



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



STEPHANIE WUTKE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO ESTRUTURAL E DA COMPOSIÇÃO
QUÍMICA DE OSSOS EM MODELO MURINO DE
SEPSE EXPERIMENTAL**

UBERLÂNDIA

2018

STEPHANIE WUTKE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO ESTRUTURAL E DA COMPOSIÇÃO
QUÍMICA DE OSSOS EM MODELO MURINO DE
SEPSE EXPERIMENTAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a
Faculdade de Odontologia da UFU, como
requisito parcial para obtenção do título de
Graduado em Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Robinson Sabino da Silva
Co-orientadora: Ms. Emília Aguiar

UBERLÂNDIA

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai e à minha mãe.

Ao meu pai, que sempre valorizou o estudo e o conhecimento, além de me incentivar diariamente a ir atrás dos meus sonhos e ideais. Obrigada Pai, por ser um exemplo de dedicação e comprometimento com seu trabalho como professor. Hoje vejo que ser um educador vai muito além de aulas e matérias, é sobre transmitir conhecimento, entender e compreender o outro como um ser particular. O senhor faz isso com excelência e mesmo com tanto dom e inteligência, sua humildade e preocupação com o próximo me incentiva a te ter como exemplo de vida.

À minha mãe, por me compreender como ninguém. Por saber exatamente como eu sou e por respeitar as minhas vontades. Obrigada mãe, por estar diariamente disposta a fazer a seu melhor para nós, por ter aberto mão de tantas coisas na sua vida para que tivéssemos as melhores oportunidades. A senhora sempre esteve presente e ciente de tudo, e sempre me apoiou nas minhas escolhas. Obrigada por fazer tudo pra mim. Sua forma de amar é particular, singela e única.

Espero um dia poder retribuir tudo que já fizeram e fazem por mim.

Amo vocês.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente à Deus, por ter me colocado em uma família tão maravilhosa, por guiar meus passos e me colocar sempre ao lado de pessoas que me fazem tão bem. Obrigada meu Deus, por ser a minha fortaleza e por escutar e compreender minhas orações e pedidos, me dando forças para que eu dê o meu melhor diariamente.

Aos meus pais, Isabel e Daniel, por serem minha base. Obrigada por me incentivarem a ir em busca dos meus objetivos e por me proporcionarem a vivência diária de um amor incondicional, único da nossa maneira.

Aos meus irmãos, Daniella, Ingrid e Elias. À minha irmã Daniella, por saber me ouvir e me aconselhar. Por ter cuidado e cuidar de mim com um carinho de mãe. Você é um exemplo pra mim. Ao meu irmão Elias, por ter cuidado de mim. À minha irmã Ingrid, por ser meu maior exemplo de disciplina, e por sempre me ajudar em tudo que preciso.

Ao meu orientador, Robinson, pela oportunidade de conhecer uma área nova na odontologia e por ser tão presente. Obrigada Robinson por desenvolver o seu trabalho como orientador com excelência, sendo sempre tão atencioso e correto com tudo. Você é um exemplo de profissional para mim.

À equipe que trabalhei, em especial a Leia e a Emília, que me ajudarem no desenvolvimento desse projeto e por sempre terem me dado suporte em tudo que precisei. Vocês são demais meninas!

À professora Ana Paula, por me orientar atualmente e ter me proporcionado crescer como aluna. Obrigada professora, por ter me dado essa oportunidade de trabalhar com você. Parabéns por ser tão acolhedora e dedicada.

À minha Tia Denise, por sempre ter me incentivado a buscar novos horizontes na faculdade e por ter me proporcionado experiências maravilhosas em Bauru. Obrigada Tia, por toda a sua atenção comigo.

Agradeço à minha turma, 78, por termos compartilhado de uma caminhada tão maravilhosa, onde todos crescemos e amadurecemos um com os outros.

Agradeço à minha parceira de clínica, Letícia, pela vivência diária. Obrigada Let, por todas as palavras de incentivo e pela sua amizade. Ter atendido com você todos esses anos me fez aprender muito, principalmente sobre humanidade e paciência.

Agradeço à Morgana e à Gabi pelas confidências trocadas, conversas atuas e pelas vezes que me ouviram, com toda a atenção e compreensão do mundo. Obrigada por se fazerem presente diariamente. Vocês são como irmãs pra mim.

À Fernanda, Anne, Jéssica Monteiro e Letícia de Castro por termos criado uma amizade tão maravilhosa, que acalma o coração e tranqüiliza até os dias mais difíceis. Obrigada por todos os conselhos e momentos.

Ao Pajé, Miss e ao Igor, por todas as conversas, confidências, brincadeiras, caronas e por sempre estarem dispostos a me ouvir e a me ajudar, nem que fosse para me levar e buscar em algum lugar quando estava perdida (kkkkkkkk). Vocês são irmãos que fiz na faculdade e que sempre levarei no coração.

Ao Daniel e Mateus pelas conversas atuas, brincadeiras e por serem tão prestativos. Sempre que precisei, vocês estiveram ali.

Aos meus amigos, principalmente a Natália, Laurinha, Giselle, Danilo, Paloma e Bruno, por se preocuparem tanto comigo. Por me ouvirem nos meus momentos mais difíceis e por termos uma amizade tão enriquecedora. Por sermos tão presentes um na vida do outro fazendo com que a caminhada seja mais prazerosa. Minha empatia e carinho por cada um de vocês é gigante.

Ao Gabriel, por todo o carinho e amor. Por sempre me incentivar e estar ao meu lado. Por compreender meu jeito de ser e me amar exatamente assim.

Aos meus sogros, Heloísa e Renato, por cuidarem e se preocuparem tanto comigo. Vocês são um exemplo de casal por mim.

Agradeço aos professores que passaram pelo meu caminho, ensinando não só a odontologia, e sim, a sermos pessoas mais humanas, respeitadas e dedicadas com o próximo.

Agradeço aos pacientes pela compreensão de sempre. Por saberem que somos alunos e entenderem nossos desafios diários.

Agradeço aos funcionários, por todo o zelo com nosso trabalho.

Agradeço à CNPq pelo apoio financeiro.

Essa trajetória foi maravilhosa e ter vocês ao meu lado, fez tudo ser melhor.

Obrigada à cada um que compartilhou de momentos únicos comigo.

EPÍGRAFE

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Teixeira de Andrade

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABEVIAÇÕES.....	8
RESUMO.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVO.....	13
3. DESENVOLVIMENTO.....	14
4. RESULTADOS.....	17
5. DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÃO.....	26
7. REFERÊNCIAS.....	27
8. ANEXOS.....	30

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

FTIR - Técnica de Espectroscopia Infravermelho com Transformada em Fourier

AFM - Microscopia de Força Atômica

SHAM - Ratos que receberam simulação de cirurgia de indução da sepse;

CLP - Ratos com sepse induzida através de perfuração cecal

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da sepse sobre as propriedades biomecânicas e a composição química de ossos. Para isto, o padrão morfológico de colágeno da tíbia de ratos foi avaliado por meio da técnica Picrosirius Red, a biomecânica óssea por meio de teste de flexão, a densidade de componentes ósseos da tíbia por espectroscopia FTIR e Raman e a análise por Microscopia de Força Atômica (AFM). As análises morfométricas demonstraram alteração do perfil de deposição de colágeno nas tíbias dos animais portadores de sepse em comparação aos controles. Os resultados de força, energia e rigidez obtidos no ensaio biomecânico foram similares ($p > 0,05$) em animais controles e sepse. A sepse aguda promoveu aumento ($p > 0,05$) na composição de amida II, amida III e colágeno pela espectroscopia FTIR. A espectroscopia Raman demonstrou aumento ($p < 0,05$) de fenilalanina em tíbia de animais com sepse em comparação aos controles. Além disso, pela primeira vez, foi demonstrado que a rugosidade nanométrica está reduzida em tecido ósseo de ratos portadores de sepse em comparação aos controles. Em conjunto, acreditamos que é possível perceber que a sepse aguda pode promover alterações patofisiológicas no tecido ósseo que podem ser importantes na tomada de decisões da rotina clínica.

Palavras-chave: Sepse, osso, composição óssea, rugosidade nanométrica,

1. INTRODUÇÃO

A sepse é caracterizada como uma síndrome clínica resultante de uma resposta inflamatória sistêmica, relacionada a um foco de infecção. O desfecho nos pacientes com sepse pode ser o desenvolvimento do choque séptico ou da falência múltipla dos órgãos (HOTCHKISS; KARL, 2003; LEVY et al., 2003). Dados do *Brazilian Sepsis Epidemiological Study* mostram que os pacientes do Brasil possuem um maior tempo de internação, além de apresentarem gravidade aumentada em comparação à outras regiões no mundo. Pacientes portadores de sepse possuem uma alta taxa de mortalidade, além de gerarem custo muito elevado com seu tratamento nos setores público e privado (SALES-JÚNIOR et al., 2006).

A inflamação é um processo biológico crucial para a erradicação de patógenos e manutenção da homeostase dos tecidos. No entanto, se essa progressão de eventos continuar, devido à persistência de estímulos pró-inflamatórios, o processo pode evoluir para um estado de inflamação crônica associado com secreção contínua de citocinas e outros fatores que podem levar a destruição contínua dos tecidos e da homeostase. A lesão óssea provoca uma resposta inflamatória aguda e altamente regulada que é benéfica ao processo de reparo. No entanto, se esta resposta é suprimida, desregulada ou se torna crônica, a inflamação pode ser prejudicial ao processo de reparo ósseo (O'KEEFE, MAO, 2011; WATERS et al., 2000). Células do sistema imune, principalmente macrófagos, são moduladores vitais da inflamação (NICH et al., 2013).

O reparo ósseo é um processo regenerativo complexo, que inclui a interação de uma série de eventos biológicos, como a síntese ativa de genes e a ação de um grande número de células e proteínas que atuam para restaurar a integridade do tecido ósseo (ROSENBERG, 2005).

Osteoblastos secretam a matriz óssea orgânica e induzem a mineralização (HARADA, RODAN, 2003). Durante a fase final da remodelação óssea, os osteoblastos incorporam-se na matriz óssea como osteócitos mediados por fosfatase alcalina (WALSH et al., 2006; MARIE, KASSEM, 2011). Como reguladores do metabolismo mineral, os osteócitos são as células primárias que coordenam a atividade de osteoblastos e osteoclastos em resposta a estímulos mecânicos (BELLIDO, 2014). Os osteoclastos de

origem hematopoiética reabsorvem a matriz óssea através de descalcificação ácida e dissolução proteolítica (BOLEY, SIMONET, LACEY, 2003).

No entanto, no percurso deste processo, algumas alterações podem culminar na regeneração deficiente e conseqüentemente, no atraso da consolidação e não-união óssea. Essas alterações são comumente encontradas na prática médica, e estão associadas a altos índices de morbimortalidade, bem como a altos custos para os sistemas de saúde (SENA et al., 2005). Além disso, sabe-se que sistema nervoso simpático pode modular o processo de remineralização óssea (KYUNGHWA et al., 2014).

Sendo assim, as alterações de composição óssea em portadores de doença sistêmica, como a sepse, apresentam interesse evidente para a área de ortopedia na medicina e para áreas de implatodontia e periodontia na área odontológica. As pesquisas com perda óssea também apresentam grande interesse econômico. Aproximadamente 100.000 fraturas da área médica e odontológica desenvolvem não-união óssea a cada ano nos EUA, fato que pode estar relacionado com presença de alterações de composição óssea provenientes de processos inflamatórios e infecciosos que ainda estão em fases preliminares de estudos da patofisiologia óssea (MIRANDA; MOON (2007). Estes são apenas alguns exemplos do que a perda óssea colocam na nossa sociedade, mostrando a necessidade urgente de uma compreensão mais profunda da etiologia, mecanismos e métodos de prevenção de fratura e possível reparo ósseo (KYUNGHWA et al., 2014).

A utilização da técnica de espectroscopia infravermelho com transformada em Fourier (FTIR) para análise de amostras biológicas de tecido é uma área de pesquisa com enorme expansão, pois possibilita o estudo da composição molecular das amostras e a proporção de seus compostos de forma rápida e com baixa quantidade de recursos em cada amostra (BAKER et al., 2014). Além disso, ainda não foram realizados estudos com esta análise em amostras de tíbia em condições de sepse.

A espectroscopia Raman é uma técnica de espectroscopia vibratória usada para avaliar a luz dispersa de moléculas biológicas e íons. A dispersão de Raman ocorre quando moléculas dentro de uma amostra são excitadas pela luz laser incidente. Movimentos vibratórios dentro das moléculas levam a uma pequena fração da luz (aproximadamente um em 10⁷ fótons) perdendo energia e sendo espalhados em comprimentos de onda mais longos (BAZIN et al., 2029). A diferença de comprimento de

onda entre luz dispersa e incidente corresponde a vibrações moleculares e leva a bandas em deslocamentos de frequência característicos no espectro Raman. As principais vantagens da espectroscopia Raman incluem sua aplicabilidade ao tecido fresco (FRREMAN et al., 2001; TARNOWSKI et al., 2001) e maior resolução espacial (com volumes de amostragem de 1 μm^3 ou menos) (GAMSJAEGER et al., 2009). Quando combinado com regimes de carregamento mecânico, a espectroscopia Raman correlaciona informações químicas com respostas de falha óssea no nível ultraestrutural (CARDEN et al., 2003).

Os problemas de consolidação óssea resultam também em incapacidade física e altos custos sócio-econômicos, o que constitui um importante desafio para clínica médica (BRIGHTON & MCCLUSKEY, 1988). Entretanto, não foram evidenciadas alterações de marcadores de turnover ósseo entre crianças que não desenvolveram sepse em comparação as que desenvolveram sepse (ELIAKIM et al., 2003). Sabe-se que a sepse pode resultar em um período prolongado de imobilidade, o que pode contribuir de forma significativa para a reduzida mineralização óssea (Bozzettiet al. 2009). Além disso, já foi descrita a presença de osteoporose transitória tecido-específico em condições de sepse (MCALINDON et al., 1993).

