



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA



EDUARDO MOURA MENDES

Efeitos da radiação ionizante no osso imaturo: influência na rede de osteócitos, padrão de colágeno e microarquitetura

Effects of Ionizing radiation on woven bone: influence on osteocyte network, collagen pattern and microarchitecture

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia na Área de Clínica Odontológica Integrada.

Uberlândia, 2019

EDUARDO MOURA MENDES

Efeitos da radiação ionizante no osso imaturo: influência na rede de osteócitos, padrão de colágeno e microarquitetura

Effects of Ionizing radiation on woven bone: influence on osteocyte network, collagen pattern and microarchitecture

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia na Área de Clínica Odontológica Integrada.

Orientadora: Profa. Dra. Priscilla Barbosa Ferreira Soares

Banca Examinadora:

Orientadora: Profa. Dra. Priscilla Barbosa Ferreira Soares

Profa. Dra. Paula Dechichi

Prof. Dr. Gustavo Davi Rabelo

Uberlândia, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M538e
2019 Mendes, Eduardo Moura, 1977
 Efeitos da radiação ionizante no osso imaturo = Effects of Ionizing radiation on woven bone [recurso eletrônico] : influência na rede de osteócitos, padrão de colágeno e microarquitetura = influence on osteocyte network, collagen pattern and microarchitecture / Eduardo Moura Mendes. - 2019.

 Orientadora: Priscilla Barbosa Ferreira Soares.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

 Modo de acesso: Internet.

 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1261>

 Inclui bibliografia.

 Inclui ilustrações.

 1. Odontologia. 2. Radiação ionizante. 3. Colágeno. 4. Osteócitos. I. Soares, Priscilla Barbosa Ferreira, 1974, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Av. Pará, 1720, Bloco 4L, Anexo B, Sala 35 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 3225-8115/8108 - www.ppgoufu.com - copod@umuarama.ufu.br



ATA

Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de Mestrado - COPOD

Data: 26/02/2019

Discente: **Eduardo Moura Mendes (11712ODO007)**

Título do Trabalho: ***Effects of Ionizing radiation on woven bone: influence on osteocyte network, collagen pattern and microarchitecture.***

Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Linha de pesquisa: Processo de Reparo.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Processo de Reparo.

As **nove horas** do dia **vinte e seis de fevereiro de 2019** no Anfiteatro do Bloco 4L, Anexo A - sala 23, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em janeiro de 2019, assim composta: Professores Doutores: Paula Dechichi (UFU); Gustavo Davi Rabelo (UFSC); e o orientador(a) do(a) candidato(a): **Priscilla Barbosa Ferreira Soares**. Ressalta-se que o Prof. Dr. Gustavo Davi Rabelo participou da defesa por meio de webconferência desde a cidade de Florianópolis - SC e os demais membros da banca e o aluno participaram *in loco*.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa **Dra. Priscilla Barbosa Ferreira Soares** apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos (às) examinadores (as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Finalizada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o(a) candidato(a) (a)provado(a).

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 11 horas e 58 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada eletronicamente pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Priscilla Barbosa Ferreira Soares, Professor(a) do Magistério Superior**, em 26/02/2019, às 12:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Paula Dechichi Barbar, Professor(a) do Magistério**



Superior, em 26/02/2019, às 12:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Davi Rabelo, Usuário Externo**, em 26/02/2019, às 12:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0999408** e o código CRC **24A04A72**.

DEDICATÓRIA

Ao meu companheiro Luciano,
pelo amor e apoio incondicionais,
imprescindíveis durante essa caminhada.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, irmãos, sobrinhas,

“A família é a demonstração perfeita do amor incondicional.”

Esteja eu onde estiver, meu coração estará sempre com vocês.

Obrigado pelo amor e apoio inesgotáveis.

Ao meu companheiro Luciano,

“O maior amor está no companheirismo, no confiante e recíproco afeto, na conversa, no carinho constante.”

Agradeço a benção de poder compartilhar a vida com você. Obrigado pelo pelas palavras doces de incentivo, por todo carinho e atenção com que me acolhe.

À minha orientadora Priscilla Barbosa Ferreira Soares,

“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou pelo caminho.”

Obrigado pelo apoio, ensinamentos e pela confiança depositados em mim. Obrigado pelo carinho com que me recebeu, pela amizade e oportunidade. Você sempre será um exemplo para mim.

À minha amiga-irmã Luciana Guarda Marques,

“A amizade promove a paz nos corações e fortalece os laços que a distância separa”.

Obrigado pelo seu carinho e de sua família, me acolhendo sempre com amor.

AGRADECIMENTOS

Aos professores da banca de qualificação, Prof^a. Dr^a. Camilla Christian Gomes Moura, Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira e Prof. Dr. Pedro Henrique Justino Oliveira Limirio pela contribuição para o enriquecimento do trabalho.

Aos professores da banca de defesa, Prof^a. Dr^a. Priscilla Barbosa Ferreira Soares, Prof^a. Dr^a. Paula Dechichi e Prof. Dr. Gustavo Davi Rabelo pela disponibilidade e ensinamentos.

Aos amigos do grupo de pesquisa Biaor (Biomecânica Aplicada à Odontologia Restauradora) pelo amparo durante o trabalho.

Aos queridos Milena Suemi Irie, Juliana Simeão Borges, Jessyca Figueira Venâncio, Pedro Henrique Justino Oliveira Limirio, obrigado pela convivência e ajuda durante as etapas do trabalho.

Aos amigos de Mestrado pelo companheirismo, em especial às amigas Cristiane Sousa e Beatriz Vieira pela companhia nas viagens à Uberlândia.

Ao médico oncologista Dr. Vitor Carvalho Lara e aos físicos médicos Ricardo Fernandes Goulart, Adriana Rosa de Oliveira, Luiz Fernando Pirani e Adriano Luís do setor de Oncologia do Hospital Escola da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pela ajuda durante os experimentos da pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia pelo apoio à pesquisa, ensino e extensão.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, sempre nos atendendo com carinho e contribuindo para o funcionamento dos setores.

À Faculdade de Medicina Veterinária (UFU) representada pelo diretor Amado da Silva Nunes Júnior.

Ao Hospital Odontológico da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia representado pelo Prof. Dr. Márcio Teixeira.

Ao CPbio, Centro de Pesquisa Odontológico de Biomecânica, Biomateriais e Biologia Celular da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

À FAPEMIG pelo auxílio financeiro e financiamento desta pesquisa.

À FPM (Faculdade Patos de Minas), seus professores e demais funcionários pelo apoio durante o período de trabalho.

EPÍGRAFE

*“A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

SUMÁRIO

Resumo.....	12
Abstract	14
1 Introdução e Referencial Teórico	16
2 Objetivos	24
3 Artigo - <i>Effects of Ionizing radiation on woven bone: influence on osteocyte network, collagen pattern and microarchitecture</i>	26
4 Conclusão	49
Referências	51
Anexos	61
Parecer do Comitê de Ética	62
Release para imprensa	63

RESUMO

Efeitos da radiação ionizante no tecido ósseo: influência na rede de osteócitos, padrão de colágeno e microarquitetura – EDUARDO MOURA MENDES- Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Uberlândia.

RESUMO

A radiação ionizante provoca alterações no processo de reparo ósseo. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da radiação ionizante no osso imaturo de uma área lesionada. Vinte coelhos foram submetidos à cirurgia para a criação de defeitos ósseos em suas tíbias esquerdas. Após 2 semanas, eles foram aleatoriamente divididos em dois grupos (n = 10): Nolr (grupo controle); Ir (grupo irradiado). Os animais do grupo Ir receberam irradiação (dose única de 30 Gy) nas tíbias operadas. Quatro semanas após o procedimento cirúrgico os animais foram eutanasiados. A microarquitetura tridimensional foi analisada por meio de microtomografia por raios-X (micro CT). Os resultados mostraram que a espessura trabecular do Ir foi menor que do Nolr ($p = 0,028$), mas nenhuma diferença foi encontrada para a fração de volume ósseo. A rede de osteócitos, a quantificação da área óssea e o padrão de colágeno foram analisados histomorfometricamente. A análise da rede de osteócitos mostrou que as lacunas preenchidas por osteócitos foram mais numerosas ($p < 0,0001$) no Nolr ($2,61 \pm 0,64$) do que no Ir ($1,97 \pm 0,53$) e que as lacunas vazias estavam mais presentes ($p < 0,003$) no grupo Ir ($0,14 \pm 0,10$) em comparação com Nolr ($0,09 \pm 0,10$). O tamanho médio das lacunas de osteócitos revelou valores maiores ($p < 0,01$) em Ir ($15,41 \pm 4,41$) do que no grupo Nolr ($12,72 \pm 3,73$). A análise da quantificação da área óssea não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A análise de Picrosirius Red revelou maior quantidade ($p < 0,05$) de colágeno maduro no grupo Nolr ($28,96 \pm 5,31$) do que no grupo Ir ($23,42 \pm 4,47$). A quantificação de colágeno imaturo não revelou diferença estatística entre os grupos. Os resultados evidenciam um atraso no processo de reparo do osso irradiado, 14 dias após a radioterapia.

