pelo empenho em me ensinar algo tão novo que era a biologia molecular, obrigada pela paciência no meu processo de aprendizagem.

Aos membros da banca que dedicaram seu tempo ao aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório Nacional de Radiação Ionizante do IAEV, por preparar os equipamentos necessários para que as irradiações nos animais de maneira correta, por calcular as doses, por se disponibilizar e nos acompanhar em todos os períodos de irradiação.

Aos técnicos do biotério, por cuidarem tão bem dos animais e terem tanto zelo com nossa pesquisa.

Agradeço à bolsa concedida no âmbito com convênio FAPESP-CAPEP, processo nº 2016/20103-7, no período de 01/01/2017 a 31/12/2017 e à bolsa CAPES, no período de 05/01/2016 a 30/12/2016.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP, por fornecer toda infraestrutura utilizada para realização desse trabalho. Aos outros alunos usuários do LEIC, principalmente a Noala, Lucas e Mariana, obrigada pelas trocas e empréstimos de materiais e pelas conversas durante testes imensos.

À coordenação, professores, técnicos e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, pela grande oportunidade de tamanho crescimento profissional e pessoal, que levarei para o resto de minha vida.

À empresa Enfilis por fornecer os implantes utilizados nessa pesquisa.

À aluna de doutorado Daphne, que me ensinou a fazer a extração e cultivo de células primárias, além de me ensinar os testes de vitalidade celular, obrigada pela disponibilidade e pelo seu caderno de laboratório “top”.

À aluna de pós doutorado Patrícia, por me socorrer em algumas partes do desenvolvimento laboratorial desse trabalho. Obrigada pela sua paciência, por ter dedicado seu tempo a me ensinar cálculos, padronizações e estatística.

À aluna Mariana, que se dispôs a me ensinar os testes ELISA, que me acompanhou por vezes ao laboratório. Que sempre esteve presente organizando o biotério durante as eutanásias, realizando e atualizando inúmeras vezes os cronogramas, me ajudando durante as irradiações dos ratos. E pela companhia durante inúmeros almoços. Obrigada por todo apoio e incentivo Mari, torço muito pelo seu sucesso.

Aos alunos Leonardo e Bruno, pelo apoio e ajuda durante todas as fases de execução dessa pesquisa.

As minha amigas de pós-graduação que estiveram comigo desde o primeiro café na Dona Vilma, Camila e Lígia, obrigada pelas noites de estudos, pelas risada, pelos conselhos, pelos galhos quebrados, pelos almoços e por me apresentarem o ballet. Quero vocês sempre perto meninas!

Ao Victor, Noala, Vivian, Elis, Felipe e Milagros companheiros de salinha, de cantorias, de cafés, risadas e desabafos, meu muito obrigada por terem deixado a pós-graduação mais amena.

À Camila Duarte, aluna de IC que me acompanhou em todos os testes e me ajudou a conduzir uma pesquisa paralela. Obrigada pela ajuda, você é brilhante!

Ao pessoal de Taubaté, que me receberam de portas abertas, Dr Rubens Guimarães, Thammy, Sara, Franciele, Marina e Karen.

*“Escreva uma história linda”*

Milene Rodrigues *“in memoriam”*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>15</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>16</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>22</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Comitê de Ética .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Confeção dos implantes .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3 Procedimento cirúrgico .....</b>	<b>24</b>
<b>3.4 Radioterapia.....</b>	<b>27</b>
<b>3.5 Análise das alterações nos animais.....</b>	<b>31</b>
<b>3.6 Eutanásia .....</b>	<b>31</b>
<b>3.7 Cultura de células mesenquimais e análise da diferenciação celular.....</b>	<b>32</b>
<b>3.8 Avaliação da expressão de genes por qRT-PCR.....</b>	<b>33</b>
<b>3.8.1 Extração de RNA .....</b>	<b>33</b>
<b>3.8.2 Desenho dos Primers .....</b>	<b>34</b>
<b>3.8.3 qRT-PCR.....</b>	<b>36</b>
<b>3.9 Ensaio imunoenzimático - ELISA .....</b>	<b>38</b>
<b>3.10 Análise dos resultados .....</b>	<b>40</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Pâmetros irradiação .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Análise de alterações dos animais.....</b>	<b>41</b>
<b>4.3 Cultura de células mesenquimais e análise da diferenciação celular.....</b>	<b>43</b>

<b>4.4</b>	<b>Avaliação da expressão de genes por qRT-PCR.....</b>	<b>47</b>
<b>4.5</b>	<b>Verificação da eficiência dos primers .....</b>	<b>48</b>
<b>4.6</b>	<b>Análises de qRT-PCR.....</b>	<b>49</b>
<b>4.7</b>	<b>Teste de ELISA .....</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>79</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Implantes de titânio .....	24
Figura 2 - Instalação dos implantes .....	26
Figura 3 - Distribuição dos animais entre os diferentes tratamentos e períodos de eutanásia .....	27
Figura 4 - Lote de 50 pastilhas de TLD-800 inseridas no estojo de acrílico	28
Figura 5 - Equipamento desenvolvido para estabilização dos animais durante a irradiação e padronização da área a ser irradiada com aposição de dosímetros individuais .....	29
Figura 6 - Posicionamento dos animais para irradiação com câmara de ionização e com dosímetros individuais .....	29
Figura 7 - Fluxograma demonstrando estabelecimento de dose equivalente para órgãos e tecidos dos animais .....	30
Figura 8 - Sequência dos procedimentos laboratoriais para extração de RNA .....	34
Figura 9 - Diluição seriada de cDNA na concentração de 1:10.....	37
Figura 10 - Alterações nos animais.....	43
Figura 11- Cultura de células Grupo C, IrI, IrT e IrP - eutanásia de 3 dias..	44
Figura 12 - Cultura de células dos Grupos C, IrI, IrT e IrP – eutanásia de 14 dias .....	45
Figura 13 - Cultura de células dos Grupos C, IrI, IrT e IrP – eutanásia de 49 dias .....	46
Figura 14 - Nódulos de calcificação vistos em microscópio de luz em 100x, corados com vermelho de Alizarina .....	47
Figura 15 - Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, mostrando a integridade do RNA extraído das amostras.....	48
Figura 16 - Análise dos genes de referência, Beta-actina e Gapdh .....	49

Figura 17 - Curvas de amplificação demonstrando o <i>Threshold Cycle</i> .....	50
Figura 18 - Expressão gênica dada em <i>fold change</i> dos genes <i>Alp</i> , <i>Col-1</i> , <i>Int <math>\beta</math>1</i> , <i>Osx</i> , <i>Runx2</i> e <i>Osp</i> nos períodos de 3 dias, 14 dias e 49 dias. ....	53
Figura 19 - Expressão gênica dada em <i>fold change</i> dos genes <i>Osn</i> , <i>Tgf-<math>\beta</math></i> , <i>Bgp</i> nos períodos de 3 dias, 14 dias e 49 dias .....	55
Figura 20 - Expressão gênica dada em <i>fold change</i> dos genes <i>Apo E</i> , <i>PgE2</i> , <i>Il-6</i> e <i>M-csf</i> aos 3 dias, 14 dias e 49 dias.....	57
Figura 21 - Resultado do ELISA em densidade óptica, comparando diferentes períodos dos grupos C, IrI, IrT e IrP .....	58
Figura 22 - Resultado do ELISA em densidade óptica, comparando diferentes períodos dos grupos IrI, IrT e IrP com o controle.....	59
Figura 23 - Resultado do ELISA para <i>Osteocalcina</i> em densidade óptica, comparando diferentes períodos dentro dos grupos IrI, IrT e IrP.....	60
Figura 24 - Resultado do ELISA em densidade óptica, comparando diferentes períodos dos grupos IrI, IrT e IrP com o controle.....	61

Godoi FHC. Análise dos efeitos da radioterapia sobre a atividade osteogênica de células mesenquimais na instalação de implantes [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

## RESUMO

A sobrevivência de pacientes submetidos a tratamentos para câncer de cabeça e pescoço está aumentando e a busca por reabilitação é necessária para promover qualidade de vida. O objetivo deste estudo é avaliar o perfil da expressão gênica de transcritos relacionados na osteogênese e osteoclastogênese em uma cultura primária de células mesenquimais de fêmures de ratos submetidos a radioterapia e colocação de implantes de titânio. Setenta e dois ratos receberam implantes de titânio em ambos os fêmures. Os animais foram divididos em quatro grupos: 1) Grupo controle (C): cirurgia de colocação dos implantes; 2) Implante + irradiação imediata (IrI): cirurgia de implantes e seguido de irradiação imediata; 3) Implante + irradiação tardia (IrT): cirurgia de implantes e irradiação após 4 semanas; 4) Irradiação prévia + implantes (IrP): irradiação e após 4 semanas cirurgia de implantes. A dose de irradiação foi de 30 Gy fracionadas em duas sessões. As eutanásias nos períodos de 3, 14 e 49 dias após o tratamento. As células cultivadas sofreram diferenciação em osteoblastos. A expressão gênica dos genes *Fosfatase alcalina (Alp)*, *Colágeno 1 (Col-1)*, *Integrina  $\beta 1$  (Itg  $\beta$ )*, *Osteocalcina (Bglap)*, *Osteopontina (Osp)*, *Osteonectina (Osn)*, *Sialoproteína Óssea (Bsp)*, *Fator de crescimento transformador ( $Tgf-\beta$ )*, *Osterix (Osx)*, *Fator relacionado ao Runt (Runx2)*, *Fator estimulador de colônias de macrófagos (M-csf)*, *Interleucina -6 (Il-6)*, *Apolipoproteína E (Apo-E)*, *Prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>)*, foram avaliados por qRT-PCR e os resultados validados por ELISA. A expressão mais alta de *Alp* foi encontrada no grupo IrP ( $p=0.0001$ ) e foi subexpressa nos grupos IrI e IrT ( $p<0.0001$  e  $p=0.0041$  respectivamente). Resultados similares foram encontrados nos transcritos de *Itg  $\beta$* , *On*, *Bsp*, *Osx* e *Runx2*. mRNA do *Tgf- $\beta$*  foi hiperexpresso em todos os grupos principalmente aos 49 dias. Depois de 49 dias, os níveis de proteína da *Bglap* e *Il-6* foram correlacionados com a expressão do mRNA. A radioterapia imediata altera a atividade de diferenciação das células mesenquimais dos fêmures de ratos.

Palavra-chave: Osseointegração. Implantes de titânio. Célula mesenquimal. Radioterapia.

Godoi FHC Radiotherapy analysis in the differentiation of mesenchymal cells before implants surgery [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

## ABSTRACT

Prognosis of patient submitted to head and neck cancer treatment has increased and the oral rehabilitation becomes necessary to improve their life quality. The aim of this study was to evaluate the gene expression profile of transcripts related to osteogenesis and osteoclastogenesis in primary culture of mesenchymal cells from rat femurs submitted to radiotherapy and installation of pure titanium implant. Seventy two rats received titanium implants in both femurs. The animals were divided in four groups: 1- Control (C) implant surgery; 2- Implant + immediate irradiation after 24 hours (IrI); 3- Implant + late irradiation after 4 weeks (IrL); 4- Implant + Previous irradiation 4 weeks before surgery (IrP) irradiation. The irradiation dose was 30Gy fractioned in two. The animals were euthanized in day 3, 14 and 49 after surgery. The mesenchymal cells from femurs were extracted and cultivated. The differentiation into osteoblastic cells was verified by calcification nodules formation. The gene expression of Alkaline Phosphatase (Alp), Collagen 1 (Col 1), Integrin  $\beta_1$  (ItgB<sub>1</sub>), Osteocalcin (Bglap), Osteopontin (Osp), Osteonectin (Osn), Bone Sialoprotein (Bsp), Transforming Growth Factor  $\beta$ -type (Tgf- $\beta$ ), Osterix (Osx), Runt-related transcription factor 2 (Runx<sub>2</sub>), Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-csf), Interleukin-6 (IL-6), Apolipoprotein E (ApoE) and Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) were evaluated by qRT-PCR and the results were validated by ELISA test. Higher mRNA of Alp expression was found in IrP group ( $p=0.0001$ ) and it was downregulated in IrI and IrL groups ( $p<0.0001$  and  $p=0.0041$ , respectively). Similar results were found for transcript levels of ItgB<sub>1</sub>, Osn, Bsp, Osx and Runx<sub>2</sub>. mRNA of Tgf- $\beta$  was overexpressed in all groups mainly in 49 days. After 49 days, Osn and Bsp transcripts were downregulated in the 3 groups evaluated. The Bglap and IL-6 protein level was correlated to their mRNA expression. The radiotherapy alters immediately the differentiation and activity of mesenchymal cells from rat femurs; however these cells seem to recover becoming suitable for receiving implants.

**Keywords:** Osseointegration. Titanium implants. Mesenchymal cell. Radioterapy.

## 1 INTRODUÇÃO

A radioterapia em combinação ou não à cirurgia é um arsenal terapêutico frequentemente utilizada no tratamento de pacientes com tumores malignos de cabeça e pescoço, sendo eficaz no tratamento e cuidados paliativos de tumores malignos (Wang et al., 2015). Por vezes, esse tratamento ocasiona defeitos estéticos e funcionais graves, sendo necessário a utilização de implantes osseointegrados para a devolução de função mastigatória, seja pelo uso de próteses dentais ou prótese faciais ancoradas (Mancha de la Plata et al., 2012).

A radioterapia ou radiação ionizante tem sua dose é limitada pela tolerância à radiação dos tecidos sadios circunjacentes, uma vez que a irradiação pode promover efeitos colaterais agudos ou acumulativos nestes tecidos (Sonstevold et al., 2015). Seu efeito terapêutico é atribuído a capacidade de danificar o DNA nuclear das células tumorais, causando morte celular ou dificuldade de multiplicação. O maior desafio do tratamento radioterápico é alcançar as células alvos com dano mínimo aos tecido normais circunjacentes (Thariat et al., 2011).

A radiação ionizante é uma onda eletromagnética, constituída de campos eletromagnéticos 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 de 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 de Câncer, 2008).

Atualmente, com o advento da radioterapia de intensidade modulada (RIM), o planejamento do tratamento pode ser direcionado para

os tecidos alvo, diminuindo as doses de radiação em tecidos saudáveis e os efeitos colaterais, no entanto não os eliminam completamente, além de ser uma tecnologia que não está presente na grande parte dos serviços de oncologia devido ao seu alto custo de operação (Argiris et al., 2008).

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 de Câncer, 2008). A dose total absorvida, para o tratamento de neoplasias malignas pode ser fracionada em doses menores durante o tratamento (Chandra et al., 2015; Russell, Connor, 2014). As toxicidades da radioterapia podem ser divididas em danos imediatos e crônicos. Os efeitos colaterais crônicos torna-se um evidente problema com o aumento da sobrevivência dos pacientes, como a osteorradionecrose (Ruggiero et al., 2006)

O tecido ósseo é um dos tecidos normais a serem irradiados e está sujeito aos efeitos deletérios da radiação ionizante (Hu et al., 2010; Wang et al., 2015), sendo que a injúria causada no tecido ósseo varia desde osteopenia até osteoradionecrose (Williams, Davies, 2006). Os tumores de cabeça e pescoço apresentam uma sobrevivência de 57% em 5 anos (Oral Cancer Foundation, 2012) e estes pacientes geralmente são submetidos a radioterapia durante o tratamento (Mancha de la Plata et al., 2012). Sabe-se que o osso irradiado tem a regeneração comprometida devido à redução da atividade celular, do suprimento vascular e da oxigenação local (Williams, Davies, 2006). As principais alterações dos efeitos da radiação são em osteoblastos, resultando na alteração da capacidade de formação de matriz óssea (Williams, Davies, 2006).

A osteogênese é um processo altamente regulado em um osso normalmente vascularizado (Zhang et al., 2012). A formação óssea depende de muitos fatores correlacionados como células progenitoras de

osteoblastos derivadas de células mesenquimais oriundas da medula óssea (Bressan et al., 2013).

O uso de próteses sobre implantes tem permitido a substituição de dentes perdidos e de estruturas alveolares ressecadas, bem como o apoio dos lábios e a melhoria estética. No entanto, a reabilitação com implantes dentários, ainda é um desafio quando se trata de osso irradiado (Pompa et al., 2015), já que o sucesso da osseointegração dos implantes está associado com a saúde do tecido peri-implantar (Faggion et al., 2013), além das propriedades físico-química do tecido ósseo neoformado e a capacidade de formação da matriz extra-celular, são determinantes na biomecânica da osseointegração (Mendonça et al., 2011).

A radioterapia promove efeitos prejudiciais no tecido ósseo (Chandra et al., 2015; Hu et al., 2010), levando a uma menor capacidade de cicatrização (Pompa et al., 2015) pois o dano ósseo inclui a perda da atividade funcional dos osteoblastos (Chandra et al., 2015) formação de uma maior quantidade de tecido adiposo no osso medular e diminuição da microvascularização (Chandra et al., 2014; Williams, Davies, 2006).

Entretanto, segundo alguns estudos a densidade mineral parece retornar à normalidade, por meio da remodelação óssea constante (Brasseur et al., 2006; Verdonck et al., 2008; Pompa et al., 2015) permitindo que ocorra a reabilitação por meio de implantes osseointegrados.

As células mesenquimais são fundamentais para a recuperação óssea após irradiação, já que são capazes de se autorregenerar e se diferenciar em vários tecidos especializados, pois elas exibem um alta taxa proliferativa e elevado potencial de diferenciação. São responsáveis por manter a homeostase entre osteogênese e adipogênese sob condições fisiológicas, mas há evidências que a irradiação pode alterar a diferenciação entre osteoblastos e adipócitos, uma vez que elas provêm da mesma origem celular (Rodríguez et al., 2008). Este potencial das células mesenquimais

em reparar o dano resultante da radiação ionizante e repovoar o compartimento medular é um dos sinais observados nos pacientes irradiados para verificar a tolerância a radioterapia (Nicolay et al., 2015). Além disso, no processo de neoformação óssea pós cirurgia de instalação de implantes, as linhagens de células osteoblásticas e não osteoblásticas, participam ativamente da osseointegração (Bressan et al., 2013).

Tendo em vista que a interação das células sobre a superfície dos implantes é iniciada pela adesão celular, proteínas como a integrina são importantes para a adesão celular ao titânio (Anselme, Bigerelle, 2014), além da expressão coordenada de fatores de crescimento como Fator transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), proteínas morfogenéticas (BMPs) e transcrição como Fatores de transcrição relacionados com Runt (Runx2), Osterix e citocinas como a Inteleucina - 6 (Il-6) (Wang et al., 2016). Os fatores de crescimento iniciam a casacata onde os fatores de transcrição são ativados, ou seja, a expressão gênica desses fatores influenciam funções como a mitose, síntese de matriz e diferenciação tecidual, (Oryan et al., 2015 ).

Estudos *in vitro* realizados com linhagens de células mesenquimais (Dare et al., 1997; Chandra et al., 2015; Wang et al., 2015), utilizando marcadores como *Runx2*, *Fosfatase Alcalina (Alp)*, *Osteocalcina (Bglap)*, genes associados a adiponeogênese e *Receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (Ppar-Y)* (apoptose) foram avaliados por RT-PCR (reverse transcriptase-polimerase chain reaction), e a expressão dos níveis de proteínas como *Runx2*, *Alp* e *Ppar-Y* foram mensurados pela técnica de Western blotting, demonstraram que há uma influência negativa da irradiação na osteogênese devido a menor atividade e diferenciação celular. Adicionalmente, outros autores verificaram em linhagem celular osteoblástica (OCY454) e em cultura de células primárias extraídas da calvária de ratos, que a irradiação *in vitro* causa danos ao DNA celular (Chandra et al., 2015).

Os fatores de transcrição como Runx-2 e Osterix são essenciais para a diferenciação de osteoblasto e na formação óssea, sendo que o Runx-2 é responsável pela fase pré-osteoblástica, pois ativa genes específicos para a maturação de osteoblastos como Osteopontina, Colágeno tipo 1, Osteocalcina e fosfatase alcalina (Wittkowske et al., 2016). A expressão do Osterix também está intimamente relacionada com o Runx-2, porém quando expressa ativa genes responsáveis pela fase tardia da osteogênese, e apresenta uma função essencial na homeostase óssea (Sinha, Zhou, 2013).

Uma vez que a sobrevida aumenta, os pacientes buscam melhora na qualidade de vida e almejam reabilitar-se. Nesse contexto, o uso de implantes osseointegrados torna-se uma escolha na reabilitação bucal, tanto para o restabelecimento da função mastigatória quando para correção de deformidades na região maxilo-facial, devolvendo ao paciente melhorias também na fala, estética, conforto e qualidade de vida (Nooh, 2013).

Estudos, que visam identificar os possíveis genes envolvidos no processo de diferenciação e atividade osteoblástica em osso irradiado, podem contribuir para indicarmos o melhor período pós-radioterapia (RxT) para instalação de implantes dentários; além de manejá-los adequadamente quando previamente instalados ao tratamento radioterápico contribuindo assim, para melhorar a qualidade de vida dos pacientes oncológicos.

## 2 PROPOSIÇÃO

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil da expressão gênica de transcritos relacionados à osteogênese e osteoclastogênese em cultura primária de células mesenquimais provenientes de fêmures de ratos submetidos à radioterapia e instalação de implantes rosqueáveis de titânio.

### 2.2 Objetivos específicos

- Analisar a atividade osteoblástica através de transcritos dos genes representativos da fase inicial da osteogênese tais como: *Fatores de transcrição relacionados com Runt, Osterix, Fosfatase alcalina, Colágeno 1, Integrina  $\beta 1$  e Osteopontina*, após a instalação de implantes e radioterapia;
- E também os genes representativos da fase tardia da osteogênese: Fator transformador  $\beta$ , Osteocalcina, Osteonectina e Sialoproteína óssea; e osteoclastogênese: Fator estimulador de colônias de Macrófagos, Prostaglandina E2, Interleucina-6 e Apolipo proteína E;
- Validar os resultados encontrados por meio do teste imunoenzimático (ELISA) de um gene relacionado à osteogênese e um relacionado à osteoclastogênese.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Comitê de Ética**

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/Unesp nº 003/2016 foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Foi contemplado com auxílio regular FAPESP (16/20103-7).

#### **3.2 Confeção dos implantes**

Os implantes rosqueáveis cilíndricos de titânio foram confeccionados e cedidos pela empresa Emfils Industria e Comércio situada em Itu/SP, especificamente para este projeto, sem conflitos de interesse. A medida final destes implantes foi de 2,5 mm de diâmetro por 6 mm de comprimento, com conexão para chave 1.2, análogo ao comercial como mostrado na figura 1.

Figura 1 - Implantes de titânio



Legenda: Implantes confeccionados em liga de titânio nas especificações de 3,5mm de diâmetro e 5mm de comprimento.

Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.3 Procedimento cirúrgico

Setenta e dois ratos com 90 dias e pesando aproximadamente 300g, foram usados neste estudo. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista (Unesp), situado em Botucatu e permaneceram durante o experimento no Biotério do ICT/UNESP em gaiolas (n=6) onde receberam água e ração *ad libitum*. O ambiente foi cuidadosamente monitorado para manter a temperatura em torno de 20°C e a umidade mantida em 55%.