Desta forma, é conhecido que a sepse é uma síndrome clínica resultante de uma resposta inflamatória sistêmica derivada de um foco infeccioso, e que a inflamação desencadeia mediadores que atuam em diversas partes do organismo, incluindo em tecidos ósseos. Contudo, os efeitos agudos promovidos pela sepse na morfometria, biomecânica e no perfil molecular de ossos permanecem desconhecidos.

2- OBJETIVO

2.1- Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi investigar o efeito agudo da sepse aguda na histomorfometria, biomecânica e perfil molecular em tíbias.

2.2- Objetivos específicos

1. . Caracterização do padrão morfológico da tíbia por meio da técnica Picrosirius Red;
2. Caracterização da biomecânica óssea por meio de teste de flexão;
3. Caracterização de componentes ósseos da tíbia por espectroscopia FTIR e RAMAN
4. Caracterização da rugosidade nanométrica pela Microscopia de Força Atômica (AFM)

3. DESENVOLVIMENTO

O protocolo experimental foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob protocolo de número 105/14.

3.1- Animais

Foram utilizados ratos Wistar, machos, com peso entre 200 e 250g, obtidos junto ao Biotério Central da UFU. Os animais foram acondicionados no Biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas nas seguintes condições:

- Ciclo claro/escuro de 12 horas;
- temperatura ambiente $23 \pm 2^\circ\text{C}$;
- plena oferta de água e ração.

Deste modo, foram estudados os seguintes grupos de animais (n=7/grupo):

- a) **Controles (sham):** ratos que receberam simulação de cirurgia de indução da sepse;
- b) **Sepse (CLP):** ratos com sepse induzida através de perfuração cecal (CLP);

3.2- Modelo CLP de Sepse

Os animais, exceto os do grupo controle (NSs), foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal contendo cloridrato de cetamina e cloridrato de xilasina (90mg/kg e 10mg/kg, respectivamente) e, em seguida, foi realizada uma laparotomia onde o ceco foi exposto e perfurado por seis vezes com uma agulha de 22 gauge. A incisão foi suturada e os animais foram recolocados em suas respectivas gaiolas e observados durante um período de 2 horas. Após, 24 horas animais foram mortos por dose excessiva de anestesia com tiopental sódico (500mg/kg de peso corpóreo, i.p.) para coleta da tibia.

3.3- Coleta das amostras

3.3.1- Coleta da tibia

Logo após a morte do animal, foram realizadas incisões na região plantar e na região superior da tíbia em cada uma das patas com o objetivo de remover as tíbias direita e esquerda.

Depois de removido, o fragmento direito dos ossos foi pesado e posteriormente colocado plásticos específicos para armazenamento imersos em formaldeído 4% tamponado por 24 horas. Depois de fixado foi realizado o processamento histológico. O fragmento esquerdo após sua remoção também foi pesado e inserido em plásticos específicos para armazenamento imersos em solução salina. Os fragmentos esquerdos de ossos que foram utilizados para análise biomecânica serão armazenados em freezer - 80°C até o momento da análise. Logo após a análise biomecânica, os mesmos foram macerados em mortar em uma solução com nitrogênio para análise de FTIR e Raman (BAKER et al., 2014).

3.4- Avaliação de componentes ósseos por meio de FTIR e Raman

Considerando que a espectroscopia no infravermelho é uma das mais importantes técnicas analíticas disponíveis atualmente, avaliamos a composição da tíbia pelo espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) em regiões com espectro eletromagnético entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} .

As tíbias também foram analisadas por meio da espectroscopia Raman para avaliação do perfil de componentes orgânicos e inorgânicos no osso cortical. O osso macerado foi avaliado por meio de espectroscopia RAMAN (QE65000 Spectrometer com laser de diodo de 785nm, Ocean Optics). Cada espectro foi mensurado durante 30 segundos e integrado 2 vezes para obter um duplicata de cada amostra e expresso na região de interesse entre 800-1200 cm^{-1} (Imbertet al., 2014).

3.5- Caracterização biomecânica da tíbia

A análise biomecânica foi realizada pelo teste de flexão de três pontos na tíbia esquerda dos animais. Para as análises foram utilizadas células de carga com capacidade de 100KgF e velocidade de 0,4 cm/min. As extremidades de cada amostra foram apoiadas em suportes com 3,2 cm para tíbia. A força aplicada foi registrada pelo equipamento Instron Series IX e será calculada uma variável de carga/deformação.

3.6- Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos com média \pm EPM. Foram realizadas análises de homocedasticidade para avaliação de utilização de testes paramétricos (Teste T de Student) ou não paramétricos conforme descritos nas legendas das figuras. Foram consideradas significantes as diferenças estatísticas com $p < 0,05$

4 - RESULTADOS

4.1 Teste de flexão em 3 pontos:

Não ocorreu diferença ($p > 0,05$) estatística para força (Figura 1), energia (Figura 2) e rigidez (Figura 3) nas tíbias de animais controles (SHAM) e portadores de sepse (CLP).

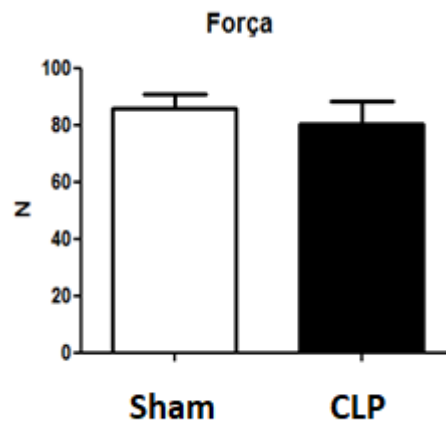


Figura 1. Análise biomecânica da força (N) em tíbia de ratos controles (Sham) e portadores de sepse (CLP). Os valores foram apresentados como média e erro padrão médio. Na barra Y, N: Newton. $P > 0,05$.

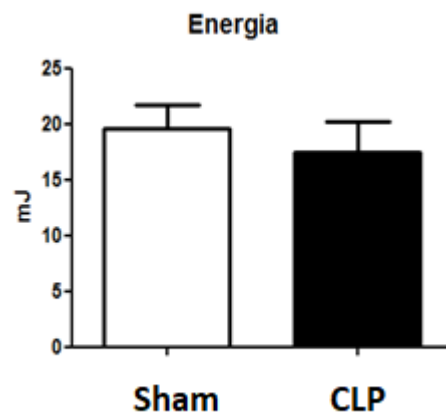


Figura 2 - Análise biomecânica da energia (mJ) em tíbia de ratos controles (Sham) e portadores de sepse (CLP). Os valores foram apresentados como média e erro padrão médio. $P > 0,05$.

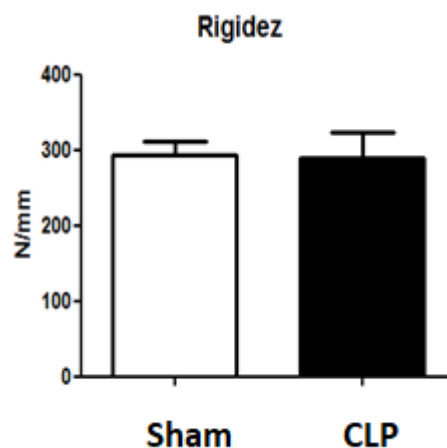


Figura 3 - Análise biomecânica da rigidez (N/mm) em tibia de ratos controles (Sham) e portadores de sepse (CLP). Os valores foram apresentados como média e erro padrão médio. N/mm: Newton/ milímetro.

4.2. Análise histológica com a técnica de coloração Picrosirius Red

A análise histológica de Picrosirius Red demonstrou alteração no perfil de deposição de colágeno nas tíbias de animais portadores de sepse (Figura 4). Isso sugere que a presença de sepse aguda pode ocasionar uma maior fragilidade nos ossos dos animais portadores desta condição.



Figura 4 - Análise histológica da tibia por meio da coloração Picrosirius Red em animais controle e portadores de sepse.

4.2 Análise óssea por Espectroscopia FTIR e Raman

O espectro de FTIR obtido na tibia de ratos controle (Sham) e portadores da sepse

(CLP) estão representados na Figura 5. A comparação destes espectros de ossos mostrou claramente alterações entre tíbias de ratos Sham e CLP. A área da banda 1645 cm^{-1} foi identificada como amida I, e os ratos CLP não alteraram este parâmetro ($p > 0,05$) em comparação com os ratos Sham (Figura 6A). A área da faixa em 1548 cm^{-1} indica a Amida II. Este componente ósseo foi aumentado ($p < 0,05$) nos ratos CLP comparados aos ratos Sham (Figura 6B). A área da faixa em 1415 cm^{-1} determina Carbonato. Este componente mineral não foi afetado ($p > 0,05$) pelos ratos CLP comparado com ratos Sham (Figura 6C). A Amida III é identificada na área da faixa 1238 cm^{-1} . Essa área da banda foi aumentada ($p < 0,05$) na tíbia dos ratos CLP em comparação com ratos sham (Figura 6D). O colágeno é identificado na área da faixa 1201 cm^{-1} . Esta área da banda foi aumentada ($p < 0,05$) na tíbia dos ratos CLP em comparação com ratos sham (Figura 6E). As bandas 1010 cm^{-1} , 870 cm^{-1} , 598 cm^{-1} e 555 cm^{-1} são identificadas como fosfato, carbonato, fosfato e fosfato, respectivamente. Ambos os componentes minerais do osso permaneceram inalterados ($p > 0,05$) nos ratos CLP em comparação com os ratos sham (Figura 6F-I).

A substituição do carbonato, o grau de mineralização (relação fosfato / amida I), a maturidade do colágeno, a cristalinidade mineral não foram alterados na tíbia dos ratos CLP em comparação aos ratos Sham (Figura 7A-D). No entanto, o grau de mineralização total (relação total de matriz mineral / total) foi reduzido ($p < 0,05$) na tíbia dos ratos CLP em comparação com ratos sham (Figura 7E).

O espectro RAMAN obtido na tíbia de ratos sham e CLP estão representados na Figura 8A. A comparação destes espectros de ossos mostrou componentes semelhantes entre ratos sham e CLP. Os ratos CLP não alteraram ($p > 0,05$) vários componentes como fosfato, prolina, carbonato, deformação CH_2 e Amida I. No entanto, o componente fenilalanina foi aumentado ($p < 0,05$) na tíbia de ratos CLP em comparação com ratos sham (Figura 8B).

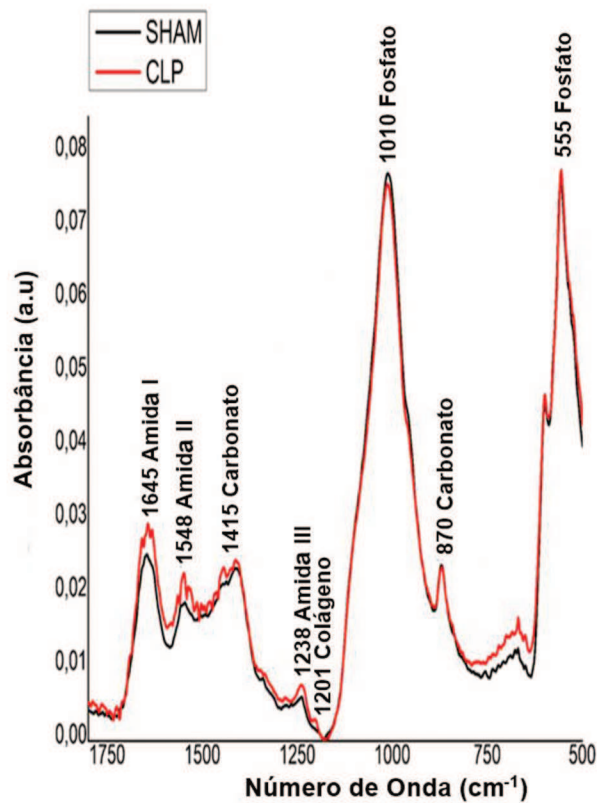


Figura 5. Espectro de FTIR do osso. Espectro médio de componentes ósseos obtidos pela análise de FTIR em ratos Sham e CLP.

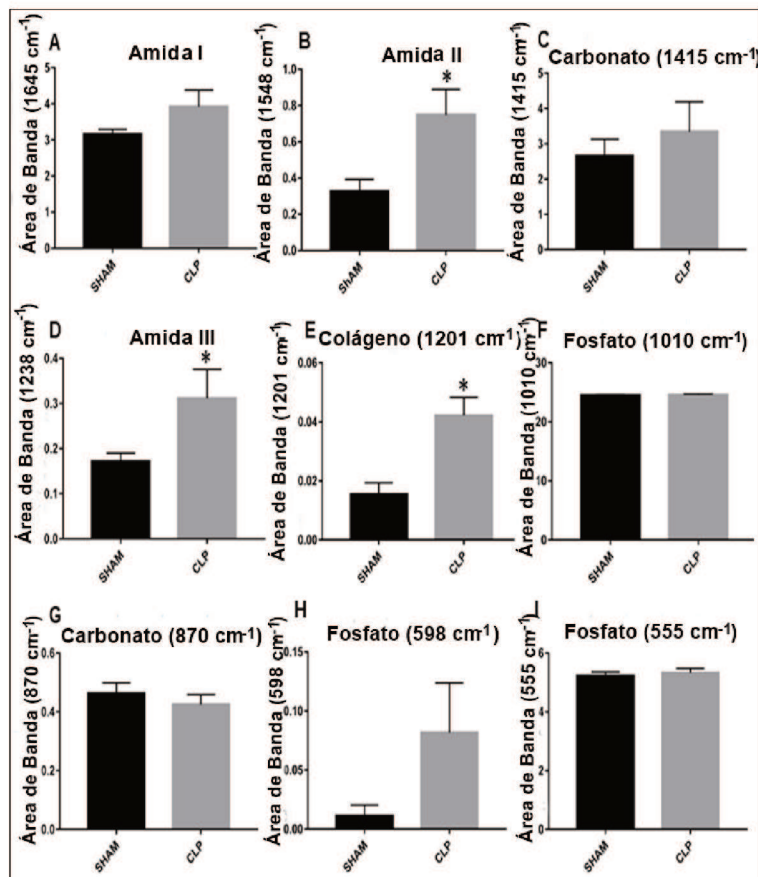


Figura 6. Resultados da composição do FTIR. Componentes ósseos avaliados na tíbia de 7 ratos SHAM e CLP (n = 7). A. Média ± EPM da porcentagem de Amida I (1645 cm⁻¹) analisada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (p <0,05). B. Média ± SEM da Amida II (1548 cm⁻¹) analisada pelo teste t-Student paramétrico (p <0,05). C. Média ± EPM do Carbonato (1415 cm⁻¹) analisada pelo teste t-Student paramétrico (p <0,05). D. Média ± EPM da Amida III (1238 cm⁻¹) analisada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (p <0,05). E. Média ± SEM de colágeno (1201 cm⁻¹) analisada pelo teste t-Student paramétrico (p <0,05). F. Média ± SEM de Fosfato (1010 cm⁻¹) analisada por t-Teste paramétrico de Student (p <0,05). G. Média ± SEM do Carbonato (870 cm⁻¹) analisada pelo teste t-Student paramétrico (p <0,05). H. Média ± SEM de Fosfato (598 cm⁻¹) analisada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney (p <0,05) e I. Média ± SEM de Fosfato (555 cm⁻¹) analisada por t-Teste paramétrico de Student (p <0,05).