Palavras chave: Radiação ionizante, Reparo ósseo, Osteócito, Microtomografia por raios-X, Colágeno

ABSTRACT

Efeitos da radiação ionizante no tecido ósseo: influência na rede de osteócitos, padrão de colágeno e microarquitetura – EDUARDO MOURA MENDES- Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Uberlândia.

ABSTRACT

Ionizing radiation causes changes in bone repair process. The aim of the present study was to evaluate the effects of ionizing radiation on immature bone of an injured area. Twenty rabbits underwent surgery for the creation of bone defects in their left tibias. After 2 weeks, they were randomly divided in two groups (n = 10): Nolr (control group); Ir (irradiated group). Ir animals were irradiated (single dose 30 Gy) in the operated tibias. Four weeks after the surgical procedure the animals were euthanized. Three-dimensional microarchitecture was analyzed by X-ray microtomography (micro CT). Results showed that the trabecular thickness of the Ir was smaller than Nolr ($p = 0.028$), but no difference was found for bone volume fraction. Osteocyte network, bone area quantification and collagen pattern were histomorphometrically analyzed. Analysis of osteocyte network showed that lacunae filled by osteocytes were more numerous ($p < 0.0001$) in Nolr (2.61 ± 0.64) than Ir (1.97 ± 0.53) and empty lacunae were more present ($p < 0.003$) in Ir group (0.14 ± 0.10) compared to Nolr (0.09 ± 0.10). Mean size of osteocyte lacunae revealed higher values ($P < 0.01$) for Ir (15.41 ± 4.41) than Nolr group (12.72 ± 3.73). Analysis of the bone area quantification showed no statistically significant difference between groups. Analysis of Picrosirius Red revealed a higher amount ($p < 0.05$) of mature collagen in Nolr group (28.96 ± 5.31) than Ir group (23.42 ± 4.47). Quantification of immature collagen showed no statistical difference between the groups. Results evidenced a delay in repair process of irradiated bone, 14 days after radiotherapy.

Key words: Ionizing radiation, Bone repair, Osteocyte, X-ray microtomography, Collagen

INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

Efeitos da radiação ionizante no tecido ósseo: influência na rede de osteócitos, padrão de colágeno e microarquitetura – EDUARDO MOURA MENDES- Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Uberlândia.

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo, mineralizado que passa por constante remodelação (Yi *et al.*, 2016), cuja organização estrutural é responsável pelo suporte, propriedades mecânicas, homeostase mineral e equilíbrio ácido-base (Mackiewicz *et al.*, 2011). A matriz óssea é composta de células e material extracelular calcificado. A parte inorgânica da matriz é composta por cristais de hidroxiapatita hidratados. A parte orgânica da matriz é constituída por colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas (Barth *et al.*, 2011; Reznikov *et al.*, 2014; Yi *et al.*, 2016).

Osteoblastos são células do tecido ósseo, derivados das células mesenquimais osteoprogenitoras, que sintetizam a porção orgânica e mineralizam a matriz (Clarke, 2008). Durante a formação óssea os osteoblastos podem sofrer apoptose, tornar-se células de revestimento ósseo ou ficarem aprisionados na matriz mineralizada, tornando-se osteócitos (Bonewald, 2011). As células de revestimento ósseo (osteoblastos quiescentes) comunicam-se com a rede de osteócitos e retornam suas atividades como osteoblastos após estímulos hormonais e mecânicos (Clarke, 2008). Os osteócitos e seus prolongamentos celulares formam uma rede de canalículos com numerosas projeções citoplasmáticas que participam da dinâmica do tecido ósseo, mantendo uma linha de vida metabólica (Bonewald, 2011; Mackiewicz *et al.*, 2011).

Osteoclastos são células de origem hematopoiética, formados pela fusão de precursores sanguíneos mononucleados, sendo responsáveis pela reabsorção tanto da porção orgânica quanto inorgânica da matriz (Katagiri & Takahashi, 2002). Os osteoclastos juntamente com os osteoblastos modelam e remodelam o osso durante o desenvolvimento, mantêm e reparam o esqueleto. Os osteócitos, por sua vez, podem remover íons da matriz para homeostase do cálcio (Katagiri & Takahashi, 2002; Bonewald, 2011).

A matriz orgânica do osso é composta principalmente por colágeno tipo I que passa por um processo de reticulação que promove a estabilidade de sua tripla hélice e facilita a precipitação de cristais de hidroxiapatita (Du *et al.*,

2018). Essa associação de colágeno e hidroxiapatita confere ao osso melhores propriedades biomecânicas (Tzaphlidou, 2005; Du *et al.*, 2018).

O tecido ósseo é dinâmico e sofre remodelação e reparo ao longo da vida. A remodelação óssea ocorre frente a diferentes estímulos metabólicos (citocinas e hormônios) em quatro fases distintas: quiescência / ativação, marcada pela formação de osteoclastos; reabsorção osteoclástica; reversão, marcada pela ocupação das lacunas de Howship pelos osteoblastos (Clarke, 2008; Brandi, 2009; Katsimbri, 2017). A remodelação ocorre pelo sistema RANK-OPG-RANKL (Katagiri, 2002). O receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) é um receptor presente na superfície de células pré-osteoclásticas e o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) é uma proteína expressa pelas células de revestimento e osteoblastos (Clarke, 2008). Quando há ligação RANK-RANKL ocorre ativação do processo de reabsorção óssea (Katsimbri, 2017). A osteoprotegerina (OPG) é uma proteína secretada por osteoblastos que tem ação oposta ao RANKL, ou seja, inibe a reabsorção óssea para que se dê início ao processo de formação óssea (Mackiewicz *et al.*, 2011).

Evidências científicas demonstram que os osteócitos são os principais determinantes da estrutura e função óssea, pois influenciam a função dos osteoblastos e osteoclastos (Bonewald, 2011; Dallas *et al.*, 2013; Bellido, 2014). Os osteócitos produzem proteínas WNT1 que sinalizam a formação óssea, além de esclerostina, proteína que possui ação oposta, inibindo a formação óssea (Rauch, 2017). A principal fonte de RANKL na remodelação óssea são os osteócitos, os quais podem sofrer ação hormonal e apoptose, processo diretamente relacionado à reabsorção óssea (Nakashima *et al.*, 2011; Bellido, 2014). Os osteócitos regulam o processo de formação óssea através do mecanismo SOST / esclerostina enquanto regulam o processo de remodelação através do sistema RANK-OPG-RANKL (Shah *et al.*, 2018).

Os osteócitos orquestram o processo de remodelação óssea, guiados por estímulos biológicos e mecânicos através de sua rede lacunar-canalicular, transmitindo sinais aos osteócitos vizinhos e às células da superfície óssea (Heinonen *et al.*, 2018). Os canalículos dessa rede são ocupados por prolongamentos celulares dos osteócitos e por fluido extracelular, responsável

pelo transporte de resíduos celulares, nutrientes e moléculas de sinalização (Dallas *et al.*, 2013). Os osteócitos participam da homeostase do cálcio por meio da dissolução do mineral de seus canaliculos e mantêm o equilíbrio de remodelação óssea, permitindo o reparo dos microdanos da fadiga (Varga *et al.*, 2015; Nango *et al.*, 2016).

