



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

MARIANA RAQUEL DA CRUZ VEGIAN

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

2018

MARIANA RAQUEL DA CRUZ VEGIAN

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

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

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

São José dos Campos

2018

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

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

Vegian, Mariana Raquel da Cruz

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

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

Orientador: Luana Marotta Reis de Vasconcellos
Coorientador: Gabriela de Fátima Santana- Melo

1. Remodelação óssea. 2. Implantes de titânio. 3. Citocinas. 4. Osseointegração. 5. Radiação ionizante. I. Vasconcellos, Luana Marotta Reis de , orient. II. Santana- Melo, Gabriela de Fátima, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profª Adj. Luana Marotta Reis de Vascellos (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Dra. Ritchelli Ricci

Universidade do Vale do Paraíba (Univap)

Campus de São José dos Campos

Profª Dra. Marianne Spalding

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 02 de maio de 2018.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gratidão!

SUMÁRIO

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

O sistema esquelético é um dos alvos mais relevantes que se correlaciona com a lesão induzida por radiação (Hu et al., 2010; Wang et al., 2016), sendo que a injúria causada no tecido ósseo varia desde osteopenia até osteoradionecrose (Williams, Davies, 2006). Os pacientes portadores de tumores de cabeça e pescoço, geralmente são submetidos à radioterapia durante o tratamento (Mancha De La Plata et al., 2012). Contudo, posteriormente ao tratamento radioterápico, muitos destes pacientes necessitam de reabilitação oral, para repor perdas dentárias ou ainda para o restabelecimento de deformidades causadas por ressecção cirúrgica devido ao tumor. Os implantes dentários têm um papel crucial nesta reabilitação, entretanto, nesta situação o tratamento com implantes torna-se um desafio, uma vez que o osso, no qual os implantes serão inseridos, foi irradiado (Pompa et al., 2015).

A osseointegração pode ser prejudicada devido à diminuição da vascularização e da vitalidade óssea decorrentes da radioterapia (Verdonck et al., 2008). Também é descrita a progressiva fibrose de vasos e tecidos moles (Pompa et al., 2015). Estes efeitos resultam em maior reabsorção peri-implantar no osso irradiado (Brasseur et al., 2006; Brogniez et al., 2002) e menor capacidade de cicatrização (Pompa et al., 2015). A radioterapia focal promove efeitos prejudiciais no tecido ósseo quando ele está no campo irradiado (Chandra et al., 2015; Hu et al., 2010), e os sinais primários do dano ósseo incluem a perda da atividade funcional

dos osteoblastos (Chandra et al., 2015), maior quantidade de tecido adiposo no osso medular e diminuição da microvascularização (Williams, Davies, 2006). Além disso, Zou et al. (2016) demonstraram que o dano causado na região óssea, que recebe radiação, é dependente do tempo após a exposição, bem como da quantidade de osso e qualidade (força e microarquitetura) do esqueleto circunjacente que não foi exposto à radiação.

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

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

Tanto a destruição do tumor como a indução de lesões indesejáveis nos tecidos normais podem ocorrer por um mecanismo de interação que age sobre o DNA nuclear, causando morte celular ou dificuldade de multiplicação. Este mecanismo pode ser consequência tanto de uma ação direta, quando a radiação atua na clivagem do DNA, quanto de uma ação indireta, na qual há dissociação da água em íons (H^+ e OH^-) e este íon OH^- reage com as bases nitrogenadas do DNA, interferindo também na multiplicação celular (Caldas et al., 1970). A interação entre as radiações ionizantes e as células depende da energia absorvida pelas moléculas. Os efeitos biológicos dessa interação estão relacionados à dose, transferência linear

de energia, fracionamento e radiosensibilidade celular (Instituto Nacional do Câncer, 2008).

A dose necessária para tratamentos neoplásicos, baseia-se na localização e no tipo de malignidade, e se a radioterapia será utilizada unicamente ou em combinação com outras modalidades de tratamentos. A maioria dos pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço recebem uma dose total entre 50 e 70 Gy (Vissink et al., 2003). Doses únicas de 20-30 Gy estão associadas a alterações na morfologia e fibrose muscular, enquanto que doses fracionadas maiores que 14 Gy causam apoptoses em células endoteliais (Gallet et al., 2011). Recentemente, Chandra et al. (2014) verificaram maior perda funcional de osteoblastos após radioterapia com dose total de 16 Gy, devido ao maior número de apoptose destas células.

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

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

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

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

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

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

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

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi elucidar as alterações induzidas pela radiação ionizante, em modelo animal com implantes recém instalados, avaliando o efeito modulador sistêmico e local ao simular uma dose total de radiação utilizada em tratamento radioterápico convencional para pacientes oncológicos, por meio da avaliação dos níveis sanguíneos das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 e a atividade de células envolvidas na remodelação óssea presentes na interface osso-implante, quantificadas por meio de marcadores imuno-histoquímicos para osteocalcina (OC) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comitê de Ética

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

3.2 Implantes e procedimento cirúrgico

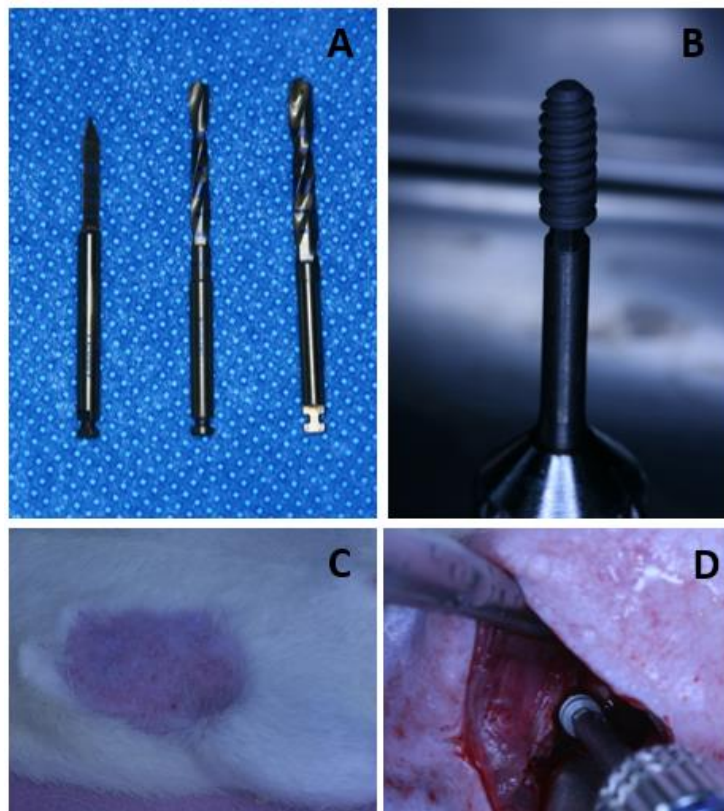
Implantes rosqueados de titânio grau V medindo 2,5 mm de diâmetro por 6,0 mm de comprimento foram produzidos para este projeto pela empresa Emfils (Itu, São Paulo, Brasil).

Quarenta e cinco ratos com 90 dias e pesando cerca de 300 g, foram usados neste estudo. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Unesp (Botucatu, SP, Brasil) e permaneceram durante o experimento no Biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia/UNESP (São José dos Campos, SP, Brasil) em gaiolas (n=5) onde receberam água e ração *ad libitum*. O ambiente foi cuidadosamente monitorado para manter a temperatura em torno de 20°C.