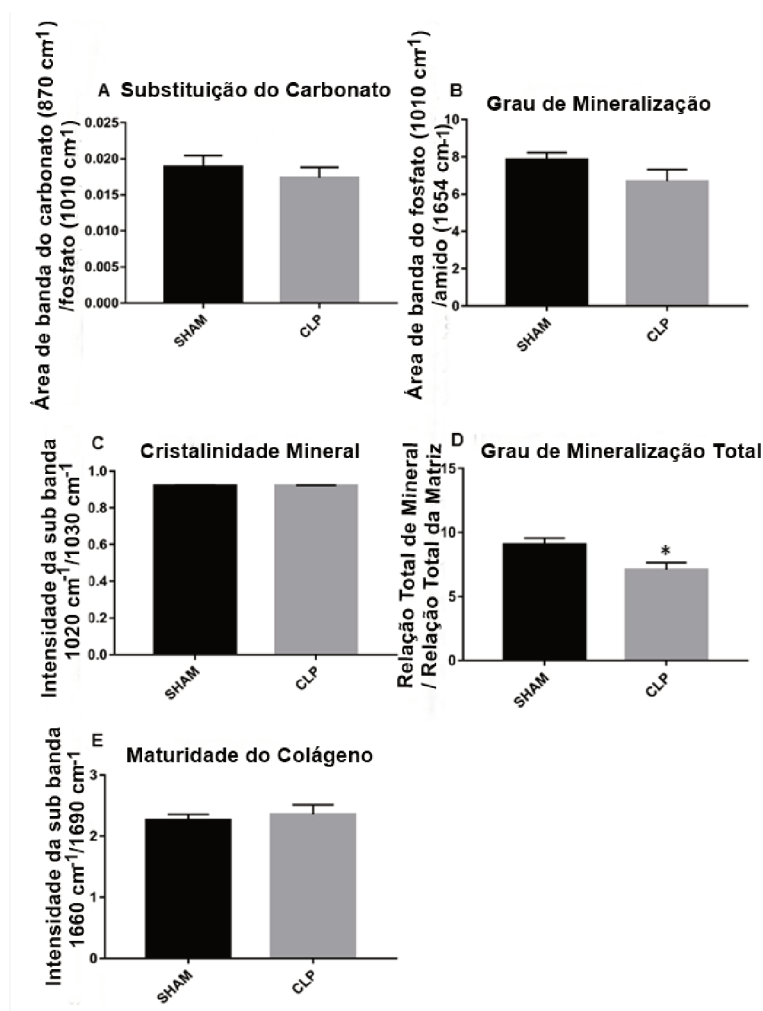


Figura 7. Resultados dos parâmetros do FTIR. Parâmetros avaliados na tíbia de 7 ratos SHAM e CLP (n = 7) e analisados pelo teste t-Student paramétrico, os resultados são Média ± EPM (p <0,05). A. Substituição de Carbonato. B. Grau de Mineralização. C. Cristalinidade Mineral. D. Grau de Mineralização Total. E. Maturidade de colágeno.

4.3 Espectroscopia RAMAN

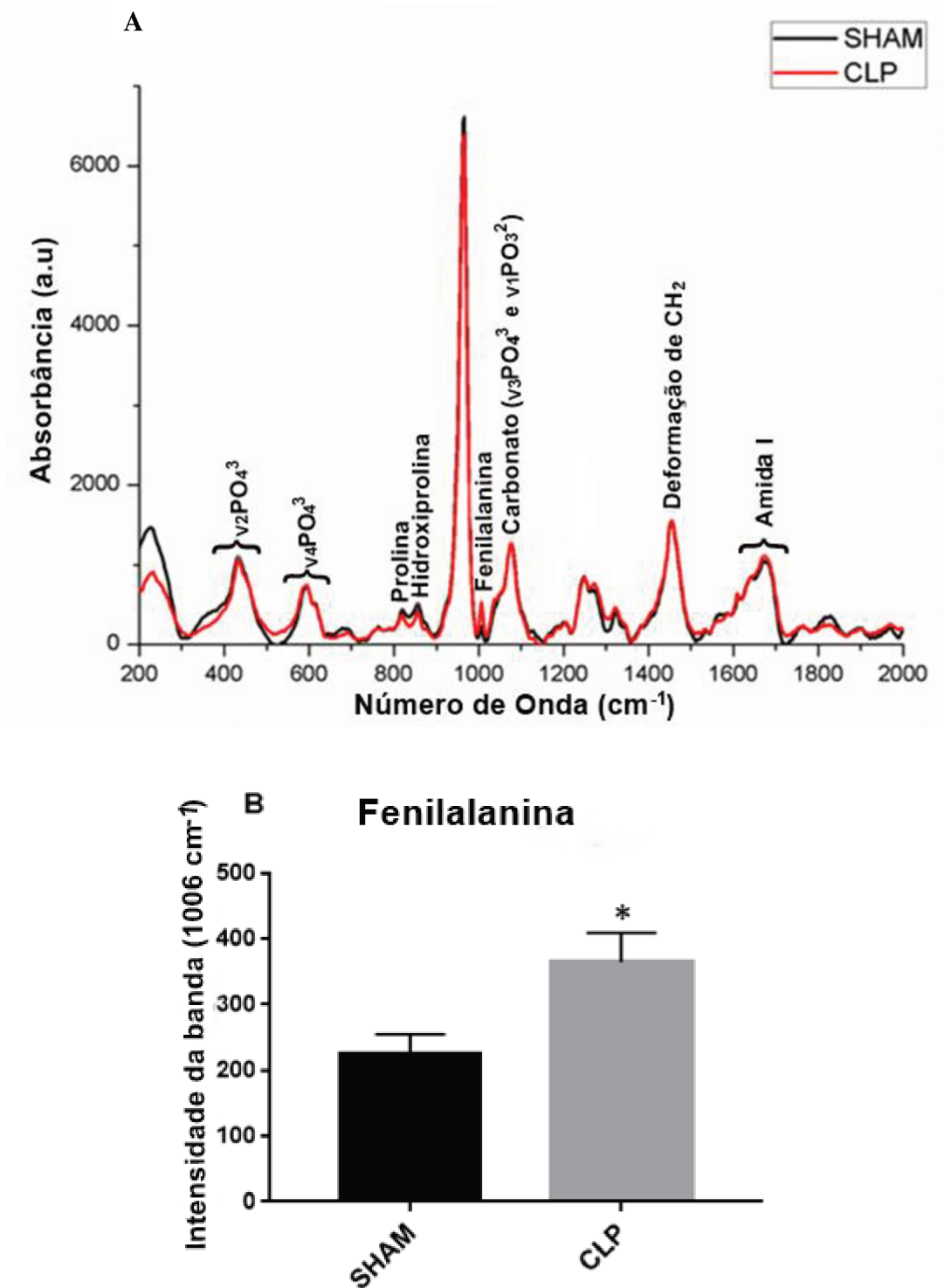


Figura 8. Espectro e compostos de RAMAN. A. Espectro médio de compostos ósseos obtidos pela análise RAMAN em ratos SHAM e CLP. B. Gráfico de fenilalanina com resultados em média \pm SEM de 4 animais ($n = 4$) analisados por t- teste paramétrico de Student ($p < 0,05$)

4.4 Análise por Microscopia de Força Atômica (AFM)

Medição de AFM foi implementada para examinar a diferença da rugosidade superficial do osso cortical em ratos CLP e sham. Como mostrado na Figura 10A e 10C, o osso cortical de ratos sham apresenta uma rugosidade nanométrica. Por outro lado, osso cortical em ratos CLP apresentam superfícies mais lisas (Figura 10B e 10D).

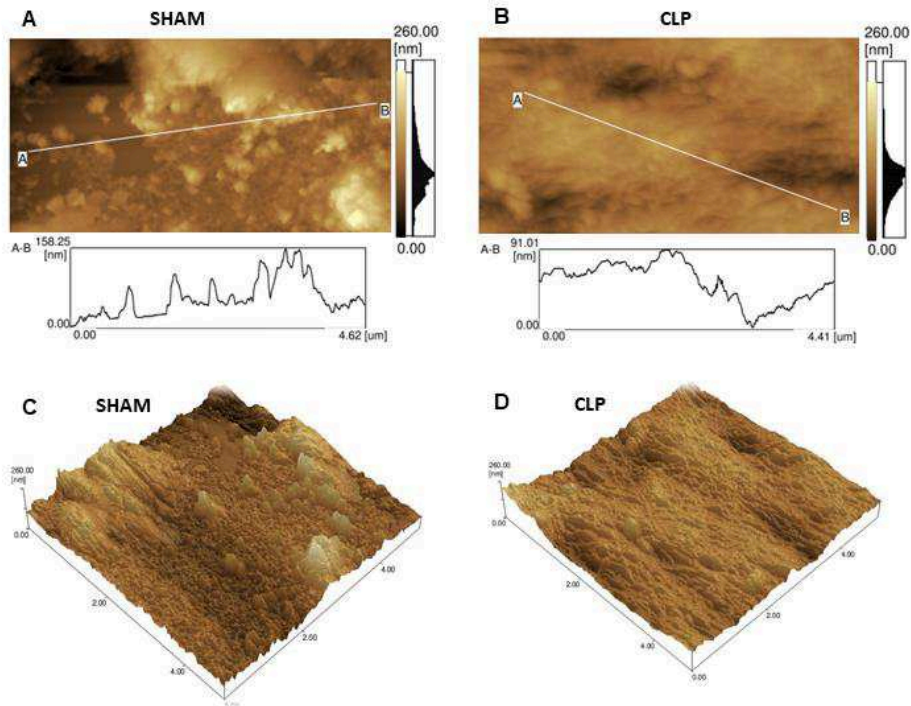


Figura 9. Aspereza da superfície óssea por microscopia de força atômica (AFM). Imagem de AFM em osso cortical. A e C. Representam a rugosidade superficial em ratos SHAM. B e D. representam uma diminuição na rugosidade superficial em ratos CLP.

5 – DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou que a sepse aguda pode promover alterações na rugosidade nanométrica e na composição óssea de componentes proteicos como Amida II, Amida III e colágeno. Acreditamos que as alterações na biomecânica óssea poderão ser evidenciadas em tempos mais prolongados de sepse.

A sepse induzida experimentalmente pelo procedimento de CLP, pode mimetizar a sepse humana. Sabe-se que a sepse é uma resposta inflamatória e que a inflamação desencadeia mediadores químicos que atuam em diversas partes do organismo, assim como no tecido ósseo (HOTCHKISS, KARL, 2003, LEVY et al., 2003; O'KEEFE, MAO, 2011). Os osteoblastos participam do reparo ósseo, assim como os osteoclastos participam da reabsorção óssea (HARADA, RODAN, 2003; BOLEY, SIMONET, LACEY, 2003). Este balanço no processo de osteogênese e osteoclastogênese é fundamental para na homeostasia óssea. Dados não apresentados neste estudo mas que foram desenvolvidos em nosso laboratório (ainda não publicados) demonstram que a sepse aguda promove um aumento da atividade de osteoclastos em ossos. A presença de um incremento na presença de osteoclastos na região cortical de tíbias de ratos portadores de sepse sugere maior reabsorção óssea neste território. Isto pode levar a um atraso na consolidação óssea ou um atraso no processo de reparo ósseo em condições de sepse. Além disso, sugere-se que a rugosidade manométrica presente na cortical óssea possa estar reduzida nesta patologia devido a uma intensidade aumentada de osteoclastos. Adicionalmente, a alteração dos níveis de rugosidade nanométrica indica que isto pode estar relacionado com alterações de cálcio plasmático, condição que muitas vezes está afetada na sepse.

Apesar desta redução de rugosidade nanométrica e alteração no perfil de deposição de colágeno nos animais com sepse, esta alteração não foi suficiente para alterar as análises de mecânica óssea. Acreditamos que a análise mecânica não foi alterada porque as alterações agudas (24 horas) da sepse ocorrem inicialmente na região cortical mais externa. Sugere-se que alterações na nanomorfometria não tenham papel fundamental nas análises mecânicas. Também acreditamos que tempos mais prolongados com a mesma intensidade do fator desencadeador de sepse, possam ser capazes de alterar a composição e função óssea de forma mais exacerbada.