O trauma ao tecido ósseo desencadeia eventos que objetivam sua regeneração (Borrelli *et al.*, 2012). O reparo ósseo pode ocorrer diretamente por meio de ossificação intramembranosa, indiretamente por ossificação endocondral ou uma combinação de ambas, como em situações de fraturas ou distrações osteogênicas (Borrelli *et al.*, 2012; Hvid *et al.*, 2016). O processo de reparo é coordenado por citocinas e fatores de crescimento, cujo resultado final é a produção de uma matriz de colágeno, cuja mineralização restaura as propriedades mecânicas normais do osso (Dimitriou *et al.*, 2005; Rosset *et al.*, 2014). A lesão provoca sangramento imediato na região danificada e um coágulo logo se forma dando início ao processo de reparo. Os tecidos moles da região mostram as alterações habituais da inflamação aguda com vasodilatação e exsudação de plasma e leucócitos (McKibbin, 1978). É durante esta fase que os macrófagos e as plaquetas infiltram o local e liberam fatores de crescimento (Borrelli *et al.*, 2012) e citocinas inflamatórias, principalmente interleucinas IL-1 e IL-6 (Giannoudis *et al.*, 2007), levando ao recrutamento, proliferação e diferenciação celular (Rosset *et al.*, 2014). As células mesenquimais e os fibroblastos proliferam e estão associados à expressão de fatores de crescimento de fibroblastos (Borrelli *et al.*, 2012; Hvid *et al.*, 2016). O coágulo torna-se povoado por osteoblastos, condroblastos diferenciados a partir de células mesenquimais e fibroblastos. Gradativamente, o coágulo é substituído por tecido ósseo imaturo por meio de ossificação intramembranosa ou endocondral (Dimitriou *et al.*, 2005; Borrelli *et al.*, 2012). Por fim, o tecido ósseo recém-formado é remodelado pela atividade de osteoblastos e osteoclastos em osso lamelar maduro (Ai-Aql *et al.*, 2008).

O reparo ósseo intramembranoso foi bem documentado em estudos histológicos que utilizaram tíbias de coelhos (Ägren & Arwill, 1968). A formação do coágulo sanguíneo dá início ao processo de reparação óssea. Uma semana

após a injúria, o tecido de granulação preenche completamente o defeito, o perióstio torna-se espessado e é possível observar a presença de matriz osteóide. Em duas semanas, numerosas trabéculas de osso imaturo se formam e substituem a maior parte do tecido de granulação. Assim, o defeito é preenchido por trabéculas ósseas e espaços fibrovasculares. Na quarta semana, a resposta inflamatória diminui e o defeito está totalmente preenchido com novo osso imaturo que contém numerosos osteócitos grandes e distribuídos irregularmente. A borda cortical adjacente ao defeito sofre reabsorção formando cavidades haversianas que aumentam gradualmente até que a cavidade se conecta diretamente com o espaço fibrovascular do defeito. O vaso sanguíneo do canal haversiano une-se por anastomoses aos vasos do defeito. Nova matriz óssea passa a ser depositada ao redor desses vasos formando um novo sistema haversiano composto parcialmente de osso cortical preexistente e parcialmente do novo osso do defeito. Após dois meses o osso imaturo incorpora-se ao osso cortical. Os espaços fibrovasculares são reduzidos em tamanho e aparecem como grandes canais haversianos. O processo de reparo está praticamente completado após quatro meses, com presença de osso lamelar (Ägren & Arwill, 1968; Najjar & Kahn, 1971).

O tecido ósseo no processo de ossificação, seja para reparo ou para formação óssea, organiza-se em osso compacto ou esponjoso, estabelecendo uma microarquitetura característica. No osso compacto as lamelas são justapostas, enquanto o osso esponjoso apresenta trabéculas ósseas que delimitam pequenos espaços macroscópicos (Rho et al., 1998) A formação do osso compacto ou esponjoso está intimamente relacionada às necessidades funcionais dos ossos (Fonseca *et al.*, 2014).

A microarquitetura óssea refere-se tanto ao volume ósseo como à sua organização e distribuição espacial, representando uma resposta adaptativa às variações mecânicas (Fonseca *et al.*, 2014). Atualmente, a microarquitetura óssea trabecular é reconhecida como um importante componente da qualidade óssea, podendo refletir sua fragilidade (Carbonare *et al.*, 2005). Os fatores ligados à qualidade óssea incluem microarquitetura óssea (Donnelly, 2011), taxa de remodelação, grau de mineralização e sua heterogeneidade, tamanho dos

cristais de hidroxiapatita (Chappard *et al.*, 2008), composição do colágeno e das proteínas não-colágenas, viabilidade dos osteócitos e resistência micro ou nanomecânica (Fonseca *et al.*, 2014). A qualidade óssea é um descritor global da massa óssea, geometria óssea e propriedades do material tecidual que, juntas, contribuem para a resistência óssea total (Guda *et al.*, 2014).

O estabelecimento da qualidade óssea que determina o desempenho dos ossos pode ser alterado por fatores ambientais e fisiológicos, principalmente em áreas em reparação (Borrelli *et al.*, 2012). A radiação ionizante utilizada em diagnósticos e tratamentos é um dos elementos que influenciam no processo de reparo ósseo (Rocha *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2017). As alterações a nível celular e vascular provocadas por altas doses de radiação no tecido ósseo resultam na neoformação de um tecido desorganizado (Batista *et al.*, 2014) e rico em tecido fibrótico (Barth *et al.*, 2011; Lucatto *et al.*, 2011; Bartlow *et al.*, 2018). Após a exposição à radiação ionizante, ocorrem alterações vasculares que se iniciam com o aumento da permeabilidade das células endoteliais, resultando em disfunção endotelial (Baselet *et al.*, 2018). A medula hematopoiética irradiada é substituída por uma medula gordurosa e há diminuição do número de células-tronco mesenquimais (Pacheco & Stock, 2013; Lambert *et al.*, 2016). Os efeitos celulares da radiação são morte celular imediata ou retardada, lesão celular com recuperação, parada da divisão celular e reparo anormal com neoplasia (Williams & Davies, 2006). As alterações na atividade celular prejudicam o processo de remodelação e diminuem as propriedades mecânicas do osso, deixando-o susceptível à fratura (Pacheco & Stock, 2013; Lambert *et al.*, 2016).

Os efeitos da radiação no reparo incluem diminuição da atividade osteoblástica (Zhang *et al.*, 2017) e morte de osteócitos (Dudziak *et al.*, 2000). A presença de lacunas vazias e diminuição de osteócitos afetam negativamente a mecanotransdução, a mecanosensibilização (Ma *et al.*, 2008), retardam o reparo e aumentam a formação de osso imaturo (Inyang *et al.*, 2010; Zheutlin *et al.*, 2015). Os danos aos osteoblastos causam diminuição da produção de matriz óssea e reabsorção sem oposição pelos osteoclastos (Williams & Davies, 2006; Donneys *et al.*, 2014). Logo após a irradiação, há um aumento precoce de osteoclastos que reabsorvem o osso trabecular neoformado (Zhang *et al.*, 2017).

Porém, a longo prazo, há uma depleção dessas células que prejudica o turnover ósseo homeostático e permite a continuação da deposição de matriz de baixa qualidade (Oest et al., 2016). Há um aumento de matriz imatura, não mineralizada que indica retardo do reparo, devido à função prejudicada dos osteoblastos (Inyang et al., 2010; Zheutlin et al., 2015).

A radiação provoca alterações na microarquitetura óssea (Rabelo et al., 2010) que incluem perda de osso trabecular (Oh & Huh, 2014), espessamento do osso cortical, aumento da densidade mineral (Oest et al., 2016). Na nanoestrutura, a radiação provoca alterações físico-químicas na matriz que contribuem para a fragilidade óssea (Soares et al., 2018) e prejudicam a formação de osso maduro, pois afetam a maturação do colágeno e os cristais de hidroxiapatita (Zheutlin et al., 2015; Oest et al., 2016). A radiação ionizante rompe a estrutura molecular do colágeno, induz alterações na composição química e no alinhamento molecular das fibrilas e minerais (Oest & Damron, 2014; Oest et al., 2016). Além disso, induz ao aumento da reticulação do colágeno, provocando o enrijecimento da matriz e prejudicando sua remodelação (Limirio et al., 2019). Os efeitos deletérios da radiação na estrutura hierárquica do osso maduro prejudicam seu reparo e sua remodelação (Pacheco & Stock, 2013).