Após 30 dias de adaptação ao ambiente, com ciclos diários alternando 12 h correspondentes ao período de luz e ao período noturno, foi iniciado este experimento. Todos os 72 ratos foram submetidos à cirurgia para instalação de implantes em seus fêmures, previamente ou após à

radioterapia, sendo subdivididos nos seguintes grupos demonstrados no quadro abaixo.

Quadro 1- Distribuição dos grupos

<b>Grupos</b>	<b>Descrição</b>
C	Sem irradiação, apenas cirurgia
IrI	Implante + Irradiação imediatamente após (24 h)
IrL	Implante + Irradiação após 4 semanas
IrP	Irradiação 4 semanas antes cirurgia + Implante

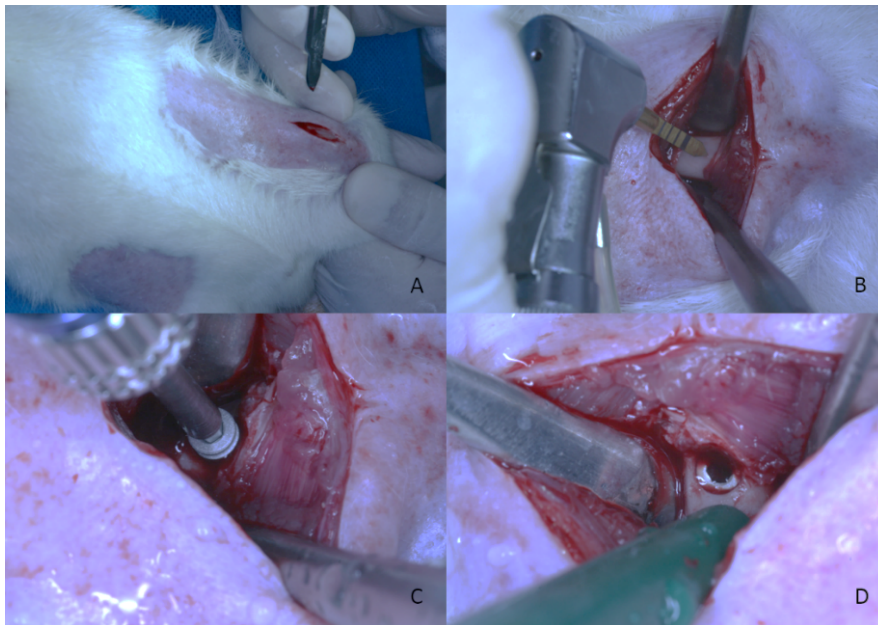
Fonte: Elaborado pela autora.

Os períodos de eutanásia e de irradiação foram determinados baseado em estudos prévios que correlacionaram a idade dos ratos com o homem (Quinn, 2005).

Os procedimentos cirúrgicos para a colocação dos implantes nos fêmures direito e esquerdo foram realizados de acordo com Vasconcellos et al. (2014), como observado na figura 2. A região cirúrgica foi submetida a tricotomia e assepsia local, a incisão na região femural com deslocamento do tecido muscular e exposição óssea para perfuramento, o qual foi realizado com sequências de brocas lança e 2,0 mm, para a instalação dos implantes rosqueados com auxílio de uma chave manual.

Após as cirurgias, todos os animais receberam uma injeção subcutânea com 0,1 mg/kg de buprenorefrina como analgésico.

Figura 2 - Instalação dos implantes

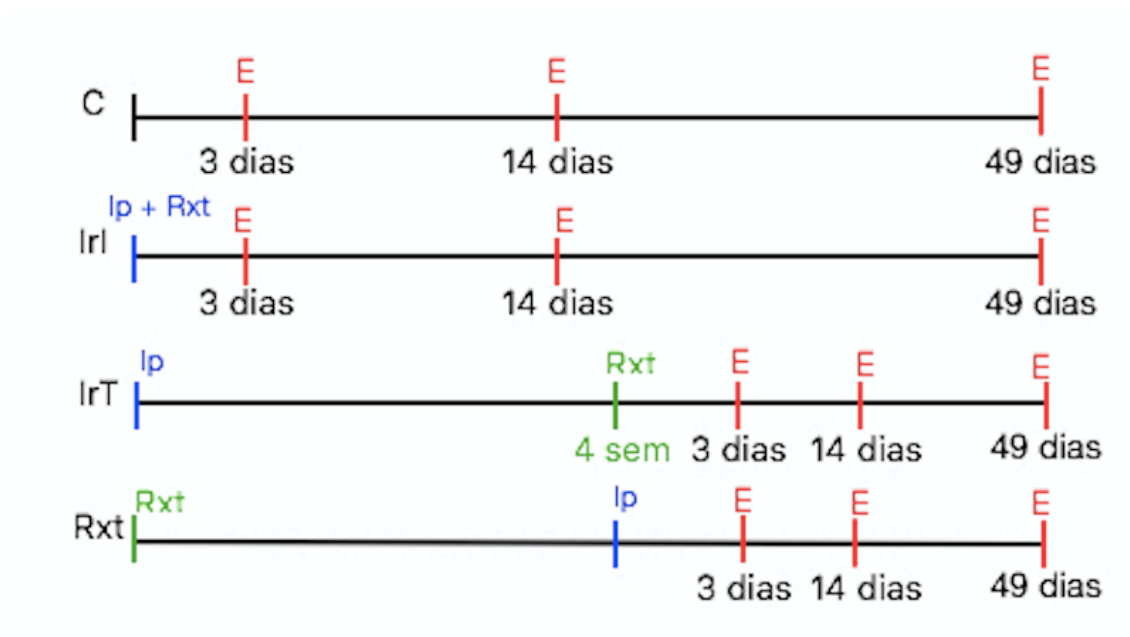


Legenda: (A) Tricotomia em fêmures bilateral para incisão em pele; (B) Perfuração com broca lança e 2,0 mm; (C) Instalação de implante com auxílio de chave manual; (D) Implante instalado.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após os procedimentos, os animais foram colocados nas gaiolas novamente com n=6 e monitorados até o prazo da eutanásia de 3, 14 e 49 dias (Figura 3).

Figura 3 - Distribuição dos animais entre os diferentes tratamentos e períodos de eutanásia



Legenda : C=Controle; E= eutanásia; Ip= implante; Irl= irradiação imediata; IrT= irradiação tardia; IrP= irradiação prévia  
 Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.4 Radioterapia

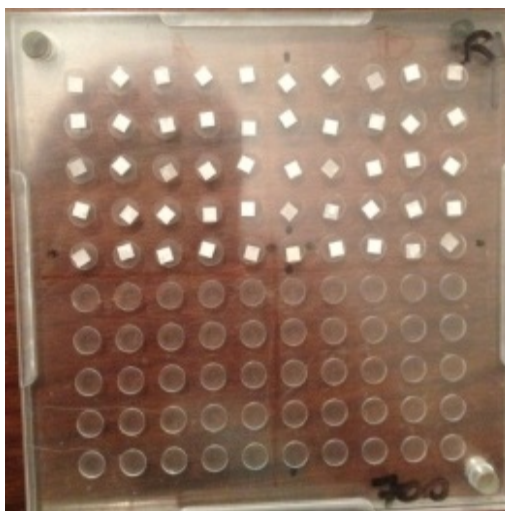
As irradiações visaram simular um tratamento radioterápico de dose máxima em humanos correspondente a 70 Gy. Para monitoramento da radiação incidente durante o procedimento foi utilizado um lote do dosímetro, TLD-800 (*lithium borate manganese* Li<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>:Mn), da Thermo Scientific Inc.) demonstrado na figura 4, que foi utilizado pelo Laboratório de Dosimetria Aeroespacial do IEAv (LDA) para dosimetria das irradiações realizadas no feixe gama de <sup>60</sup>Co, produzidas pelo irradiador de teleterapia Eldorado 78 da *Atomic Energy of Canadian Limited*, situado no

Laboratório de Radiação Ionizante do IEAv (LRI). Este dosímetro responde linearmente em um longo intervalo de dose, desde 0,5 mGy até 100 kGy.

Os animais foram anestesiados e posicionados nos imobilizadores previamente desenvolvidos para reprodutibilidade do local de irradiação (Figura 5). Os dosímetros foram posicionados e os fêmures direito e esquerdo foram irradiados.

Como métodos alternativos e complementares dos estudos foram utilizados em conjunto uma câmara de ionização (Figura 6) e um eletrômetro, ambos calibrados no Laboratório Nacional de Metrologia das Radiações Ionizantes, do IRD (Instituto de Radioproteção e Dosimetria). O modelo do eletrômetro utilizado foi o 35040 *Advanced Therapy Dosimeter* da Fluke, esse equipamento converte a carga coletada em dose, a carga é coletada através de uma câmara de Ionização, *Farmer Type Chamber* FC65-G da Scanditronix, utilizado com capa de equilíbrio eletrônico para obter valores de dose com maior acurácia. A dose obtida no ar foi convertida em dose no tecido através da Teoria de Cavidade.

Figura 4 - Lote de 50 pastilhas de TLD-800 inseridas no estojo de acrílico



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 5 - Equipamento desenvolvido para estabilização dos animais durante a irradiação e padronização da área a ser irradiada com aposição de dosímetros individuais



Fonte: Elaborada pela autora.

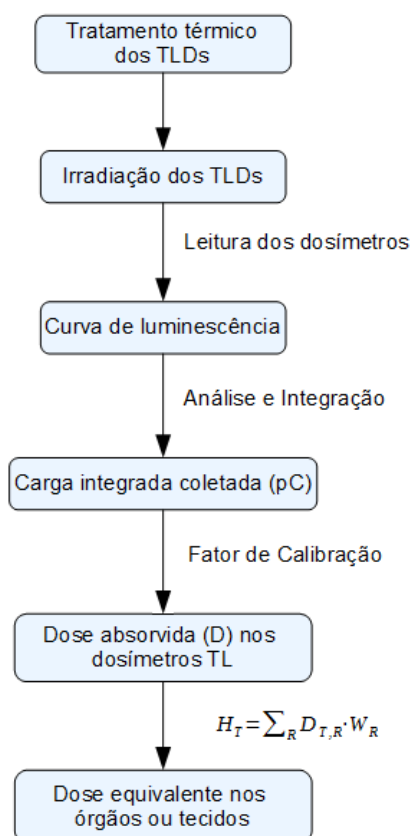
Figura 6 - Posicionamento dos animais para irradiação com câmara de ionização e com dosímetros individuais



Fonte: Elaborada pela autora.

As irradiações foram realizadas em duas etapas, de acordo com o estabelecido por (Da Cunha et al., 2007), dentro de 24 h, com a dose total acumulada de 37,79 Rad/h em uma distância da fonte aos espécimes de 0,48 metros, resultando em uma dose acumulada de 3000 Rad (3 krad = 30 Gy). Para obtenção dos valores de doses durante o procedimento foi necessário o estabelecimento de uma metodologia para dosimetria termoluminescente que é baseada nas seguintes atividades descritas no fluxograma a seguir (Figura 7).

Figura 7 - Fluxograma demonstrando estabelecimento de dose equivalente para órgãos e tecidos dos animais



Fonte: Elaborada pela autora.

### **3.5 Análise das alterações nos animais**

Os animais foram cuidadosamente monitorados quanto a alterações clínicas como hábitos alimentares, perda de pêlos, infecção das feridas cirúrgicas e perda de peso. Esse procedimento teve como finalidade verificar se o tratamento interferiu no desenvolvimento dos animais. No início do experimento e imediatamente antes da eutanásia, todos os animais foram pesados em balança semianalítica. As alterações de peso foram verificadas em porcentagem utilizando a fórmula: Alterações no peso: (%) =  $(\text{peso final} - \text{peso inicial}) / \text{peso inicial} \times 100$ . Perda de peso menor que 20% do peso corpóreo foram consideradas aceitáveis, para isso foram calculadas as médias e desvio padrão para cada períodos de todos os grupos (Sonstevold et al., 2015).

### **3.6 Eutanásia**

As eutanásias foram realizadas por meio de sobredoses de anestésicos contendo uma mistura de 0,85mL de Xilazina e 0,5mL de Ketamina, segundo Vasconcellos et al. (2014).

### **3.7 Cultura de células mesenquimais e análise da diferenciação celular**

Todos os passos referentes à cultura celular foram realizados no Laboratório de Estudo Interdisciplinar em Células (LEIC) do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia – UNESP de São José dos Campos – SP.

Após a limpeza dos fêmures, estes foram colocados em solução de transporte contendo meio essencial mínimo, modificação alfa com L-glutamin ( $\alpha$ -MEM – Gibco) e gentamicina (Gibco, Grand Island, Nova Iorque). No fluxo laminar, a parte do fêmur com o implante instalado foi removido por meio de um disco diamantado em motor elétrico, sob irrigação constante, para obtenção de sobrenadante, sendo o fragmento distal utilizado para a culturas primárias de osteoblastos. Foram isoladas a partir das células obtidas pela lavagem da medula óssea dos fêmures, utilizando meio de cultura osteogênico de acordo com Rosa et al. (2009). Posteriormente estas células foram distribuídas em frascos para cultura de 75 cm<sup>2</sup> de área (Nunc, Dinamarca) e incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> (Incubadora Ultrasafe HF 212 UV). Para cada garrafa, representando um grupo, foram acrescentadas as células da medula de 6 fragmentos distais de fêmures, sendo uma garrafa contendo todas as células dos fragmentos dos fêmures direitos e outra com os esquerdos.

O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss – Axiovert 40C, Germany). Foram cultivadas duas garrafas por grupo, sendo que as células de uma garrafa foram plaqueadas e utilizadas em testes para avaliação da viabilidade celular, analisadas em outro experimento, além da utilização do sobrenadante de cada poço em teste ELISA. Já a outra garrafa, após a confluência, o meio de cultura foi

removido, e adicionado 3 mL do Trizol Reagent (Ambion®, Life Technologies Corporation, Van Allen Way, Carlsbad, California, USA). As células foram lisadas e o conteúdo coletado armazenados em 3 criotubos por garrafa em freezer -80°C conforme orientações do fabricante para posterior extração do RNA.

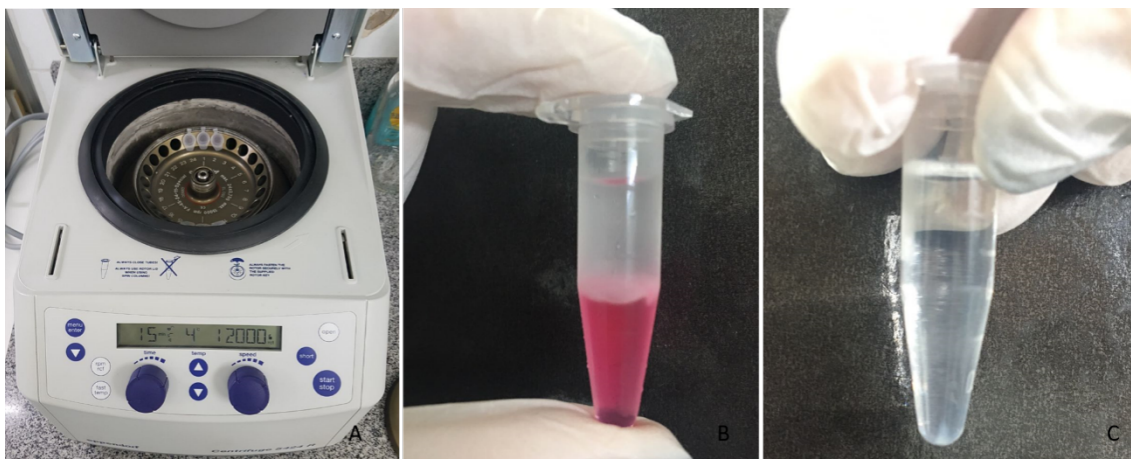
### **3.8 Avaliação da expressão de genes por qRT-PCR**

#### **3.8.1 Extração de RNA**

Para a extração do RNA total destas células foi utilizado 1 mL de Trizol Reagent (Ambion®, Life Technologies Corporation, Van Allen Way, Carlsbad, California, USA), e o protocolo foi realizado conforme as instruções do fabricante. O RNA foi armazenado a -80°C. As concentrações e purzas das amostras de RNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc. - Wilmington, DE 19810, USA). Em seguida a qualidade e integridade do RNA foram avaliadas em gel de agarose (Ultrapure Agarose Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a 1X TBE por eletroforese, corado com brometo de etídeo (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Foi misturado à 1µL de 10X DNase I Reaction Buffer, 1 µL DNase I, Amp Grade, 1U/µL e água DEPC para volume de 10 µL. Incubados por 15 min. à temperatura ambiente e a DNase inativada com 1 µL de EDTA 25 mM, aquecidos por 10 min. à 65°C para seguir para a confecção do cDNA, como demonstrado na figura 8.

Figura 8 - Sequência dos procedimentos laboratoriais para extração de RNA



Legenda: (A) Centrifugação para separação em fases; (B) Aspecto trifásico da solução; (C) Pellet constituído pelo RNA total extraído das amostras.

Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.8.2 Desenho dos Primers

As sequencias de pares de bases foram desenhadas e analisadas nas células dos grupos C, IrI, IrT e IrP nos períodos de 3, 14 e 49 dias após a cultura primária por aproximadamente 7 dias, quando observadas confluências das células, foi avaliada a expressão gênica dos seguintes produtos de genes relacionados a osteogênese inicial, osteogênese tardia e osteoclastogênese, sendo eles respectivamente para genes referentes a osteogênese inicial: *Fator de transcrição relacionados ao Runt 2 (Runx-2)*, *Osterix (Osx)*, *Fosfatase alcalina (Alp)*, *Colágeno 1 (Col-1)*, *Integrina  $\beta 1$  (Int  $\beta 1$ )*, *Osteopontina (Osp)*; Para genes relacionados com o aparecimento tardio na osteogênese: *Osteocalcina (Bglap)*, *Fator transformador -  $\beta$  (Tgf- $\beta$ )*, *Osteonectina (Osn)*, *Sialoproteína Óssea (Bsp)*; E relacionados com a osteoclastogênese tem-se o *Fator estimulador de colônias de macrófagos*

(*M-csf*), *Interleucina -6 (Il-6)*, *Apolipoproteína E (Apo E)*, *Prostaglandina E2 (Pg E2)*. Como genes endógenos foram testados a *Beta-Actina* e o *Gapdh*. Os primers seguem descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores

Gene	Oligonucleotídeos iniciadores: sense (F); antisense (R)	TM (°C)	TF	FASTA PUBMED
<i>Beta-actina</i>	F GCAGGAGTACGATGAGTCCG R ACGCAGCTCAGTAACAGTCC	59,97 60,04	74	NM_031144.3
<i>Fosfatase alcalina</i>	F TATGTCTGGAACCGCACTGAAC R CACTAGCAAGAAGAAGCCTTTGGG	60,61 61,87	192	XM_006239136.3
<i>Osteocalcina</i>	F GAGGGCAGTAAGGTGGTGAA R CGTCCTGGAAGCCAATGTG	59,31 58,83	154	NM_013414.1
<i>Osteopontina</i>	F ATCTGATGAGTCCTTCACTG R GGGATACTGTTTCATCAGAAA	54,18 52,28	151	NM_012881.2
<i>Sialoproteína óssea II</i>	F CTACTTTTATCCTCCTCTGAAACGGTT R GCTAGCGGTTACCCCTGAGA	60,79 61,04	202	NM_012587.2
<i>Osteonectina</i>	F CTCCCATTTGGCGAGTTTG R TGTAGTCCAGGTGGAGCTTGTG	56,08 61,93	129	NM_012656.1
<i>Colágeno-1</i>	F CCAACGAGATCGAGCTCAGG R GACTGTCTTGCCCCAAGTTCC	60,25 61,15	101	NM_053304.1
<i>Runx2</i>	F GCCGGAATGATGAGAACTA R GGACCGTCCACTGTCACTTT	57,09 59,89	200	NM_001278483.1
<i>Osterix</i>	F CAAGAGTCGGATTCTAGGATTGGAT R CAAACTTGCTGCAGGCTGCT	59,99 62,08	208	NM_001037632.1
<i>Tfg-β</i>	F GGACTCTCCACCTGCAAGAC R CTCTGCAGGCGCAGCTCTG	60,04 63,64	63	NM_021578.2
<i>Mcs-f</i>	F CCGACACAGGCTCTTCTATTTCAG R CAGCCAGCAAGACTAGGATGA	60,74 59,72	84	XM_008761428.2
<i>Integrina β1</i>	F GGAGAAAACCTGTGATGCCATACAT R TGGGCTGGTACAGTTTGTTCAT	59,36 60,36	85	NM_017022.2
<i>Interleucina 6</i>	F TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC R TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC	62,22 62,22	79	NM_012589.2
<i>Apolipoproteína E</i>	F TGTTGGTCCCATTGCTGACAGGAT R TGGTGTTTACCTCGTTGCGGTA	64,43 64,33	382	NM_001270681.1
<i>Prostaglandina E2</i>	F CATGATCTACCCTCCCCACG R CAGACCAAAGACTTCTGCCC	60,00 57,14	67	NM_017232.3
<i>Gapdh</i>	F GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG R ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA	61,77 61,44	143	NM_017008.4

Legenda: Sequência das bases, TM temperatura de melting, TF tamanho esperado do amplificado e referência.

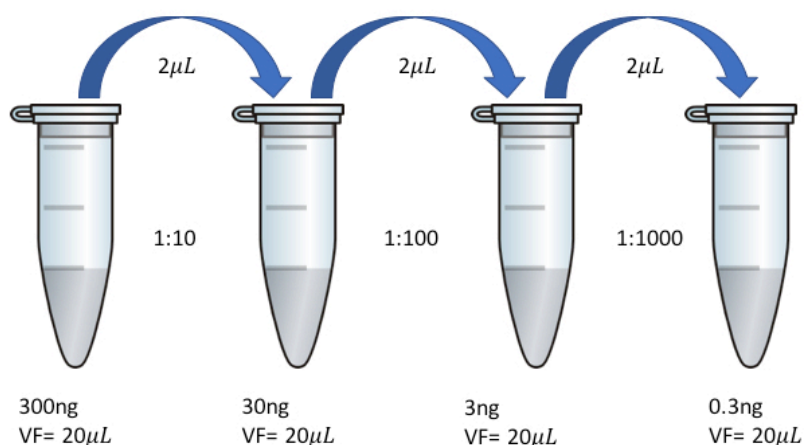
Fonte: Elaborado pela autora.

A síntese de cDNA foi realizada com reações de transcrição reversa seguindo instruções do fabricante do Kit comercial SuperScript III, First-Strand Synthesis Supermix (Invitrogen Life Technologies Corporation-Van Allen Way, Carlsbad, California, USA). Para a transcrição reversa foi adicionado em um microtubo os seguintes reagentes: 1µL de random hexamers 50: ng/µL, 1. µL de annealing buffer, solução de RNA e água DPEC para completar volume de 8 µL. Incubação por 65°C por 5 min. e imediata incubação em gelo por 1 min. Então será adicionado 10µL de 2X First-Strand Reaction Mix e 2a µL de SuperScript III/RNaseOUT Enzyme Mix, homogenização em vórtex, rapidamente centrifugação e incubação por 5 min 25°C e 50 min. à 50°C. Para finalizar, ocorreu incubação à 85°C por 5min. e armazenamento do cDNA a -20°C.