A análise do osso cortical com sepse apresenta aumento da intensidade de fibras colágenas, amida II e amida III que foram acessadas por FTIR e aumento de fenilalanina

que foi acessada por espectroscopia Raman. Considerando que a matriz óssea depende de um sistema de duas fases derivado da composição mineral e da proteica, percebe-se que esta relação pode ser desregulada pela sepse de forma aguda. Estas alterações foram descritas, pelo nosso conhecimento, pela primeira vez na literatura. O aumento de amida III, é um forte indicativo de alfa-elastinas ósseas, fato que pode estar prevenindo as esperadas mudanças na composição óssea (WATERS et al., 2000).

A espectroscopia RAMAN correlaciona informações químicas com respostas de falha óssea no nível ultraestrutural. Podemos perceber que a espectroscopia Raman demonstrou alterações moleculares na fenilcetonúria de tíbias de animais portadores de sepse, o que pode levar a um grande potencial no monitoramento de fisiopatologias ósseas futuramente. Isso pode ocorrer pois altos índices fenilalanina plasmático ou de fenilcetonúria são indicativos de danos ósseos. Adicionalmente, a presença de fenilalanina pode ser um ativador da osteoclastogênese, fato que corrobora os achados destes trabalho em um doença sistêmica de grande abrangência mas em um condição patofisiológica ainda pouco conhecida (CARDEN et al., 2003)

6- CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que as tíbias de animais portadores de sepse apresentam alteração na deposição de colágeno. Além disso, as análises de composição óssea por espectroscopia FTIR e Raman demonstraram alterações moleculares em vários componentes, o que demonstra grande potencial no monitoramento de fisiopatologias ósseas. Além disso, pela primeira vez foi demonstrado que a rugosidade nanométrica está reduzida em ossos de ratos com sepse. Em conjunto, acreditamos que é possível perceber que a sepse aguda pode promover alterações patofisiológicas no tecido ósseo que podem ser importantes na tomada de decisões da rotina clínica.

7. REFERÊNCIAS

BAKER MJ, TREVISAN J, BASSAN P, et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nat Protoc.** 2014 Aug;9(8):1771-91.

BAZIN D, CHAPPARD C, COMBES C, CARPENTIER X, ROUZIÈRE S, ANDRE G, MATZEN G, ALLIX M, THIAUDIÈRE D, REGUER S, JUNGERS P, DAUDON M. Diffraction techniques and vibrational spectroscopy opportunities to characterise bones. **Osteoporosis Int.** 2009;20:1065–1075.

BHULAN, K.S. et al. Isoproterenol-Induced Cardiomyopathy in Rats: influence of *Acorus Calamus* Linn. **Cardiovascular Toxicology.** v. 11, p. 263-271, 2011.

BOZZETTI V, TAGLIABUE P. Metabolic bone disease in preterm newborn: an update on nutritional issues. *Italian Journal of Pediatrics.* 2009;35:20.

BRIGHTON CT, MCCLUSKEY WP. Response of cultured bone cells to a capacity coupled electric field: inhibition of cAMP response to parathyroid hormone. **J Orthop Res.** 6:567-571, 1998.

CARDEN A, MORRIS MD. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review) **J Biomed Opt.** 2000;5:259–268.

CARDEN A, RAJACHAR RM, MORRIS MD, KOHN DH. Ultrastructural changes accompanying the mechanical deformation of bone tissue: a Raman imaging study. **Calcif Tissue Int.** 2003;72:166–175.

C. NICH, Y. TAKAKUBO, J. PAJARINEN, M. AINOLA, A. SALEM, T. SILLAT, A.J. RAO, M. RASKA, Y. TAMAKI, M. TAKAGI, Y.T. KONTTINEN, S.B. GOODMAN, J. GALLO, Macrophages-key cells in the response to wear debris from joint replacements, **J. Biomed. Mater. Res. A** 101 (2013) 3033–3045.

ELIAKIM A, SHIFF Y, NEMET D, DOLFIN T. The effect of neonatal sepsis on bone turnover in very-low birth weight premature infants. **J Pediatr Endocrinol Metab.** 2003 Mar;16(3):413-8.

FAIBISH D, OTT SM, BOSKEY AL. Mineral changes in osteoporosis: a review. **Clin Orthop Relat Res.** 2006;443:28–38.

FREEMAN JJ, WOPENKA B, SILVA MJ, PASTERIS JD. Raman spectroscopic detection of changes in bioapatite in mouse femora as a function of age and in vitro fluoride treatment. **Calcif Tissue Int.** 2001;68:156–162.

GAMSJAEGER S, ROSCHGER P, KLAUSHOFER K, PASCHALIS EP, FRATZL P. Cortical bone orientation and composition in a mouse model as a function of tissue age vs animal age. **Bone.** 2009;44(Suppl 2):S269–S270.

LEVINE RS, PITTS NB, NUGENT ZJ. The fate of 1,587 unrestored carious deciduous teeth: a retrospective general dental practice based study from Northern England. **Br Dent**

*J*193: 99–103, 2002.

LEVY, M. M; FINK, M. P; MARSHALL, J. C; ABRAHAM, E; ANGUS, D; COOK, D; COHEN, J; OPAL, S. M; VICENT, J. L; RAMSAY, G; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical Care Medicine**.V.31, n. 4, 2003.

M.A. MIRANDA, M.S. MOON, Treatment strategy for nonunions and malunions, in: J.P. STANNARD, A.H. SCHMIDT, P.J. KREGOR (Eds.), **Surgical Treatment of Orthopaedic Trauma**, Thieme, New York 2007, pp. 77–100.

MCALINDON TE, WARD SA, MACFARLANE D, MATHEWS JA. Transient regional osteoporosis presenting as a septic arthritis. **Postgrad Med J**. Nov;69(817):871-3,1993.

M.C. WALSH, N. KIM, Y. KADONO, J. RHO, S.Y. LEE, J. LORENZO, Y. CHOI, Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism, **Annu. Rev. Immunol**. 24 (2006) 33–63.

MORRIS MD, CRANE NJ, GOMEZ LE, IGNELZI MA. Compatibility of staining protocols for bone tissue with Raman imaging. **Calcif Tissue Int**. 2004;74:86–94.

P.J. MARIE, M. KASSEM, Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets, **Eur. J. Endocrinol**. 165 (2011) 1–10.

R.J. O'KEEFE, J. MAO, Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic—an overview, **Tissue Eng. B Rev**. 17 (2011) 389–392.

ROSEMBERG AE. **Ossos, Articulações e Tumores de Tecidos Moles**. In: ROBBINS, S.L., COTRAN, R.S. Patologia - Bases Patológicas das Doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

R.V. WATERS, S.C. GAMRADT, P. ASNIS, B.H. VICKERY, Z. AVNUR, E. HILL, M. BOSTROM, Systemic corticosteroids inhibit bone healing in a rabbit ulnar osteotomy model, **Acta Orthop. Scand**. 71 (2000) 316–321.

SABINO-SILVA, R. et al. SGLT1 protein expression in plasma membrane of acinar cells correlates with the sympathetic outflow to salivary glands in diabetic and hypertensive rats. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**. v. 299, p. 1028-1037, 2010.

SALES-JÚNIOR, J. A. L; DAVID, C. M; HATUM, R; SOUZA, P. C. S. P; JAPIASSÚ, A; PINHEIRO, C. T. S; FRIEDMAN, G; DA SILVA, O. B; DIAS, M. D. A; KOTERBA, E; DIAS, F. S; PIRAS, C; LUIZ, R. R. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. **RBTI – Revista Brasileira Terapia Intensiva**, v. 18, p. 9-17, 2006.

SENA K, LEVEN RM, MAZHAR K, SUMMER DR, VIRDI AS. **Early gene response to low-intensity pulsed ultrasound in rat osteoblastic cells.** *UltrasoundMed Biol.* 31:703-708, 2005.

S. HARADA, G.A. RODAN, Control of osteoblast function and regulation of bone mass, *Nature* 423 (2003) 349–355.

TARNOWSKI CP, IGNELZI MA, WANG W, TABOAS JM, GOLDSTEIN SA, MORRIS MD. Earliest mineral and matrix changes in force-induced musculoskeletal disease as revealed by Raman microspectroscopic imaging. **J Bone Miner Res.** 2004;19:64–71.

T. BELLIDO, Osteocyte-driven bone remodeling, **Calcif. Tissue Int.** 94 (2014) 25–34.

W.J. BOYLE, W.S. SIMONET, D.L. LACEY, Osteoclast differentiation and activation, **Nature** 423 (2003) 337–342.

8 – ANEXOS

ARTIGO 1 - Acute Systemic Sepsis Bone Implications: A chemical and structural analysis

Acute Systemic Sepsis Bone Implications: A chemical and structural analysis

Emília Maria Gomes Aguiar¹, Stephanie Wutke¹; Léia Cardoso-Sousa¹; Douglas Carvalho Caixeta²; Alexandre Vieira¹; Paula Dechichi³; Carlos José Soares⁴, Priscilla Barbosa Ferreira Soares⁵, Luiz Ricardo Goulart^{2,6}; Roberta Okamoto⁷; Robinson Sabino-Silva^{1*}.

¹Department of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

²Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

³Department of Morphology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlandia, Minas Gerais, Brazil.

⁴Department of Dental Materials, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

⁵Department of Periodontology and Implantology, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

⁶Department of Medical Microbiology and Immunology, University of California Davis, California, USA.

⁷Department of Basic Sciences, School of Dentistry, São Paulo State University, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author

E-mail: robinsonsabino@gmail.com

Abstract

Sepsis is a host inflammatory response to infection that is caused by multiple organs damages. It is already known that inflammatory diseases promote damage on bone tissue, however, the chemical and structural effects of systemic sepsis on bone has not yet been well elucidated. The aim of this study was to investigate the effect of acute systemic sepsis on osteoclast activity, bone mechanical, bone composition and surface roughness of cortical tibia. Sepsis was induced by cecal ligation and puncture surgery (CLP) and twenty-four hours after surgery, animals were anesthetized to remove tibia. No significant differences in mineral compartments of the cortical tibia could be observed between SHAM and CLP rats. Sepsis induced ($p < 0.05$) increase in amide II, amide III and collagen, which contributes to reduce ($p < 0.05$) total mineralization degree (total mineral-to-total matrix ratio) in tibia of CLP compared with SHAM rats. CLP rats also showed higher values of phenylalanine (62%, $p < 0.05$) as compared with SHAM rats. Besides, sepsis led to increased expression of osteoclasts on cortical tibia associated with reduction in surface roughness of cortical tibia. In summary, we showed that acute sepsis promotes reduction in nanometric rugosity associated with increased osteoclasts activity in sepsis. Finally, our study unravels new effects of acute sepsis on bone composition and suggests that septic patients are at risk of bone damage.

1. Introduction

Sepsis is a serious clinical condition that represents a response to an infection that may lead to multiple organ damage [1]. In severe sepsis a poor prognosis with high mortality rates is achieved when organs are affected [2; 3]. Sepsis survivors are exposed to an inflammation, acidosis and hypoxia that may rapidly compromise bone health [4]. A decrease in plasma calcium was described 24 h after intraperitoneal sepsis induction [5]; however, hypocalcemia is detected around ~20% of patients [6].

Bone is a main territory of mineral deposit in vertebrate organisms throughout the life [7]. The bone promote its functions of delivering calcium to plasma while maintaining strength [8]. Bone is a metabolically active organ that undergoes continuous remodeling by osteoclastic bone resorption and osteoblastic bone formation [9]. Osteoblast attachment and differentiation were greater on micro-rough surfaces than on smoother topographies; whereas, the activity of the osteoclast was greater on smoother surfaces [10]. Osteoclasts are specialized cells that adhere to bone matrix, then secrete acid and lytic enzymes to degrade bone in extracellular compartment [11]. Whole bone strength can be determined by intrinsic properties of bone microarchitecture [12]. Several evidences indicate that bone composition and mechanical properties plays a critical role in skeletal integrity [13]. It has been suggested that Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and Raman spectroscopy can indicate changes in bone composition, which are predictors of changes in mechanical properties [13].

Bone displays suppressed osteogenesis and enhanced bone resorption activity in inflammatory diseases such as sepsis [14]. Lipopolysaccharide (LPS) induces elevated expressions of osteoclast differentiation-related genes and inflammation genes at an early stage in bone [14]. In an experimental sepsis model, trabecular femoral strength and collagen elastic modulus were reduced at 24 hours and 96 hours [4]. Although the direct relationship between inflammatory condition and bone defects was well characterized, the capacity of acute sepsis to modulate bone composition, surface topography and bone mechanical were not considered in sepsis.

We hypothesized that acute systemic sepsis promotes changes on bone composition and development of smoother surface roughness of cortical bone promoted by cortical osteoclasts. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects of acute sepsis on bone tissue by osteoclast activity, composition, roughness, biomechanical and microarchitecture.

2. Methods

2.1. Experimental design

Animal procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Uberlandia (Proposal #45/2015). After randomization, Cecal Ligation and Puncture (CLP) induced a sublethal polymicrobial sepsis in male Wistar rats (weighing ~260g). Under anesthesia (ketamine (90 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), intraperitoneally) the rats received an aseptic midline laparotomy, and the portion of cecum was exteriorized and placed outside of the abdominal cavity. The cecum was partially ligated using a 4.0 silk tie and perforated with a 22-gauge needle for nine times. The cecum was gently squeezed to extrude a small amount of feces from the perforation. After that, the portion of cecum was inserted into the abdominal cavity and the laparotomy was closed using a 4.0 silk sutures. Sham animals received the same procedure by the same operator; however, the cecum was not perforated [15]. During the experimental procedures the animals were kept in dorsal recumbence. Body temperature of animals was maintained at 37.5 ± 1.5 °C with a heating blanket. All rats were caged and allowed free access to water and standard rodent chow diet (Nuvilab CR-1; Nuvital, Curitiba, Brazil). Sham and CLP rats were studied 24 hours after sepsis induction. A direct cardiac puncture was performed in the left ventricle to collect the whole blood of the animal. After euthanasia, tibias were dissected and removed. Rights tibia were frozen in PBS in freezer -20°C to be used in the Mechanical Test, Micro-CT, FTIR spectroscopy, Raman spectroscopy and Atomic Force Microscopy (AFM) analysis. In contrast, those on the left side were fixed in formalin and underwent histological processing. All efforts were made to minimize animal suffering. The methods were carried out in accordance with the approved guidelines.