Recentemente há um foco renovado para garantir a recuperação da qualidade do osso utilizando metodologias capazes de avaliar a qualidade óssea (Carbonare et al., 2005), mudanças no processo de reparo (Irie et al., 2018) e alterações estruturais (Chappard et al., 2008). A associação de metodologias como ensaios mecânicos (Donnelly, 2011), microtomografia computadorizada e histomorfometria contribuem para o avanço do conhecimento nesta área (Carbonare et al., 2005). A microtomografia computadorizada (micro CT), padrão-ouro para a determinação da microarquitetura e morfologia ósseas 3D, foi desenvolvida para realizar imagens in vitro de pequenas amostras ósseas com resolução isotrópica na faixa de 10 a 100 μm (Irie et al., 2018). Esta resolução permite análise tridimensional altamente precisa do volume ósseo, da rede trabecular (número trabecular, espessura trabecular, separação trabecular, padrão trabecular) e das superfícies corticais endosteal e periosteal

(Kalpakcioglu *et al.*, 2008; Guda *et al.*, 2014). A micro CT não fornece informações sobre as atividades celulares, mas oferece a vantagem de não ser destrutiva para amostras ósseas, que podem, portanto, ser processadas posteriormente por métodos histológicos convencionais (Chappard *et al.*, 2008).

A histomorfometria é a avaliação quantitativa de amostras biológicas e baseia-se no processamento post-mortem *ex vivo* (Guda *et al.*, 2014), permitindo uma análise abrangente do desenvolvimento e remodelação óssea através de índices estáticos e dinâmicos, bem como uma avaliação das características microarquitetônicas do osso (Yeh, 2018).

O bjetivos

Efeitos da radiação ionizante no tecido ósseo: influência na rede de osteócitos, padrão de colágeno e microarquitetura – EDUARDO MOURA MENDES- Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Uberlândia.

2. Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da radiação ionizante no osso imaturo no local do processo de reparo.

Objetivos específicos

1. Analisar a microarquitetura óssea por micro CT por meio de parâmetros morfológicos de densidade mineral, porcentagem de volume ósseo (BV/TV), densidade de superfície óssea (BS/TV), espessura trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.n) e separação trabecular (Tb.Sp).
2. Analisar histomorfometricamente a quantidade de matriz óssea, o número de osteócitos, o tamanho e número de lacunas vazias.
3. Analisar a maturidade do colágeno da matriz óssea.

Artigo

Efeitos da radiação ionizante no tecido ósseo: influência na rede de osteócitos, padrão de colágeno e microarquitetura – EDUARDO MOURA MENDES- Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Uberlândia.

3. Artigo

Artigo a ser enviado para publicação no periódico Clinical Oral Investigations

Effects of ionizing radiation on woven bone: influence on osteocyte network, collagen pattern and microarchitecture

Eduardo Moura Mendes¹, Milena Suemi Irie¹, Gustavo Davi Rabelo², Juliana Simeão Borges¹, Paula Dechichi³, Priscilla Barbosa Ferreira Soares¹

¹ Department of Periodontology and Implantology, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia, Avenida Pará s/n°, Campus Umuarama, Bloco 4L, Bairro Umuarama, 38.400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

² Department of Dental Clinic, School of Dentistry, Federal University of Juiz de Fora, Rua José Lourenço Kelmer, S/n - São Pedro, Juiz de Fora, MG, 36036-900, Brazil.

³ Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia, Avenida Pará 1720, Campus Umuarama, Bloco 2B, Bairro Umuarama, 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

Corresponding author:

Priscilla Barbosa Ferreira Soares

Address: Avenida Pará s/n°, Campus Umuarama, Bloco 4L, Bairro Umuarama. Uberlândia - Minas Gerais – Brazil, 38.400-902. Phone/ Fax: +55 (34) 3225-8106. e-mail: pbfsoares@yahoo.com.br

Effects of ionizing radiation on woven bone: influence on osteocyte network, collagen pattern and microarchitecture

Abstract

Objectives: Evaluate the effects of ionizing radiation on microarchitecture, osteocyte network and collagen maturity in the area under bone repair.

Materials and Methods: Bone defects were created in the left tibia of 20 *New Zealand* rabbit. After 2 weeks, they were aleatory divided into (n = 10): Nolr (no irradiated group) and Ir (irradiated group). In Ir group, animals received single-dose irradiation of 30 Gy on tibia and euthanized after 2 weeks. Bone microarchitecture, osteocyte network, bone area, and collagen pattern were analyzed.

Results: Trabecular thickness in Ir was lower than in Nolr ($p=0.028$). No difference was found for bone volume fraction and bone area. Regarding osteocyte network, lacuna filled with osteocytes were more numerous ($p<0.0001$) in Nolr (2.61 ± 0.64) than Ir (1.97 ± 0.53). Empty lacunae were more present ($p<0.003$) in Ir (0.14 ± 0.10) compared to Nolr (0.09 ± 0.10). The mean osteocyte lacunae size revealed higher values ($p<0.01$) in Ir (15.41 ± 4.41) than non-irradiated animals (12.72 ± 3.73). Picrosirius Red analysis showed higher amount ($p<0.05$) of mature collagen in Nolr (28.96 ± 5.31) than in Ir (23.42 ± 4.47). Immature collagen quantification revealed no statistical difference between the groups.

Conclusions: A delay in bone repair was shown, revealed by thinner trabeculae arrangement, less osteocytes and more empty lacunae in irradiated woven bone. Smaller osteocyte lacunae size and greater amount of mature collagen in non-irradiated group also support this fact.

Clinical Relevance: After surgical resections, patients with neoplastic lesion might undergo radiotherapy. By understanding the irradiated bone repair process, novel therapies can be developed.

Keywords Ionizing radiation; bone repair; osteocyte; x-ray microtomografy; collagen

Acknowledgement The authors are grateful to the Department of Clinical Oncology at Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), MG, Brazil.

Funding: This work was supported by the following research promotion foundations in Brazil: Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Introduction

In 2018, there were an estimated 18.1 million new cases of cancer worldwide [1]. Most cancer patients undergo radiation therapy. While tumor radiation improves patient survival, it causes effects on normal tissues [2]. Ionizing radiation (IR) in the bone cause changes in its volume, composition and microarchitecture [3]. Radiation damages both organic and mineral components of the matrix, worsening bone quality [4]. Biological effects of radiation on bone are dose- and time-dependent, with narrowing of blood vessels resulting in an affected tissue cellularity. Apoptosis of bone cells, mostly osteoblasts and osteocytes, results in reduced bone density, explained in parts by an impairing of the natural bone morphology and its inner properties [5-7].

Regarding bone cells affect by radiation, the osteocytes are the ones located within the mineralized matrix, and are essential for the maintenance of homeostasis and bone integrity [8]. These cells form a functional network, which is essential to mineralization process, likewise as having a fundamental role in mechanotransduction [9,10]. Experimental evidence demonstrates the importance of osteocyte network in the formation and activity of osteoblasts, and in the direct and indirect regulation of osteoclast differentiation and function [8]. In addition, the osteocyte regulates both remodeling and bone repair [11]. The aforementioned cells indeed regulate bone metabolism, and the effect of IR on them was already reported to cause their apoptosis and an increase in the percentage of empty lacunae, resulting in delayed repair and increase in formation of immature bone [12,13].

The remodeling process in bone submitted to IR becomes disordered due to changes in the microstructure of the Haversian system [14]. As well, it is known

that radiation causes fibrosis and reduces the proliferation and differentiation of bone cells, so affecting bone formation, leaving to a delay in the repair process [15,16]. Mature bone changes its microarchitecture, also presenting less matrix and specific cell alterations, both in osteoblastic and osteoclastic lines. These deleterious effects also play a role on bone repair and remodeling. Surprisingly, little is known about the effects of radiation in woven bone. Therefore, the question is whether the immature woven bone would be affected in the same pattern as the mature bone. In this way, the aim of the present study was to evaluate the effects of IR on the newly formed bone microarchitecture, osteocyte network and collagen maturity at the site of the bone repair process.