Após 45 dias de adaptação ao ambiente, com ciclos diários alternando 12 h correspondentes ao período de luz e ao período noturno, foi iniciado o experimento. Os animais foram divididos, aleatoriamente, de acordo com o tratamento: a) Grupo Sem-Irradiação (S-Ir): cirurgia de colocação dos implantes (grupo controle com tecido sadio sem exposição à radiação); b) Grupo Irradiação Posterior (IrPos): cirurgia de colocação dos implantes e primeira irradiação após 24 h; c) Grupo Irradiação Prévia (IrPrev): irradiação e após 4 semanas cirurgia de colocação dos implantes.

Para os procedimentos cirúrgicos foi preparada uma mistura de cloridrato de xilazina (Anasedan - Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil) com ketamina (Dopalen - Agibrands Brasil Ltda, Paulínia, SP, Brasil), nas proporções de 0,8 ml e 0,5 ml, respectivamente e administrados por via intramuscular na dose de 0,1 ml / 100 g de peso dos animais. Após isso, foi realizada a tricotomia local e incisão para exposição do fêmur direito. A perfuração do osso foi realizada utilizando brocas sequenciais de 2,0, 2,3 e 2,5 mm de diâmetro e em seguida os implantes foram instalados e o local foi suturado com fio de seda 3.0 (Ethicon, Johnson & Johnson) (Figura 1).

Figura 1 – Materiais e procedimento para a colocação do implante

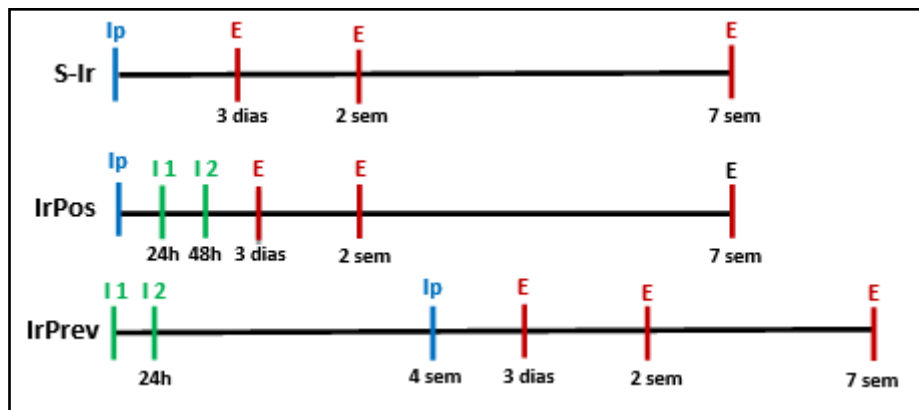


Legenda: (A) brocas para realizar perfuração; (B) implante posicionado na chave auxiliar; (C) tricotomia local; (D) colocação do implante de Ti grau V com chave auxiliar.

Fonte: Elaborada pelo autor

Após os procedimentos, os animais foram alocados em gaiolas com n=5 por grupo e monitorados até o período da eutanásia de 3 dias, 2 semanas e 7 semanas (Figura 2).

Figura 2 – Representação esquemática dos diferentes tratamentos e períodos de eutanásia



Legenda: S-Ir=grupo Sem-Irradiação; IrPos=grupo Irradiação Posterior; IrPrev=grupo Irradiação Prévia; Ip=implante; E=eutanásia; I=irradiação; sem=semanas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.3 Procedimentos de irradiação

Inicialmente os animais foram anestesiados com a mistura de anestésicos utilizada na cirurgia, e imobilizados, em um dispositivo desenvolvido especialmente para este estudo, visando a padronização da aplicação em todos os animais, com os membros inferiores imobilizados para evitar movimentação durante a exposição à fonte de radiação (Figura 3).

As irradiações simularam um tratamento radioterápico com doses baseadas no modelo animal utilizado e nos tecidos atingidos conforme descrito por (Cunha et al. 2007). Para este procedimento foi utilizado um irradiador de teleterapia modelo Eldorado 76 da *Atomic Energy of Canadian Limited* (Canadá), com uma fonte de radiação-gamma ^{60}Co , localizada no Instituto de Estudos Avançados (IEAv) do Departamento de Ciência e Tecnologia Aeroespacial (DCTA), em São José dos

Campos, São Paulo. As irradiações de 30 Gy foram divididas em dois procedimentos de, aproximadamente, 15 Gy cada, com seções que duravam cerca de 1 h e 18 min por dia, sendo dois animais irradiados simultaneamente por seção. Para padronização, as irradiações foram realizadas com intervalos de 24 h e a distância entre a fonte e os sítios de irradiação foi de 0,9 metros.

A região irradiada foi selecionada com auxílio da fonte luminosa para direcionar a fonte de radiação aos locais de interesse e restringir ao máximo possível os tecidos afetados. Após o posicionamento dos animais, uma placa de acrílico foi colocada na região selecionada para evitar dispersão dos raios-gamma (Figura 3).

Figura 3 – Imobilização dos espécimes e disposição abaixo da fonte Eldorado 76



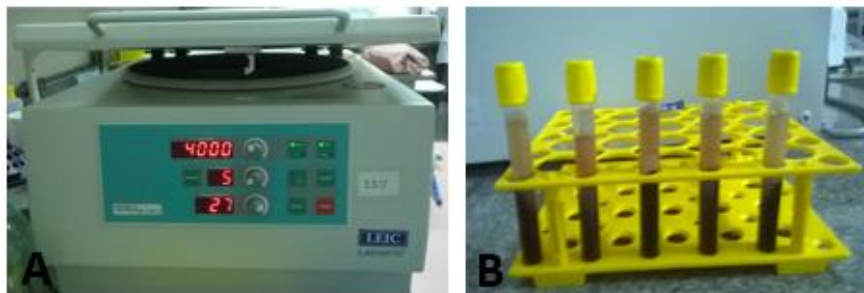
Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4 Coleta e armazenamento do soro

Foram coletados, aproximadamente, 5 ml de sangue via punção cardíaca de todos os animais, previamente à eutanásia, em todos os períodos mencionados. A coleta foi realizada utilizando seringas de 5 ml e após a coleta o sangue foi transferido para tubos à vácuo com gel separador de coágulo (Labor Import, Osasco, SP, Brasil), os quais foram deixados em estante para sedimentação por 30 min. Após esse período os tubos foram colocados em centrífuga (Labnet Z400, Edison,

NJ, EUA) por 5 min em rotações de 4000 rpm, para separação do soro (Figura 4). Em seguida, o soro foi retirado dos tubos à vácuo com micropipetas e armazenado em microtubos, devidamente identificados, a -20°C até o momento da realização dos testes.

Figura 4 – Separação do soro sanguíneo



Legenda: a) centrífuga Labnet Z400 programada; b) tubos à vácuo após centrifugação.
Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5 Análise das citocinas

Os níveis das citocinas foram mensurados utilizando o método imunoenzimático (ELISA), com os kits específicos para IL-1 β (DY501, R&D Systems, Minnesota, EUA), IL-10 (DY522, R&D Systems, Minnesota, EUA) e TNF- α (DY410, R&D Systems, Minnesota, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Para análise das citocinas, a placa de microtitulação de 96 poços (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) foi sensibilizada com anticorpos de captura de rato anti-TNF- α , anti-IL-1 β e anti-IL-10 dos kits, e mantida *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, a placa foi lavada com tampão de PBS com 0,05% de Tween20 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e bloqueada com 300 μ L / poço de tampão de bloqueio, PBS com 1% de albumina bovina sérica (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) por 1 h à temperatura ambiente. Após, a placa foi lavada e as amostras de soro foram distribuídas nos poços (100 μ L / poço), incubadas 2 h à temperatura ambiente. A seguir, a placa foi lavada e foram acrescentados 100 μ L / poço de anticorpos de

detecção de rato de cada citocina, fornecidos nos kits, marcados com biotina. Após 2 h, foi acrescentada estreptoavidina (100 μ L / poço) e a placa foi mantida por 20 min coberta com papel alumínio para evitar luz direta.