2.2. FTIR and RAMAN spectroscopy

FTIR and RAMAN spectroscopy are techniques used to evaluate the chemical profile of the samples. For this, the ends of tibia (between the diaphysis and the proximal epiphyses) were stored – 80 °C and macerated with a sterile mortar and pestle to obtain sample spectra. Chemical profile in bone by FTIR spectra were recorded in $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ region using FTIR spectrophotometer Vertex 70 (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) associated with a micro-attenuated total reflectance (ATR) accessory. All spectra were recorded at room temperature (23 ± 1 °C). The crystal material unit of ATR unit was a diamond disc as internal-reflection element. The sample penetration depth ranges between 0.1 and 2 μm and depends on the wavelength, the refractive index of the ATR-crystal material and the incidence angle of the beam. The infrared beam was reflected at the interface toward the sample. The air spectrum was considered as a background in FTIR analysis. Samples spectrum were taken with 4 cm^{-1} of resolution and 32 scans were performed to each

analysis. The FTIR spectra were normalized and the baselines were corrected using OPUS 6.5 software (Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) [16]. None noise removal techniques were applied. Table 1 shows the frequencies and assignments of the vibrational modes identified on bone. Briefly, in original spectra the vibrational mode 1645 cm^{-1} is identified as νNH (Amide I) bending vibrations [17; 18; 16]. The δNH (Amide II) bending vibration is usually represented in $\sim 1548\text{ cm}^{-1}$ [16; 19]. The vibrational mode 1415 cm^{-1} and $\sim 870\text{ cm}^{-1}$ are identified as carbonate [20]. The vibrational modes at ~ 1238 and $\sim 1201\text{ cm}^{-1}$ are attributed to stretching vibrations of carboxyl group νCOO (amide III) and collagen, respectively [21]. Besides, spectral areas of 1010 , 598 and 555 cm^{-1} vibrational modes indicate phosphate [20]. The mineral phase is defined by the parameters of carbonate substitution (Area of $850\text{--}890\text{ cm}^{-1}$ band/area of phosphate band), mineralization degree (area of $900\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ phosphate band/area of amide I band ($1585\text{--}1720\text{ cm}^{-1}$)), mineral cristallinity (Area of 1030 cm^{-1} subband/area of 1020 cm^{-1} subband) and total mineralization degree (total mineral ratio/total matrix ratio). The protein phase can be analyzed by collagen maturity (Area of 1660 cm^{-1} subband/area of 1690 cm^{-1} subband).

To assess chemical components changes in cortical tibia by Raman spectroscopy, specimens were lyophilized and measurement were recorded in a QE65000 Spectrometer (Ocean Optics) with a 785 nm diode laser (LASER-785-IP-LAB), assembled with diffraction grating H#6, slit of $100\text{ }\mu\text{m}$, and Raman shift measurements were obtained and plotted from 200 to 2.000 cm^{-1} , and resolution 4 cm^{-1} . Data were processed using SpectraSuite and ASP-QE softwares. The $\sim 959\text{ cm}^{-1}$ vibrational mode is attributed to Phosphate [22]. The 1070 cm^{-1} vibrational mode is attributed to carbonate [22]. The 1242 and 1272 cm^{-1} vibrational modes indicates amide III stretch observed in several proteins [22]. The 1660 cm^{-1} vibrational mode is attributed to amide I also frequently observed proteins [22].

2.3. Biomechanical testing

Twenty-four hours before bone mechanical testing, the tibias were thawed at $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$. After that, the tibias were inserted at room temperature 1-hour before testing. The specimens were maintained wrapped in the PBS-soaked gauzes except during mechanical analysis. Each right tibia was subjected to a three-point bending test until failure, using a material testing machine (EMIC DL 2000, EMIC Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda, Sao José dos Pinhais, Brazil). Each specimen was positioned horizontally on the two holding fixtures of the machine, with the tibial tuberosity facing outwards, while the upper loading fixture applied the load from lateral to medial at a loading rate of 1.0 mm/min (Figure 2. A e B). The span length between holding fixtures was 24 mm and the load was applied at the center of the lengthened area. Load and displacement data were

recorded and subsequently, load vs. displacement curves were plotted. Maximum load values were derived from data force (N), energy-to-fracture work to failure (mJ) and stiffness values (N/mm) were calculated as the slope of the initial linear unloading portion of the curves. After the three-point bending test, the portion of the tibia diaphysis was sectioned with a diamond disk with constant irrigation for obtain two bone segments. The distal segment was used for Micro-CT evaluation and the proximal segment for FTIR and RAMAN spectroscopy and atomic force microscopy analysis.

2.4. Micro-CT evaluation

For assessing bone micro-architecture in the experimental groups, the distal tibial diaphysis were examined using a desktop micro-CT system, commercially available as SkyScan 1272 (Bruker, Kontich, Belgium). During scanning, the tibia were placed in the polyethylene tube and immobilized inside the tubes by means of soft modeling clay. The scanning parameters were 15 μm pixel size, 50 kV X-ray voltage, 160 mA electric current and 0.5 mm Al filter. Subsequently, the reconstructed 3D data sets were quantified using CTAn3 automated image analysis system, Fig 3.A (Bruker, Kontich, Belgium). For this, the volume-of-interest (VOI) for cortical analyses was selected and extending totally 190 slices. Cortical architecture was assessed in the diaphysis and was characterized by bone cortical volume (Ct.V, %), bone cortical thickness (Ct.Th, mm), closed porosity (Ct.Po, %), bone surface/volume ratio (BS/BV, mm^{-1}) fractal dimension (Ct.FD, a.u.) and degree of anisotropy (Ct.DA, a.u.) according to standard procedures [23; 24].

2.5. Calcemia

The blood collected by the cardiac puncture was placed in an eppendorf (São Paulo, São Paulo, Brazil) with 10 μL of heparin. To obtain the plasma the blood samples were centrifuged at 1000 rpm for 15 minutes using a centrifuge (Waltham, Massachusetts, USA). After centrifugation, it was possible to observe the separation of the blood in 3 layers in which the plasma was the supernatant, the Leukocytes the intermediate layer and the red blood cells the pellet. Plasma calcium dosing was performed using the Calcium Liquiform kit (Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil) following the manufacturer's instructions. A final solution formed was homogenized and the reading was performed on a Genesys 10S UV-VIs spectrophotometer (Waltham, Massachusetts, USA) at a wavelength of 570 nm. The absorption values obtained were recorded and the plasma calcium concentration obtained.

2.6. Immunohistochemical analysis

Left tibias were dissected and fixed in 4% buffered formalin for 24 hours and washed in running water for 24 hours. The tibias were subsequently submitted to decalcification in 2% ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) with changes every 3 days until their complete descaling. After decalcification, the tibias were stored in 70% alcohol followed by the processing of the samples for inclusion in paraffin with alcohol, dehydration in increasing concentrations (70%, 85%, 95% and absolute alcohol), diaphanization in xylol, inclusion in paraffin blocks and microtomy (Leica RM2125, Wetzlar, Germany) of the 5 µm thick samples.

For immunohistochemistry the cuts were mounted on gelatinized slides and the activity of the endogenous peroxidase was inhibited with hydrogen peroxide. Next, the slides underwent the antigenic recovery step with phosphate buffer citrate (pH 6.0). Polyclonal antibody produced in goats (Santa Cruz Biotechnology) against Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) (SC30832) was used. A choice of this antibody was found in its need to evaluate a cellular response in the bone resorption process (TRAP). Immunohistochemical experiments were performed using immunoperoxidase as a detection method. Biotinylated secondary rabbit-produced goat anti-rabbit antibody (Pierce Biotechnology) was used, the amplifier was Avidin and Biotin (Vector Laboratories) and diaminobenzidine (Dako) as chromogen. At the end of the development with diaminobenzidine, the non-staining was performed by Harris Hematoxylin. The analysis was performed using a 20x objective Nikon (Eclipse 80i, Shinagawa, Tokyo, Japan) microscope.

2.7. Analysis by Atomic Force Microscopy (AFM)

The surface roughness of cortical tibia was analyzed with a scanning probe atomic force microscopy (AFM) (SPM-9600; Shimadzu, Tokyo, Japan). The images were recorded in tapping mode with a silicium cantilever (tip curvature radius of < 10nm, Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) at room temperature. Randomly selected sites of samples were scanned with the scanning rate of 200 kHz and 3-dimensional images were obtained and analyzed with AFM systemic software (Gwyddion).

2.8. Statistical analysis

All values reported as Mean \pm SEM. Number of animals is informed in legends. Comparisons of the means were performed by non-paired student t-test and Mann-Whitney non-parametric test (GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Values of $p < 0.005$ were considered as statistically significant.

3. Results

All rats survived to the end of the protocol. The body weight at the time of samples collection was similar in sham and CLP rats.

3.1. FITR and RAMAN spectroscopy

The infrared spectrum obtained in tibia of sham and CLP rats are represented in Figure 1. The comparison of these bones spectra showed clearly changes between sham and CLP rats. The band area at 1645 cm^{-1} was identified as amide I, CLP does not change this parameter ($p > 0.05$) compared to sham rats (Figure 2A). The band area at 1548 cm^{-1} indicates amide II. This bone component was strongly increased ($p < 0.05$) in CLP than sham rats (Figure 2B). The band area at 1415 cm^{-1} determinates carbonate. This mineral component was not affected ($p > 0.05$) by CLP compared with sham rats (Figure 2C). Amide III is identified in the band area at 1238 cm^{-1} . This band area was increased ($p < 0.05$) in tibia of CLP compared with sham rats (Figure 2D). Collagen is identified in the band area at 1201 cm^{-1} . This band area was increased ($p < 0.05$) in tibia of CLP compared with sham rats (Figure 2E). The bands at 1010 cm^{-1} , 870 cm^{-1} , 598 cm^{-1} and 555 cm^{-1} are identified as phosphate, carbonate, phosphate and phosphate, respectively. Both mineral bone components were unchanged ($p > 0.05$) in CLP compared with sham rats (Figure 2F-I).

Carbonate substitution, mineralization degree (phosphate-to-amide I ratio), collagen maturity, mineral crystallinity were unchanged in tibia of CLP than sham rats (Figure 3A-D). However, the total mineralization degree (total mineral-to-total matrix ratio) was reduced ($p < 0.05$) in tibia of CLP compared with sham rats (Figure 3E).

The RAMAN spectrum obtained in tibia of sham and CLP rats are represented in Figure 4A. The comparison of these bones spectra showed similar components between sham and CLP rats. CLP does not change ($p > 0.05$) several phosphate components, proline, carbonate, CH₂ deformation and Amide I. However, phenylalanine component was increased ($p < 0.05$) in tibia of CLP compared with sham rats (Figure 4B).

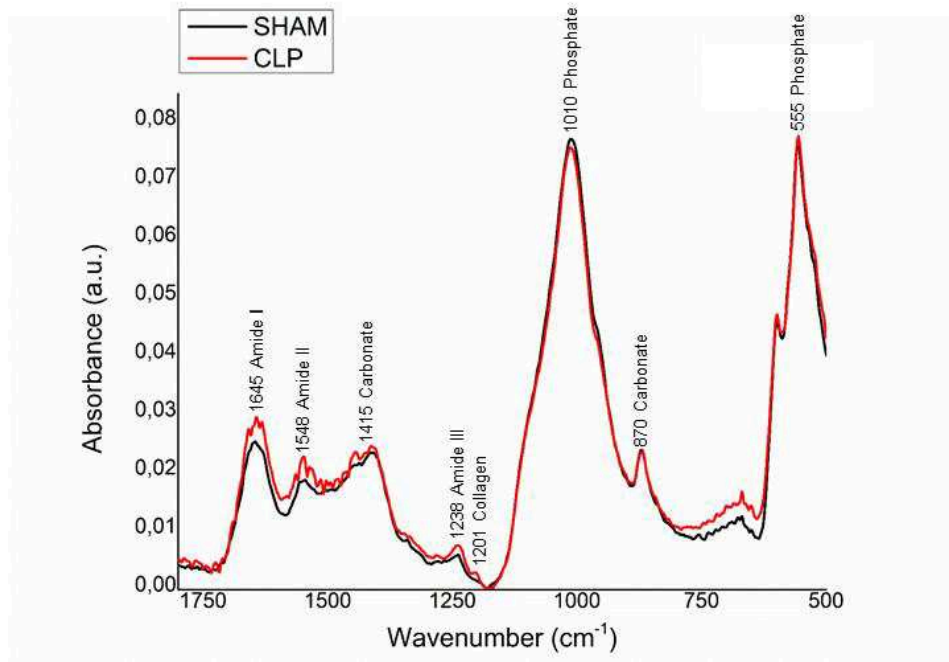


Figure 1. FTIR spectrum of bone. Mean spectrum of bone components obtained by the FTIR analysis in Sham and CLP rats.