Materials and Methods

Study design

This study followed the normative guidelines of the National Council for Animal Control and Experimentation (CONCEA), constituent of the Ministry of Science, Technology and Innovation (MCTI; Law 11.794, 08/19/2008), Brazil. The animal experimental protocol was approved by the Bioethics Committee for Animal Experimentation (CEUA #093/12) at the Federal University of Uberlândia. Twenty New Zealand white rabbit (average of 3.0 to 3.5 kg), were kept in cages with a 12-hour light-dark cycle, and controlled temperature conditions (average $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Diet consisted of standard laboratory pellets and water ad libitum. The animal caretakers were blind to the experimental groups. Bone defects were created on both tibias and after 2 weeks they were aleatory divided into two groups (n = 10): NoIr (control group, with animals kept free of irradiation) and Ir (irradiated group, with animals receiving external irradiation on both tibias).

Surgical procedure

Animals were fasted twelve hours before surgery and were anaesthetized using intramuscular injection with a combination of 0.25 mg of ketamine/kg (KetaminaAgener®; AgenerUnião Ltda., São Paulo, SP, Brazil) and 0.5 mg of xylazine/kg (Rompum® Bayer S.A. São Paulo, SP, Brazil). The anesthetic

infiltration was made by using 2% lidocaine and 1:100,000 epinephrine (Alphacaine® 0.5 - 1 ml/site, DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), to reduce stimulation during surgery and generate vasoconstriction. Incisions of 3 cm in length were performed in the both tibias. Soft tissue and periosteum were removed, and a sharp subperiosteal dissection exposed the proximal region of the tibia. A standardized 2.3 mm bone defect was created using a round drill, under constant irrigation with 0.9% sodium saline solution. The drilling depth was limited to cortical bone rupture. To prevent infection and pain, daily intramuscular injections of Cefazolin (Yuhan Company; 250mg) were given for 1 week and a dose of an anti-inflammatory Meloxicam® 0.3 mg/kg (Ourofino, São Paulo, SP, Brazil) were administrated.

Radiation protocol

During radiation, the animals (1r) were maintained under sedation by an intramuscular injection with a combination of 1.3 ml of ketamine (100mg/ml) and xilazyne chlorate (7mg/kg per body weight). The metaphysis region of the hind leg was designated as the zone for irradiation. Both tibias were subjected to a radiation using a single dose of 30 Gy, performed in the afternoon at the same day. A 5-mm bolus device was applied to optimal dose of radiation. This total dose of 30Gy, classified as a mild procedure, is considered suitable for producing compromised surgical bed, simulating the clinical situation in rabbits similarly that damage observed in humans with radiation superior at 60Gy [17]. A single dose of irradiation was delivered with a source–skin distance of 60 cm and the field of size was 15 x 15 with direct electron beam of 6 MeV electrons (Varian 600-C® Varian Medical Systems Inc, Palo Alto, California, USA). The dose rate was 400cgy/min. After radiation, the skin, hair, weight, and appetite of the rabbits were closely monitored by the responsible veterinarian.

Animals sacrificing and sample preparations

After 4 weeks of the surgery, animals were anesthetized with thiopental 2.5% and euthanized under anesthesia overdose with an intravenous injection of potassium chloride 19% (Ariston Chemical and Pharmaceutical Industry Ltda. São Paulo,

SP). The overlying soft tissues were removed and the tibias were stored in plastic tubes containing phosphate buffered saline solution and immediately fixed in 4% paraformaldehyde solution in phosphate buffered for 48h. Samples were first scanned using micro-computerized tomography. Subsequent to micro-CT analysis, samples were decalcified in 10% EDTA, dehydrated with graded ethanol and embedded in paraffin. Longitudinal histological sections of 5 μ m were obtained and stained with Hematoxylin and Eosin for qualitative and osteocyte network analysis, Mallory Trichrome for histomorphometric analysis and Picrosirius Red for quantitative analysis of collagen.

Micro-CT analysis

Samples were scanned using micro-computerized tomography (Skyscan-1272 X-ray microtomography; Bruker, Kontich, Belgium) with a nominal isotropic voxel size of 9 μ m (X-ray source 90 kVp, 279 μ A). The 3D reconstruction was made using the software nRecon (version 1.6.10.1, SkyScan, Bruker, Belgium), calibrated by a smoothing of 1 and a ring artifact correction of 2. Reconstructed images were analyzed in CTAn software (version 1.14.4.1, SkyScan, Bruker, Belgium), using a standard threshold (upper 255 and lower 65). A region of interest was created including only the area of the newly formed bone, from the top to the bottom of the whole lesion. The following parameters were analyzed: bone mineral density (BMD), percent bone volume (BV/TV), bone surface density (BS/TV), trabecular thickness (Tb.Th), trabecular number (Tb.N), trabecular separation (Tb.Sp), according to standard procedures [18,19].

Histomorphometric analysis

Osteocyte network in bone repair

Analysis of osteocyte network was performed on two randomly chosen areas within the new formed bone at the lesion site. All analyses were performed manually using ImageJ software (ImageJ 1.51k, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). The osteocyte lacunar distribution was evaluated on two H&E stained sections per sample through the following parameters: number of lacunae with osteocytes (Ot.N) and the number of empty lacunae (Ot.e.N).

These parameters were evaluated considering the bone area (B.Ar), calculated in each image (mm², original magnification of 20X). In addition, lacunar size was measured in the osteocytes from two random images with original magnification of 40X, in the newly formed bone area. The mean lacunae size was determined in 20 cells per sample (µm²).

Bone area quantification

In Mallory Trichrome stained sections, histologic images of the lesion were captured using a digital scan coupled with a microscopic camera (ScanScopeAT, Leica Biosystems Imaging, USA), with objective lens of 20x. Soft tissue areas were erased using Photoshop CS6 (Adobe Systems, San Jose, CA) and converted to binary images with ImageJ ImageJ 1.51k, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) to calculate the percentage of bone matrix area.

Collagen analysis

Mature and immature collagen were quantified on four chosen areas within the lesion site. Images were captured by a polarization microscopy (Nikon Eclipse Ti - S) with a 20x objective lens against a black background. Analysis were performed using ImageJ (ImageJ 1.51k, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). To measure greenish/reddish color, segmentation of bone area (Photoshop CS6, Adobe Systems, San Jose, CA). split imaging in channels (red-green-blue) and image binarization were performed [20].

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Sigma Plot version 13.1 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) and GraphPad Prism version 6.00 (GraphPad Software, San Diego California, the USA). The results obtained were subjected to D'Agostino-Pearson normality. Two-tailed, unpaired Student's t-test was applied for analyzing the difference between the groups. Differences were considered statistically significant at an α value less than 0.05.

Results

Micro-CT analysis - morphological parameters

The mean and standard deviation values of the analyzed parameters are listed in Table 1. The values of bone surface density ($p = 0.590$) and trabecular number ($p = 0.643$) were the same for the two groups. The Ir showed values insignificantly lower than the control for the parameters of bone mineral density ($p = 0.353$), percent bone volume ($p = 0.227$) and trabecular separation ($p = 0.651$). The trabecular thickness of the Ir was significantly lower than in the Nolr ($p = 0.028$).

Histological findings and osteocyte network

Histological sections analysis revealed a newly formed bone within the lesion, resembling a trabecular bone arrangement. Comparison of the bone area (B.Ar) between Nolr (Fig. 1A) and Ir (Fig. 1B) showed no statistical difference ($p = 0.12$) (Fig. 1C). Woven bone was covered by a line of osteoblasts in almost half of the bone surface, both in Ir and Nolr. In a qualitative evaluation, osteoclasts seemed to be less abundant in Nolr (Fig.2A) than Ir (Fig.2C). Basophilic tidemarks were present in both groups, and sometimes permeated by a distinct pattern of stain (Fig.2B and 2D). Regarding osteocyte network, lacunae was assessed, counted and measured at the whole bone area within images. Lacuna filled with osteocytes were more numerous in Nolr (2.61 ± 0.64) than Ir (1.97 ± 0.53) ($p < 0.0001$, Fig.2E). Empty lacunae were more present in Ir (0.14 ± 0.10) compared to Nolr (0.09 ± 0.10) ($p < 0.003$, Fig.2F). The mean osteocyte lacunae size revealed higher values in Ir (15.41 ± 4.41) than non-irradiated animals (12.72 ± 3.73) ($p = 0.01$, Fig.2B, 2D and 2G).