Após mais uma lavagem, a reação foi revelada com 100 μ L / poço de solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio. Após 20 min, foram adicionados em cada poço 50 μ L de solução *stop* (ácido sulfúrico 2 N) e as densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas (Elx 808, Biotek Instruments Inc., Vermont, EUA), com comprimento de onda de 450 nm e os resultados foram expressos em densidades ópticas (DO).

3.6 Processamento histológico dos espécimes

Após a eutanásia, o fragmento ósseo contendo o implante inserido no fêmur direito de cada rato foi fixado em formol tamponado 10% por um período mínimo de 48 h. Em seguida, as peças foram desmineralizadas por meio de imersão em solução de ácido etilenodinitrotetracético (EDTA Titriplex III, EMD Millipore, Massachusetts, EUA) por um período aproximado de 40 dias. Durante o processo de desmineralização, foi verificado o momento ideal para a remoção dos implantes da peça óssea e somente o fragmento ósseo continuou no processamento histológico convencional para os testes imuno-histoquímicos.

Após a desmineralização, as peças foram armazenadas em cassetes plásticos e colocadas em um equipamento histotécnico (Leica TP1020, Wetzlar, Alemanha) para posterior inclusão em parafina. No histotécnico, as peças foram desidratadas em uma série de etanol, diafanizadas em xilol e por último receberam banhos de parafina. Todo procedimento durou por um período aproximado de 13 h e 30 min. Em seguida, as peças foram incluídas em blocos de parafina para realização dos cortes histológicos para imuno-histoquímica, os mesmos foram realizados longitudinalmente na interface osso-implante com 3,5 μ m de espessura em lâminas silanizadas.

3.7 Análise imuno-histoquímica

A reação imuno-histoquímica foi realizada pelo método da imunoperoxidase utilizando como marcadores imuno-histoquímicos os anticorpos primários para Osteocalcina - OC (sc-365797, Santa Cruz Biotechnology, EUA) e para Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato – TRAP (ab185716, Abcam, Cambridge, Reino Unido). A diluição, tempo / temperatura de incubação e recuperação antigênica utilizados para cada marcador, estão listados no quadro 1.

Quadro 1 – Diluição, incubação e recuperação antigênica

Marcador	Diluição	Incubação	Recuperação antigênica
Anti-osteocalcina	1:100	4 °C, <i>overnight</i>	Citrato
Anti-TRAP	1:200	4 °C, <i>overnight</i>	Citrato

Fonte: Elaborado pelo autor.

As lâminas com os cortes histológicos foram submetidos a reação de imuno-histoquímica mediante a realização dos seguintes procedimentos:

- a) desparafinização em 2 banhos de xilol (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 15 min cada, primeiro em estufa a 60°C e posteriormente em temperatura ambiente;
- b) reidratação em uma série de etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) em concentrações decrescentes: absoluto e 95% por 5 min, 90%, 80% e 70% por 3 min;
- c) lavagem em água corrente por 10 min e passagem em água destilada;
- d) recuperação antigênica ocorreu com a colocação das lâminas em uma cuba de vidro contendo citrato (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 10 mM

- pH 6,0; as cubas foram levadas ao forno microondas (Panasonic, Kadoma, Japão) e foram submetidas a 2 ciclos consecutivos de 3 min na potência 5, seguida de resfriamento a temperatura ambiente por 30 min;
- e) lavagem em água corrente por 10 min, seguida por duas passagens em água destilada;
 - f) bloqueio da peroxidase endógena tecidual: incubação com 150 mL de peróxido de hidrogênio 20 volumes (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil) e 150 mL de álcool metílico (Merck, Darmstadt, Alemanha) duas vezes, por 5 min cada;
 - g) lavagem em água corrente por 10 min, seguida por duas passagens em água destilada e imersão por duas vezes em solução Tris (pH 7,4), durante 5 min cada;
 - h) incubação com soro albumina bovina - BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) por 1 h, em câmara úmida específica para técnica de imuno-histoquímica (Erviagas, São Paulo, SP, Brasil), para bloqueio dos anticorpos inespecíficos;
 - i) lavagem rápida com solução Tris (pH 7,4);
 - j) incubação dos anticorpos primários diluídos em diluente universal (DAKO, Carpinteria, CA, USA), de acordo com os parâmetros descritos no quadro 1.

Todos os procedimentos a seguir foram precedidos por duas lavagens em solução Tris (pH 7,4), durante 5 min cada:

- a) incubação com o anticorpo secundário Universal Envision (DAKO, Carpinteria, CA, EUA) por 30 min a temperatura ambiente;
- b) incubação com solução de diaminobenzidina (Dako Liquid DAB, Carpinteria, CA, EUA), por 3 min para TRAP e 5 min para OC;
- c) lavagem em água corrente por 10 min seguida por duas passagens em água destilada;

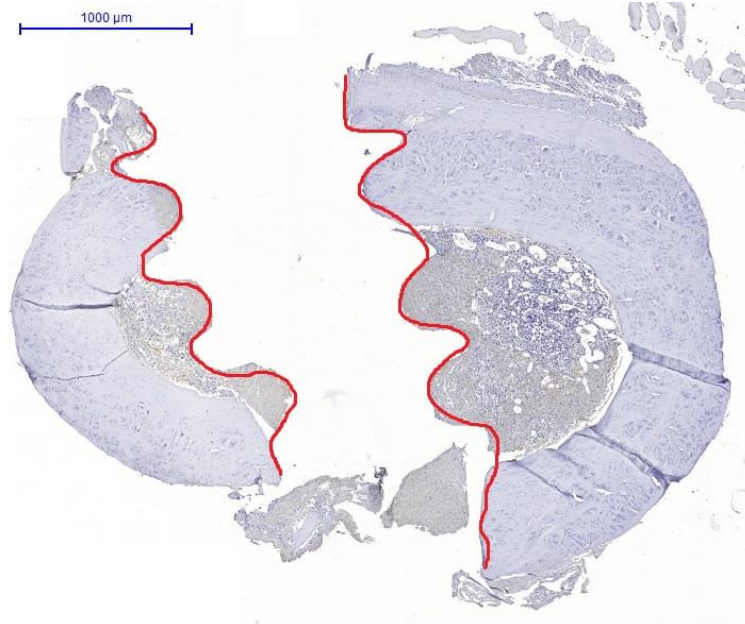
Posteriormente, realizou-se a contra-coloração dos cortes com hematoxilina de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 40 s, lavagem por 5 min em água corrente seguida de duas passagens em água destilada, desidratação em cadeia crescente de etanol (70%, 80%, 90% e absoluto) por 5 min cada, diafanização em xilol por 10 min e montagem com Permount (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

Para a validação da metodologia empregada na análise imuno-histoquímica, os controles negativos foram obtidos dos cortes histológicos dos respectivos grupos estudados e submetidos ao protocolo descrito, porém, no momento da incubação dos anticorpos primários OC e TRAP, foi feita a substituição dos mesmos pelo diluente universal (DAKO, Carpinteria, CA, USA).