### **3.8.3 qRT-PCR**

Foi realizado a análise da eficiência da reação de PCR, através do slope da reação da curva padrão e da curva de dissociação dos primers testados. A valiação de cada primer foi feita afim de calcular a sua eficiência de amplificação. Assim foram preparadas diluição seriada do cDNA 1:10. Com a concentração dos primers fixa, variou-se a concentração de cDNA por meio de uma diluição seriada em 1:10, como demonstrado na figura com a massa inicial de 300 ng. Cada diluição foi realizada em triplicata e testada em cada primer, e a concentração padronizada em 300 nM. A concentração ideal dos primers foi otimizada em 3000 ng para todas as amostras pois obteve a melhor amplificação.

Figura 9 - Diluição seriada de cDNA na concentração de 1:10



Fonte: Elaborada pela autora

O cDNA foi utilizado para o RT-PCR com o sistema de detecção Step One Plus Time PCR System (Thermofisher Scientific Inc Waltham, Massachusetts, EUA) utilizando o sistema Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen Life Technologies Corporation-Van Allen Way, Carlsbad, California, USA). Os primers específicos e cDNAs transcritos serão utilizados em cada reação. Cada espécime foi avaliado em triplicata.

Foi realizado a padronização das condições da qRT-PCR baseadas nas sugestões do fabricante do SYBR Green (Kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMIX –UDG – Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) e nas temperaturas de melting dos primers com uma amostra calibrador. As amostras serão submetidas à reação em cadeia da polimerase em tempo real para o gene endógeno proposto *β-actina* e *Gapdh* para selecionar aquele com menor variação de expressão para a realização da quantificação relativa.

A reação consistiu em uma placa de 96 poços, foi colocado 10  $\mu\text{L}$  de SuperMix platinum SYBR Green, 1  $\mu\text{L}$  de ROX (corante), 1  $\mu\text{L}$  de primer forward e 1  $\mu\text{L}$  de primer reverse (300 nM), 3  $\mu\text{L}$  de cDNA (diluição 1:10) e água DEPEC para a concentração final de 20  $\mu\text{L}$ . Para o controle negativo adicionou-se todos os reagentes excluindo o cDNA. A placa foi vedada com adesivo óptico (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

A placa então foi colocada no aparelho StepOnePlus System (Applied biosystems, Framingham, MA, USA) com os seguintes parâmetros: 2 min, seguido pela desnaturação inicial a 95°C por 2 min e mais 40 ciclos alternando 95°C por 15 s e 60°C por 40 s. Após o término as amostras são submetidas a análise da curva de dissociação (Melt), para conferir a ausência de curva bimodal ou sinal anormal de amplificação.

Os valores de Ct (*Threshold Cycle*) das amostras serão utilizados nos cálculos a seguir (Livak, 2001). A média das triplicatas biológicas de cada gene será calculada para todas as amostras e será subtraído o Ct do gene constitutivo:  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{gene}) - \text{Ct}(\text{constitutivo})$ . O  $\Delta\text{Ct}$  será subtraído da amostra calibrador resultando em  $\Delta\Delta\text{Ct}$ :  $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} - \Delta\text{Ct}(\text{calibrador})$ . Então a quantificação relativa (RQ - Relative Quantification) será calculada para cada gene em cada amostra conforme a equação:  $\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

### 3.9 Ensaio imunoenzimático - ELISA

Os níveis das proteínas presentes no meio de cultura de todas as células foram mensurados de acordo com os períodos da eutanásia, utilizando o método imunoenzimático (ELISA). Para a Interleucina-6 foram utilizadas, placas de microtitulação de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpos (IL-6) de captura 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  $\mu$ L de tampão de bloqueio (PBS com 1% de soro albumina bovina) por 1 h a temperatura ambiente. Após, foram lavadas e receberam 100  $\mu$ L dos sobrenadantes do sangue e 100  $\mu$ L dos padrões das proteínas, que representará a curva-padrão. Os testes foram realizados em duplicata e as placas foram mantidas 2 h à temperatura ambiente. A seguir, as placas foram lavadas e serão acrescentados 100  $\mu$ L de anticorpos primários de detecção de rato marcados com biotina. Após 2 h, foi acrescentada estreptoavidina (100  $\mu$ L/poço) e as placas mantidas por 20 min cobertas com papel alumínio para evitar luz direta. Após lavagem, a reação é revelada com 100  $\mu$ L/poço de solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio. Após 20 min, foram adicionados em cada poço 50  $\mu$ L de solução stop (ácido sulfúrico 2 N) e as densidades ópticas (DO) lidas no leitor de microplacas com comprimento de onda de 450 nm.

Para a Osteocalcina, foi utilizado o kit OC/BGP (MyBiosource, San Diego, CA), adicionando a solução padrão nas duas primeiras fileiras, deixando por 90 minuto a 37°C, após removido sem lavar, foi acrescentado 100 $\mu$ L da solução Biotinylated Detection (diluído 1:100), por 1 a 37°C. Após o descarte foi acrescentado 300 $\mu$ L de tampão de lavagem, por 3 vezes consecutivas. Adicionado HRP Conjugate, por 30 min a 37°C, descarte e lavagem novamente por 3 vezes. Foi adicionado 90  $\mu$ L do substrato reagente, incubado por 15 min a 37°C sob proteção da luz. Após os 30 min, foi utilizado 50 $\mu$ L da solução de parada.

A densidade óptica de cada poço foi realizada a 450nm.

Após obtenção das densidades ópticas, os níveis das proteínas (pg/mL) presentes nos sobrenadantes das culturas de osteoblastos foram determinados utilizando o programa GraphPad Prism 7.03.

### **3.10 Análise dos resultados**

Os dados foram expressos pela média e desvio padrão dos resultados de cada grupo experimental e foram estatisticamente analisados, inicialmente por meio do teste de normalidade visando a aplicação do teste estatístico t para avaliar diferenças entre dois grupos, para cada gene em diferentes períodos, e o teste ANOVA para avaliar os resultados dos testes ELISA comparando todos os grupos entre si.

O teste de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar as expressões gênicas de genes dependentes entre si.

Todos os testes foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 7.03 (GraphPad Software INC, La Jolla, CA, USA). O nível de significância adotado foi de 5%.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Pâmetros irradiação

A irradiação seguiu obteve alguns resultados os quais utilizamos como parâmetros para calcular médias de dose as quais os animais foram submetidos, como demonstrado no quadro 3.

Quadro 3 - Parâmetros utilizados na irradiação

<b>Tempo dosagem</b>	1h18min
<b>Intervalo</b>	24 hs
<b>Local dosímetro</b>	lateral fêmur esquerdo e direito
<b>Distância da fonte</b>	60 cm
<b>Média das doses</b>	12,256 Gy
<b>Dose tecido</b>	31,905 Gy
<b>Dose osso</b>	30,591 Gy
<b>Desvio padrão</b>	0,465663494

Fonte: Elaborado pela autora.

### 4.2 Análise de alterações dos animais

Durante todo o estudo foram operados 72 animais, sendo que 13 deles foram perdidos (18%), 6 decorrentes de morte no pós operatório da instalação dos implantes e outros 7 por efeitos da irradiação, sendo que o n de cada grupo, ao final do esicada e as amostras se most 3 tudo foi de 18 animais para o contole, 18 animais para o grupo IrI - no qual os animais

perdidos foram substituídos, 15 foram eficientes, como indicado nas figuras apresentadas animais para o grupo IrT - no qual perdemos 6 ratos sendo três foram substituídos e 17 animais no grupo IrP – no qual 4 ratos morreram e três foram substituídos.

Os animais de cada grupo foram pesados em balança analítica com o intuito de realizar a observação da interferência do tratamento. Considerando a média de peso inicial prévia aos tratamentos de 300 g, foi calculado a média e o desvio padrão de cada grupo, apresentado na Tabela , na qual não foram evidenciadas alterações de pesos expressivas.

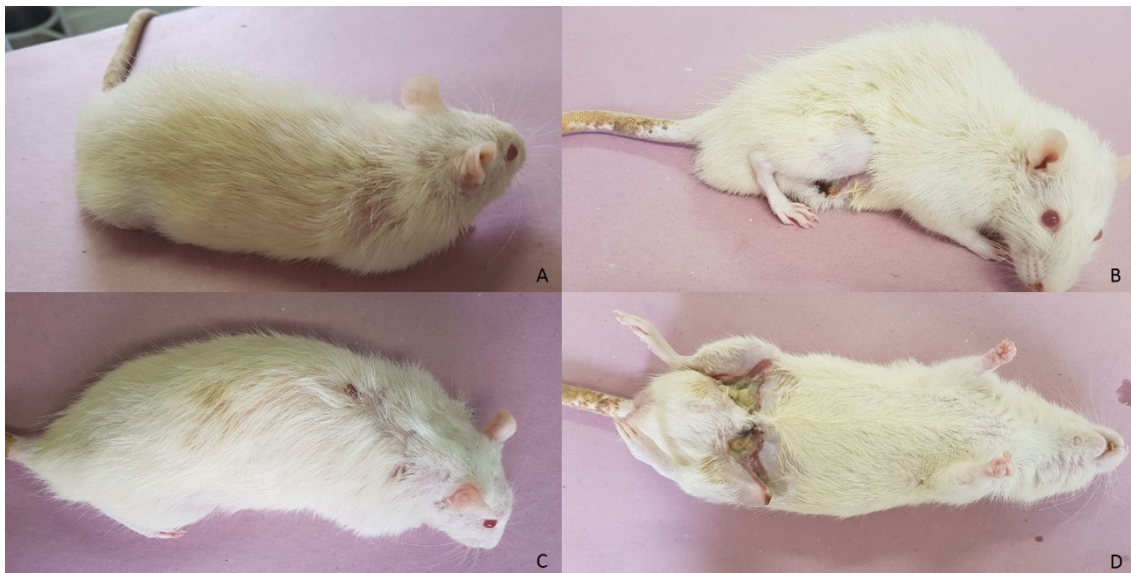
Tabela 1 - Média e desvio padrão dos pesos por grupo e período

<b>Grupos</b>	<b>3 dias</b>	<b>14 dias</b>	<b>49 dias</b>
<b>C</b>	397,66	415,00	391,00
<b>IrI</b>	393,50	361,67	374,33
<b>IrT</b>	375,66	317,16	425,50
<b>IrP</b>	415,60	382,33	406,00

Fonte: Elaborada pela autora.

Porém, outras alterações foram evidenciadas em alguns animais, principalmente notadas nos grupos de animais que ficaram mais tempo entre irradiação e eutanásia, como o caso dos animais do grupo IrP 49 dias, que foram sacrificados com 11 semanas após serem irradiados, com os reagentes, quando perda de pelo, feridas em pele, infecções nos sítios cirúrgicos e necrose de tecidos, perda de implantes, como pode ser notado na figura 10.

Figura 10 - Alterações nos animais



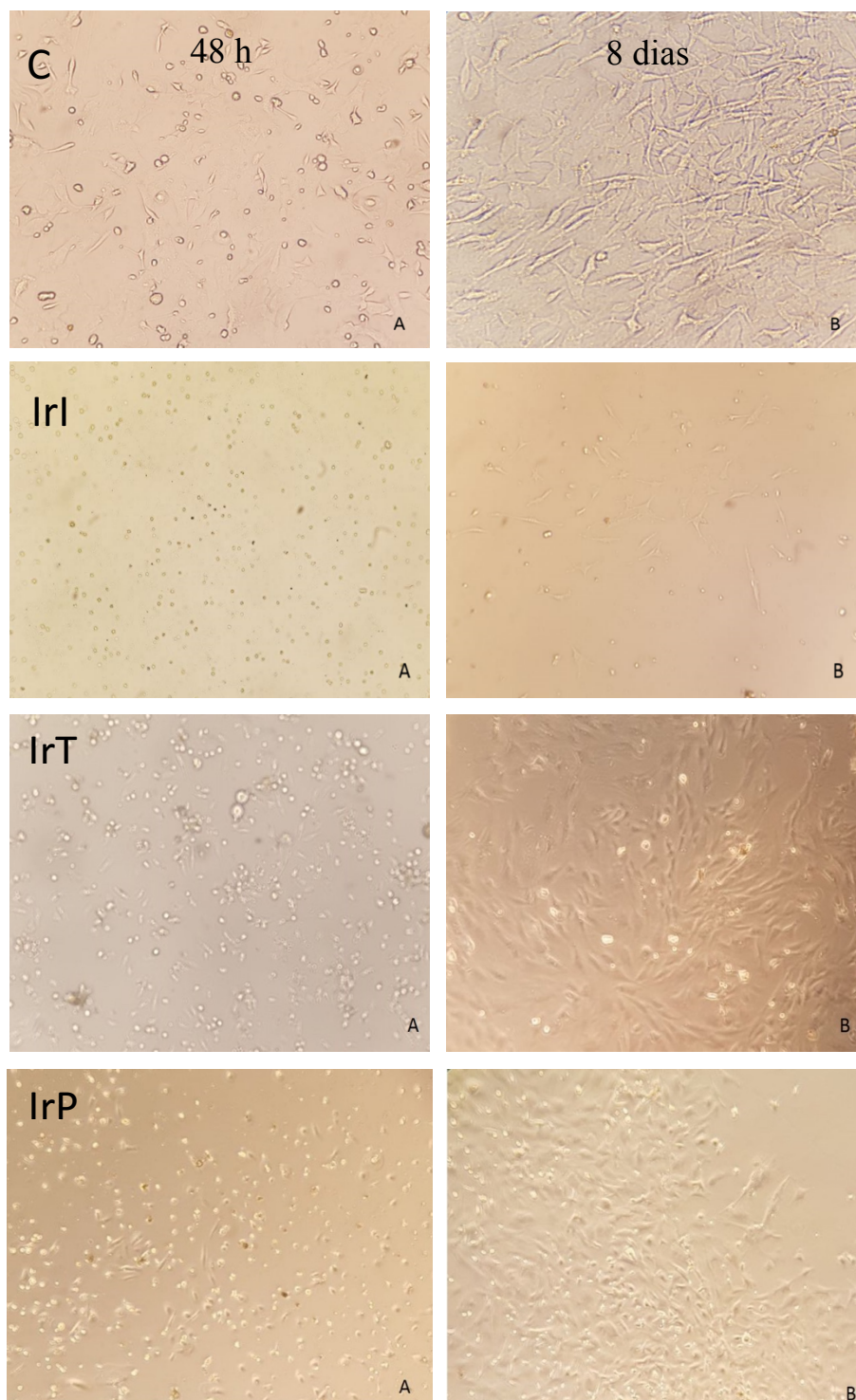
Legenda: (A) Perda de pelos; (B) Má cicatrização do sítio cirúrgico; (C) Feridas em pele; (D) Necrose em pele, músculos e ossos.

Fonte: Elaborada pela autora.

### 4.3 Cultura de células mesenquimais e análise da diferenciação celular

O meio de cultura foi trocado nas primeiras 24 de cultura primária, sendo depois trocado a cada 72 horas, acompanhando a progressão de crescimento celular (Figuras 11 a 13) pelo microscópio de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss – Axiovert 40C, Germany). A confluência foi obtida em aproximadamente 7 dias, quando foi realizada a coleta de RNA total das células cultivadas.

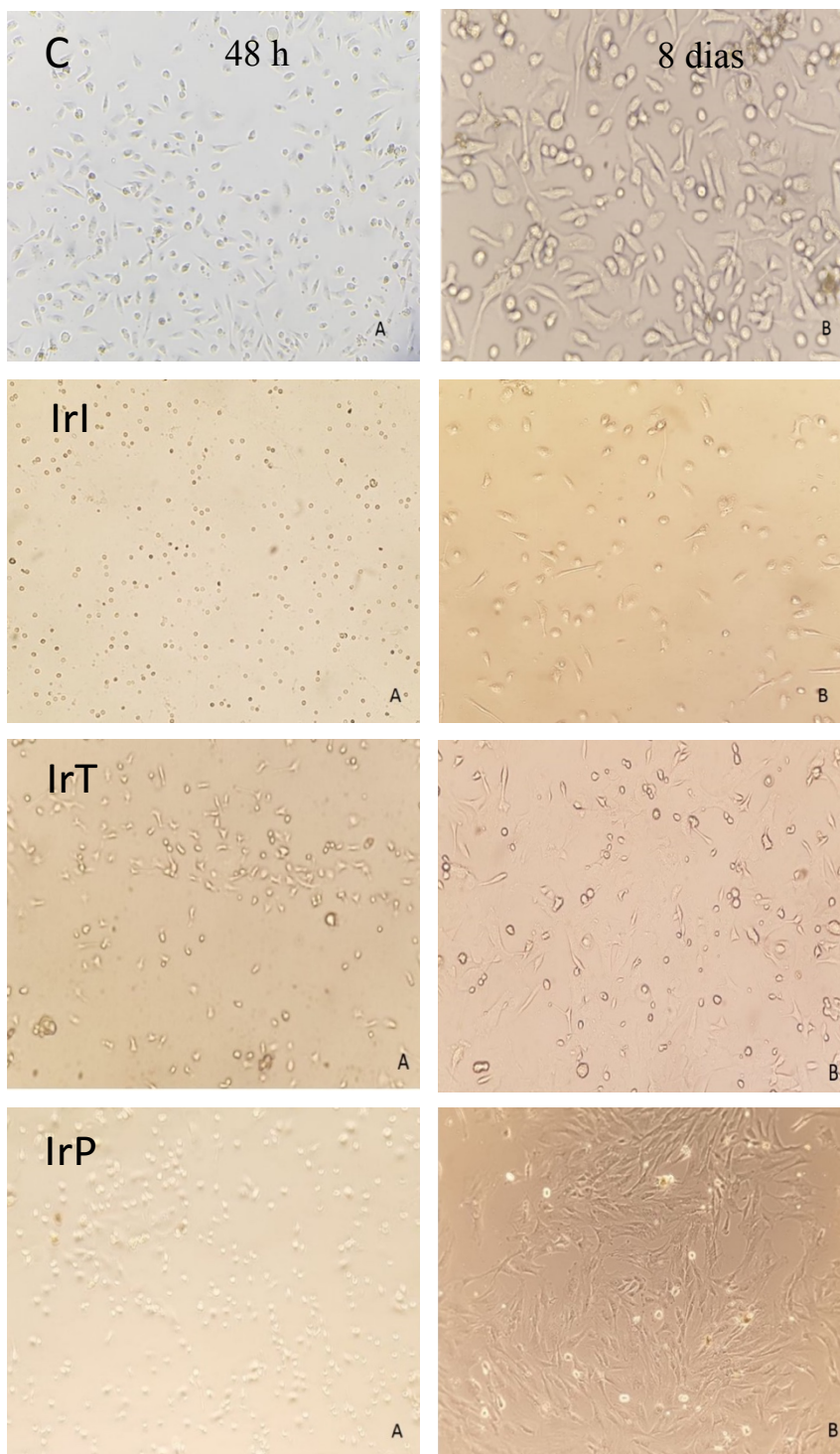
Figura 11- Cultura de células Grupo C, IrI, IrT e IrP - eutanásia de 3 dias



Legenda: Cultura de células no qual a eutanásia foi realizada 3 dias após instalação dos implantes Grupo C (A) 48 h após isolamento celular; (B) 8 dias após cultura de células.; IrI (A) 48 h após isolamento celular; (B) 8 dias após cultura de células.; IrT: (A) 48 h após isolamento celular; (B) 8 dias após cultura de células. e IrP: (A) 48 h após isolamento celular; (B) 8 dias após cultura de células (Aumento 20x).

Fonte: Elaborada pela autora.

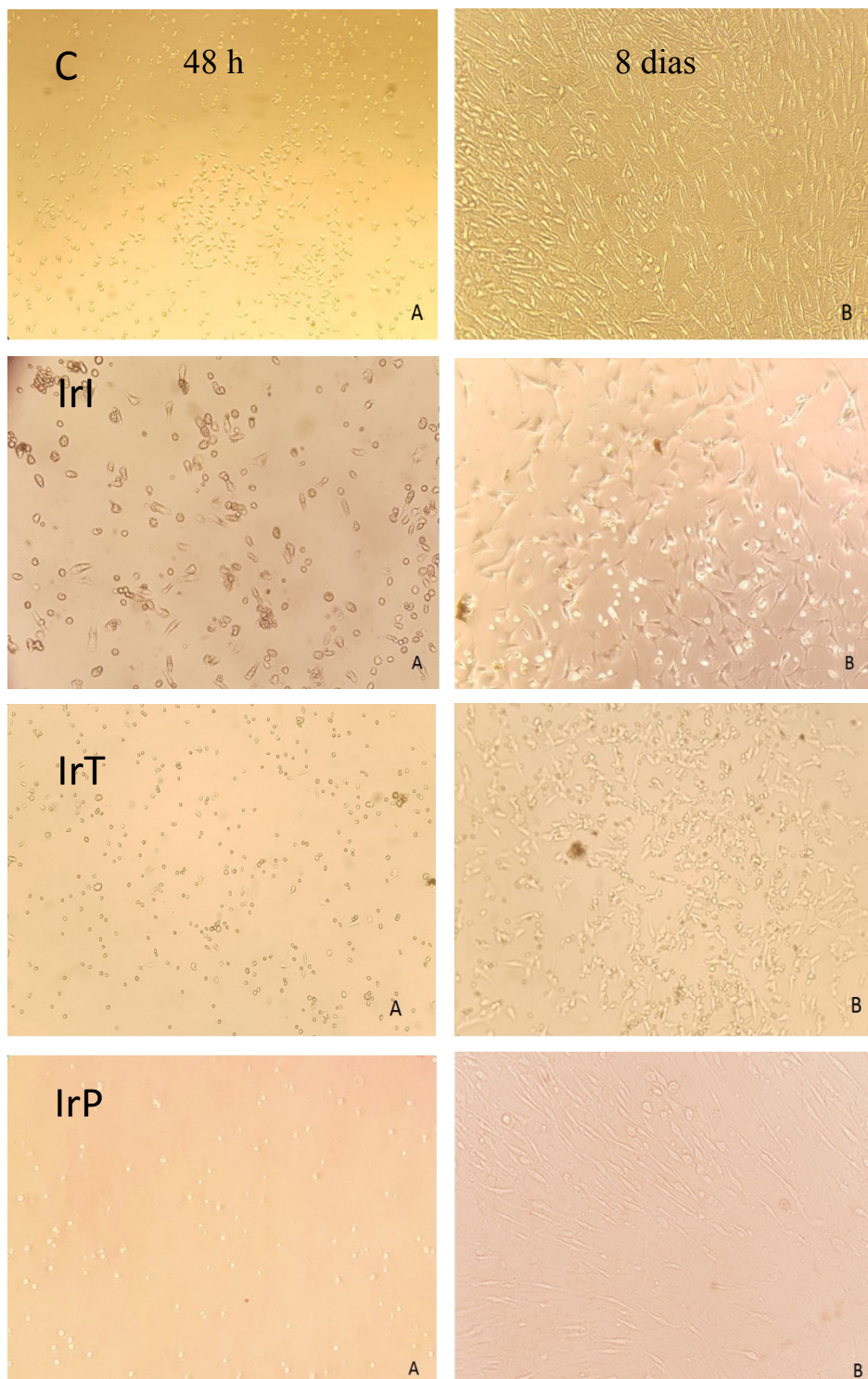
Figura 12 - Cultura de células dos Grupos C, IrI, IrT e IrP – eutanásia de 14 dias



Legenda: Cultura de células no qual a eutanásia foi realizada 14 dias após instalação dos implantes Grupo C (A) 48 h após isolamento celular; (B) 8 dias após cultura de células.; IrI (A) 48 h após isolamento celular; (B) 8 dias após cultura de células.; IrT: (A) 48 h após isolamento celular; (B) 8 dias após cultura de células. e IrP: (A) 48 h após isolamento celular; (B) 8 dias após cultura de células (Aumento 20x).

Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 13 - Cultura de células dos Grupos C, IrI, IrT e IrP – eutanásia de 49 dias

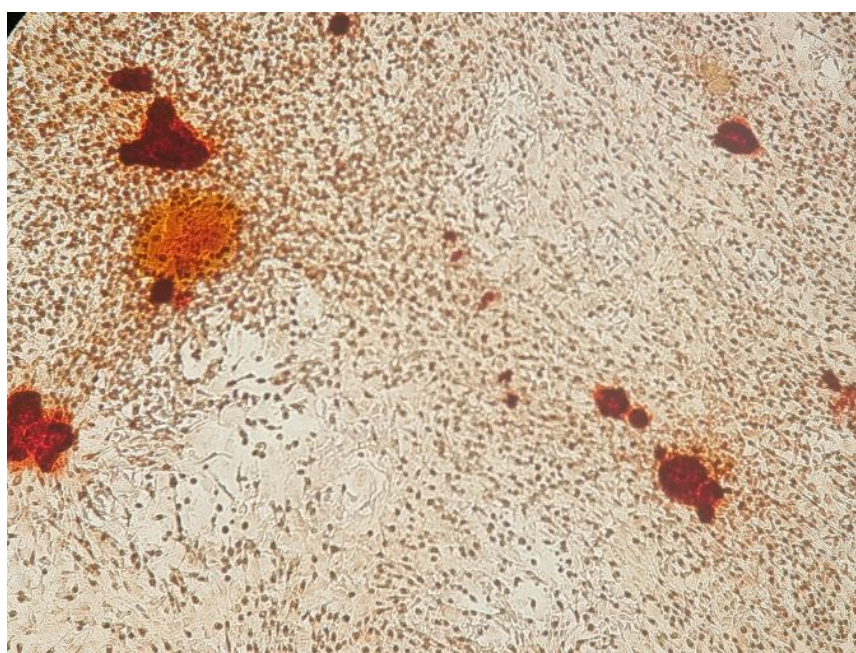


Legenda: Legenda: Cultura de células no qual a eutanásia foi realizada 49 dias após instalação dos implantes Grupo C (A) 48 h após isolamento celular; (B) 8 dias após cultura de células.; IrI (A) 48 h após isolamento celular; (B) 8 dias após cultura de células.; IrT: (A) 48 h após isolamento celular; (B) 8 dias após cultura de células. e IrP: (A) 48 h após isolamento celular; (B) 8 dias após cultura de células (Aumento 20x).

Fonte: Elaborada pela autora.

A comprovação da diferenciação se deu após 21 dias, quando as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 15 min e coradas com vermelho de alizarina 2% por 20 min, para coloração de deposições calcificadas, como demonstrado na figura 14.

Figura 14 - Nódulos de calcificação vistos em microscópio de luz em 100x, corados com vermelho de Alizarina



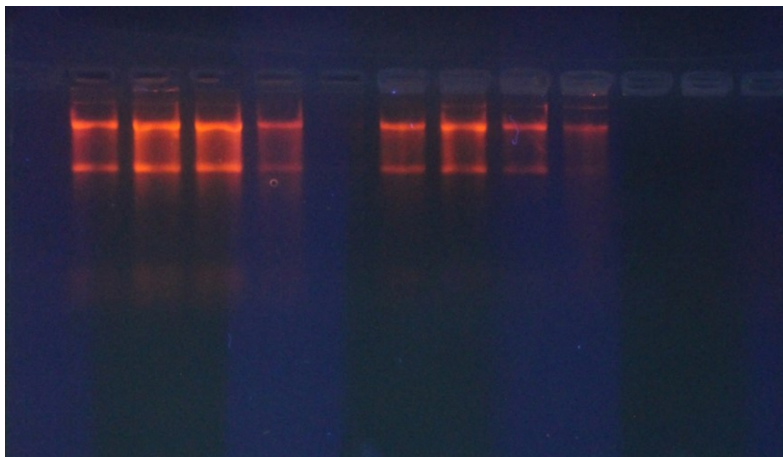
Fonte: Elaborada pela autora.

#### **4.4 Avaliação da expressão de genes por qRT-PCR**

Após realizada a extração de RNA total as concentrações e purezas das amostras de RNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc. - Wilmington, DE 19810, USA).

Em seguida a qualidade e integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose por meio da eletroforese (Figura 15).

Figura 15 - Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, mostrando a integridade do RNA extraído das amostras



Fonte: Elaborada pela autora.

Após detectada a qualidade do RNA extraído, foi realizada a síntese de cDNA com reação de transcrição reversa.

#### 4.5 Verificação da eficiência dos primers

O slope da curva padrão, que valida a eficiência da reação, dependente diretamente da qualidade dos reagentes, quantidade e qualidade da amostra. A concentração dos primers foi verificada e as amostras se mostraram eficientes, como indicado nas figuras apresentadas no ANEXO A.

A curva de dissociação dos primers testados mostrou apenas um pico, o que indica especificidade, como demonstrado no ANEXO B.

No presente estudo foram testados dois genes de referência, o gene  *$\beta$ -actina* e *Gapdh* (genes endógenos constitutivos) para todos os primers. Os resultados obtidos foram analisados no software RefFinder<sup>1</sup>. A  *$\beta$*  -

*actina* foi escolhida como normalizador por apresentar melhor eficiência, como evidenciado na Figura 16, considerando que quanto menor o rankig melhor a estabilidade do gene.

Figura 16 - Análise dos genes de referência, Beta-actina e Gapdh



Fonte: Elaborada pela autora.

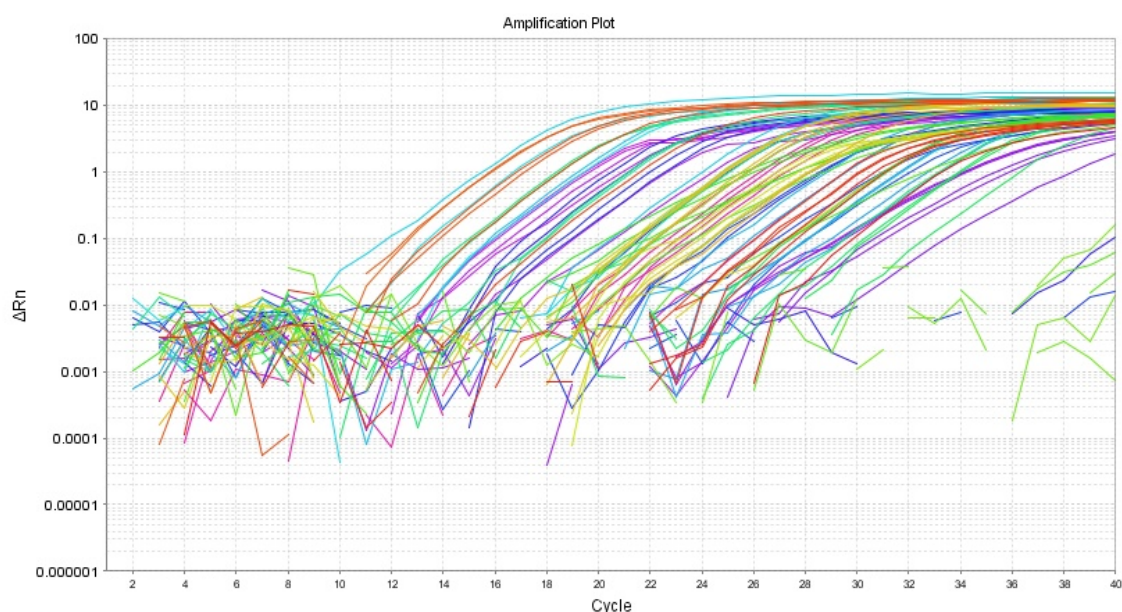
## 4.6 Análises de qRT-PCR

Os cDNAs transcritos foram amplificados para a quantificação relativa da expressão do Runx-2, Osx, Alp, Col-1, Int- $\beta$ 1, Bglap, Osn, Osp, Bsp, M-scf, Tgf- $\beta$ , Il-6, Apo-E, Pg E2. A expressão gênica é apresentada por uma razão entre a concentração dos genes alvo em relação ao gene de referência escolhido, no caso a Beta actina (Act).

<sup>1</sup> Disponível em: <http://www.leonxie.com/referencegene.php>

O Ct (*Threshold Cycle*), ponto que corresponde ao número de ciclos a partir do qual a amplificação atinge seu limiar que permite a análise quantitativa do gene avaliado, sendo considerado as médias dos Cts, medidas em triplicatas, foram utilizadas para calcular a expressão dos genes de interesse em relação a um controle interno (*Act*), como observado na figura 17.

Figura 17 - Curvas de amplificação demonstrando o *Threshold Cycle*



Fonte: Elaborada pela autora.

Em *fold change* os valores maiores ou menores do que 1 indicam maior expressão ou menor expressão gênica em relação ao controle, cujo valor de expressão foi normalizada para fins de comparação (expressão=1).

Avaliaram-se as expressões dos *Runx2*, *Osx*, *Alp*, *Col-1*, *Int β1*, e *Osp*, listados como fatores essenciais para o início da osteogênese, chegando-se aos valores em *fold change* demonstrados nos gráficos da Figura 18.

Ao se analisar a expressão da *Alp*, ocorreu subexpressão no grupo IrI em todos os períodos, começando a recuperar sua expressão após 49 dias ( $p < 0.0001$ ). No grupo IrT a *Alp* também se mostrou subexpressa nos três períodos analisados ( $p = 0.0041$ ). Já no grupo que recebeu radiação anteriormente à instalação dos implantes (IrP), houve uma hiperexpressão da *Alp*, principalmente no período de 3 dias ( $p = 0.001$ ), sendo essa expressão diminuída com o passar do tempo, igualando-se ao controle com 49 dias, não apresentando diferenças estatísticas nesse período ( $p = 0.977$ ).

Os transcritos de *Col-1* não foram detectados em todos os grupos e períodos ( $p = 0.0001$ ). No entanto, no grupo IrP 3 dias sua expressão se mostrou próxima ao controle, não apresentando diferença estatisticamente significativa ( $p = 0.887$ ).

A *Int  $\beta$ 1* se mostrou subexpressão nos grupos IrI e IrT aos 3 dias ( $p = 0.0025$  e  $p = 0.0013$ ), aumentando sua expressão aos 14 dias e 49 dias no grupo IrI ( $p = 0.103$  e  $p = 0.045$ ) e IrT ( $p = 0.045$  e  $p = 0.114$ ). Já no grupo IrP, a *Int  $\beta$ 1* mostrou-se 150 vezes mais expressa no período de 3 dias ( $p < 0.0001$ ), não apresentando expressão a partir dos 14 dias, não tendo significância estatísticas nestes períodos ( $p = 0,264$  e  $p = 0.141$ ).

Não houve a expressão do *Osx* no grupo IrI nos períodos de 3 dias e 14 dias ( $p = 0.001$ ), com leve aumento da sua expressão aos 49 dias ( $p = 0.008$ ). No grupo IrT ocorreu uma subexpressão em todos os períodos ( $p = 0.018$ ,  $p = 0.007$   $p < 0.0001$ ). Ao considerar o grupo IrP, evidenciou-se uma hiperexpressão no período de 3 dias ( $p = 0.041$ ) e 14 dias ( $p = 0.036$ ), regredindo aos 49 dias, não ocorrendo sua expressão em comparação ao controle ( $p < 0.0001$ ).

O marcador *Runx 2* foi expresso em todos os grupos com  $p < 0,0001$ , com maiores picos no período de 3 dias. A partir dos 14 dias a expressão se mantém.

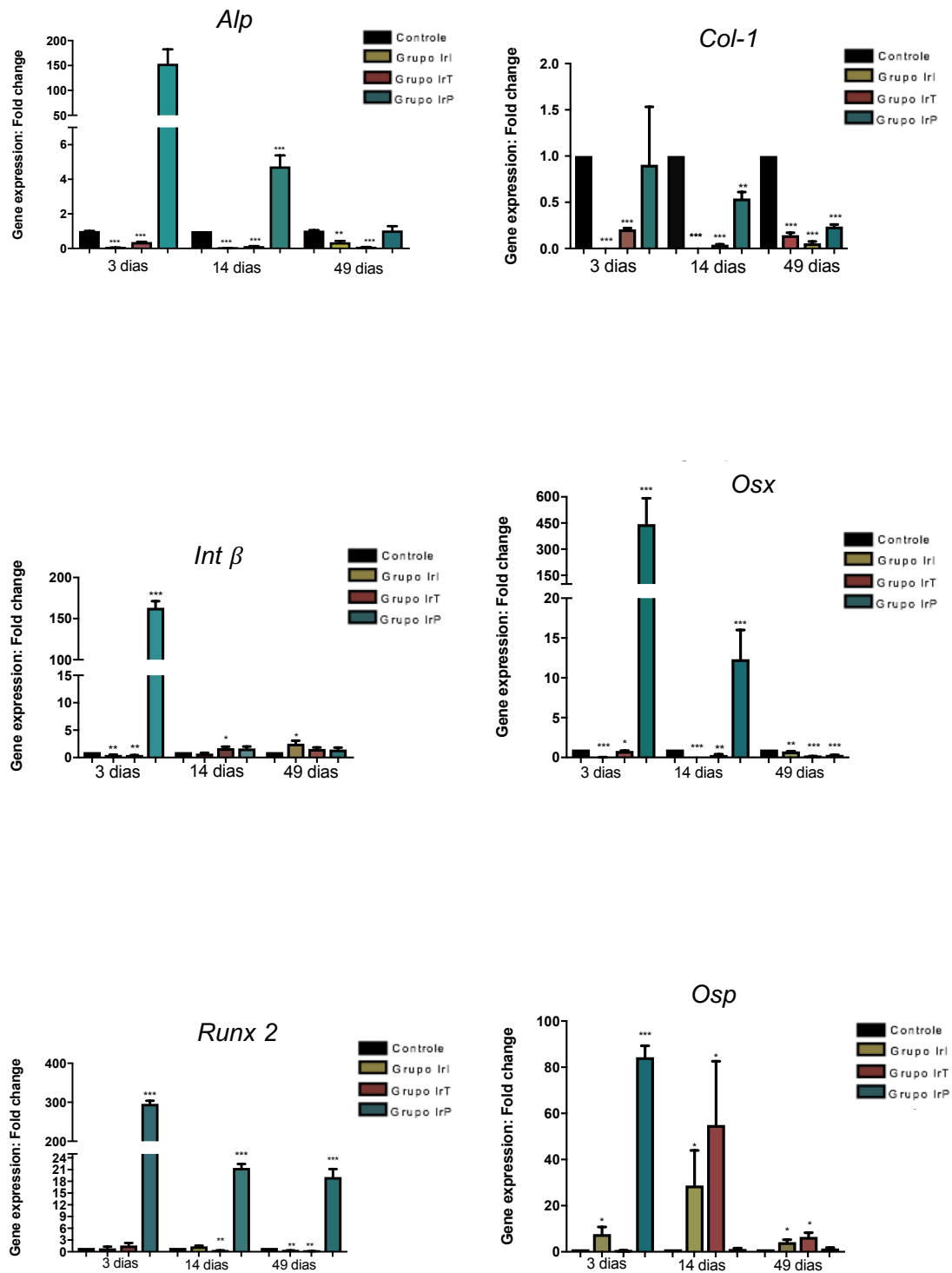
A *Osp* foi hiperexpressa no grupo IrI no período de 3 dias ( $p=0.043$ ), 14 dias ( $p=0.141$ ) e 49 dias ( $p=0.042$ ). No grupo IrT, não apresentou significância estatística aos 3 dias ( $p=0.124$ ), aumentando sua expressão aos 14 dias ( $p=0.042$ ) e aos 49 dias ( $p=0.043$ ). No grupo IrP, houve hiperexpressão aos 3 dias ( $p<0.0001$ ), ocorrendo expressão similar ao controle aos 14 dias ( $p=0.405$ ) e 49 dias ( $p=0.312$ ).

Ao realizar teste de correlação (*Spearman*) entre os genes envolvidos no início da osteogênese no grupo IrI, nota-se que a expressão de *Alp* ( $\rho 0.016$ ), *Int  $\beta$*  ( $\rho 0.67$ ) e *Osp* ( $\rho 0.233$ ) é diretamente proporcional ao *Runx-2* e *Osx*, exceto *Col-1* ( $\rho - 0.69$ ), porém nenhuma correlação mostrou significância estatística

No teste de correlação (*Spearman*) para o grupo IrT, nota-se que a expressão de *Alp* ( $\rho - 0.033$ ) *Col-1* ( $\rho - 0.676$ ), *Int  $\beta$*  ( $\rho - 0.533$ ) e *Osp* ( $\rho - 0.116$ ) não apresentou correlação diretamente relacionada a expressão de *Runx2* porém mostrou correlação positiva com *Osx* (*Alp* ( $\rho 0.366$ ) *Col-1* ( $\rho - 0.70$ ), *Int  $\beta$*  ( $\rho - 0.566$ ) e *Osp* ( $\rho 0.176$ ), sem significância estatística

A correlação entre os genes no grupo IrP, nota-se correlação positiva entre a expressão de *Osx* com *Alp* ( $\rho 0.166$ ) *Col-1* ( $\rho 0.333$ ), *Int  $\beta$*  ( $\rho 0.903$ ) e *Osp* ( $\rho 0.476$ ) com significância estatística apresentada apenas na correlação *Osx* x *Int  $\beta$*  ( $p=0.0046$ ).

Figura 18 - Expressão gênica dada em *fold change* dos genes *Alp*, *Col-1*, *Int  $\beta$* , *Osx*, *Runx2* e *Osp* nos períodos de 3 dias, 14 dias e 49 dias.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os genes *Bglap*, *Osn*, *Tgf- $\beta$*  e *Bsp*, são marcadores característicos da osteogênese com o aparecimento tardio. As expressões obtidas para esses genes estão demonstradas na Figura 19.

A *Bglap* não apresentou a formação de transcritos, já que não houve expressão gênica nos grupos experimentais.

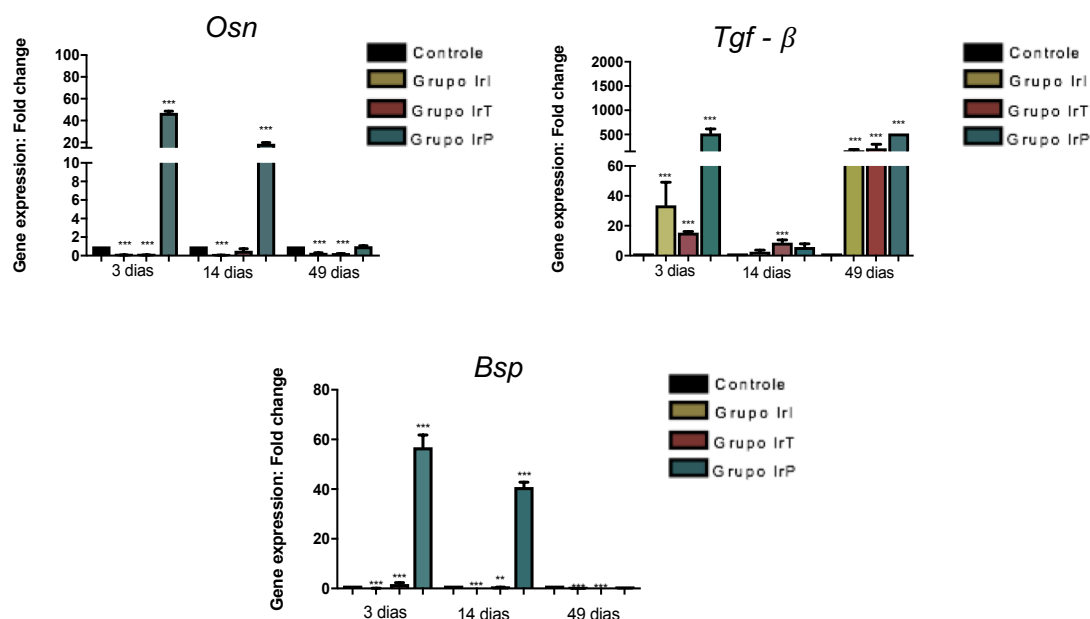
A *Osn* foi subexpressa nos grupos IrI e IrT em todos os períodos ( $p < 0.0001$ ), sendo hiperexpressa no grupo IrP, com o maior pico aos 3 dias ( $p < 0.0001$ ), diminuindo essa expressão aos 14 dias ( $p < 0.0001$ ) e aos 49 dias se igualando ao controle no qual não apresentou diferença estatística ( $p = 0.724$ ).

O *Tgf- $\beta$*  apresentou hiperexpressão em todos os grupos estudados, sendo que no grupo IrI sua expressão aos 3 dias foi cerca de 30 vezes maior do que o controle ( $p = 0.011$ ) e seu pico mais evidente foi aos 49 dias (0.0004). No grupo IrT houve expressão significativa aos 3 dias ( $p = 0.042$ ), e aos 14 dias ( $p = 0.012$ ), com aumento aos 49 dias ( $p < 0.0001$ ). O grupo IrP apresentou maior expressão aos 3 dias ( $p = 0.046$ ) e 49 dias ( $p = 0.039$ ).

A *Bsp* mostrou expressão abaixo do controle no grupo IrI em todos os períodos ( $p < 0.0001$ ), e IrT mostrou expressão pouco maior que o controle apenas no período de 3 dias ( $p = 0.219$ ), diminuindo essa expressão aos 14 dias ( $p = 0.005$ ) e aos 49 dias ficando subexpressa ( $p < 0.0001$ ). No grupo IrP, apresentou-se próxima de 60 vezes maior aos 3 dias (0.0006), diminuindo essa expressão aos 14 dias ( $p = 0.0050$ ) e se não tendo diferença estatística do controle aos 49 dias ( $p = 0.234$ ).

Sabendo que a *Bsp* é ativada pela expressão *Osx*, o teste de Spearman comprovou correlação positiva entre ambos ( $p = 0.2$ ), porém sem significância estatística.

Figura 19 - Expressão gênica dada em *fold change* dos genes *Osn*, *Tgf- $\beta$* , *Bgp* nos períodos de 3 dias, 14 dias e 49 dias



Fonte: Elaborada pela autora.

Os genes *Apo E*, *PgE2*, *Il-6* e *M-csf* relacionados com a osteoclastogênese também foram avaliados em todos os grupos e períodos e resultados encontram-se expostos na Figura 20.