PicroSirius Red staining under polarized light microscope exhibits birefringence from yellow to reddish color, represented by the presence of thicker fibers (mainly composed of mature collagen). Greenish color is displayed when thin fibrils formed by immature collagen are predominant [21,22].

The present analysis (Fig.3) showed a higher ($p=0.04$) amount of mature collagen (reddish birefringence) in Nolr (Fig 3A) than Ir (Fig. 3B), with statistical values of 28.96 ± 5.31 in Nolr and 23.42 ± 4.47 in Ir (Fig. 3C). Immature collagen (greenish birefringence) quantification revealed no statistical difference ($p=0.17$) between Nolr (32.60 ± 6.07) and Ir (36.09 ± 2.83 , Fig. 3D).

Discussion

A single dose of IR on woven bone during the repair process was found to be enough to produce effects on bone structure, collagen and in the osteocytes. We found that 30Gy of IR leads to an arrest of the bone repair process, characterized by morphological changes in the trabecular arrangement of the newly formed bone, together with alterations in the osteocyte network and collagen patterns.

In our research, we took advantage of an experimental rabbit tibiae model, as it is wide enough recommended for a bone repair assessment, once it presents the possibility to create an ideal critical-size defect, which would not heal completely. This model would allow to deliver IR when the bone repair process is still occurring, since our focus was the assessment of the immature bone. Further on, the rabbit is an animal model commonly used to evaluate the effects of IR on bone tissue [14, 23, 24]. Although, due to the inherent difficulty of the study with animals, the exposure to only one dose of IR (not fractionated) was the most viable option.

Woven bone is a primary bone formed during the repair process due to rapid deposition of osteoid matrix, which will be replaced by lamellar bone in the future [25]. Regarding bone resistance, reduced mechanical competence of woven bone has been related not just to collagen orientation, but also to the orientation and shape of the mineral particles [26]. With this in mind, it was expected to found more pronounced deleterious effects after radiation exposure in immature bone when compared to mature lamellar bone. In our findings, it was impressive to found that irradiation on woven bone hold some similarities with mature bone, reported in our previous studies [14, 27].

Microarchitecture analysis using a high-resolution imaging method revealed thinner trabeculae (Tb.Th) on Ir compared to the NoIr. Even with similar bone volume and trabecular number, it was interesting to found that after radiation, the trabecular arrangement of the bone in repair process was defined by having elongated trabeculae. In contrast with our study, Green and Rubin [28], pointed to a decline in trabecular bone volume in irradiated mice (5Gy), however the same phenomenon of decreasing in trabecular thickness was found similar to our

results. Considering our findings, we can presume that thinner trabecular arrangement in a lesion area after radiation might be comparable to the findings of a mature trabecular bone that became more fragile, also after radiation. As suggested by Green and Rubin [28], fragility after radiation could be linked to suppression of bone formation, elevation of resorption and alterations in non-cellular organic and inorganic bone components.

After radiotherapy, a disrupted balance between osteoclast and osteoblast activity occurs. Oest et al [29], reported the biphasic changes in osteoclast behavior in mice related to radiation. First, an early (1-2 weeks) increase in local osteoclast number was observed followed by osteoclast depletion. *In vitro* study [30] showed lower radiosensitivity of osteoblast than osteoclast. Therefore, our findings infer that the effects on osteoblasts and osteoclasts in our model could not be sufficient to interrupt bone matrix formation, that was maintained during early periods after irradiation, such as 2 weeks in our study. Nevertheless, it was found a delayed bone repair process, suggested by the presence of early phenotypic osteocytes (higher lacunae sizes recently included within the matrix) and less predominant collagen I percentage in Ir. One could suppose that the lack of significance in our results related to bone volume and density may be explained not just by the early period of analysis, but also by the cellular behavior concerning osteoblasts and osteoclasts. After longer periods, a reduction of bone formation is certainly likely, as bone marrow population is suppressed and mesenchymal stem cells are also affected [28, 31].

Interestingly, besides osteoclasts and osteoblasts and their role on bone repair, our focus was on the most bone abundant cells, such as osteocytes, which regulates bone metabolism [8,11]. It was observed a decrease in the number of osteocytes and increased empty lacunae within the analyzed woven bone. As in our results to immature bone, several studies [32-34] reported an increase of empty lacunae after high doses (> 30 Gy) of irradiation at the mature cortical bone. Osteocyte is the conductor of bone mineral metabolism. This primary cell forming the intercellular network likely orchestrate the biomechanical response of bone mass and architecture by modulating osteoblast and osteoclast activity [8]. Empty lacunae and osteocyte decrease could negatively affect the

mechanotransduction system and mechanosensation resulting in impaired bone repair (35-38). Also important, osteocytes have been shown to have an endocrine function, and that is capable to induce new bone formation at sites of fracture damage by recruiting mesenchymal stem cells [11]. In addition, we have found that empty lacunae were more present in Ir. This scenario may be supported by reduced vascularization after radiation [39], leading to a limited supply of oxygen and nutrients to the network of osteocytes, resulting in apoptosis. Furthermore, the importance of vascularization for the survival of osteocytes has been demonstrated in a study in which angiogenesis promotes the survival of osteocytes after irradiation [40].

The formation of the osteocyte begins with the incorporation of the osteoblast to the osteoid matrix displaying a polygonal morphology, then its differentiation into the pre-osteocyte. After matrix mineralization, this cell alters its phenotype and becomes an osteocyte with dendritic morphology. Mature osteocytes reside in the lacunae connected by a network of cytoplasmic processes [41]. So, regarding osteocyte phenotype, it could be suggested that this have an intimate relation to the size of their lacunae. Ir revealed larger osteocytes within larger lacunae. This reveals that the osteocytes in Ir are probably osteoblasts that have recently been incorporated into the matrix. Taken together, the information on the osteocytes with structural findings suggests a delay in repair when comparing to non-irradiated bone.

Another fundamental aspect of our findings that support the “delay theory” on bone repair after radiation were the greater amount of mature collagen in non-irradiated group when compared to irradiated bone. At the same time, there was a predominance of immature collagen in both groups revealed by quantitative collagen analysis. Immature collagen is homotrimeric fibril-forming collagen. Its expression is increased in repair process of various connective tissues, such as bone, tendon, ligament and skin [42, 43]. Bone undergoing healing has been shown to contain substantial amount of immature collagen which is later replaced by mature collagen [44,45]. Given this fact, a smaller amount of mature collagen indicates more immaturity of this woven bone in Ir than NoIr since the radiation reduces the maturation and crystallinity of the collagen [46].

By the use of distinct quantitative methodologies applied in this study, it was possible to assess the quality of the bone repair. Bone matrix deposited with lower amount of mature collagen together with thinner trabeculae arrangement at the bone formation site indicates that radiotherapy changes repair properties at the healing area. In addition, a decrease in the number of osteocytes, with an increase in empty lacunae and the presence of osteocytes in bigger lacunae implies in a healing delay profile that characterizes the repair process. The understanding of the factors that influence and induce on the impairment of bone repair after radiotherapy is a clear need. The discovery of the effects on cellular component, matrix, composition and microarchitecture may improve our ability to conduct new researches aiming to recover bone quality under this condition.

Conclusion

This study demonstrated a delay in the repair process of woven bone at a healing site two weeks after therapy, revealed by a more trabecular arrangement, with fewer osteocytes and more empty gaps. In addition, the smaller size of the osteocyte gaps along with greater amount of mature collagen in the non-irradiated group also corroborates this fact.