Após o término da imuno-histoquímica as lâminas foram escaneadas pelo *Scanner Panoramic Desk* (3DHistech, Budapeste, Hungria) e analisadas por meio do programa *Pannoramic Viewer* para a análise histomorfométrica. Foram avaliadas 5 lâminas contendo 3 cortes histológicos, por grupo e por período estudado para cada anticorpo. Dentre estas lâminas, um corte de cada lâmina foi separado aleatoriamente para análise histomorfométrica.

A mensuração da porcentagem de células imunomarcadas para os anticorpos TRAP e OC foi realizada em toda a extensão da região de contato osso-implante como demonstrado na figura 5. Inicialmente foi realizada uma análise qualitativa com base nos escores de coloração de células imunomarcadas para cada anticorpo da seguinte forma: negativo (-), positivo (+), superpositivo (++) e hiperpositivo (+++), entretanto, para realizar uma comparação quantitativa, as pontuações foram convertidas em porcentagem: 0% (equivalente a "-", coloração negativa), 20% (equivalente a "+", coloração total de 10% a 30%), 60% (equivalente a "++", coloração total de 50% a 70%) e 90% (equivalente a "+++", coloração total de 80% a 100%), as porcentagens da coloração total é referente a toda extensão analisada. Este modelo de análise foi previamente descrito na literatura (Esteves et al., 2013; Queiroz et al., 2008; dos Santos et al., 2016; dos Santos et al., 2013).

Figura 5 – Região analisada para células imunomarcadas para OC e TRAP demarcada em vermelho



Legenda: Corte transversal do fêmur.
Fonte: Elaborada pelo autor.

3.8 Análise estatística

Todos os dados foram estatisticamente analisados, inicialmente por meio do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, foi realizado o teste ANOVA *One way* e, quando necessário, o teste de comparação múltipla de Tukey para análise de diferença entre as amostras. Foi utilizado o *software GraphPad Prism 7* (San Diego, CA, USA) e o nível de significância adotado foi o valor convencional de 5%.

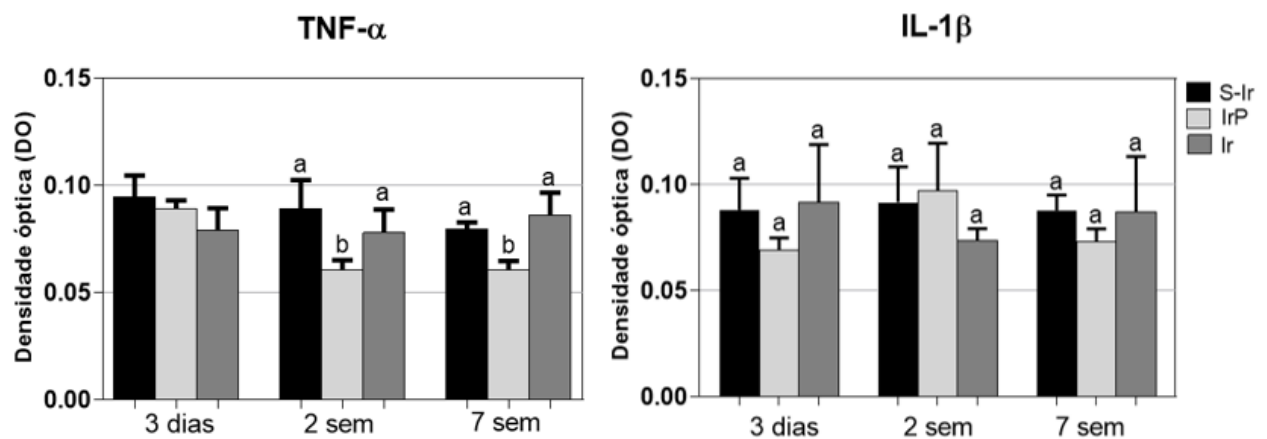
4 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram analisados por período (3 dias, 2 semanas e 7 semanas) e entre os grupos (S-Ir, IrPos e IrPrev) para verificar os efeitos da radiação ionizante durante a osseointegração antes ou depois da colocação do implante, simulando diferentes situações clínicas.

4.1 Análise das citocinas

As densidades ópticas (DO) obtidas na análise das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 das amostras de soro dos animais após os períodos de eutanásia de 3 dias, 2 semanas e 7 semanas, estão ilustradas nas figuras 6 e 7, respectivamente.

Figura 6 – Gráfico dos valores em DO das citocinas TNF- α e IL-1 β



Legenda: S-Ir=grupo Sem-Irradiação; IrPos=grupo Irradiação Posterior; IrPrev=grupo Irradiação Prévia. sem=semanas. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).
Fonte: Elaborada pelo autor.

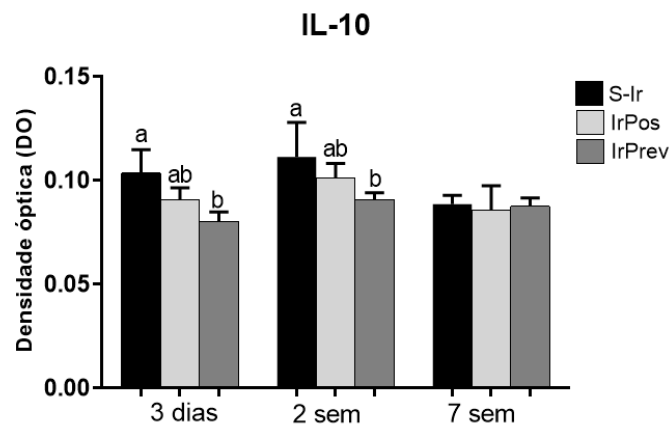
As análises das citocinas pró-inflamatórias, demonstraram que aos 3 dias da realização da cirurgia do implante, os valores mensurados de TNF- α e IL-1 β não

apresentaram diferença estatística ($p>0,05$) entre os grupos. Apesar disso, os grupos IrPos e IrPrev apresentaram os valores mais baixos de TNF- α , nesse período, comparados com o grupo S-Ir, enquanto os menores valores de IL-1 β , no mesmo período, foram demonstrados apenas por IrPos.

Nos períodos de 2 e 7 semanas os valores de TNF- α demonstraram diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre S-Ir e IrPos, e entre IrPrev e IrPos, sendo deste os menores valores apresentados.

Apesar dos valores de DO da citocina IL-1 β não apresentarem diferença estatística ($p<0,05$) entre os grupos, verificou-se em 2 semanas, aumento nos valores dessa citocina no grupo IrPos e diminuição em IrPrev, porém modulação inversa foi verificada no período de 7 semanas. Por outro lado, S-Ir manteve os valores relativamente constantes durante os períodos.