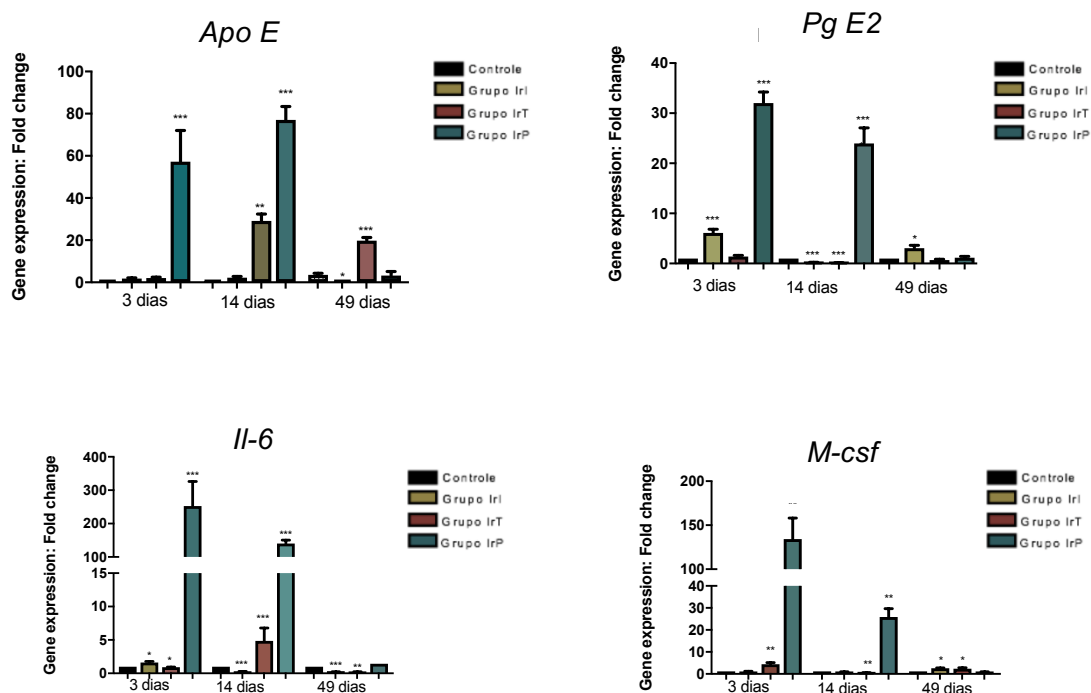
Para a *Apo E*, observou-se expressão no grupo IrI semelhante ao controle, não demonstrando significância estatística tanto no período de 3 dias ( $p=0.053$ ) quanto no de 14 dias ( $p=0.107$ ), demonstrando subexpressão aos 49 dias ( $p=0.027$ ). Aos 3 dias do grupo IrT, não foi observado diferença estatística ( $p=0.063$ ), aumentando a expressão aos 14 dias ( $p=0.001$ ) e aos 49 dias ( $p=0.002$ ). No grupo IrP no período de 3 dias nota-se um hiperexpressão ( $p=0.019$ ), aumentando aos 14 dias ( $p=0.0003$ ) e diminuindo aos 49 dias, apresentando-se nesse período sem significância estatística nesse período ( $p=0.328$ ).

A expressão da *PgE2* se mostrou presente no grupo IrI aos 3 dias ( $p=0.023$ ) e no aos 49 dias ( $p=0.019$ ), tendo subexpressão aos 14 dias ( $p<0.0001$ ). Para o grupo IrT, no período de 3 dias houve expressão similar ao controle ( $p=0.140$ ) bem como aos 49 dias ( $p=0.129$ ), sendo subexpressa aos 14 dias ( $p<0.0001$ ). A hiperexpressão se deu no grupo IrP, aos 3 dias ( $p<0.0001$ ), diminuindo aos 14 dias ( $p=0.0018$ ) e não apresentando diferença estatística aos 49 dias ( $p=0.599$ ).

A *Il-6* apresentou hiperexpressão no grupo IrI, apenas aos 3 dias ( $p=0.029$ ), ficando subexpressa aos 14 dias ( $p=0.0007$ ) e 49 dias ( $p=0.019$ ). No grupo IrT, houve expressão sem significância aos 3 dias ( $p=0.042$ ), aumentando aos 14 dias ( $p=0.016$ ) e ocorrendo uma subexpressão aos 49 dias ( $p=0.0192$ ). No grupo IrP nos períodos de 3 dias ( $p=0.026$ ) e 14 dias ( $p=0.0018$ ), notou-se uma hiperexpressão, sendo que não foi evidenciado diferença estatística aos 49 dias ( $p=0.396$ ).

Ao se avaliar os grupos para *M-csf*, evidencia-se que o grupo IrI mostrou resultados sem significância estatística no período de 3 dias ( $p=0.840$ ) e 14 dias ( $p=0.157$ ), aumentando levemente a expressão aos 49 dias ( $p=0.012$ ). O grupo IrT, obteve expressão gênica aos 3 dias ( $p=0.0097$ ) e 49 dias ( $p=0.041$ ). Já o grupo IrP apresentou hiperexpressão aos 3 dias ( $p=0.0051$ ), 14 dias ( $p=0.0029$ ) e não apresentou resultados significantes aos 49 dias ( $p=0.147$ ).

Figura 20 - Expressão gênica dada em *fold change* dos genes *Apo E*, *PgE2*, *Il-6* e *M-csf* aos 3 dias, 14 dias e 49 dias

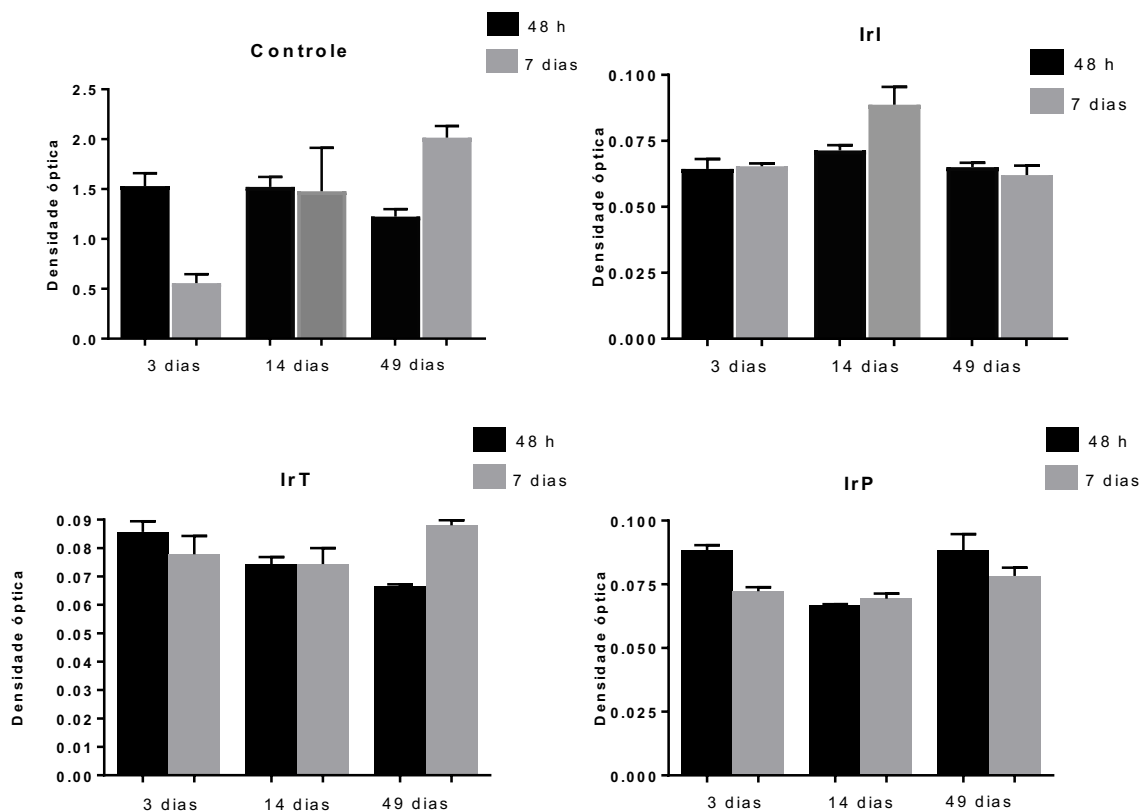


Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.7 Teste de ELISA

Levando em considerações as absorvância das fileiras padrão de cada placa, foi notado que o grupo controle para a *Il-6* apresentou-se positivo. Dentro do grupo controle, comparando os períodos utilizando o teste ANOVA obteve-se significância estatística entre os períodos de 3 dias ( $p < 0,039$ ) e 49 dias ( $p < 0,035$ ). Em todos os outros grupos a absorvância foi menor que 0,1 como visto na Figura 21, não apresentando diferença estatística significativa entre os períodos do mesmo grupo.

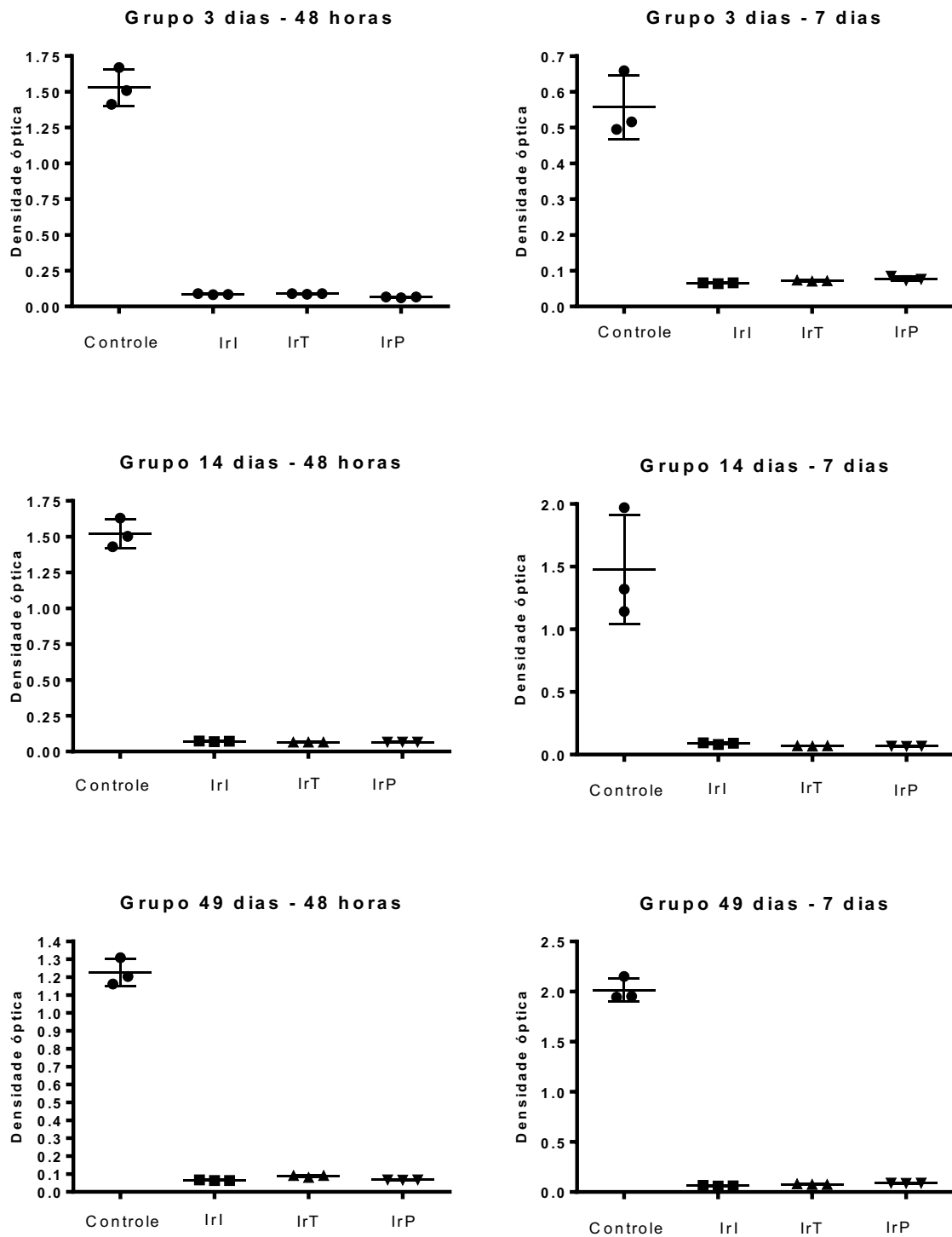
Figura 21 - Resultado do ELISA em densidade óptica, comparando diferentes períodos dos grupos C, IrI, IrT e IrP



Fonte: Elaborada pela autora.

Ao se comparar cada grupo com seu controle, temos uma diferença estatística significativa para todos os grupos e períodos, com o  $p < 0,001$ , como demonstra a Figura 22, já que todos os grupos apresentaram densidade óptica abaixo do controle.

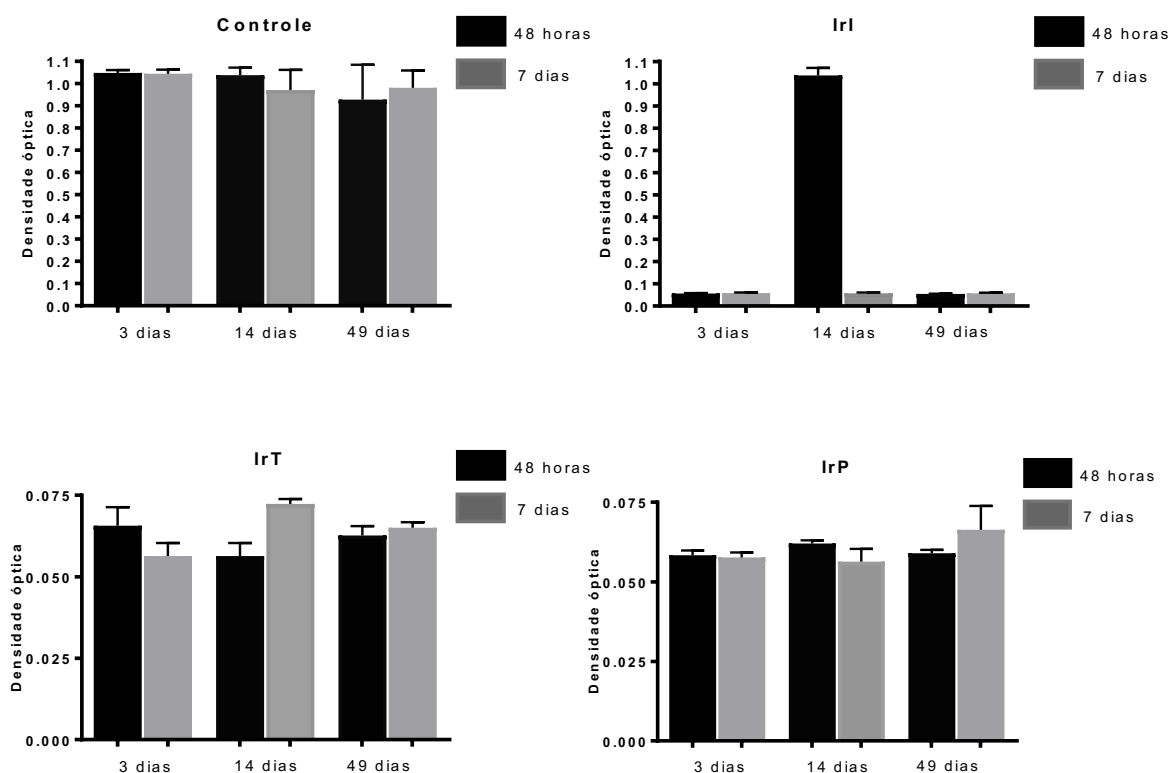
Figura 22 - Resultado do ELISA em densidade óptica, comparando diferentes períodos dos grupos IrI, IrT e IrP com o controle



Fonte: Elaborada pela autora.

Para a *Osteocalcina*, os resultados foram positivos apenas no grupo controle, sem diferença estatística entre os períodos, confirmados pelo teste ANOVA, como mostra a Figura 23.

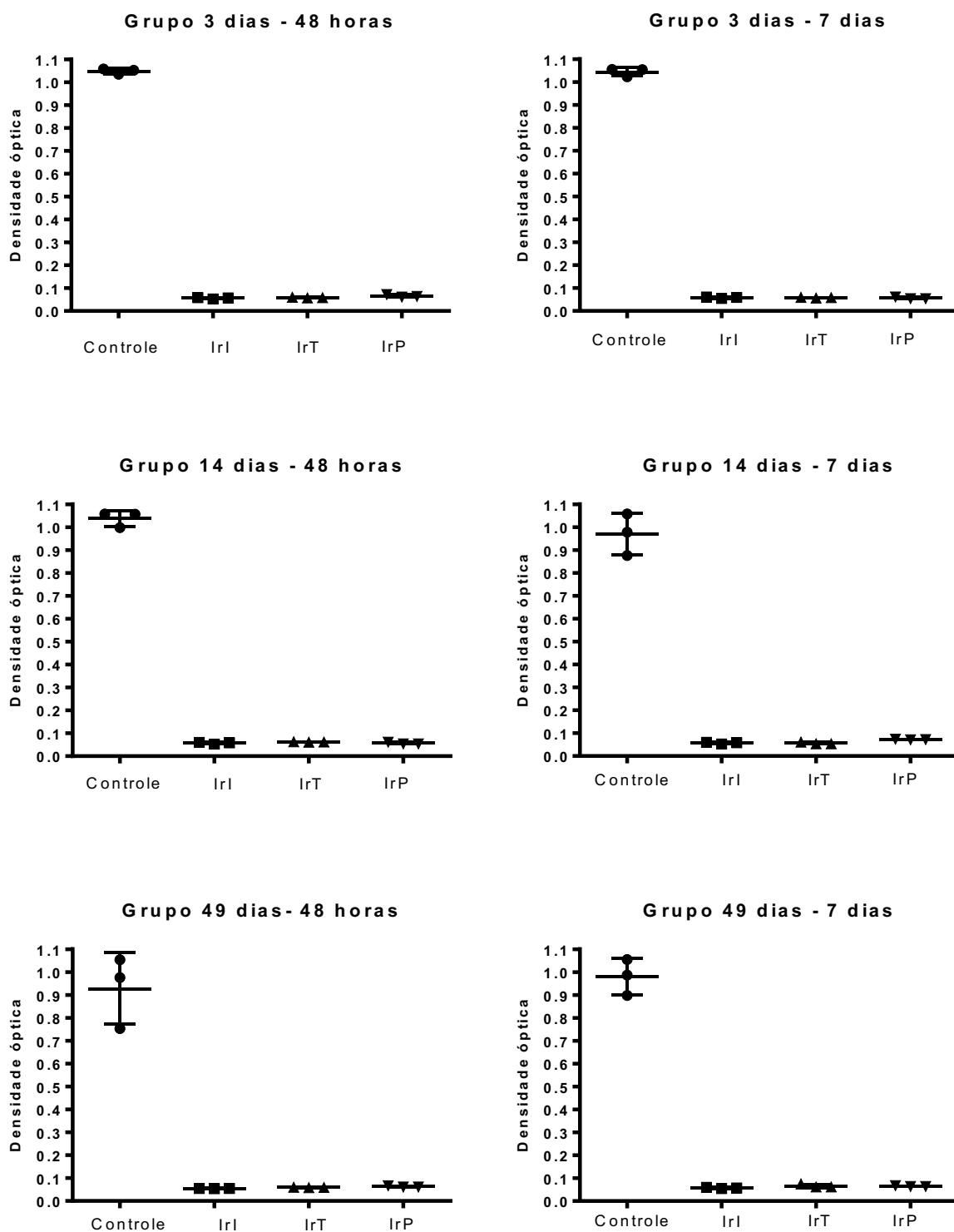
Figura 23 - Resultado do ELISA para *Osteocalcina* em densidade óptica, comparando diferentes períodos dentro dos grupos IrI, IrT e IrP



Fonte: Elaborada pela autora.

Ao se comparar os resultados dos grupos com o controle temos diferença significativa estatisticamente em todos os grupos e períodos ( $p < 0.001$ ), já que a absorvância se apresentou expressivamente menor do que o controle em todos os grupos e períodos, como exposto na Figura 24.

Figura 24 - Resultado do ELISA em densidade óptica, comparando diferentes períodos dos grupos IrI, IrT e IrP com o controle



Fonte: Elaborada pela autora.

## 5 DISCUSSÃO

Uma das principais complicações em procedimentos cirúrgicos após radioterapia é o desenvolvimento de osteorradionecrose. Para evitar esse risco, qualquer procedimento cirúrgico que envolva um osso que receberá radiação ou foi irradiado deve ser manejado o menos traumático possível, com cobertura antibiótica e cuidados pós operatórios adequados (Eposito et al., 1998; Ruggiero et al., 2006).

Neste estudo todos os cuidados de assepsia foram respeitados e os animais receberam analgesia adequada, no entanto, por se tratar de um modelo experimental em animais, a preservação da ferida cirúrgica no pós-operatório, tanto em relação ao trauma, movimento local quanto a higiene apresentaram limitações. De acordo com Eposito et al. (1998) o trauma cirúrgico, juntamente com a carga envolvida precocemente sobre o implante, infecção local e capacidade limitada de regeneração óssea do osso receptor são as causas mais comuns de insucesso nos implantes osseointegrados. Fatores como a dificuldade de controle dos animais e o tratamento a que os mesmos foram submetidos, em fontes de radiação ionizante, favoreceram o aparecimento de infecção local, deiscência de suturas, com consequente infecção do leito implantado, justificando o número de animais perdidos. Também foi evidenciado em alguns animais alopecia na região irradiada, além de úlceras, dermatites e alterações locais de acordo com os achados na literatura (Sonstevold et al., 2015).

Está comprovado que a radiação causa graves prejuízos para células mesenquimais, danos esses que podem ser irreversíveis (Green, Rubin, 2014; Wang et al., 2015). Vale acrescentar que a radiação ionizante causa supressão medular, levando à redução das células hematopoiéticas (Green, Rubin, 2014). Tanto células hematopoiéticas quanto células

mesenquimais são críticas no processo de remodelação óssea. O déficit dessas células na medula óssea causada pela irradiação pode comprometer a arquitetura e integridade estrutural óssea assim como a capacidade de auto-regeneração (Bonyadi et al., 2003).

A dose da radiação influenciará o processo de osseointegração (Gridley et al., 2001), uma vez que ela pode levar a um desequilíbrio da atividade osteoblástica e osteoclástica aumentando a concentração de osteoclastos e diminuindo a de osteócitos e osteoblastos após irradiação (Baek et al., 2009). No entanto, as células mesenquimais possuem maior resiliência quando comparados às hematopoiéticas, mantendo sua capacidade de diferenciação após serem submetidas à radiação ionizante (Cao, 2011). A radioresistência das células mesenquimais e o aumento da resistência frente a um stress oxidativo é explicada por (Chen MF et al., 2006), que mostra que radiação ionizante aumenta a capacidade antioxidante para eliminação de espécies reativas de oxigênio.

É por meio dessa resistência celular que acontece a remodelação óssea, no entanto sabe-se que a exposição à radiações ionizantes leva a um declínio na formação de trabéculas ósseas, devido ao prejuízo na formação de colágeno e deposição de hidroxapatita (Cao, 2011), o que pode explicar a menor formação de RNAm de *Col-1*.

A osteogênese, relacionada à osseointegração, é regulada por inúmeros fatores tais como: osteoblastos, matriz extracelular, moléculas bioativas solúveis em meio extracelular (citocinas, vitaminas, fatores de crescimento, hormônios) e o estímulo de diferenciação (Bressan et al., 2013).