Disclosure of potential conflicts of interest

Conflict of interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval

All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: Cancer J Clin 68:394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

2. Furdui CM (2014) Ionizing radiation: mechanisms and therapeutics. *Antioxid Redox Signal* 21(2):218-20. <http://doi.org/10.1089/ars.2014.5935>
3. Lima F, Swift JM, Greene ES, Allen MR, Cunningham DA, Braby LA, et al (2017) Exposure to Low-Dose X-Ray Radiation Alters Bone Progenitor Cells and Bone Microarchitecture. *Radiat Res* 188(4):433-42. <https://doi.org/10.1667/RR14414.1>
4. Bartlow CM, Mann KA, Damron TA, Oest ME (2018) Limited field radiation therapy results in decreased bone fracture toughness in a murine model. *PLoS One* 13(10):1-22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204928>
5. Pacheco R, Stock H (2013) Effects of radiation on bone. *Curr Osteoporos Rep* 11(4):299–304. <https://doi.org/10.1007/s11914-013-0174-z>
6. Chandra A, Lin T, Tribble MB, Zhu J, Altman AR, Tseng W, et al (2014) PTH1-34 alleviates radiotherapy-induced local bone loss by improving osteoblast and osteocyte survival. *Bone* 67:33-40. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.06.030>
7. Michel G, Blery P, Pilet P, Guicheux J, Weiss P, Malard O, et al (2015) Micro-CT Analysis of Radiation-Induced Osteopenia and Bone Hypovascularization in Rat. *Calcif Tissue Int* 97(1):62-8. <https://doi.org/10.1007/s00223-015-0010-9>
8. Bellido T (2014) Osteocyte-Driven Bone Remodeling. *Calcif Tissue Int* 94(1):25-34. <https://doi.org/10.1007/s00223-013-9774-y>
9. Bonewald LF (2011) The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res* 26(2):229-38. <https://doi.org/10.1002/jbmr.320>
10. Chandra A, Lin T, Young T, Tong W, Ma X, Tseng WJ, et al (2017) Suppression of Sclerostin Alleviates Radiation-Induced Bone Loss by Protecting Bone-Forming Cells and Their Progenitors Through Distinct Mechanisms. *J Bone Miner Res* 32(2):360–72. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2996>
11. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF (2013) The osteocyte: An endocrine cell . . . and more. *Endocr Rev* 34(5):658–90. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1026>

12. Inyang AF, Schwarz DA, Jamali AM, Buchman SR (2010) Quantitative histomorphometric assessment of regenerate cellularity and bone quality in mandibular distraction osteogenesis after radiation therapy. *J Craniofac Surg* 21(5):1438-42.
<https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e3181ec693f>
13. Kang SY, Deshpande SS, Zheutlin AR, Donneys A, Rodriguez JJ, Nelson NS, et al (2017) Role of parathyroid hormone in regeneration of irradiated bone in a murine model of mandibular distraction osteogenesis. *Head Neck* 39(3):464-70. <https://doi.org/10.1002/hed.24612>
14. Rabelo GD, Beletti ME, Dechichi P (2010) Histological analysis of the alterations on cortical bone channels network after radiotherapy: A rabbit study. *Microsc Res Tech* 73(11):1015–8.
<https://doi.org/10.1002/jemt.20826>
15. Batista JD, Zanetta-Barbosa D, Cardoso SV, Dechichi P, Rocha FS, Pagnoncelli RM (2014) Effect of low-level laser therapy on repair of the bone compromised by radiotherapy. *Lasers Med Sci* 29(6):1913–8.
<https://doi.org/10.1007/s10103-014-1602-8>
16. Rocha FS, Dias PC, Limirio PHJO, Lara VC, Batista JD, Dechichi P (2017) High doses of ionizing radiation on bone repair: is there effect outside the irradiated site? *Injury* 48(3):671–3.
<https://doi.org/10.1016/j.injury.2016.11.033>
17. Ma Y, Shen G (2012) Distraction osteogenesis after irradiation in rabbit mandibles. *Br J Oral Maxillofac Surg* 50(7):662-667.
<https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2011.10.008>
18. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldborg RE, Jepsen KJ, Müller R (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25(7):1468–86.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.141>
19. Irie MS, Rabelo GD, Spin-Neto R, Dechichi P, Borges JS, Soares PBF (2018) Use of micro-computed tomography for bone evaluation in dentistry. *Braz Dent J* 29(3):227–38. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201801979>

20. Martins DE, de Medeiros VP, Wajchenberg M, Paredes-Gamero EJ, Lima M, Reginato RD, et al (2018) Changes in human intervertebral disc biochemical composition and bony end plates between middle and old age. *PLoS One* 13(9):e0203932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203932>
21. Szendrői M, Vajta G, Kovács L, Schaff Z, Lapis K (1984) Polarization colours of collagen fibres: A sign of collagen production activity in fibrotic processes. *Acta Morphol Hung* 32(1):47–55
22. Retamoso LB, da Cunha TDMA, Knop LAH, Shintcovsk RL, Tanaka OM (2009) Organization and quantification of the collagen fibers in bone formation during orthodontic tooth movement. *Micron* 40(8):827–30. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.07.003>
23. Zhang WB, Zheng LW, Chua D, Cheung LK (2010) Bone Regeneration after Radiotherapy in an Animal Model. *J Oral Maxillofac Surg* 68(11):2802–9. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2010.04.024>
24. Ocaña RP, Rabelo GD, Sassi LM, Rodrigues VP, Alves FA (2017) Implant osseointegration in irradiated bone: an experimental study. *J Periodontal Res* 52(3):505–11. <https://doi.org/10.1111/jre.12416>
25. Wagermaier W, Klaushofer K, Fratzl P (2015) Fragility of Bone Material Controlled by Internal Interfaces. *Calcif Tissue Int* 97(3):201–12. <https://doi.org/10.1007/s00223-015-9978-4>
26. Hörth RM, Kerschnitzki M, Aido M, Schmidt I, Burghammer M, Duda GN, et al (2018) Correlations between nanostructure and micromechanical properties of healing bone. *J Mech Behav Biomed Mater* 77:258–66. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.08.022>
27. Soares PBF, Soares CJ, Limirio PHJO, de Jesus RNR, Dechichi P, Spin-Neto R, Zanetta-Barbosa D (2018) Effect of ionizing radiation after-therapy interval on bone: histomorphometric and biomechanical characteristics. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2724-3>
28. Green DE, Rubin CT (2014) Consequences of irradiation on bone and marrow phenotypes, and its relation to disruption of hematopoietic

- precursors. *Bone* 63:87-94. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.02.018>
29. Oest ME, Franken V, Kuchera T, Strauss J, Damron TA (2015) Long-term loss of osteoclasts and unopposed cortical mineral apposition following limited field irradiation. *J Orthop Res* 33(3):334–42. <https://doi.org/10.1002/jor.22761>
30. Zhang J, Wang Z, Wu A, Nie J, Pei H, Hu W, et al (2017) Differences in responses to X-ray exposure between osteoclast and osteoblast cells. *J Radiat Res* 58(6):791–802. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrx026>
31. Ma J, Shi M, Li J, Chen B, Wang H, Li B, et al (2007) Senescence-unrelated impediment of osteogenesis from Flk1+ bone marrow mesenchymal stem cells induced by total body irradiation and its contribution to long-term bone and hematopoietic injury. *Haematologica* 92(7):889–96. <https://doi.org/10.3324/haematol.11106>
32. Maeda M (1988) Effects of irradiation on cortical bone and their time-related changes. A biomechanical and histomorphological study. *J Bone Jt Surg Am*70:392–9. <https://doi.org/10.2106/00004623-198870030-00011>
33. Fregene A, Jing XL, Monson LA, Buchman SR (2009) Alteration in volumetric bone mineralization density gradation patterns in mandibular distraction osteogenesis following radiation therapy. *Plast Reconstr Surg* 124(4):1237–44. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181b5a42f>
34. Zheutlin AR, Deshpande SS, Nelson NS, Polyatskaya Y, Rodriguez JJ, Donneys A, et al (2015) A Histomorphometric Analysis of Radiation Damage in an Isogenic Murine Model of Distraction Osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg* 73(12):2419–28. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2015.08.002>
35. Burger EH, Klein-Nulend J, Smit TH (2003) Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon - A proposal. *J Biomech* 36(10):1453–9. [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(03\)00126-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(03)00126-X)
36. O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI, Bellido T, Powers CC, Stewart SA, et al