Figura 7 – Gráfico dos valores em DO da citocina IL-10



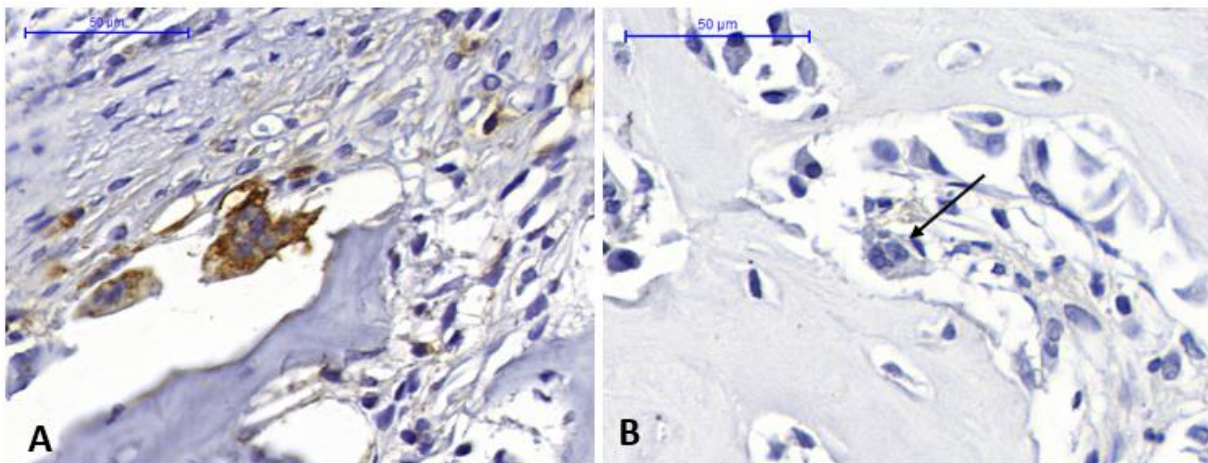
Legenda: S-Ir=grupo Sem-Irradiação; IrPos=grupo Irradiação Posterior; IrPrev=grupo Irradiação Prévia. sem=semanas. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$).
Fonte: Elaborada pelo autor.

Com relação à citocina anti-inflamatória IL-10, houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) entre S-Ir e IrPrev no período de 3 dias e 2 semanas, sendo os menores valores apresentados por IrPrev. Em 7 semanas, a variação entre os grupos não foi significativa ($p>0,05$).

4.2 Análise imuno-histoquímica

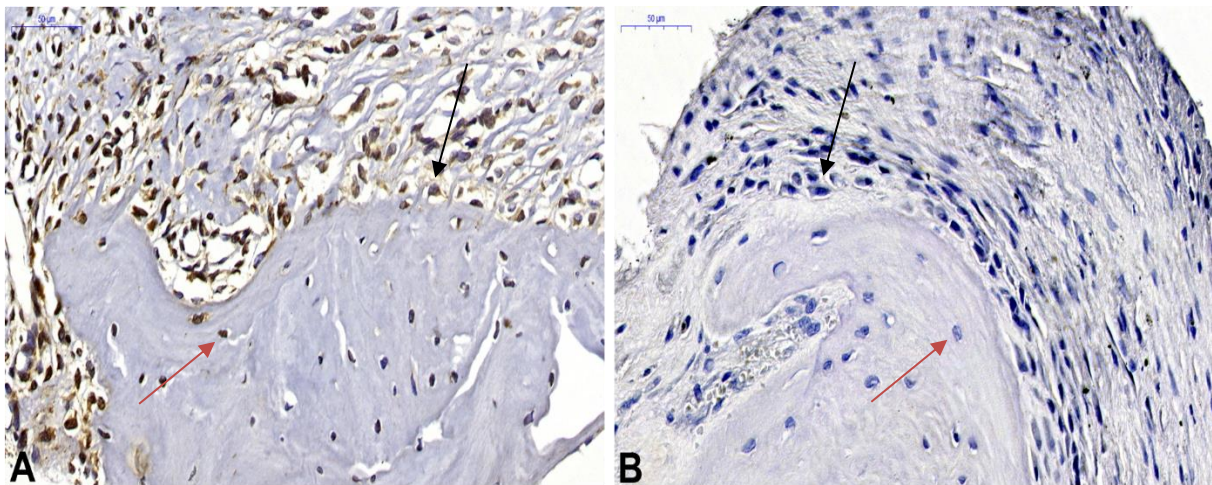
As figuras 8 e 9 representam a imunomarcção de células para os anticorpos TRAP e OC, respectivamente, de todos os grupos e períodos estudados (3 dias, 2 e 7 semanas). Os resultados estatísticos da porcentagem de células imunomarcadas para TRAP e OC na região osso-implante estão representados na figura 10.

Figura 8 – Fotomicrografia da imuno-histoquímica para TRAP



Legenda: (A) osteoclastos imunomarcados para TRAP; (B) controle negativo com osteoclasto não marcado indicado pela seta. Interface osso-implante.
Fonte: Elaborada pelo autor.

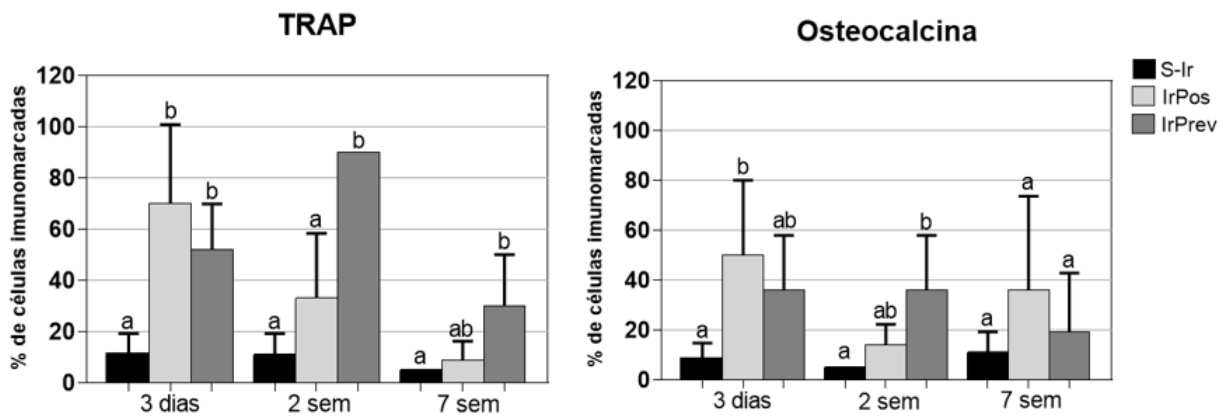
Figura 9 – Fotomicrografia da imuno-histoquímica para OC



Legenda: (A) osteoblastos (seta preta) e osteócitos (seta vermelha) imunomarcados para OC; (B) controle negativo com osteoblastos (seta preta) e osteócitos (seta vermelha) não marcados. Interface osso-implante.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10 – Gráfico da porcentagem de células imunomarcadas para cada anticorpo



Legenda: S-Ir=grupo Sem-Irradiação; IrPos=grupo Irradiação Posterior; IrPrev=grupo Irradiação Prévia. sem=semanas. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na análise da proteína TRAP, verificou-se diferença estatística ($p < 0,05$) entre a porcentagem de células marcadas de S-Ir com ambos os grupos (IrPos e IrPrev) no período de 3 dias, sendo de IrPos os valores mais altos desse período. A

diferença estatística ($p < 0,05$) encontrada em 2 semanas, foi entre IrPrev e entre os demais grupos (S-Ir e IrPos), nesta análise a maior porcentagem de marcação no grupo IrPrev. Em 7 semanas a diferença estatística ($p < 0,05$) foi verificada apenas entre S-Ir e IrPrev.