Neste presente estudo, o *Runx-2* foi subexpresso nos grupos IrI e IrT resultados semelhantes aos de Wang et al. (2015) e Yan et al. (2016). Porém foi hiperregulado no grupo IrP. Dessa forma, notou-se que 4 semanas de intervalo entre irradiação e instalação de implantes foi um

intervalo de tempo que favoreceu a recuperação celular. O marcador inicial da osteogênese é o *Runx 2*, que ativa e regula a osteogênese pela via BMP, induzindo a secreção de *Osx*, diferenciando células mesenquimais em pré-osteoblastos e sua expressão ocorre durante toda a vida para que a remodelação óssea aconteça (Harada, Rodan, 2003; Baek et al., 2009). Nossos resultados demonstraram correlação diretamente proporcional entre a quantidade de transcritos de *Runx2* e *Osx*. Desse modo, assim como o *Runx2*, o *Osx* apresentou subexpressão no grupo IrI e IrT, ficando apenas hiperexpresso no grupo IrP, com o pico de expressão mais elevada aos 3 dias.

Ao se diferenciarem em pré-osteoblastos inicia-se o processo de proliferação e adesão celular, secretando *Alp*, *Col 1*, *Opn* e *Int  $\beta$ 1*, iniciando a deposição de matriz óssea (Bressan, 2013). Picos de atividade da *Alp* ocorrem no final do processo de proliferação celular e início da maturação da matriz óssea (Sun et al., 2017). Estando um osteoblasto ativo, este possui alta expressão de *Alp*, que é considerada um marcador transitório da osteodiferenciação e regulação da mineralização óssea.

Neste estudo, a atividade *Alp* foi analisada para indicar se a radioterapia havia alterado o potencial inicial de diferenciação osteogênica das células mesenquimais. Isso indica que houve perda na capacidade de diferenciação imediata observada nos grupos IrI e IrT, indicando uma resposta negativa ao estresse pós-irradiação. Já no grupo IrP observou-se hiperexpressão de *Alp*, o que pode ter resultado de uma recuperação celular após 4 semanas pós-RxT. Esse dado é semelhante ao demonstrado por Sun et al. (2017), o qual relata uma atividade de *Alp* aprimorada no grupo irradiado direto aos 3 dias após a irradiação, enquanto os declínios foram encontrados aos 7 e 14 dias pós-irradiação, com o potencial de diferenciação inicial diminuindo com o tempo decorrido (Sun et al., 2017).

O *Col-1* é um produto primário dos osteoblastos, durante a formação da matriz óssea, que constitui 90% da matriz orgânica do osso. Como demonstrado por Baek et al. (2009), sua deposição é dependente da expressão de *Osx*. Neste trabalho, o *Osx* está superexpresso no grupo IrP, o único que apresentou correlação positiva com *Col-1*.

A *Osp* apresentou uma hiperexpressão em todos os períodos do grupo IrI, apresentando-se também expressa no grupo IrT e IrP. Essa diferença de resultados se dá devido ao fato de que a osteopontina não depende apenas do *Runx 2* ou *Osx* para ser ativada, sendo sua principal promotora a vitamina D (Mish, 2008), pois apresenta interações com múltiplos receptores de superfície celular, essa ligação com esses receptores provoca uma ampla gama de funções associada à adesão e migração celular, sendo que uma delas é a diferenciação osteogênica de células mesenquimais (Chen Q et al., 2014). A hiperexpressão da *Osp* se dá em resposta ao stress e frente à reparação de feridas (Wang et al., 2007), fato esse que pode explicar a expressão deste, mesmo sem a expressão do *Runx2*. Além disso, Chen Q et al. (2014) relata que a *Osp* atua vinculando as integrinas da superfície celular, sendo associado com a adesão celular, e assim modula a diferenciação adipogênica e osteogênica (Chen Q et al., 2014). A *Int β* foi expressa em todos os grupos deste trabalho.

A diminuição da expressão do *Runx 2* nos grupos IrI e IrT influenciou o potencial osteogênico e formação óssea, sendo caracterizado pela diminuição da expressão de outros genes dependentes do *Runx2*, também relacionados a osteogênese. Em particular, o resultado reportado nesse trabalho demonstrou que o processo de diferenciação osteogênica foi acelerado no grupo IrP, principalmente no período de 3 dias. Considera-se que esse resultado se dá pelo reestabelecimento da função celular após 4 semanas de realizado da radiação e pelo fato de terem sido instalados implantes 3 dias antes do sacrifício dos animais, sendo a resposta aguda

frente ao trauma cirúrgico.

No final do processo, o *Runx2* inibe a maturação do osteoblasto e o *Osx* termina a maturação induzindo a expressão da *Osteocalcina (Bglap)*. Quando o osteoblasto está totalmente diferenciado, começa a produzir a matriz orgânica mineralizada, aumentando a produção da *Alp*, *Col-1* e começa a produção de *Bglap* (Bressan et al., 2013), no entanto a expressão de RNAm de *Bglap* foi reprimida em todos os grupos.

A *Bglap* é secretada pelos osteoblastos e é um importante metabólito para regulação da mineralização (Bressan et al., 2013). Autores comprovam que a irradiação inibe a expressão da *Bglap* (Li et al., 2015). Acredita-se que para ter a expressão da *Osc*, além da expressão de *Runx2*, é necessário que o nível sérico de Vitamina K esteja dentro da normalidade (Zhou et al., 2013).

A *Bsp*, também dependente de *Osx*, está presente no início da produção e maturação da matriz extracelular e é a maior proteína estrutural da matriz óssea (Tang et al., 2011). Como o nível de expressão da *Osx* foi reprimido nos grupos IrI e IrT, a *Bsp* também foi reprimida nesses grupos, aparecendo expressa significativamente apenas no grupo IrP. O mesmo resultado foi encontrado para a expressão da *Osn*, uma proteína vital para a mineralização óssea.

Outra via de diferenciação osteogênica, além da expressão da *Osx*, diz respeito à via do *Tgf* (Bressan et al., 2013), que ativa um grande número de fatores que regulam a diferenciação, como o caso das proteínas morfogenéticas (BMPs), promovendo vários estágios de ossificação endocondral (Cho et al., 2002; Wu et al., 2016). Em nossos resultados, a via de diferenciação osteogênica da *Tgf- $\beta$*  foi expressa, em todos os grupos e períodos, aumentando a expressão nos grupos IrI e IrT com o passar dos dias e mantendo-se expressa no grupo IrP aos 3 dias e 14 dias sugerindo a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos nos grupos IrI e

IrT, mesmo nos grupos que mostraram uma subexpressão do *Runx2* e consequentemente do *Osx*.

A super família da *Tgf- $\beta$* , está envolvida com a regulação da osteoclastogênese pela via de fatores de diferenciação de crescimento (GDF) (Wu e al., 2016), uma vez que os macrófagos presentes na medula óssea, derivados da linhagem hematopoiética, agem diretamente na diferenciação de células mesenquimais (Winkler et al., 2010) Além disso, juntamente com citocinas, ele tem um papel importante na indução da atividade dos fatores de transcrição NF- $\kappa$  B e AP- envolvidos no desenvolvimento da inflamação. Sua expressão aumenta com a presença de mediadores inflamatórios como TGF $\alpha$ , IL -1 $\beta$ , IL-8 e IL-6 (Fennen et al., 2016).

*Il-6* demonstra desempenhar um papel no início da cascata de reparos, induz uma resposta a jusante a lesão recrutando outras células inflamatórias, aumentando a síntese da matriz extracelular e estimulando a angiogênese (Kim et al., 2017). Eles são secretados no local da lesão por macrófagos, células inflamatórias. Seu pico de ocorrência ocorre dentro das primeiras 24 h, começando a diminuir a partir de 3 dias (Cho et al., 2002). Os resultados relatados nesse trabalho mostram que a maior expressão da *Il-6* ocorreu aos 3 dias em todos os grupos, porém no grupo IrP sua expressão foi mais significativa devido ao fato do trauma cirúrgico recente, diminuindo essa expressão com o passar dos dias. O mesmo aconteceu com o grupo IrI. A proteína *Il-6* também foi expressa, porém com pouca intensidade, em todos os grupos. Dado semelhante aos resultados de Linard (Linard et al., 2004), que explica a expressão devido ativação dos receptores *Il-6*, mesmo quando a expressão gênica não ocorre.

O *M-csf* é um outro fator chave para a regulação da osteoclastogênese, pois ele estimula células hematopoiéticas a se diferenciarem em células inflamatórias, principalmente macrófagos. A

expressão do *M-csf* apresenta um aumento no início do trauma, em reposta à inflamação aguda e continuando durante toda a fase de reabsorção de cartilagem mineralizada, e uma diminuição na fase de maturação óssea (Corcione et al., 2006). Esse fator é liberado pelos osteoblastos, induzindo a diferenciação dos osteoclastos. Nos resultados encontrados nesse trabalho, o *M-csf* foi expresso no grupo IrP, em todos os períodos, tendo maior resultado no 3º dia após a instalação de implantes, diminuindo a expressão nos outros períodos. Também houve expressão significativa no grupo IrT 3 dias.

A *ApoE*, foi inicialmente descrita como uma partícula de VLDL (Very Low Density Lipoproteins), sintetizada no fígado e macrófagos, possuindo um papel importante no metabolismo e distribuição do colesterol. Um dos alelos *ApoE 4*, quando aumentado, pode levar à acumulação lipídica do osso inibindo a diferenciação dos osteoblastos e aumentando o número de adipócitos no interior da medula óssea (Liao et al., 2014). A baixa representatibilidade da expressão da *Apo E* pode ser um dos fatores que explica o fato de a radioterapia não ter alterado a capacidade das células mesenquimais de se transformarem em osteoblastos.

As prostaglandinas, principalmente a *Pg E2*, são produzidas pelos osteoblastos sob estímulo principalmente da COX-2, cuja expressão é regulada pelos hormônios, citocinas e fatores de crescimento que controlam a remodelação óssea, como o *Tgf-β*, cuja expressão se deu em todos os grupos deste trabalho. Uma importante função fisiológica das prostaglandinas no tecido ósseo é mediar o aumento da formação de matriz mineralizada em resposta ao estímulo mecânico (Raisz, 2001). Em algumas situações, notadamente nas de natureza patológica, a *Pg E2* pode estimular a absorção óssea aumentando a quantidade e a atividade funcional dos osteoclastos. A superexpressão da *PgE2* foi evidenciado em todos os grupos no período de 3 dias, apresentando expressão significativa da

prostaglandina em todos os períodos, diminuindo com a evolução do tempo, sugerindo uma resposta inicial frente aos traumas locais.

## 6 CONCLUSÃO

- *Runx2* teve sua expressão diferenciada frente a dois traumas distintos. Ao se realizar a radiação imediatamente após instalação dos implantes (grupo IrI) notou-se que a expressão do gene foi reprimida frente aos raios  $\gamma$ , comprovados pelo mesmo período do grupo IrT, o qual recebeu a instalação do implante 4 semanas antes da radioterapia e foi sacrificado com os mesmos dias. Isso mostra que o trauma cirúrgico não participou da supressão gênica.

- Já no grupo IrP, que simula um paciente adulto que realizou a instalação de implantes 2 após ter sofrido radioterapia, a hiperexpressão do *Runx2* demonstra a capacidade de regeneração celular dos osteoblastos, além de alteração frente a um trauma cirúrgico e consequente período de inflamação aguda.

- No que diz respeito aos genes oriundos de outra via de diferenciação osteogênica, como a *Tgf- $\beta$* , não foram encontradas alterações, sendo eles expressos até mesmo nos grupos IrI e IrT, com menor intensidade que o Grupo IrP, o que aumenta a expressão dos genes envolvidos com a osteoclastogênese.

- A partir desses resultados, do ponto de vista molecular, uma osseointegração de implantes dentários é inviável se o mesmo é realizado imediatamente após ao tratamento com radioterapia, como visto no grupo IrI, uma vez que a supressão do *Runx2* indica também que outros genes essenciais à mineralização óssea também não são expressos.

- Em uma osseointegração já estabelecida, a radioterapia não exerce nenhum efeito que cause a perda do implante, pois todo o processo já está consolidado, mesmo com a supressão de genes relatados na

osseointegração.

- Um ponto crucial dos resultados encontrados diz respeito ao grupo IrP, o qual apresentou todos os genes hiperexpressos, principalmente nos períodos de 3 dias. Isso evidencia que a capacidade de regeneração das células é reestabelecida após 4 semanas da realização da radioterapia.

- Dentro das limitações deste trabalho, segundo Quiin, equivale a um ano de vida de um humano, temos com os resultados reportados nesse trabalho uma evidência de que, com aproximadamente dois anos, do ponto de vista molecular, o osso já estaria apto a receber um implante dentário.

**REFERÊNCIAS\***

Anselme K, Bigerelle M. On the relation between surface roughness of metallic substrates and adhesion of human primary bone cells. *Scanning*. 2014;36(1):11–20. doi: <https://doi.org/10.1002/sca.21067>

Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet*. 2008;371(9625):1695–709. doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60728-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60728-X)

Baek WY, Lee MA, Jung JW, Kim SY, Akiyama H, de Crombrughe B, Kim JE. Positive Regulation of Adult Bone Formation by Osteoblast-Specific Transcription Factor Osterix. *J Bone Miner Res*. 2009;24(6):1055–65. doi:<https://doi.org/10.1359/jbmr.081248>

Bonyadi M, Waldman SD, Liu D, Aubin JE, Grynblas MD, Stanford WL. Mesenchymal progenitor self-renewal deficiency leads to age-dependent osteoporosis in Sca-1/Ly-6A null mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(10):5840–5. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1036475100>

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 Maxil Surg*. 2006;35(9),850–5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2006.03.016>

Bressan E, Sbricoli L, Guazzo R, Tocco I, Roman M, Vindigni V, et al. Nanostructured surfaces of dental implants. *Int J Mol Med Sci*. 2013;14(1):1918–31. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms14011918>

Cao X. Irradiation induces bone injury by damaging bone marrow microenvironment for stem cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(14):5921–2. doi:<https://doi.org/10.1073/pnas.1103973108>

---

\* 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 jun 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)

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;67:33–40.

doi: <https://doi.org/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 Biochem Physiol*. 2015;290(1): 157–67. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.608158>

Chen MF, Lin CT, Chen WC, Yang CT, Che CC, Liao SK, et al. The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;66(1): 244–53. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2006.03.062>

Chen Q, Shou P, Zhang L, Xu C, Zheng C, Han Y, et al. An osteopontin-integrin interaction plays a critical role in directing adipogenesis and osteogenesis by mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2014;32(2):327–37. doi:<https://doi.org/10.1002/stem.1567>

Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor  $\beta$  superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2002;17(3):513–20. doi:<https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.3.513>

Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006;107(1):367–72. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2657>

Da Cunha SS, Sarmiento V, Ramalho LMP, De Almeida D, Veeck EB, Da Costa NP, et al. Effect of laser therapy on bone tissue submitted to radiotherapy: Experimental Study in Rats. *Photomed Laser Surg*. 2007;25(3):197–204. doi: <https://doi.org/10.1089/pho.2007.2002>

Dare A, Hachisu R, Yamaguchi A, Yokose S, Yoshiki S, Okano T. Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *J Dent Res*. 1997;76(2):658–64.

Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants, (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci*. 1998;106(1):527–51. doi:

<https://doi.org/10.1046/j.0909-8836..t01-2-.x>

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: <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2011.00384.x>

Fennen M, Pap T, Dankbar B. Smad-dependent mechanisms of inflammatory bone destruction. *Arthritis Res Ther.* 2016; 18(1):1–10. doi: <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1187-7>

Green DE, Rubin CT. Consequences of irradiation on bone and marrow phenotypes, and its relation to disruption of hematopoietic precursors. *Bone.* 2014;63:87–94. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.02.018>

Gridley DS, Pecaut MJ, Dutta-Roy R, Nelson GA. Dose and dose rate effects of whole-body proton irradiation on leukocyte populations and lymphoid organs: Part I. *Immunol Lett.* 2001;80(1):55–66. doi: [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(01\)00306-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(01)00306-6)

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003;423(6937):349–355. doi: <https://doi.org/10.1038/nature01660>

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

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

Kim S, Choe JH, Lee GJ, Kim YS, Kim SY, et al. Ionizing radiation induces innate immune responses in macrophages by generation of mitochondrial reactive oxygen species. *Rad Res.* 2017;187(1):32-41.

Li XF, Zhu GY, Wang JP, Wang Y. Inhibitory effects of autologous irradiated cell conditioned medium on osteoblasts in vitro. *Mol Med Rep.* 2015;12(1):273–80. doi: <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3354>

Liao MH, Tai YT, Cherng YG, Liu SH, Chang YA, Lin PI, et al. Genistein induces oestrogen receptor- $\alpha$  gene expression in osteoblasts through the activation of mitogen-activated protein kinases/NF- $\kappa$ B/ activator protein-1

and promotes cell mineralisation. *Br J Nutr.* 2014;111(1):55–63. doi: <https://doi.org/10.1017/S0007114513002043>

Linard C, Marquette C, Mathieu J, Pennequin A, Clarençon D, Mathé D. Acute induction of inflammatory cytokine expression after  $\gamma$ -irradiation in the rat: Effect of an NF- $\kappa$ B inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;58(2):427–34. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.09.039>

Mancha de la Plata M, Gas LN, Dez PM, Muoz-Guerra M, Gonzalez-Garcia R, Lee GYC, Rodriguez-Campo FJ. Osseointegrated implant rehabilitation of irradiated oral cancer patients. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70(5):1052–63. doi: <https://doi.org/10.1016/j.joms.2011.03.032>

Mendonça DBS, Miguez PA, Mendonça G, Yamauchi M, Aragão FJL, Cooper LF. Titanium surface topography affects collagen biosynthesis of adherent cells. *Bone.* 2011;49(3):463–72. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.04.019>

Misch CE. *Implantes dentais contemporâneos.* 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Nicolay NH, Lopez Perez R, Debus J, Huber PE. Mesenchymal stem cells - A new hope for radiotherapy-induced tissue damage? *Cancer Lett.* 2015;366(2):133–40. doi: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.06.012>

Nooh N. Dental implant survival in irradiated oral cancer patients: a systematic review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2013;28(5):1233–42. doi: <https://doi.org/10.11607/jomi.3045>

Okuno E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes: acidente radiológico de Goiânia. *Estudos avançados.* 2013;27(77):1899.

Oral cancer foundation. *Oral Cancer Facts.* 2012.

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;15:5. doi: <https://doi.org/10.1186/1472-6831-15-5>;

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

Raisz LG. Potential impact of selective cyclooxygenase-2 inhibitors on bone metabolism in health and disease. *Am J Med.* 2001;110(Suppl):43S-45S.

Rodríguez JP, Astudillo P, Ríos S, Pino AM.. Involvement of adipogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) in osteoporosis. *Curr Stem Cell Res Ther* . 2008;3(3):208–18. doi: <https://doi.org/10.2174/157488808785740325>

Rosa AL, Crippa GE, Oliveira PT, Taba Jr. M, Lefebvre LP, Beloti MM. Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy, *Clin. Oral Implants Res.* 2009;20:472–81.

Ruggiero SL, Fantasia J, Carlson E. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: background and Guidelines for diagnosis, staging and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;102(4):188-92. doi: <https://doi.org/10.1016/j.joms.2004.02.004>

Russell JA, Connor NP. Effects of age and radiation treatment on function of extrinsic tongue muscles. *Radiat Oncol J.* 2014;9: 254. doi: <https://doi.org/10.1186/s13014-014-0254-y>

Sinha KM, Zhou X. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *Cell Physiol Biochem.* 2013;114(5):975–84. doi: <https://doi.org/10.1002/jcb.24439>

Sonstevold T, Johannessen CA, Stuhr L. A rat model of radiation injury in the mandibular area. *Radiat Oncol J.* 2015;10(1):1–11. doi: <https://doi.org/10.1186/s13014-015-0432-6>

Sun R, Zhu G, Wang J, Tong L, Zhai J. Indirect effects of X-irradiation on proliferation and osteogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in a local irradiated rat model. *Mol Med Rep,* 2017;15(6):3706–14. doi:<https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6464>

Tang W, Li Y, Osimiri L, Zhang C. Osteoblast-specific transcription factor osterix (Osx) is an upstream regulator of Satb2 during bone formation. *J Biochem Physiol* . 2011;286(38):32995–3002. doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.244236>

Thariat J, Bolle S, Demizu Y, Marcy PY, Hu Y, Santini J, et al. New techniques in radiation therapy for head and neck cancer: IMRT,

CyberKnife, protons, and carbon ions. Improved effectiveness and safety? Impact on survival? *Anti-Cancer Drugs*. 2011;22(7):596–606. doi: <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e328340fd2b>

Vasconcellos LMR, Barbara MAM, 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 (GaAlAs): A histomorphometric study in rats. *Lasers Med Sci*. 2014;29(2): 575–80. doi:<https://doi.org/10.1007/s10103-013-1326-1>

Verdone HWD, Meijer GJ, Laurin T, Nieman FH, Stoll C, Riediger D, et al. Implant stability during osseointegration in irradiated and non-irradiated minipig alveolar bone: An experimental study. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(2):201–6. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2007.01457.x>

Wang KX, Shi Y, Denhardt DT. Osteopontin regulates hindlimb-unloading-induced lymphoid organ atrophy and weight loss by modulating corticosteroid production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(37):14777–82. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0703236104>

Wang Y, Xiu JF, Cheng Z, Luo M, Zhao P, Shang XL, et al. Proteomic Analysis of the Peritrophic Matrix from the Midgut of Third Instar Larvae, *Musca domestica*. *Biomed Environ SciBES*. 2016; 29(1):56–65. doi: <https://doi.org/10.3967/bes2015.006>

Wang Y, Zhu G, Wang J, Chen J. Irradiation alters the differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep*. 2015;213–223. doi: <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4539>

Williams HJ, Davies AM. The effect of X-rays on bone: A pictorial review. *Eur Radiol*. 2006;16(3):619–633. doi: <https://doi.org/10.1007/s00330-005-0010-7>

Winkler IG, Sims N, Pettit AR, Barbier V, Nowlan B, Helwani F, et al. Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSC. *Blood*. 2010;116(23):4815–29. doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-253534>

Wittkowske C, Reilly GC, Lacroix D, Perrault CM. In vitro bone cell models: impact of fluid shear stress on bone formation. *Front Bioeng Biotechnol*. 2016;4. doi: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00087>

Wu M, Chen G, Li YP. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast, skeletal