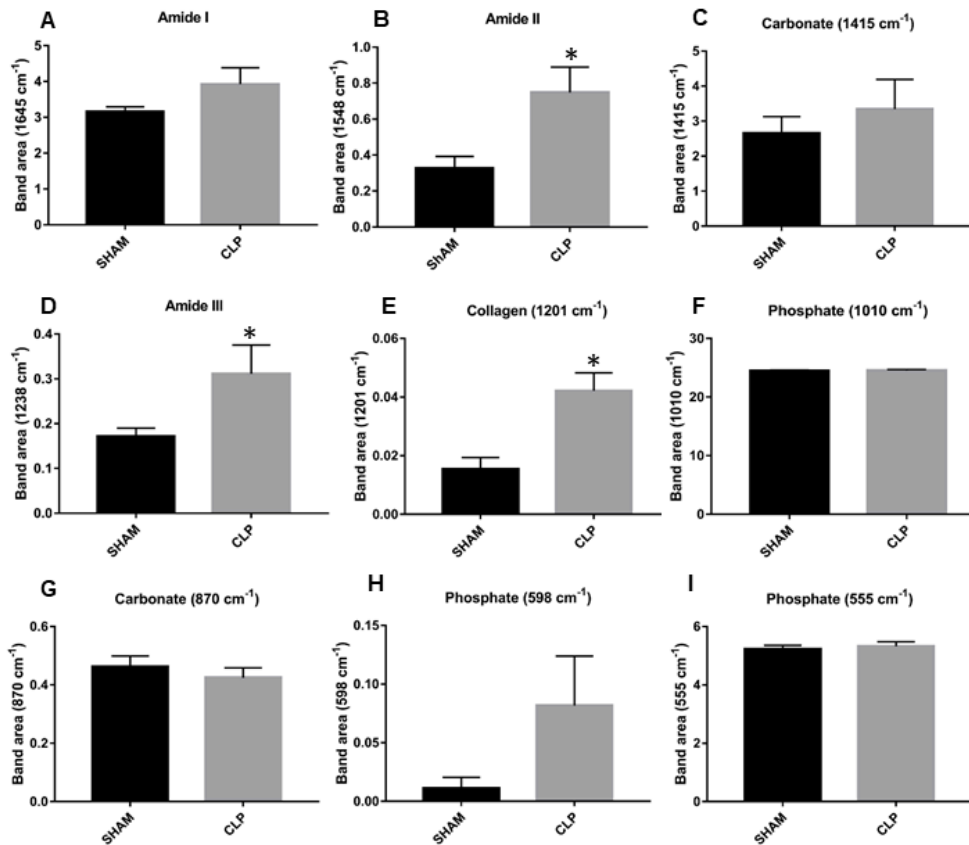


Figure 2. FTIR compositional results. Bone components evaluated in tibia of 7 SHAM and CLP rats (n = 7). **A.** Mean \pm SEM of percentage of Amide I (1645 cm⁻¹) analyzed by the non-parametric Mann-Whitney test (p < 0.05). **B.** Mean \pm SEM of Amide II (1548 cm⁻¹) analyzed by t-Student parametric test (p < 0.05). **C.** Mean \pm SEM of the Carbonate (1415 cm⁻¹) analyzed by t-Student parametric test (p < 0.05). **D.** Mean \pm SEM of Amide III (1238 cm⁻¹) analyzed by the non-parametric Mann-Whitney test (p < 0.05). **E.** Mean \pm SEM of Collagen (1201 cm⁻¹) analyzed by t-Student parametric test (p < 0.05). **F.** Mean \pm SEM of Phosphate (1010 cm⁻¹) analyzed by t-Student parametric test (p < 0.05). **G.** Mean \pm SEM of Carbonate (870 cm⁻¹) analyzed by t-Student parametric test (p < 0.05). **H.** Mean \pm SEM of Phosphate (598 cm⁻¹) analyzed by the non-parametric Mann-Whitney test (p < 0.05) and **I.** Mean \pm SEM of Phosphate (555 cm⁻¹) analyzed by t-Student parametric test (p < 0.05).

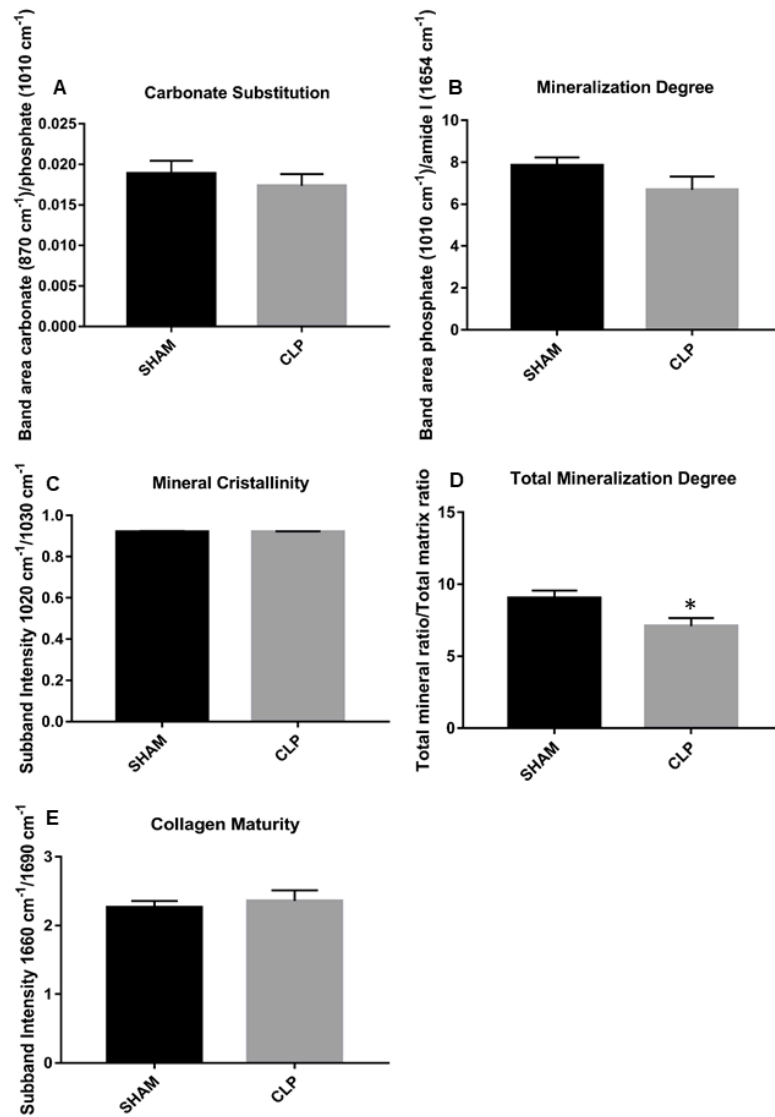


Figure 3. FTIR parameters results. Parameters evaluated in tibia of 7 SHAM and CLP rats (n = 7) and analyzed by t-Student parametric test, results are Mean ± SEM (p < 0.05). **A.** Carbonate Substitution. **B.** Mineralization Degree. **C.** Mineral Crystallinity. **D.** Total Mineralization Degree. **E.** Collagen Maturity.

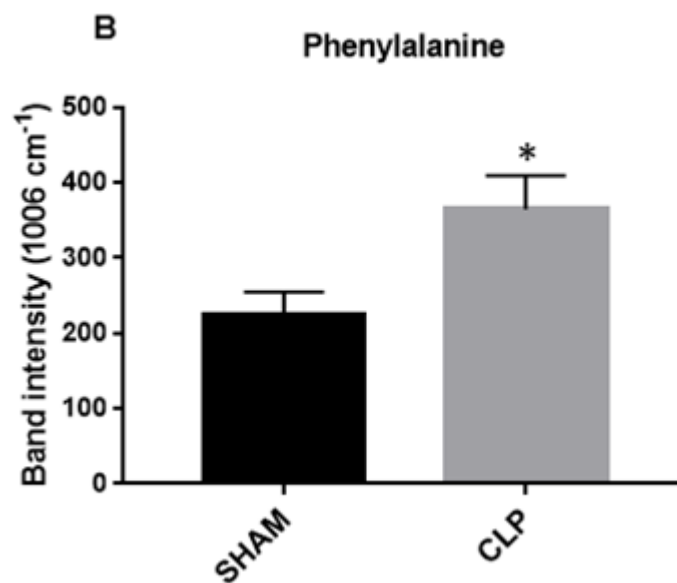
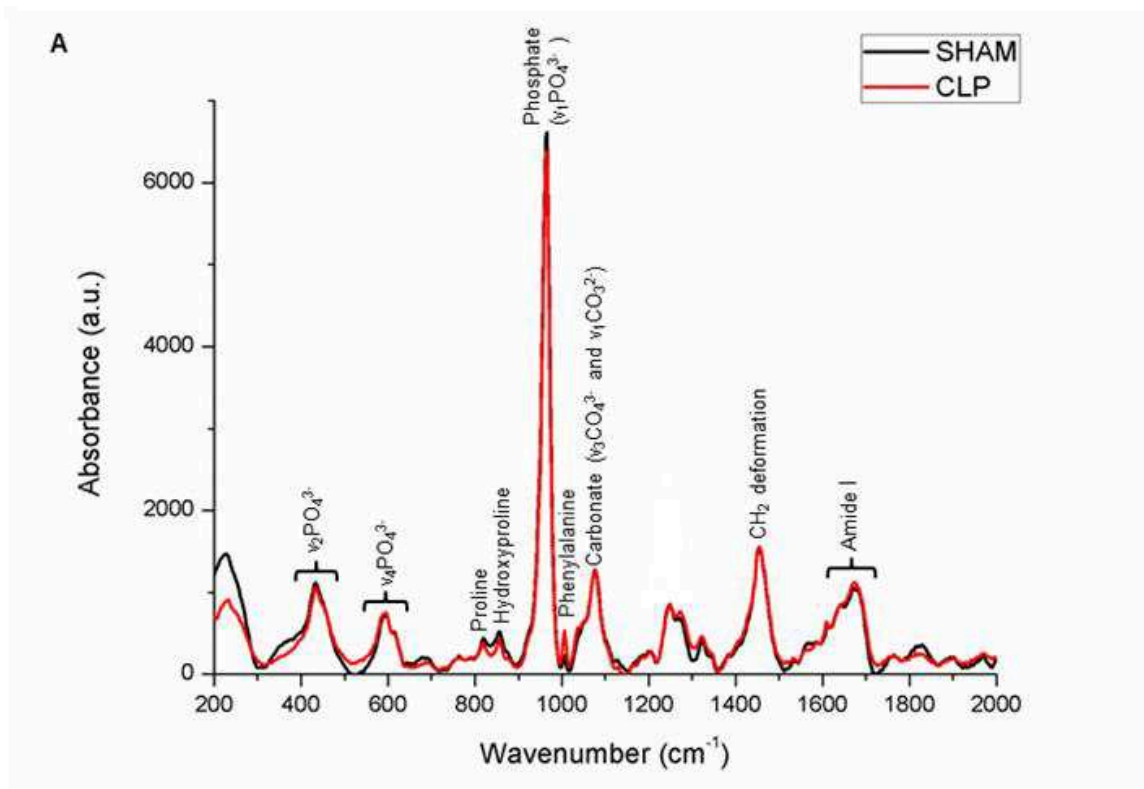


Figure 4. RAMAN spectrum and compounds. **A.** Mean spectrum of bone compounds obtained by the RAMAN analysis in SHAM and CLP rats. **B.** Graph of Phenylalanine with results in Mean \pm SEM of 4 animals ($n = 4$) analyzed by t- Student parametric test ($p < 0.05$).

3.2. Biomechanical testing

The 3-point bending test produces mid-diaphysis fractures under controlled loading conditions. The primary analysis of the test measures 3 elements of biomechanical performance: force (load, or

the force applied to the bone), energy to fracture (the area under the load-displacement curve) and stiffness. Sepsis had no effect ($p > 0.05$) in force, energy to fracture and stiffness than sham rats (Figure 5. A-C).

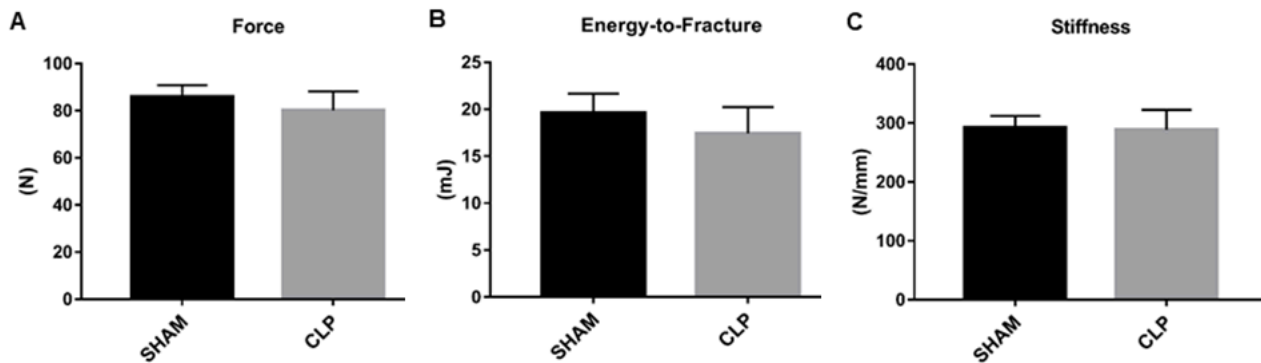


Figure 5. Biomechanical testing. Biomechanical parameters evaluated in the 3-point flexion test performed on tibiae of 7 SHAM and CLP rats ($n = 7$) and analyzed by the t-Student parametric test ($p < 0.05$). **A.** Mean \pm SEM of maximum force reached until fracture (Force, N); **B.** Mean \pm SEM of energy spent to fracture the bone (Energy-to-fracture, mJ); **C.** Mean \pm SEM of stiffness offered by bone during force application (stiffness, N/mm).

3.3. Micro-CT evaluation

The representative 3D reconstructed micro-CT images of the cortical tibia from sham and CLP rats are shown in Figure 6 (A-B). The percent of bone volume, closed porosity, cortical thickness, fractal dimension and degree of anisotropy remained unaltered between CLP and sham rats ($p > 0.05$) (Figure 7.C-G).