Com relação à OC, em 3 dias, houve maior marcação no grupo IrPos, que diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) de S-Ir, enquanto em 2 semanas a diferença foi entre S-Ir e IrPrev, sendo os valores mais altos do grupo irradiado. Já em 7 semanas não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos, porém maior marcação foi observada no grupo IrPos.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliada a ação da radiação ionizante, geralmente utilizada em tratamentos radioterápicos de pacientes oncológicos, nas células do tecido ósseo com implante e seu efeito sistêmico na produção de citocinas em modelo *in vivo*. A produção de fatores pró ou anti-inflamatórios, baseia-se no estímulo do tecido após uma agressão tecidual de colocação do implante, para reparação local, a qual poderia ser afetada diante da exposição à radiação precocemente, ou antes da implantação local, prejudicando a osseointegração e o equilíbrio celular durante a remodelação óssea.

O grupo controle, denominado Sem Irradiação (S-Ir) foi submetido apenas à cirurgia de colocação do implante, enquanto que nos outros grupos além do procedimento cirúrgico, foi administrada uma dose de 30 Gy, de radiação-gamma. No grupo Irradiação Posterior (IrPos) os animais foram submetidos à cirurgia de implante e iniciada a irradiação 24 h após a cirurgia. Este modelo foi utilizado para avaliar as alterações que ocorrem no desenvolvimento do processo da osseointegração, simulando a situação clínica na qual o paciente precisa ser submetido à radioterapia após um mês da cirurgia do implante. Já no grupo Irradiação Prévia (IrPrev), a tentativa foi de simular a situação clínica de pacientes irradiados e que após 2 anos do tratamento oncológico finalizado, necessitam da reabilitação com implantes. Para tanto, a irradiação dos animais neste grupo foi realizada 4 semanas antes do procedimento cirúrgico. Todos os períodos de eutanásia e de irradiação foram determinados baseados em estudo prévio que correlacionaram a idade dos ratos com a do ser humano (Quinn, 2005).

Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , analisadas neste estudo, e outras moléculas derivadas das células residentes nos tecidos lesionados, participam de respostas inflamatórias, induzindo alterações na permeabilidade do endotélio vascular e recrutamento celular (Takeuchi, Akira, 2010). Durante a colocação de um implante, o trauma cirúrgico exercido pela broca seguido pela inserção do implante, inicia um processo inflamatório local, aproximadamente em 10 min e dura os primeiros dias após a cirurgia, ativando elementos moleculares e celulares do sistema imune inato, incluindo citocinas inflamatórias, que auxiliam na

osseointegração, estimulando proliferação celular e remodelação óssea (Terheyden et al., 2012). Essa fase inflamatória inicial decorrente apenas do trauma cirúrgico, foi verificada neste estudo, ao analisar citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , no grupo S-Ir, que não sofreu irradiação e apresentou valores mais altos de TNF- α aos 3 dias com o implante, e que se manteve até 2 semanas. Valores semelhantes foram verificados de IL-1 β , mantendo-se constante até 7 semanas, demonstrando condições para reparação local.

Nos grupos IrPos e IrPrev a reação sistêmica ao estímulo do implante, demonstrou variações dessas citocinas durante os períodos, indicando que a radiação ionizante afetou a resposta inflamatória. Ambos os grupos apresentaram respostas semelhantes às de S-Ir, de TNF- α e IL-1 β , nos primeiros dias, porém menores, sugerindo que a radiação pode ter afetado a resposta que ocorre durante o processo inflamatório induzido pela inserção do implante. Em IrPrev a deficiência nessa resposta, pode indicar que o organismo estava se recuperando da irradiação ocorrida há 4 semanas e conseguiu reagir apenas de forma parcial diante de outra agressão, como a colocação do implante.

Sabe-se que TNF- α é produzida, preferencialmente, por macrófagos, células dendríticas e outros tipos celulares residentes do tecido diante de um dano tecidual ou induzido por micro-organismo (Abbas et al, 2015). Diante disso, de acordo com os resultados encontrados em nosso trabalho, sugere-se que no grupo Irradiação Posterior (IrPos), o momento da exposição à radiação pode ter resultado na diminuição de células produtoras de TNF- α nos períodos 2 e 7 semanas, uma vez que o grupo S-Ir, que teve a colocação do implante em tecido sadio, apresentou valores mais altos, com diferença significativa ($p < 0,05$) nestes períodos. No entanto, no grupo IrPrev, os valores não exibiram diferença estatística ($p > 0,05$) comparados à S-Ir, em nenhum dos períodos, o que pode indicar uma recuperação biológica parcial após o período irradiado.

A IL-1 β é uma citocina produzida não só por macrófagos em processos inflamatórios, mas também por neutrófilos, células epiteliais, como queratinócitos, e células endoteliais durante a resposta inflamatória (Abbas et al., 2015; Contassot et al., 2012). Neutrófilos são ativados e recrutados no desenvolvimento do processo inflamatório, pela liberação inicial de mediadores pró-inflamatórios por células residentes e podem continuar produzindo esses mediadores ao chegar no local da

lesão (Nourshargh, Alon, 2014). Análise de células do sangue periférico em tratamentos radioterápicos de 35 Gy relataram uma diminuição na quantidade de neutrófilos após 3,5 dias, com recuperação uma semana após a terapia (Plowman, 1983; Vatner, Formenti, 2014). Dessa forma, os valores mais baixos dessa citocina em 3 dias, apresentados por IrPos, podem indicar a diminuição de neutrófilos durante os primeiros dias de irradiação, com recuperação dessas células em 2 semanas.

Ao analisar o gene de citocinas como TNF- α e IL-1 β , de células do sangue periférico, vários períodos após a irradiação de primatas com 10 Gy, Ghandhi et al. (2018) também sugeriu uma recuperação biológica após 30 dias, ao verificar aumento dos fatores inflamatórios nesse período. Dessa forma, é possível que doses mais elevadas como 30 Gy, em ratos, prolongue por mais tempo a recuperação local, desencadeando respostas tardias diante de um novo estímulo inflamatório. Apesar disso, para tratamentos oncológicos de neoplasias de cabeça e pescoço, geralmente utiliza-se o protocolo de 60-70 Gy (Augustin et al., 2017; Kielbassa et al., 2006).

Contudo, a inflamação envolve um conjunto complexo de eventos de ativação e inibição de moléculas para dar início e fim a este processo. Em condições inflamatórias, existem sinais capazes de promover mudanças fenotípicas de macrófagos, que podem iniciar a produção de citocinas anti-inflamatórias, inclusive no ambiente ósseo (Lampiasi et al., 2016). As cascatas de citocinas induzidas por radiação ocorrem de forma regulatória por um conjunto de citocinas sinalizadoras de respostas pró e anti-inflamatórias (Malhotra et al., 2017). Uma das citocinas muito estudada e conhecida, principalmente, por seu papel regulador, é a IL-10, produzida, principalmente, por macrófagos polarizados para resolução da fase inflamatória (Abbas et al., 2015; Moghaddam et al., 2018). Neste estudo foi verificado que os animais que tiveram apenas o trauma cirúrgico como no grupo S-Ir, produziram os valores mais altos de IL-10 no período de 3 dias, indicando que o início da fase inflamatória ocorreu ao mesmo tempo que a resposta regulatória, diminuindo apenas em 7 semanas.

Os valores mais baixos de IL-10 expressos no grupo IrPrev no período de 3 dias e 2 semanas, o qual exibiu diferença estatística ($p < 0,05$) com S-Ir, sugerem, que a exposição à radiação há 4 semanas, pode ter prejudicado o estímulo inicial

para resolução da fase inflamatória após o trauma da cirurgia de implante. Wenxi et al. (2015) também verificaram a diminuição dessa citocina 18 dias após a exposição à 8 Gy de radiação-gamma, analisada por citometria de fluxo.