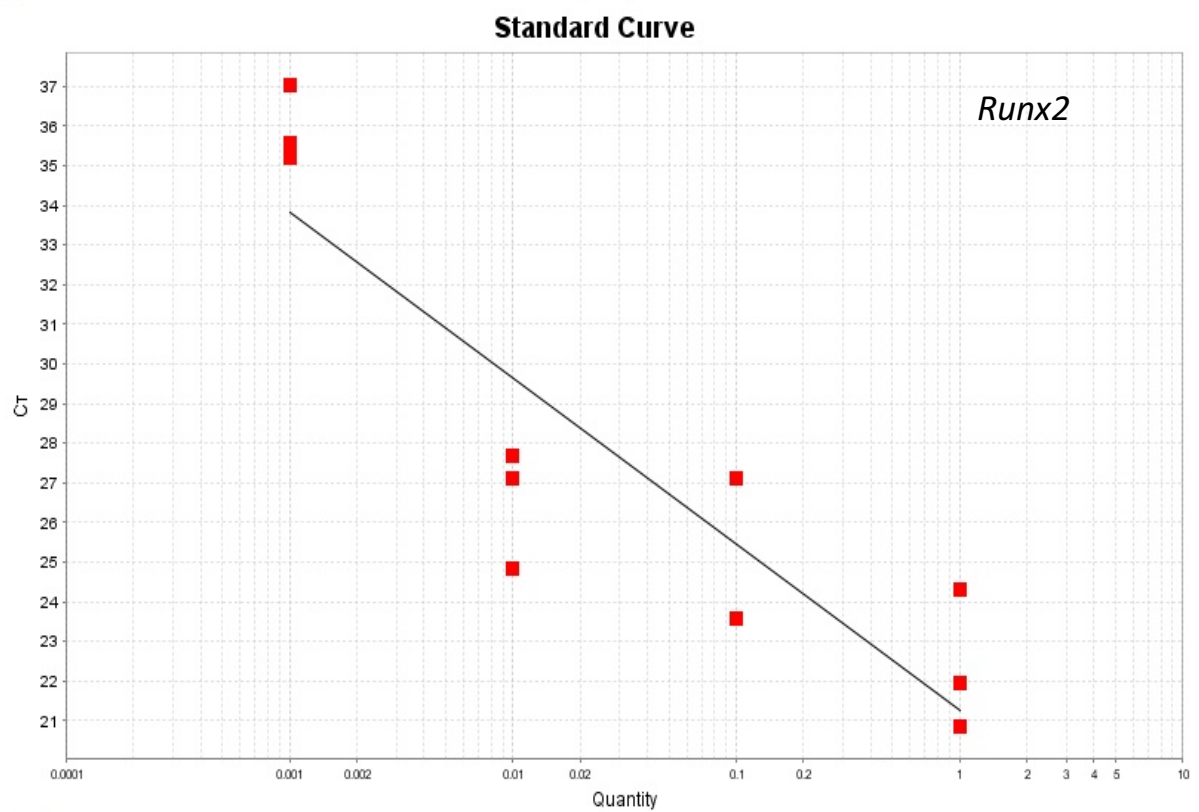
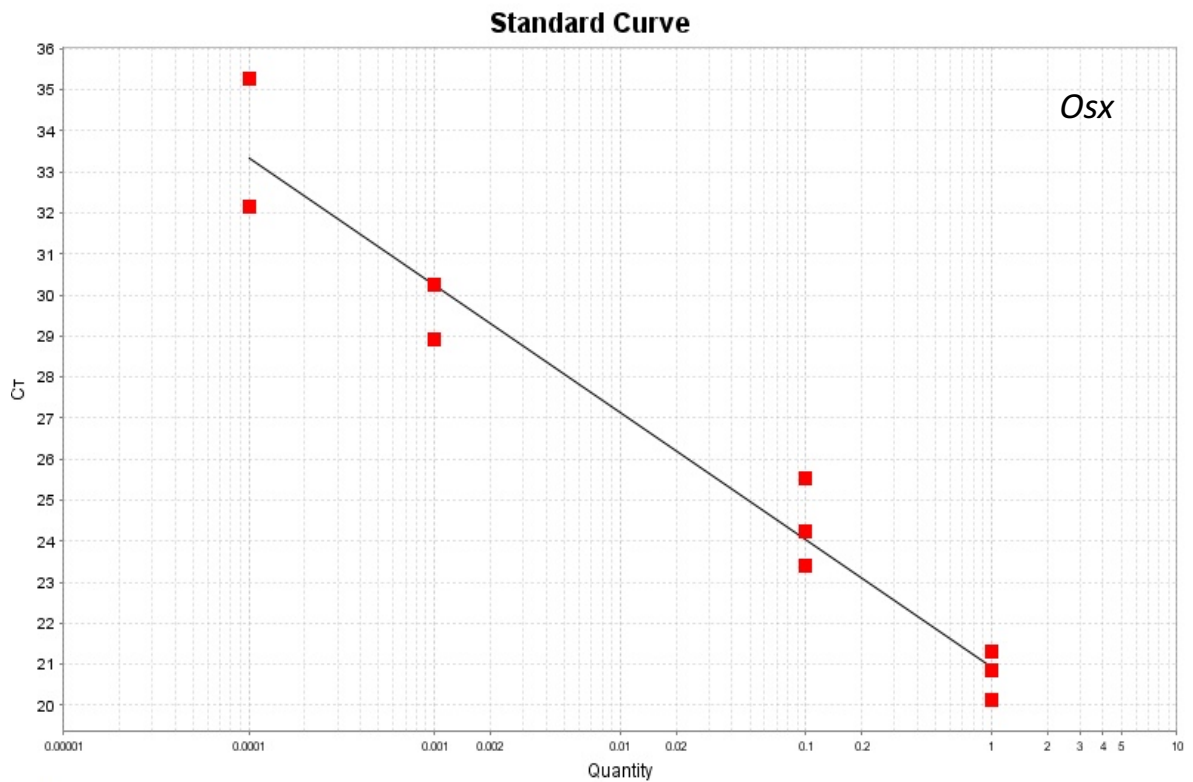
development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res.* 2016;4(March). doi: <https://doi.org/10.1038/boneres.2016.9>

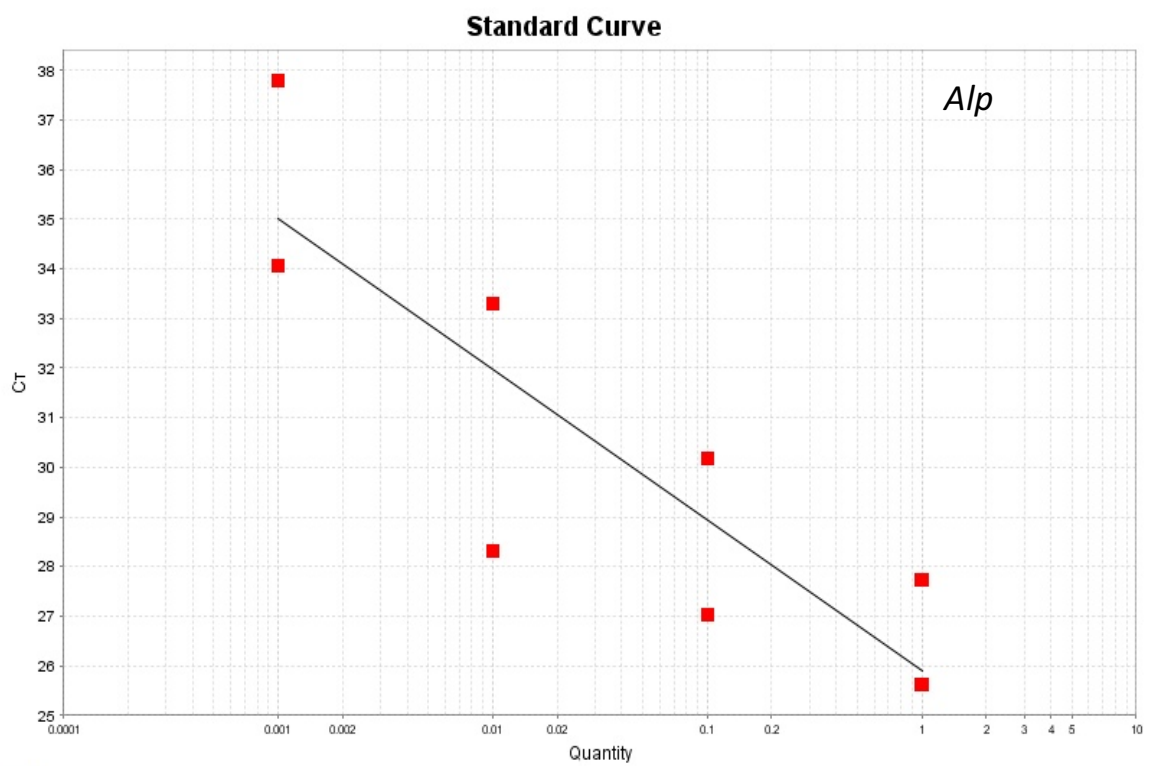
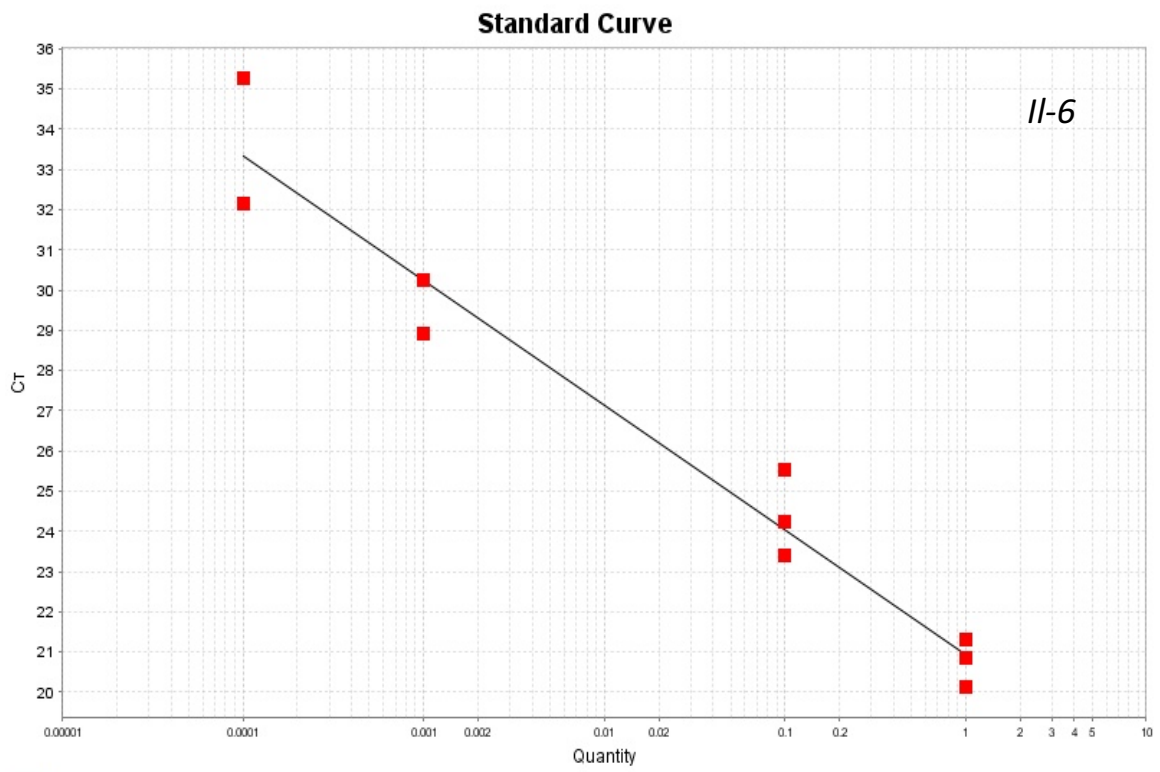
Yan L, Zhan C, Wang S, Wang S, Guo L. Genetic analysis of radiation-specific biomarkers in sinonasal squamous cell carcinomas. *Tumor Biol.* 2016;37(9):12001–9. doi: <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5057-3>

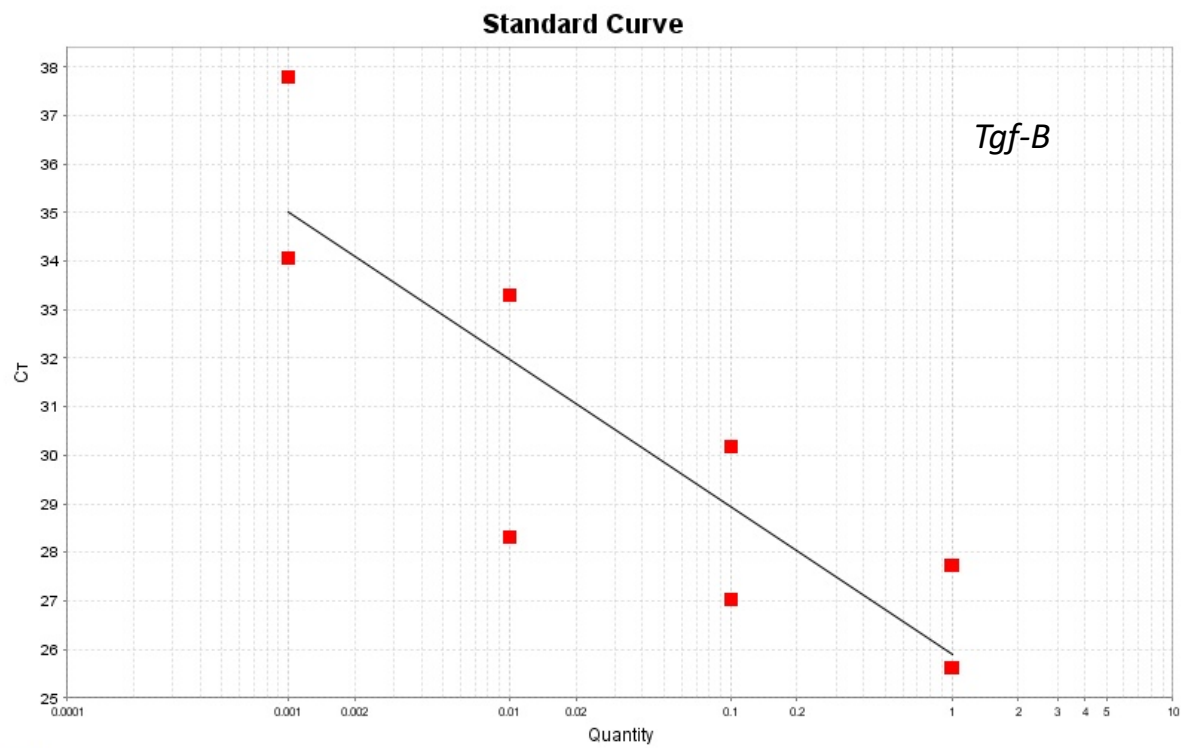
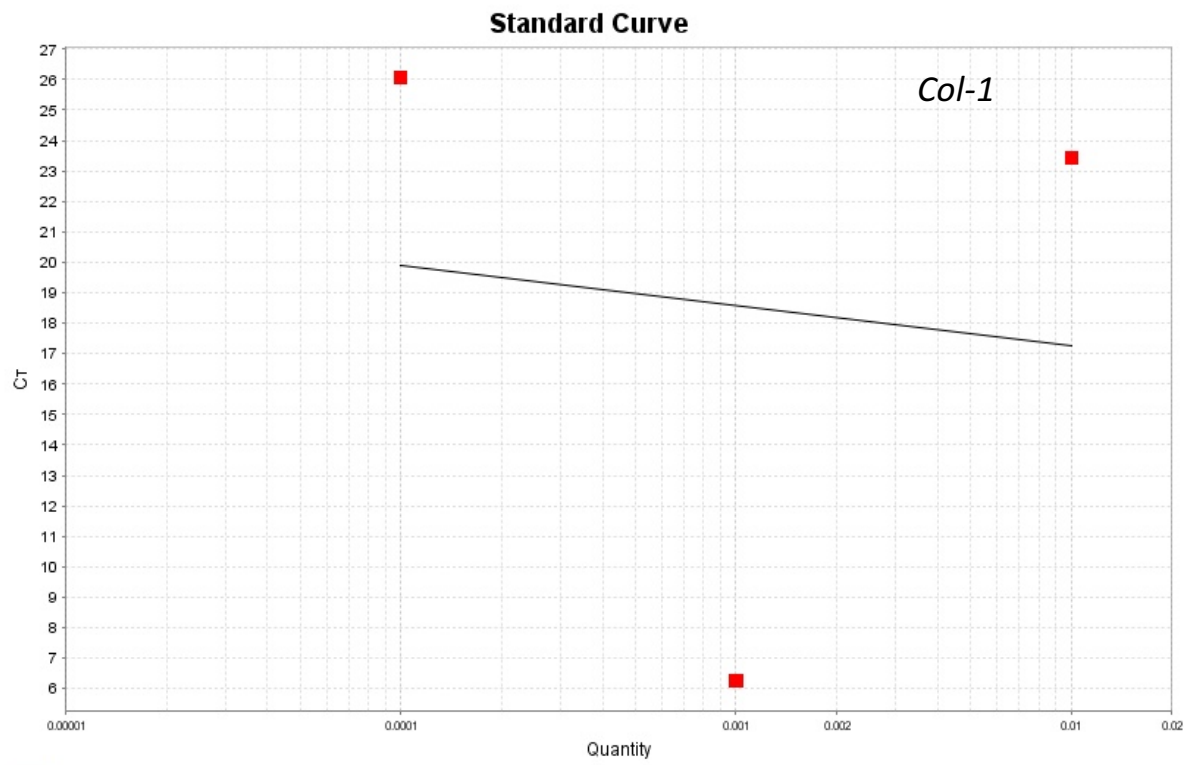
Zhang Y, Khan D, Delling J, Tobiasch E. Mechanisms Underlying the osteo and adipo differentiation of human mesenchymal stem cells. *Sci World J.* 2012;1–14. doi: <https://doi.org/10.1100/2012/793823>

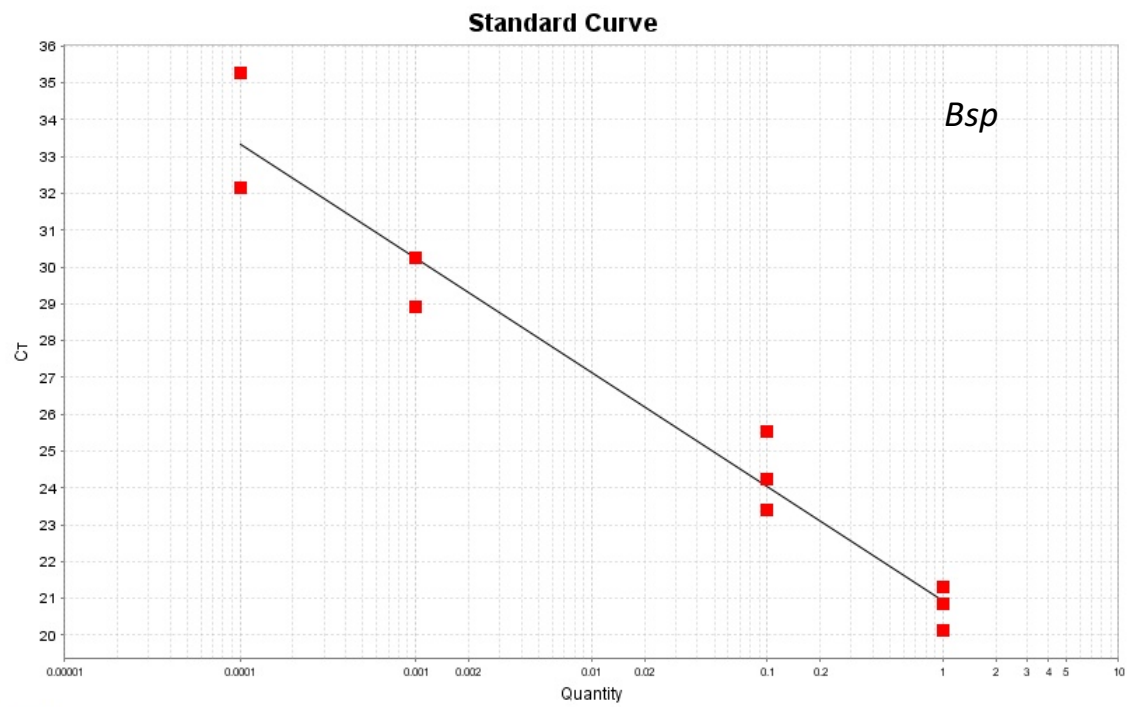
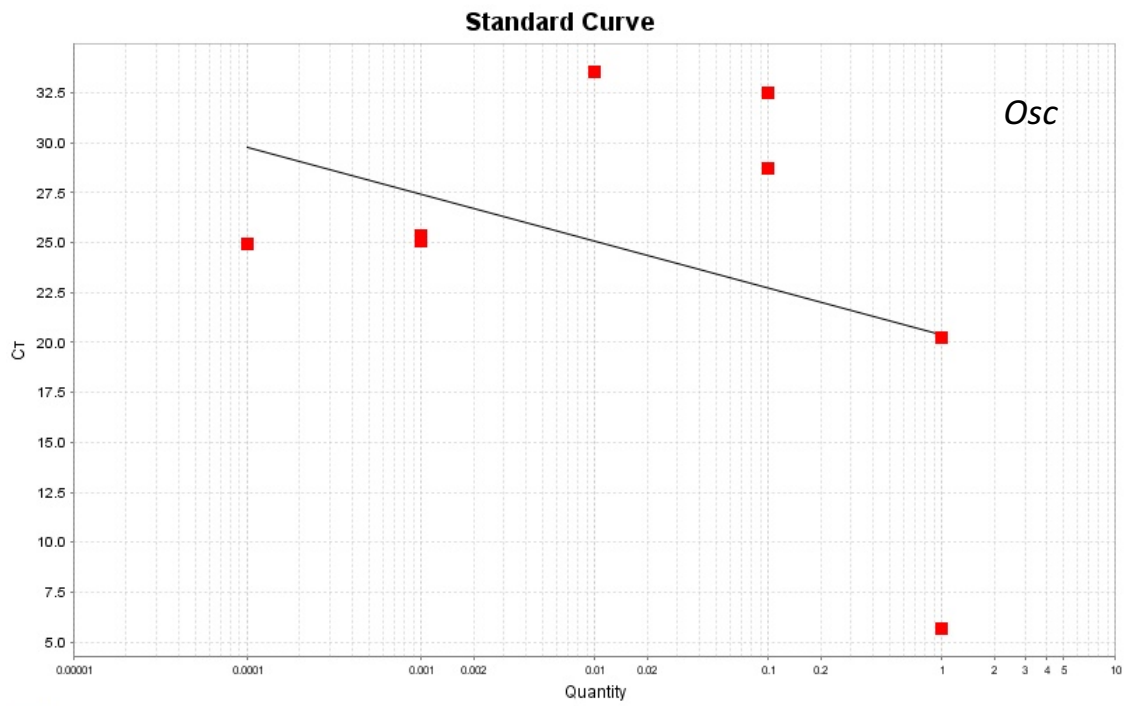
Zhou W, Liu Z, Yao J, Chi F, Dong K, Yue X, et al. The effects of exenatide microsphere on serum BGP and ALP levels in ZDF rats after implantation. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013;765–70. doi: <https://doi.org/10.1111/cid.12184>