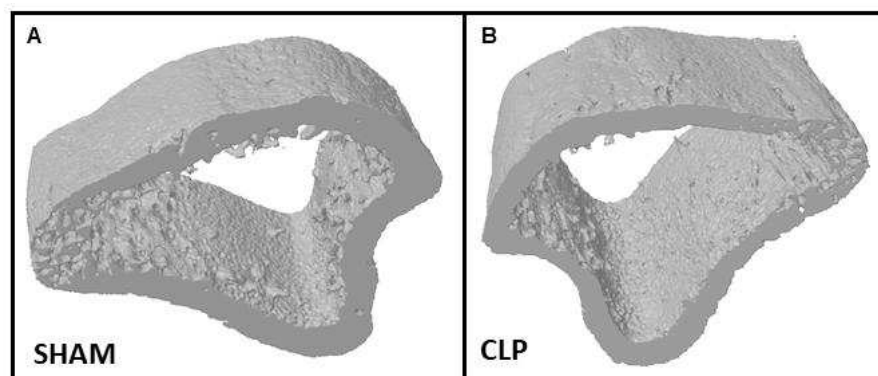


Figure 6. Micro-CT 3D rendering. Three-dimensional images of the cortical bone morphology of the rats tibia. **A.** Image of SHAM rats. **B.** Image of CLP rats.

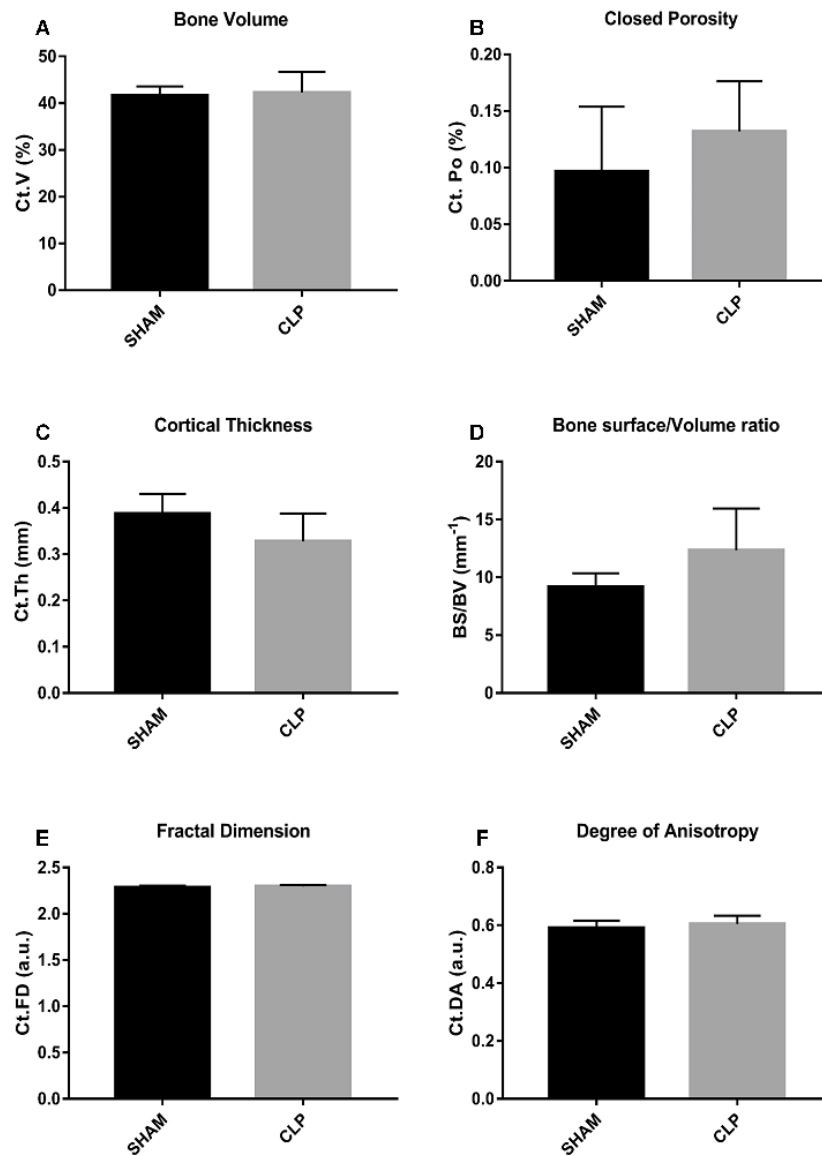


Figure 7. Micro-CT parameters. Bone Quality Parameters evaluated in the Micro-CT in tibias of 4 SHAM and CLP rats ($n = 4$) and analyzed by the t-Student parametric test ($p < 0.05$). **A.** Mean \pm SEM of Percent of Bone Volume; **B.** Mean \pm SEM of Porosity; **C.** Mean \pm SEM of the Thickness of the Bone Cortical; **D.** Mean \pm SEM of the Fractal Dimension; **E.** Mean \pm SEM of Degree of Anisotropy.

3.4. Calcemia

To determine whether sepsis promoted changes in calcemia, calcium concentration was analyzed in plasma of CLP and sham rats. The calcemia was unchanged ($p > 0.05$) in CLP as compared with sham rats (Figure 8).

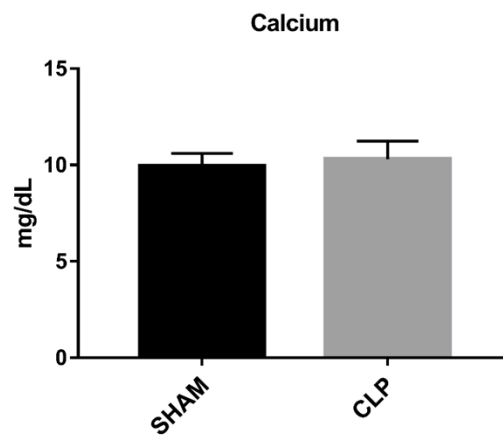


Figure 8. Calcium concentration in plasma. Mean \pm SEM of the plasma calcium dosage performed in the tibia of 6 Sham and CLP rats ($n = 6$) animals and analyzed by t- Student' parametric test ($p < 0.05$).

3.5. Immunohistochemical analysis

Immunodetection of osteoclasts activity by TRAP is shown in Figure 8. This figure shows the TRAP Immunodetection in cortical tibiae. In parallel with presence of osteoclasts in cortical tibiae, the activity of osteoclasts by TRAP in the same territory was increased in CLP than sham rats (Figure 9A e 9B).

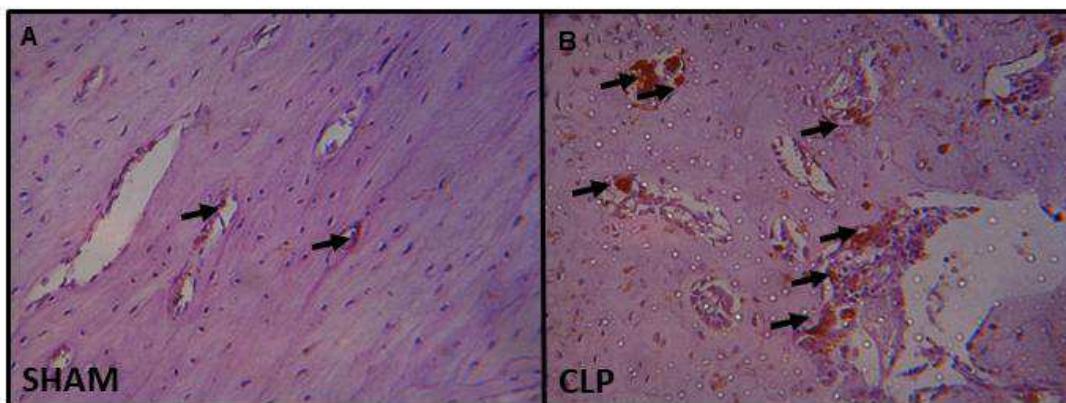


Figure 9. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity. Immunohistochemistry images to detect immunostaining positive for TRAP at the tibial shaft of 6 Sham and CLP rats ($n = 6$). **A.**

Immunostaining positive for TRAP in Sham rats. **B.** Immunostaining positive for TRAP showing the increase of the osteoclast activity in CLP rats.

3.6. Analysis by Atomic Force Microscopy (AFM)

AFM measurement was implemented to examine the difference of the surface roughness of cortical bone in CLP and sham rats. As shown in Figure 10A and 10C, cortical bone of sham rats presents a nanometric roughness. On the other hand, cortical bone in CLP rats present smoother surfaces (Figure 10B and 10D).

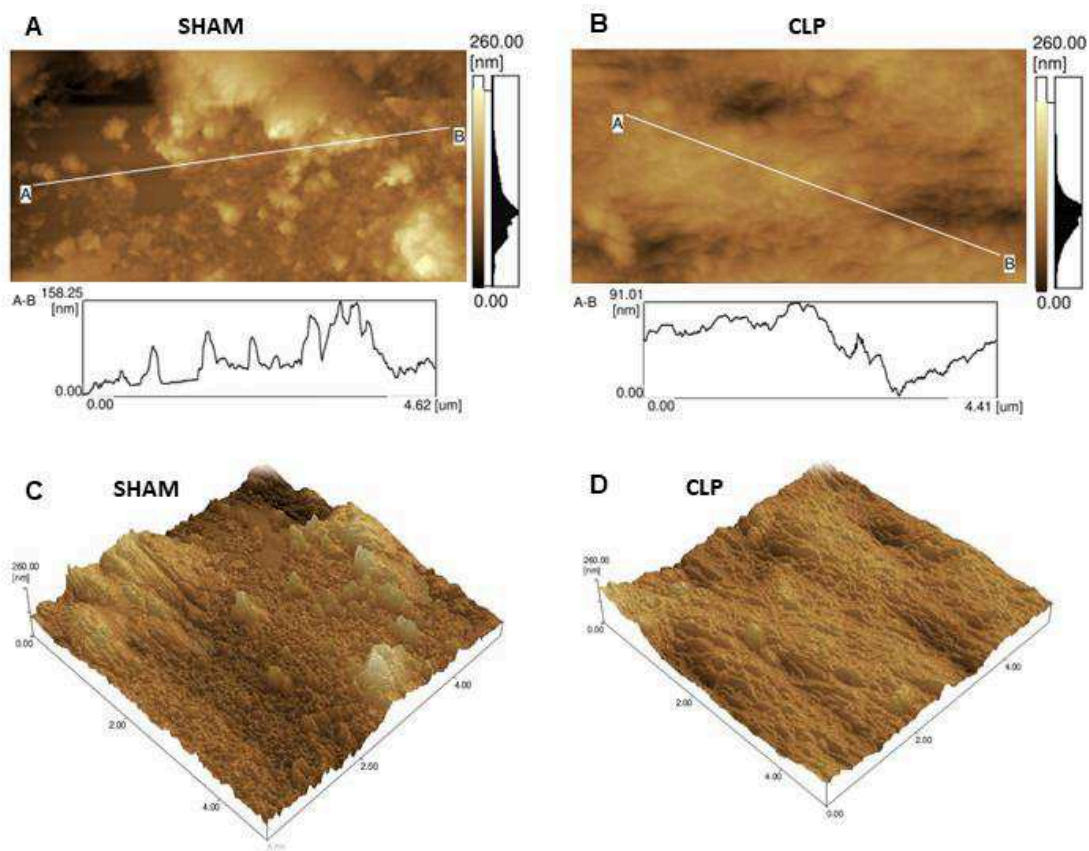


Figure 10. Bone surface roughness by Atomic force microscopy (AFM). AFM Imaging in Cortical Bone. **A and C.** Represent the surface roughness in SHAM rats. **B and D.** represent a decrease in surface roughness in CLP rats.

4. Discussion

This study clearly demonstrates that acute sepsis can promote increased osteoclasts activity on cortical tibia associated with reduction in surface roughness in this territory. Besides, Amide II, amide III and collagen were increased in tibia after acute systemic sepsis induction, indicating

changes in protein composition. These changes are also accompanied by the maintenance of the bone mineral density, bone 3-D microarchitecture and mechanical properties.

Sepsis can be induced experimentally by a procedure known as CLP, which mimic human sepsis [25; 26]. Inflammation induces bone damage by osteoblast ablation, which affects early lymphopoiesis through IL-7-mediated regulation in sepsis. Besides, it is well characterized that inflammatory-mediated osteopenia occurs via activation of osteoclast [27; 28]. Here, the functional role of cortical osteoclasts and changes in cortical bone composition were undiscovered in a classic CLP model of sepsis.

Several chronic inflammatory diseases are strongly related with bone loss [29]. Considering that almost half of patients admitted to the ICU are affected by sepsis [30] and bone fractures is a common endpoint in patients discharged from of intensive care unit [31], we expected change in mechanical or 3-D micro architectural properties of tibia after sepsis in rats. However, the present study indicates that acute systemic sepsis does not change force, energy to fracture and stiffness of tibial shaft. These data are in accordance with similar measurements using femoral shaft in septic rats after 24 h [5]. On the other hand, the maximum load required to fracture the femoral neck was reduced in septic rats after 24 h [5], indicating that acute systemic sepsis could promote mechanical changes in specific parts of bone. In the present study, there was no significant difference in 3-D Micro-CT reconstruction analysis in tibial shaft of septic rats, which corroborate with recently published data on bone volume/total volume ratio, trabecular thickness and separation, connectivity density, DA, and bone mineral density (BMD) in femoral neck of septic rats [5]. It is possible that this duration of mild sepsis is not sufficient to accumulate changes in mechanical or 3-D micro architectural properties detected by mechanical and micro-CT analyses, respectively. Although the present study may suggest that duration of sepsis could promote significant changes in mechanical and architectural properties, sepsis is an extremely turbulent process that brings about several temporary changes, which are not the focus of our study.

High blood phenylalanine levels and phenylketonuria are associated with bone damage [32]. Besides, a parallel relationship between plasma phenylalanine concentrations with osteoclastogenesis was described with peripheral blood mononuclear cell of patients with phenylketonuria [33]. The increase of phenylalanine content in cortical tibia by Raman spectroscopy analysis suggests a possible role of this component in enhancing osteoclastogenesis differentiation and consequently promoting bone resorption.