Após o estímulo da fase inflamatória, em condições normais, inicia-se a fase proliferativa, na qual aparecem osteoblastos ativos, produzindo osteocalcina e fosfatase alcalina, que vão proporcionar a estabilidade primária do implante nas primeiras semanas após a cirurgia, período vulnerável que pode ser prejudicado se o implante for sobrecarregado (Terheyden et al., 2012). A remodelação óssea ocorre por meio de processos de reabsorção e neoformação óssea na região do implante, responsável pelo crescimento e adaptação mecânica do osso para manter a integridade do esqueleto e da homeostase mineral (Raggatt e Partridge, 2010). Durante a fase de remodelação, o tecido ósseo é reabsorvido por osteoclastos, que aparecem após alguns dias para criar espaço para nova formação óssea e remover contatos primários da interface osso-implante (Terheyden et al., 2012).

As proteínas osteocalcina (OC) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), analisadas neste estudo, podem indicar o efeito da radiação ionizante nos processos de formação e reabsorção óssea, respectivamente. Osteocalcina, sintetizada predominantemente por osteoblastos diferenciados, é a proteína não colágena incorporada à matriz óssea extracelular e relacionada à formação óssea e mineralização do tecido ósseo (Saraiva et al., 2002). Por outro lado, a enzima TRAP é a substância encontrada em culturas de osteoclastos incubados *in vitro* com RANKL e IL-1 na mesma proporção de aumento da escavação da superfície óssea, indicando que essa enzima é liberada e reflete a atividade de reabsorção óssea por essas células (Kirstein et al., 2006).

A porcentagem de marcação no tecido, encontrada pela técnica de imunohistoquímica neste trabalho, demonstrou baixa marcação de OC em 3 dias no grupo S-Ir, indicando baixa formação óssea nesse período em tecido sadio. No entanto, o mesmo grupo também apresentou baixos valores de TRAP, sugerindo a homeostase mineral do tecido, sem excesso de formação ou reabsorção óssea. Berglundh et al. (2003) analisaram a remodelação óssea em torno de implantes de titânio e verificaram que no período inicial de 1 a 4 semanas o tecido ósseo, responsável pela estabilidade mecânica primária do implante, é reabsorvido e substituído por osso recém formado, apresentando sinais marcantes de

remodelação após 8 e 12 semanas. Diante disso, os resultados verificados no grupo S-Ir em 2 semanas, demonstram maior reabsorção nesse período, com valores de TRAP maiores, em relação à OC, sugerindo reposição local por osso recém formado em 7 semanas, período no qual foi verificada maior marcação de OC e diminuição de TRAP.

Entretanto, a marcação das proteínas envolvidas na remodelação óssea encontradas nos grupos irradiados foram mais altas do que em S-Ir, demonstrando alterações na produção dessas proteínas após exposição à radiação. No grupo IrPos, a colocação do implante associada a irradiação em um curto período, parece ter estimulado a reabsorção óssea no período de 3 dias uma vez que nesse período foram exibidos os maiores valores de TRAP em relação à S-Ir, apresentando diferença estatística ($p < 0,05$). No período de 2 semanas de IrPos, houve uma diminuição da TRAP e da OC em relação ao período de 3 dias, embora a TRAP apresentou maior valor, o que pode indicar uma resposta tecidual na tentativa de equilibrar o processo de remodelação óssea, uma vez que no período de 7 semanas, a relação TRAP e OC foi inversa, indicando maior formação óssea nesse período.

Da mesma forma, Kondo et al. (2009) verificaram aumento na porcentagem de osteoclastos marcados com TRAP, 3 dias após a irradiação de camundongos com dose de 2 Gy, comparado ao seu grupo controle, sem irradiação. O aumento da TRAP sérica, também foi verificado por Swift et al. (2015), em 3, 7 e 30 dias após irradiação de camundongos com 8 Gy. No entanto, os mesmos autores verificaram menor volume ósseo e número de trabéculas inicialmente em 7 dias. Sawajiri e Mizoe (2003) realizaram análises histológicas e morfométricas de tecido ósseo de ratos, após irradiação com 30 Gy, e verificaram que 5 dias após a irradiação, houve diminuição do volume ósseo comparado ao controle. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho, sugerem que, a quantidade aumentada de TRAP no período de 3 dias no grupo IrPos pode ter aumentado o processo de reabsorção, induzindo uma resposta tecidual mais rápida e prolongada, resultando na diminuição dos valores de TRAP e no aumento da OC em 7 semanas para atingir a homeostase celular.

Já no grupo IrPrev, a quantidade de TRAP em 3 dias foi menor do que IrPos, porém maior do que S-Ir, do qual diferiu estatisticamente ($p < 0,05$). No período de 3 dias esse grupo já contabilizava 4 semanas após a irradiação. Com o mesmo

período de irradiação, Sawajiri e Mizoe (2003) verificaram o desaparecimento de trabéculas e ampliação das cavidades da medula óssea. Dessa forma, a quantidade aumentada de OC verificada em 3 dias, poderia indicar uma tentativa de reposição óssea diante da agressão do implante, uma vez que o tecido estava alterado pela radiação, embora os valores de TRAP ainda permanecessem mais altos que OC.

Em 2 semanas, a quantidade de TRAP, desse grupo, aumentou drasticamente, atingindo quase 100%, com diferença estatística ($p < 0,05$) de todos os outros grupos, enquanto que a quantidade de OC se manteve estável, porém muito menor em relação à quantidade da TRAP. Esse resultado sugere que na situação do grupo IrPrev, o tecido não estava totalmente recuperado para receber o implante, ou seja, com 2 semanas de implante e 6 semanas após a irradiação, podemos sugerir que as chances de falhas após a instalação do implante será maior em relação aos demais grupos devido ao possível aumento da reabsorção do tecido ósseo.

No período de 7 semanas, IrPrev totalizou 11 semanas após a irradiação e, a marcação do tecido ósseo para TRAP apresentou maior porcentagem da área total da interface osso-implante, e diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) de S-Ir, concordando com Sawajiri e Mizoe (2003), que mesmo 12 semanas após irradiação, verificaram menos trabéculas e espaço de medula óssea preenchido com células mielóides, indicando alta reabsorção óssea. No entanto, os valores de TRAP, no presente estudo, diminuíram em comparação ao período de 3 dias e 2 semanas do mesmo grupo.

Contudo, osteoclastos envolvidos na reabsorção óssea, originam-se através de células mielóides da linhagem de monócitos, que são diferenciados em osteoclastos a partir do estímulo de vários fatores de transcrição, incluindo citocinas pró-inflamatórias e RANKL, que é uma proteína produzida por osteoblastos (Maridas et al., 2018; Raggatt, Partridge, 2010; Terheyden et al., 2012; Theill et al., 2002). Citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 ativam a sinalização RANK em precursores de osteoclastos e aumentam a expressão de RANKL em células mesenquimais, promovendo a osteoclastogênese (Okamoto et al., 2017).