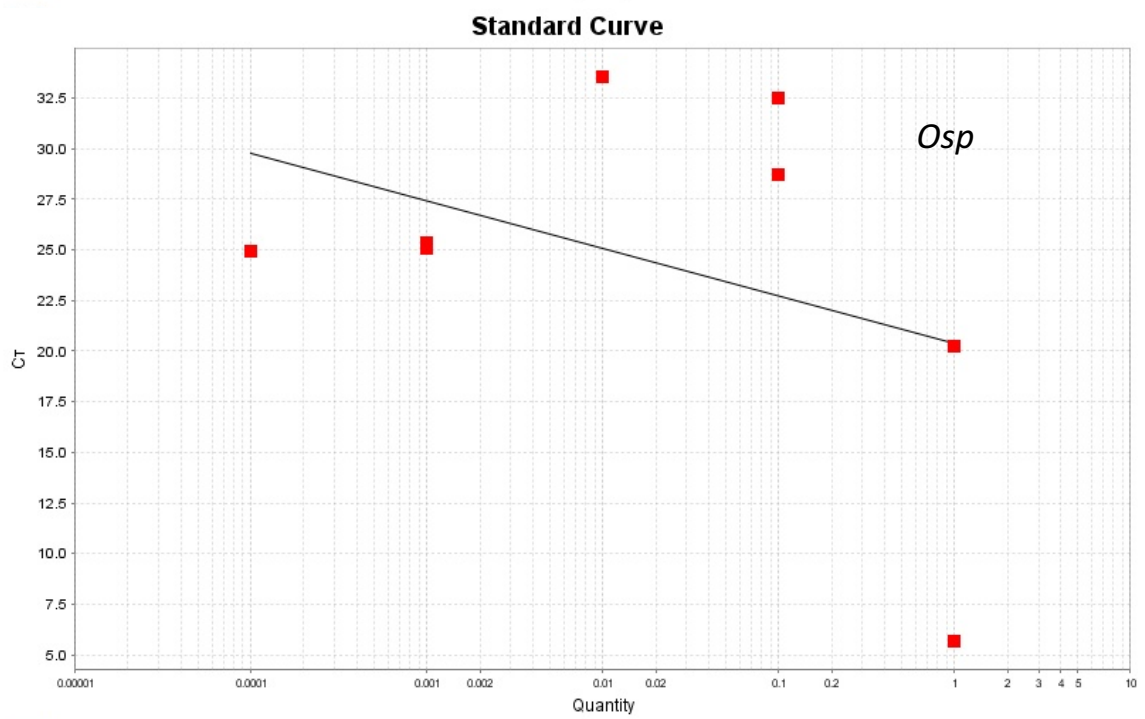
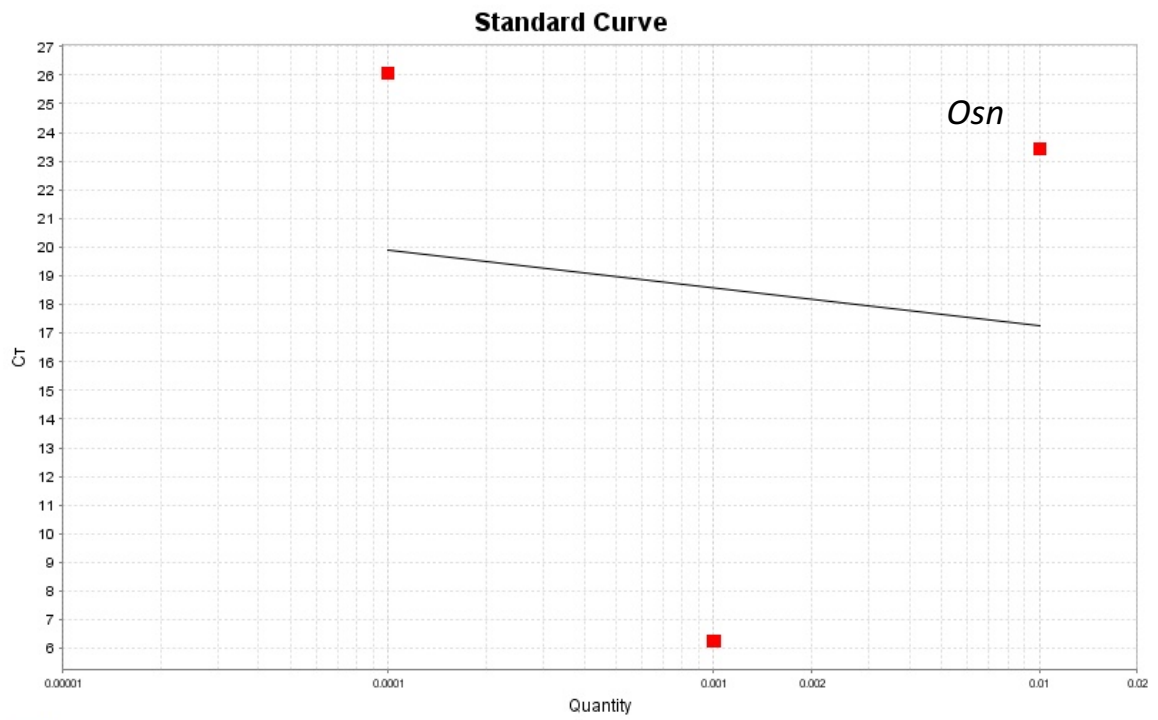
**ANEXO A** – Curvas padrão da PCR em tempo real representando a eficiência do teste.





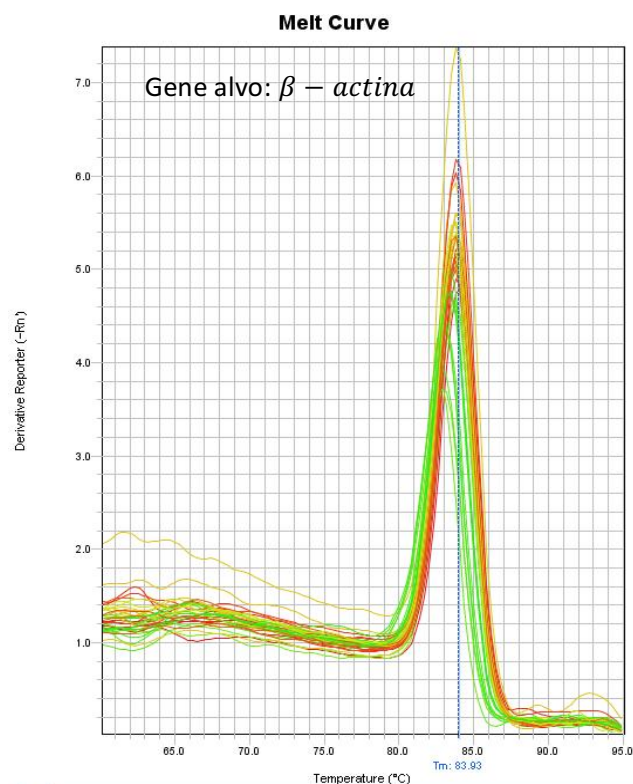
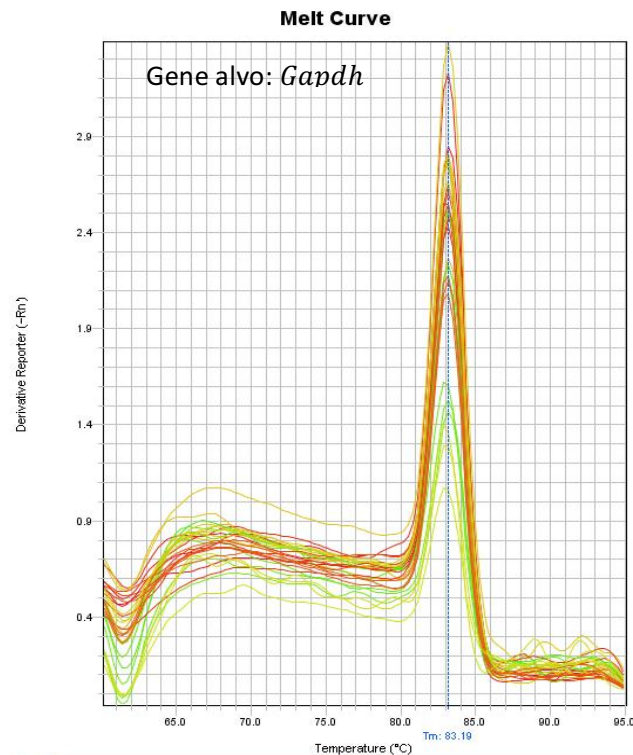


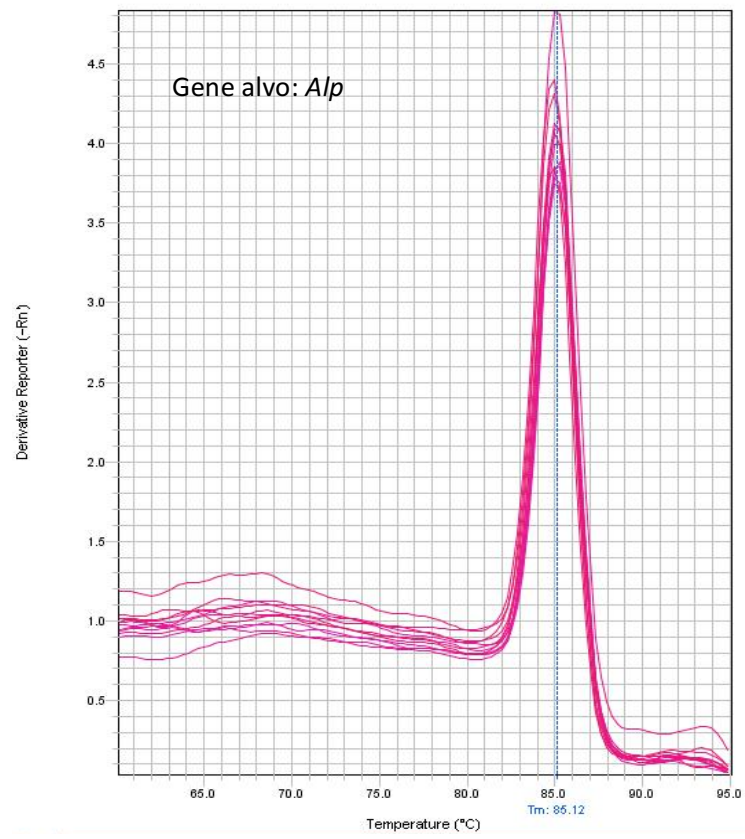
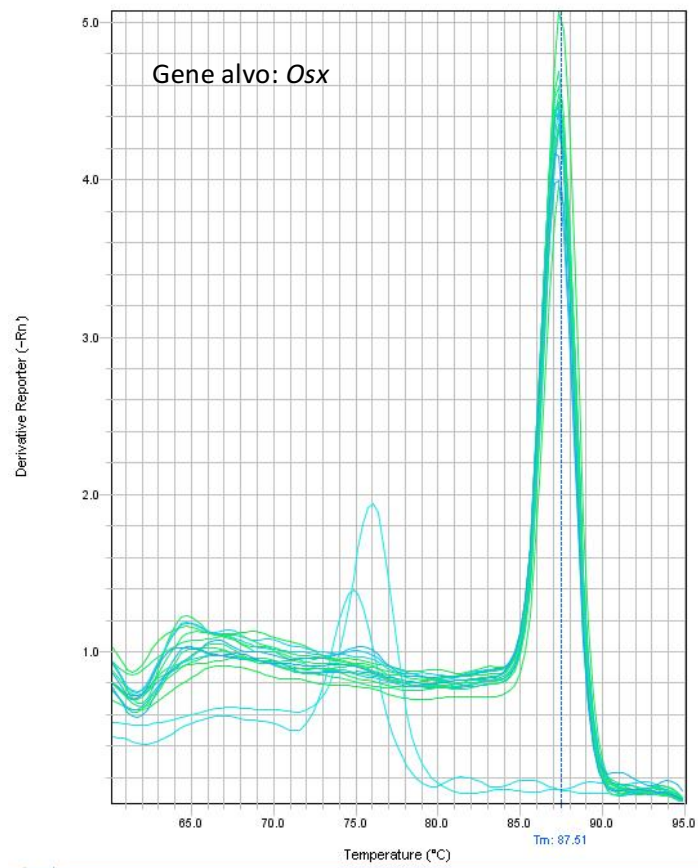




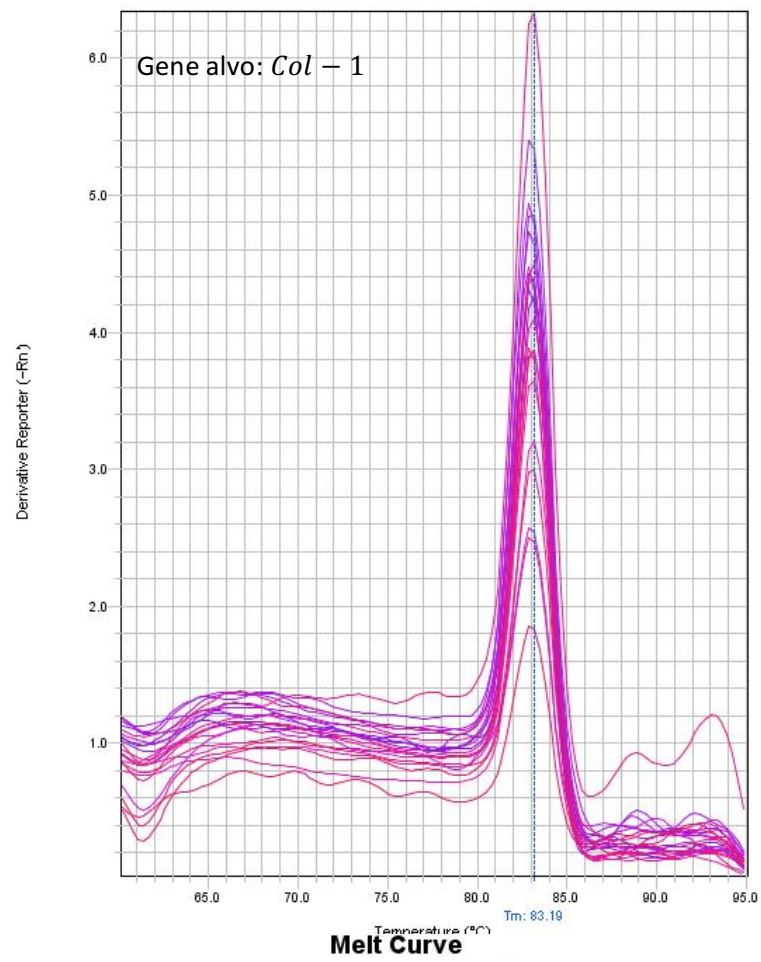
## ANEXO B – Curvas de dissociação (melting) dos primers geradas durante qRT PCR.

No eixo “y” está a derivada que indica a taxa de mudança da fluorescência do SYBR Green em função da temperatura. No eixo “x” está representada a temperatura.

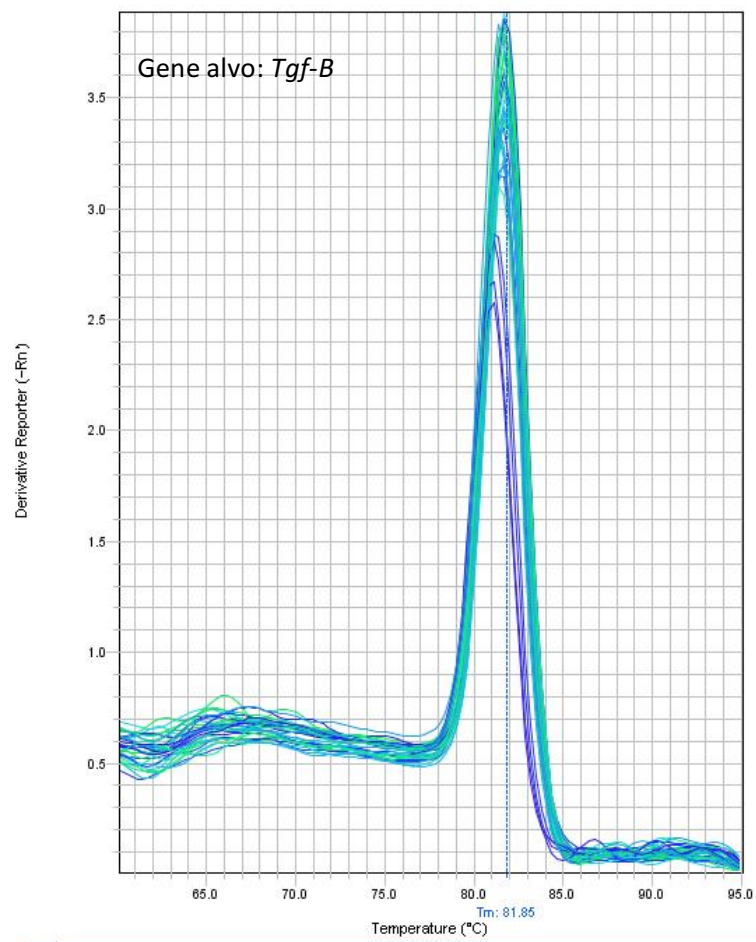


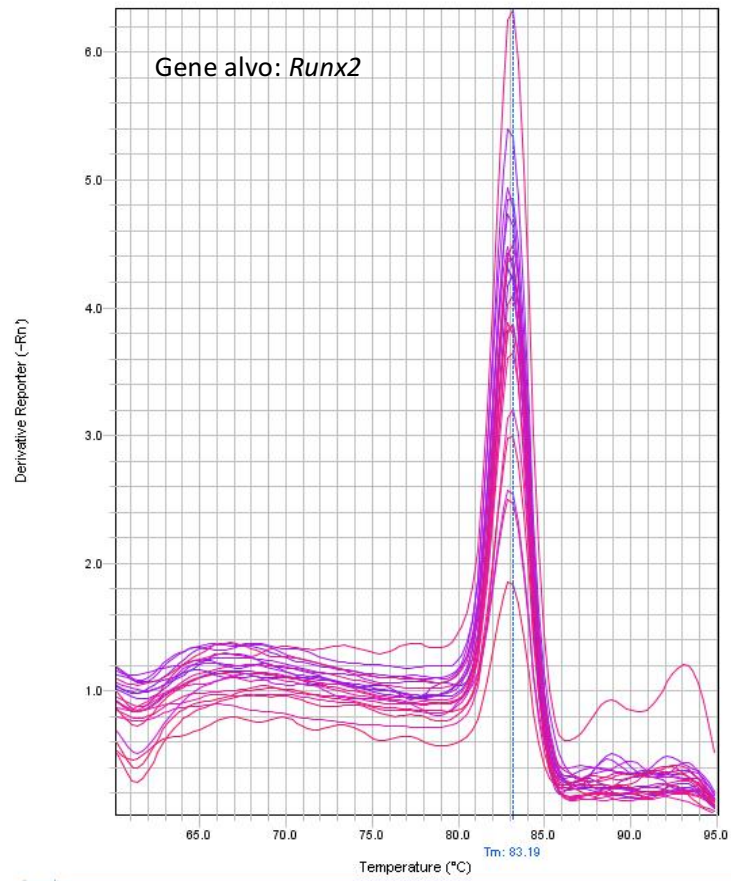
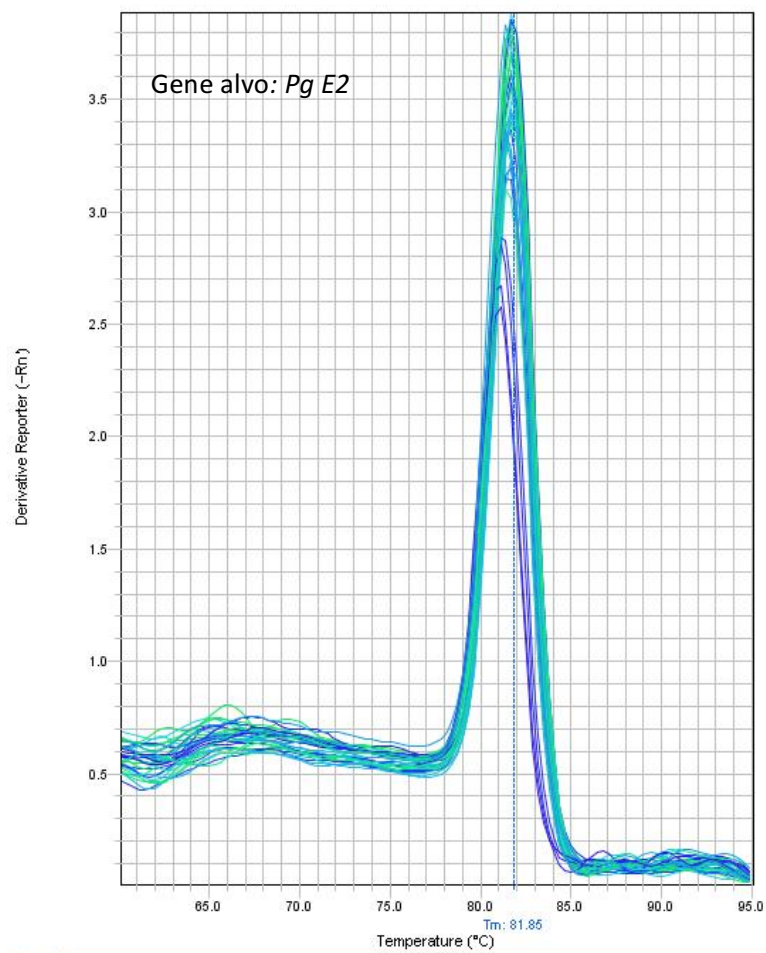
**Melt Curve****Melt Curve**

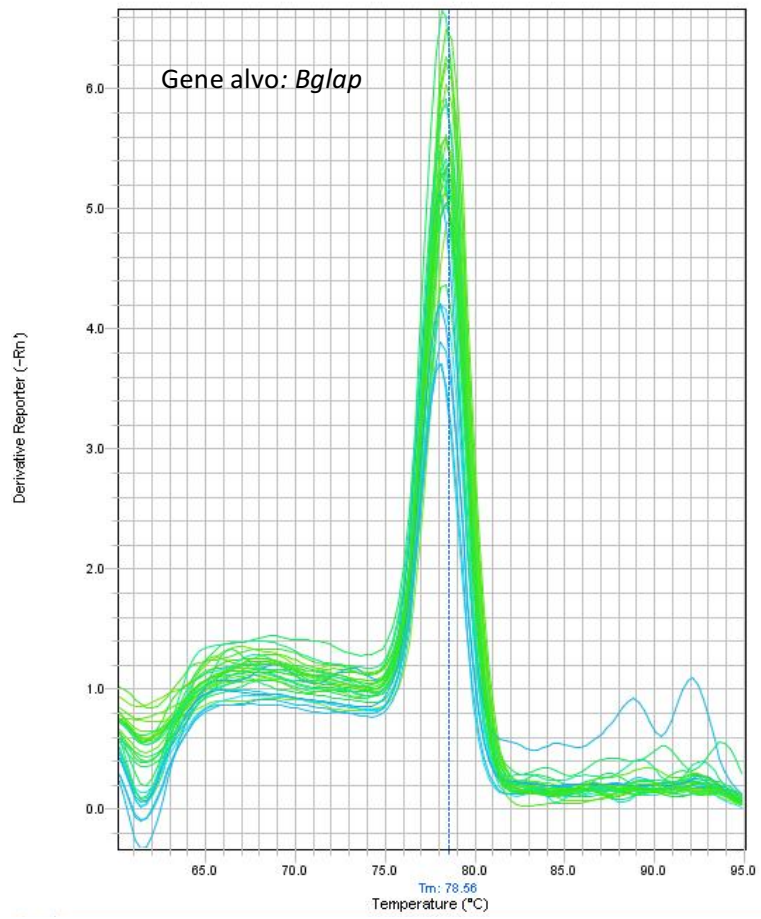
## Melt Curve



## Melt Curve



**Melt Curve****Melt Curve**

**Melt Curve****Melt Curve**