Cortical bone from rats with acute sepsis had greater collagen fibers, amide II and amide III content as assessed by FTIR and greater phenylalanine content as assessed by Raman spectroscopy. Bone matrix is a two-phase system composed by mineral and collagen phases. Mineral content is

related in determining bone stiffness, while collagen fibers play a pivotal role in its toughness (capacity to absorb energy) [34]. TRAP is expressed by osteoclasts, it has a critical role in synthesis of type I collagen, the main constituent of the organic matrix of bone tissue [35]. However, TRAP also produces reactive oxygen species that promote degradation of this protein. Thus, it is evident that TRAP acts on both synthesis and collagen degradation. In the present work, a positive balance was carried out in the synthesis of collagen, verified through the FTIR. Considering that reduction of collagen content can negatively affect mechanical properties of bone and increase the fracture susceptibility, the increased in collagen content may even be key molecular event for maintaining biomechanical properties of tibial shaft.

In addition, TRAP is related to the regulation of osteoblasts so that, the mineralization process occurs more quickly in situations where TRAP is not present [36]. In the present study, there was an increase in the positive immunostaining for TRAP in CLP rats, as well as an decrease in the degree of total mineralization in septic condition, which indicates a regulatory role of TRAP on mineralization process.

Amide II is a mixed C–N stretch associated with N–H in plane bend. Alterations in this component could indicate changes in protein secondary structure [37]. The higher content of Amide III in bone indicates increased in α - elastins [38], which imparts the properties of extensibility and reversible recoil, enabling tissues to withstand repetitive mechanical stress [39; 40]. The increase in protein bone composition of septic rats suggests that these alterations could prevent expected changes in mechanical properties in tibial shaft.

Osteoblast attachment and differentiation were higher on more complex, micro-rough hydroxyapatite surfaces (Ra ~2 μm) than on smoother topographies (Ra ~1 μm). In contrast, the osteoclast marker tartrate-resistant acid phosphatase activity was increased on smoother than on micro-rough surfaces [41]. Furthermore, scanning electron microscopy revealed the presence of resorption lacunae exclusively on smoother hydroxyapatite coatings [41]. Regarding that, the present study showed increased in osteoclast activity associated with reduction of nanometric roughness in cortical bone shaft of rats with experimental sepsis. It is important to highlight that the potential regulations of osteoclast activity in sepsis may contribute with regulation of calcemia, which is commonly reduced in severe sepsis. Although, the attachment of osteoclast on smoother topographies has already been described in *in vitro* studies [41]; and to the best of our knowledge, this is the first *in vivo* study evaluating nanometric roughness in cortical bone of animal models with experimental sepsis.

The present study could alert to the potential risk of sepsis in bone function. In summary, we showed that acute sepsis induces reduction in nanometric rugosity associated with increase in

osteoclasts activity, suggesting a potential effect in plasma calcium concentration in sepsis. Finally, our study unravels new effects of acute sepsis on bone composition and suggests that septic patients are at risk of bone damage.

ADDITIONAL INFORMATION

Competing financial

The authors declare no competing financial interests.

Authors' contributions

Aguiar MGA, Wutke S, Caixeta DC, Cardoso-Sousa L and Vieira AA collected the data, conceived the research hypothesis and wrote the manuscript. Soares CJ and Soares PBF assisted with the research assays and data collection of bone mechanical and microarchitecture. Dechichi P and Okamoto R were involved in data analysis and interpretation of bone histopathological changes. Goulart LR was involved in data analysis and interpretation of raman spectroscopy. Soares CJ, Soares PBF, Dechichi P, Goulart LR and Okamoto R reviewing and editing all parts of the final document for publication. Sabino-Silva R was involved in conception and design of the study, conceived the research hypothesis and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This research was supported by a grant from CAPES/CNPq (#458143/2014), FAPEMIG (#APQ-02872-16) and National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology (CNPq Process N.: 465669/2014-0). Aguiar EMO was recipient of a FAPEMIG fellowship. We would like to thank our collaborators at the Dental Research Center in Biomechanics, Biomaterials and Cell Biology (CPbio).

References

[1] X. Zhang, N. Chang, Y. Zhang, M. Ye, et al., Bakuchiol Protects Against Acute Lung Injury in Septic Mice. *Inflammation*. 40 (2) (2017) 351-359, <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0481-5>.

- [2] L. Yicong, H. Coedy, C. Anthonya, A. Asli, et al., Sepsis-induced elevation in plasma serotonin facilitates endothelial hyperpermeability. *Sci Rep.* 9 (6) (2016) 22747, <https://doi.org/10.1038/srep22747>.
- [3] H. Kang, Z. Mao, Y. Zhao, T. Yin, et al., Ethyl pyruvate protects against by regulating energy metabolism. *Ther Clin Risk Manag.* 12 (2016) 287-94, <https://doi.org/10.2147/TCRM.S97989>.
- [4] Z. A. Puthuchear, Y. Sun, K. Zeng, L. H. Vu, Z. W. Zhang, R. Z. L. Lim, N. S. Y. Chew, M. E. Cove, Sepsis Reduces Bone Strength Before Morphologic Changes Are Identifiable. *Crit Care Med.* 45 (12) (2017) e1254-e1261. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002732>.
- [5] A. D. Cumming, Changes in plasma calcium during septic shock. *Journal of Accident & Emergency Medicine.* 11 (1) (1994) 3-7.
- [6] G. P. Zaloga, B. Chernow, The Multifactorial Basis for Hypocalcemia During Sepsis: Studies of the Parathyroid Hormone-Vitamin D Axis. *Ann Intern Med.* 107 (1) (1987) 36-41, <https://doi.org/10.7326/0003-4819-107-1-36>.
- [7] G.A. Rodan, T.J. Martin, Therapeutic approaches to bone diseases, *Science.* 289 (5484) (2000) 1508-14, <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1508>.
- [8] S.Harada, G.A. Rodan, Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature,* 423 (6937) (2003) 349, <https://doi:10.1038/nature01660>.
- [9] W. J. Boyle, W.S. Simonet, D. L. Lacey, Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 423 (6937) (2003) 337-42, <https://doi.org/10.1038/nature01658>.
- [10] D. O. Costa, P. D. Prowse, T. Chrones, S. M. Sims, D. W. Hamilton, A. S. Rizkalla, S. J. Dixon, The differential regulation of osteoblast and osteoclast activity by surface topography of hydroxyapatite coatings. *Biomaterials.* 30 (2013)7215-26, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.014>.
- [11] W. J. Boyle, W. S. Simonet, D. L. Lacey, Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 423 (6937) (2003) 337-42.
- [12] J. Wegrzyn, J. P. Roux, D. Farlay, H. Follet, R. Chapurlat, The role of bone intrinsic properties measured by infrared spectroscopy in whole lumbar vertebra mechanics: organic rather than inorganic bone matrix?. *Bone.* 56 (2) (2013) 229-33, <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.06.006>.
- [13] M. Raghavan, N. D. Sahar, D. H. Kohn, M. D. Morris, Age-specific profiles of tissue-level composition and mechanical properties in murine cortical bone. *Bone.* 50 (4) (2012) 942-53, <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.12.026>.
- [14] J. Yang, N. Su, X. Du, L. Chen, Gene expression patterns in bone following lipopolysaccharide stimulation. *Cell Mol Biol Lett.* 19 (4) (2014) 611-22, <https://doi.org/10.2478/s11658-014-0216-2>.

- [15] M. B. Santiago, A. A. Vieira, L. L. Elias, J. A. Rodrigues, A. Giusti-Paiva, Neurohypophyseal response to fluid resuscitation with hypertonic saline during septic shock in rats. *Exp Physiol.* 98 (2013) 556-563, <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2012.066241>.
- [16] S. Khaustova, M. Shkurnikov, E. Tonevitsky, V. Artyushenko, A. Tonevitsky, Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. *Analyst.* 135 (12) (2010) 3183-92, <https://doi.org/10.1039/c0an00529k>.
- [17] M. J. Baker, J. Trevisan, P. Bassan, R. Bhargava, et al., Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. *Nat Protoc.* 9 (8) (2014) 1771-91, <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>.
- [18] N. Kourkoumelis, A. Lani, M. Tzaphlidou, Infrared spectroscopic assessment of the inflammation-mediated osteoporosis (IMO) model applied to rabbit bone. *J Biol Phys.* 38 (4) (2012) 623-35, <https://doi.org/10.1007/s10867-012-9276-6>.
- [19] P. C. C. Júnior, J. F. Strixino, L. Raniero, Analysis of saliva by Fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. *Research on Biomedical Engineering.* 31 (2) (2015) 116-124, <http://dx.doi.org/10.1590/2446-4740.0664>.
- [20] M. M. Figueiredo, J.A.F. Gamelas, A.G. Martins, Characterization of Bone and Bone-Based Graft Materials Using FTIR Spectroscopy, *Infrared Spectroscopy. Life and Biomedical Sciences*, Prof. Theophanides Theophile (Ed.), InTech, 2012, <http://dx.doi.org/10.5772/36379>. Available from: <https://www.intechopen.com/books/infrared-spectroscopy-life-and-biomedical-sciences/characterization-of-bone-and-bone-based-graft-materials-using-ftir-spectroscopy>.
- [21] L. Rieppo, S. Saarakkala, T. Närhi, H. J. Helminen, et al., Application of second derivative spectroscopy for increasing molecular specificity of Fourier transform infrared spectroscopic imaging of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 20 (5) (2012) 451-9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2012.01.010>.
- [22] G. S. Mandair, M. D. Morris, Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength. *Bonekey Reports.* 4 (2015) 620. <http://dx.doi.org/10.1038/bonekey.2014.115>.
- [23] G. D. Rabelo, C.Coutinho-Camillo, L. P. Kowalski, N. Portero-Muzy, J-P. Roux, P. Chavassieux, F. A. Alves, Evaluation of cortical mandibular bone in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Oral Invest.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1007/s00784-017-2153-8>.
- [24] M. L. Bouxsein, S. K. Boyd, B. A. Christiansen, R. E. Guldborg, K. J. Jepsen, R. Müller, Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 25 (2010) 1468–1486, <http://dx.doi.org/10.1002/jbmr.141>.

- [25] K. A. Wichterman, A. E. Baue, I. H. Chaudry, Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 29 (2) (1980) 189-201, [http://dx.doi.org/10.1016/0022-4804\(80\)90037-2](http://dx.doi.org/10.1016/0022-4804(80)90037-2).
- [26] J. A. Buras, B. Holzmann, M. Sitkovsky, Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov.* 4 (10) (2005) 854-65, <https://doi.org/10.1038/nrd1854>.
- [27] A. Terashima, K. Okamoto, T. Nakashima, S. Akira, et al., Sepsis-Induced Osteoblast Ablation Causes Immunodeficiency. *Immunity.* 44 (6) (2016) 1434-43, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.012>.
- [28] A. Terashima, Aberrant bone remodeling during sepsis. *Clin Calcium.* 27 (12) (2017) 1759-1766, <https://doi.org/CliCa171217591766>.
- [29] R. Hardy, M. S. Cooper, Bone loss in inflammatory disorders. *J Endocrinol.* 201 (3) (2009) 309-20, <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0568>.
- [30] J. L. Vincent, Y. Sakr, C.L. Sprung, V. M. Ranieri, Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study*. *Critical Care Medicine.* 34 (2) (2006)344-353, FEB 2006, <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000194725.48928.3A>.
- [31] N. R. Orford, K. Saunders, E. Merriman, M. Henry, J. Pasco, P. Stow, M. Kotowicz, Skeletal morbidity among survivors of critical illness. *Crit Care Med.* 39 (6) (2011) 1295-300, <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318211ff3d>.
- [32] A. B. Mendes, F. F. Martins, W. M. Cruz, L. E. da Silva, C. B. Abadesso, G. T. Boaventura, Bone development in children and adolescents with PKU. *J Inherit Metab Dis.* 35 (3) (2012) 425-30, <https://doi.org/10.1007/s10545-011-9412-7>.
- [33] I. Roato, F. Porta, A. Mussa, L. D'Amico, L. Fiore, D. Garelli, M. Spada, R. Ferracini, Bone impairment in phenylketonuria is characterized by circulating osteoclast precursors and activated T cell increase. *PLoS One.* 5 (11) (2010) e14167, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014167>.
- [34] S. Viguier-Carrin, P. Garnero, P. D. Delmas, The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int.* 17 (3) (2006) 319-36, <https://doi.org/10.1007/s00198-005-2035-9>.
- [35] H. C. Roberts, L. Knott, N.C. Avery, T. M. Cox, M. J. Evans, A. R. Hayman, Altered collagen in tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-deficient mice: A role for TRAP in bone collagen metabolism. *Calcif Tissue Int.* 80 (2007) 400-410, <https://doi.org/10.1007/s00223-007-9032-2>.
- [36] Alison. R. Hayman, Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity.* 41 (3) (2008) 218-223, <https://doi.org/10.1080/08916930701694667>.
- [37] E. P. Paschalis, R. Mendelsohn, A. L. Boskey, Infrared Assessment of Bone Quality: A Review. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 69 (8) (2011) 2170-2178, <https://doi.org/10.1007/s11999-010-1751-4>.

- [38] M. C. Popescu, C. Vasile, O. Craciunescu, Structural analysis of some soluble elastins by means of FT-IR and 2D IR correlation spectroscopy. *Biopolymers*. 93 (12) (2010) 1072-84, <https://doi.org/10.1002/bip.21524>.
- [39] L. D. Muiznieks, F. W. Keeley, Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective. *Biochim Biophys Acta*. 1832 (7) (2013) 866-75, <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.11.022>.
- [40] S. Rauscher, R. Pomès, Structural disorder and protein elasticity. *Adv Exp Med Biol*. 725 (2012) 159-83, https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0659-4_10.
- [41] D. O. Costa, P. D. Prowse, T. Chrones, S. M. Sims, D. W. Hamilton, A. S. Rizkalla, S. J. Dixon, The differential regulation of osteoblast and osteoclast activity by surface topography of hydroxyapatite coatings. *Biomaterials*. 34 (30) (2013) 7215-26, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.014>.