Dessa forma, os valores de citocinas encontrados no soro, podem ter estimulado a diferenciação de osteoclastos, pois são produzidas durante os estímulos inflamatórios derivados da lesão cirúrgica e da radiação ao tecido. Os

valores da citocina TNF- α no grupo S-Ir, apesar de altos, diminuiu ao longo do tempo, assim como a presença de TRAP nos mesmos períodos, apesar de ter sido observada em baixa quantidade. Os resultados sugerem que parte da expressão da citocina pode ter estimulado a formação de osteoclastos. Além disso, no grupo IrPos essa correlação ficou mais evidente, uma vez que a diminuição TNF- α , ocorreu nos mesmos períodos (2 semanas e 7 semanas), nos quais iniciou, provavelmente, nova formação óssea com valores mais baixos de TRAP e mais altos de OC.

Em relação à IrPrev, todos os valores de TNF- α , IL-1 β e IL-10 sugeriram uma tentativa de responder ao estímulo inflamatório devido ao trauma sofrido pela exposição à radiação por um longo período antes da cirurgia, tanto na resposta pró como na anti-inflamatória. As citocinas pró-inflamatórias podem, então, ter contribuído para a reabsorção óssea, uma vez que esse grupo apresentou a maior quantidade de TRAP de todos os grupos e períodos, em 2 semanas, indicando maior processo de reabsorção após um período de irradiação prolongado.

6 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS*

- Abbas AK, Lichtman AH, Pilai S. *Imunologia celular e molecular*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier 2015.
- Augustin NH, Kim SW, Uhlig A, Hanser C, Henke M, Schumacher M. A flexible multivariate random effects proportional odds model with application to adverse effects during radiation therapy. *Biometrical J*. 2017;59(6):1339–51. doi: 10.1002/bimj.201600142
- Barcellos-Hoff MH, Park C, Wright EG. Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(11):867–75. doi: 10.1038/nrc1735
- Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(3):251–62. doi:10.1034/j.1600-0501.2003.00972.x
- Brasseur M, Brogniez V, Grégoire V, Reychler H, Lengelé B, D'Hoore W, et al. Effects of irradiation on bone remodelling around mandibular implants: an experimental study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006;35(9):850–5. doi: 10.1016/j.ijom.2006.03.016
- Brogniez V, Nyssen-behets C, Grégoire V, Reychler H, Lengelé B. Implant osseointegration in the irradiated mandible microradiographic and histologic assessment. *Clin Oral Implants Res*. 2002;13:234–42.
- Caldas LR. *Bases radiobiológicas*. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência Médica. Divisão Nacional de Cancer; 1970.
- Chambrone L, Mandia J, Shibli JA, Romito GA, Abrahao M. Dental implants installed in irradiated jaws: a systematic review. *J Dent Res*. 2013;92(12 Suppl):119–30. doi: 10.1177/0022034513504947
- Chandra A, Lin T, Tribble MB, Zhu J, Altman AR, Tseng W, et al. PTH1-34 alleviates radiotherapy-induced local bone loss by improving osteoblast and osteocyte survival. *Bone*. 2014;67:33–40. doi: 10.1016/j.bone.2014.06.030
- Chandra A, Lin T, Zhu J, Tong W, Huo Y, Jia H, et al. PTH1-34 blocks radiation-induced osteoblast apoptosis by enhancing DNA repair through canonical Wnt pathway. *J Biol Chem*. 2015;290(1):157–67. doi: 10.1074/jbc.M114.608158
- Chang PC, Wang CY, Sheng-Chueh T. Combination of LED light and platelet-derived growth factor to accelerate dentoalveolar osteogenesis. *J Clin Periodontol*. 2014;41(10):999–1006. doi: 10.1111/jcpe.12301

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

Chen H, Liu N, Xu X, Qu X, Lu E. Smoking, radiotherapy, diabetes and osteoporosis as risk factors for dental implant failure: a meta-analysis. *PLoS ONE*. 2013;8(8):e71955. doi:10.1371/journal.pone.0071955.

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

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

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

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

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

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

Faggion CM, Chambrone L, Listl S, Tu YK. Network meta-analysis for evaluating interventions in implant dentistry: The case of peri-implantitis treatment. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013;15(4):576–88. doi: 10.1111/j.1708-8208.2011.00384

Gallet P, Phulpin B, Merlin JL, Leroux A, Bravetti P, Mecellem H, et al. Long-term alterations of cytokines and growth factors expression in irradiated tissues and relation with histological severity scoring. *PLoS One*. 2011;6(12):1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0029399

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

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

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

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

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

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

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

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

Klokkevold PR, Han TJ. How do smoking, diabetes, and periodontitis affect outcomes of implant treatment? *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2007;22(Suppl):173–202.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pompa G, Saccucci M, Di Carlo G, Brauner E, Valentini V, Di Carlo S, et al. Survival of dental implants in patients with oral cancer treated by surgery and radiotherapy: a retrospective study. *BMC Oral Health*. 2015;15(1):5. doi: 10.1186/1472-6831-15-5

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

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

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

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

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

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

- Sonstevold T, Johannessen A, Stuhr L. A rat model of radiation injury in the mandibular area. *Radiat Oncol.* 2015;10:129. doi: 10.1186/s13014-015-0432-6
- Swift JM, Swift SN, Smith JT, Kiang JG, Allen MR. Skin wound trauma, following high-dose radiation exposure, amplifies and prolongs skeletal tissue loss. *Bone.* 2015;81:487–94. doi:10.1016/j.bone.2015.08.022.
- Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010;140:805–20. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022
- Terheyden H, Lang NP, Bierbaum S, Stadlinger B. Osseointegration-communication of cells. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(10):1127–35. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02327.x
- Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T Cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol.* 2002;20(1):795–823; doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064753.
- Vatner RE, Formenti SC. Myeloid-derived cells in tumors: effects of radiation. *Semin Radiat Oncol.* 2014;25:18–27. doi: 10.1016/j.semradonc.2014.07.008
- Verdonck HWD, Meijer GJ, Nieman FH, Stoll C, Riediger D, De Baat C. Quantitative computed tomography bone mineral density measurements in irradiated and non-irradiated minipig alveolar bone: an experimental study. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(5):465–8. doi: 10.1111/j.1600-0501.2007.01496.x
- Vissink A, Jansma J, Spijkervet F, Burlage F, Coppes R. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(3):199–212. doi:10.1177/154411130301400305.
- Wang Y, Zhu G, Wang J, Chen J. Irradiation alters the differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep.* 2016;13(1):213–23. doi: 10.3892/mmr.2015.4539
- Wenxi D, Shufang D, Xiaoling Y, Liming Y. Panax notoginseng saponins suppress radiation-induced osteoporosis by regulating bone formation and resorption. *Phytomedicine;* 2015;22(9):813–9. doi:10.1016/j.phymed.2015.05.056
- Wijekoon S, Bwalya E, Fang J, Kim S, Hosoya K, Okumura M. Chronological differential effects of pro-inflammatory cytokines on RANKL-induced osteoclast differentiation of canine bone marrow-derived macrophages. *J Vet Med. Sci.* 2017 Dec 22;79(12):2030-5. doi: 10.1292/jvms.17-0393.
- Williams HJ, Davies AM. The effect of X-rays on bone: a pictorial review. *Eur Radiol* 2006;16(3):619–33. doi: 10.1007/s00330-005-0010-7
- Zou Q, Hong W, Zhou Y, Ding Q, Wang J, Jin W, et al. Bone marrow stem cell dysfunction in radiation-induced abscopal bone loss. *J Orthop Surg Res.* 2016;11(1):3. doi:10.1186/s13018-015-0339-9

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética



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



CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

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

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

São José dos Campos, 11 de março de 2016


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