- (2004) Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology* 145(4):1835–41. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0990>
37. Ma YL, Dai RC, Sheng ZF, Jin Y, Zhang YH, Fang LN, et al (2008) Quantitative associations between osteocyte density and biomechanics, microcrack and microstructure in OVX rats vertebral trabeculae. *J Biomech* 41(6):1324–32. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.01.017>
 38. Hemmatian H, Laurent MR, Bakker AD, Vanderschueren D, Klein-Nulend J, van Lenthe GH (2018) Age-related changes in female mouse cortical bone microporosity. *Bone* 113:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.05.003>
 39. Poort LJ, Ludlage JHB, Lie N, Böckmann RA, Odekerken JCE, Hoebbers FJ, et al (2017) The histological and histomorphometric changes in the mandible after radiotherapy: An animal model. *J Cranio-Maxillofacial Surg* 45(5):716–21. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.02.014>
 40. Donneys A, Nelson NS, Page EE, Deshpande SS, Felice PA, Tchanque-Fossuo CN, et al (2015) Targeting angiogenesis as a therapeutic means to reinforce osteocyte survival and prevent nonunions in the aftermath of radiotherapy. *Head Neck* 37(9): 1261–1267. <http://doi.org/10.1002/hed.23744>
 41. Chen X, Wang L, Zhao K, Wang H (2018) Osteocytogenesis: Roles of Physicochemical Factors, Collagen Cleavage and Exogenous Molecules. *Tissue Eng Part B Rev* 24(3):215-225. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2017.0378>
 42. Merkel JR, DiPaolo BR, Hallock GG, Rice DC (1988) Type I and Type III Collagen Content of Healing Wounds in Fetal and Adult Rats. *Exp Biol Med* 187(4):493–7. <https://doi.org/10.3181/00379727-187-42694>
 43. Ashhurst DE (1990) Collagen synthesized by healing fractures. *Clin Orthop Relat Res* (255):273-83
 44. Liu SH, Yang RS, Al-Shaikh R, Lane JM (1995) Collagen in Tendon, Ligament, and Bone Healing. A current review. *Clin Orthop Relat Res* (318):265-78

45. Bland YS, Critchlow MA, Ashhurst DE (1999) The expression of the fibrillar collagen genes during fracture healing: heterogeneity of the matrices and differentiation of the osteoprogenitor cells. *Histochem J* 31(3):221–5. <https://doi.org/10.1023/A:1003954104290>
46. Limirio PHJO, Soares PBF, Emi ETP, Lopes CCA, Rocha FS, Batista JD, et al (2019) Ionizing radiation and bone quality: time-dependent effects. *Radiation Oncology* 14:15. <https://doi.org/10.1186/s13014-019-1219-y>

Table 1. Mean and standard deviation values of bone mineral density, percent bone volume BV/TV in %, bone surface density BS/TV in $1/\mu\text{m}$, trabecular thickness Tb.Th in μm , trabecular number Tb.N in $1/\mu\text{m}$, and trabecular separation Tb.Sp in μm measured by microCT analysis for non-irradiated and irradiated groups.

Groups	Noir	Ir
Bone mineral density	0.20 ± 0.03^A	0.19 ± 0.03^A
Percent bone volume, BV/TV (%)	44.10 ± 13.24^A	37.63 ± 9.57^A
Bone surface density, BS/TV ($1/\mu\text{m}$)	0.01 ± 0.003^A	0.01 ± 0.002^A
Trabecular thickness, Tb.Th (μm)	165.73 ± 43.74^A	129.53 ± 25.59^B
Trabecular number, Tb.N ($1/\mu\text{m}$)	0.003 ± 0.001^A	0.003 ± 0.001^A
Trabecular separation, Tb.Sp (μm)	406.86 ± 153.69^A	367.30 ± 114.99^A

Letters represent significant difference within each morphological parameter, defined by Tukey test ($P < 0.05$).

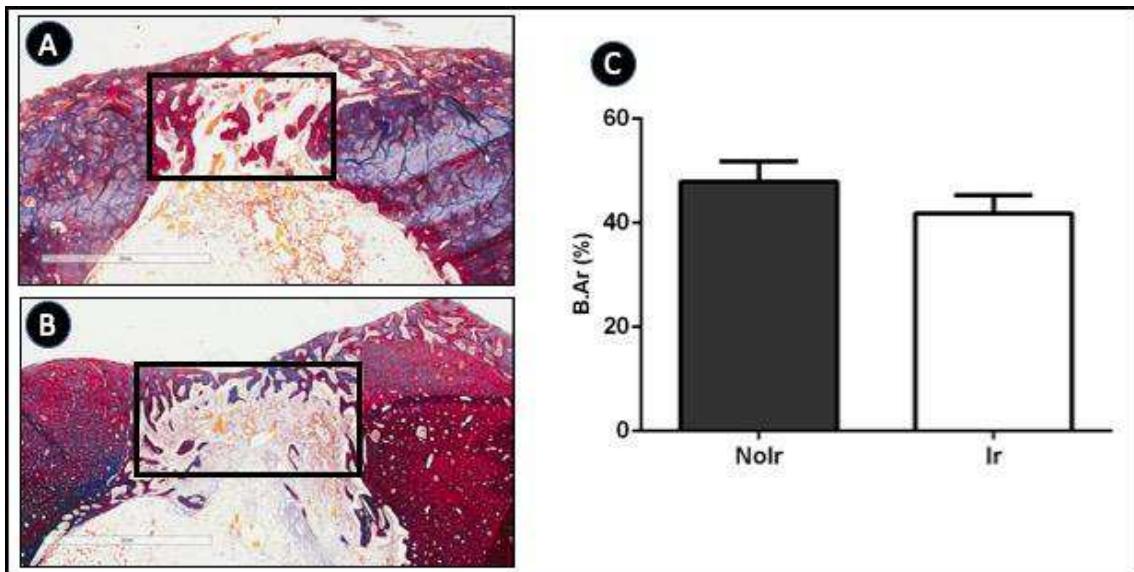


Fig. 1 Photomicrograph of the bone area formation (rectangle; Mallory Trichrome stained; original magnification 20x); **A**, bone area formation of the Nolr group; **B**, bone area formation of the Ir group; **C**, bone area (B.Ar) values for Nolr and Ir groups; Statistical analysis of B.Ar showed no statistical difference between groups ($p = 0.12$)

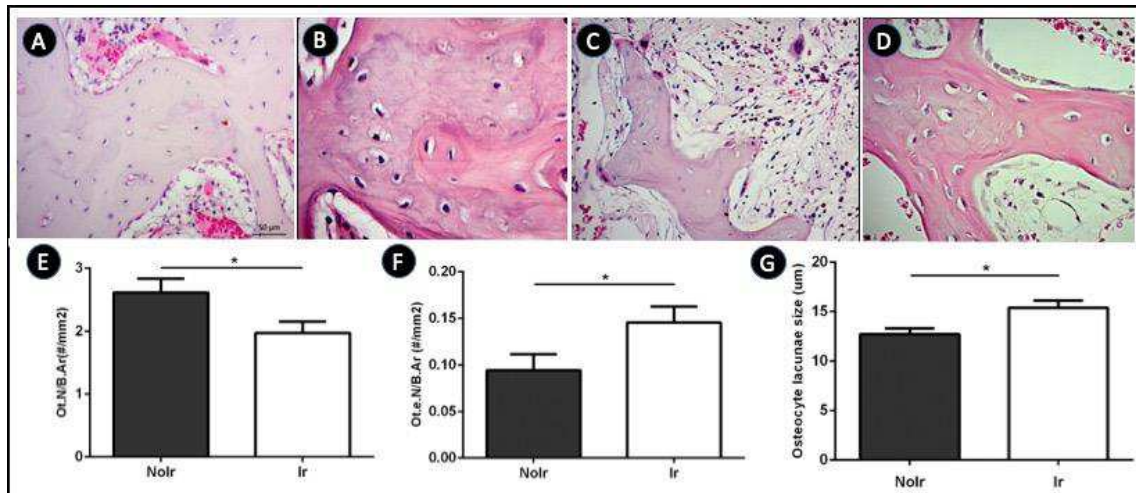


Fig. 2 Photomicrograph of the osteocyte network (Hematoxylin and Eosin stained); **A**, parameter analysis of the (Ot.N) and (Ot.e.N) with original magnification of 20x in Nollr group; **B**, measurement of lacunae size of osteocytes with original magnification of 40x in Nollr group; **C**, parameter analysis of the Ot.N and Ot.e.N with original magnification of 20x in Ir group; **D**, measurement of lacunae size of osteocytes with original magnification of 40x in Ir group; **E**, statistical analysis showed higher Ot.N in Nollr ($p < 0.05$); **F**, statistical analysis showed higher Ot.e.N in Ir ($p < 0.05$); **G**, mean osteocyte lacunae size showed higher values in Ir ($p < 0.05$). *represent significant difference

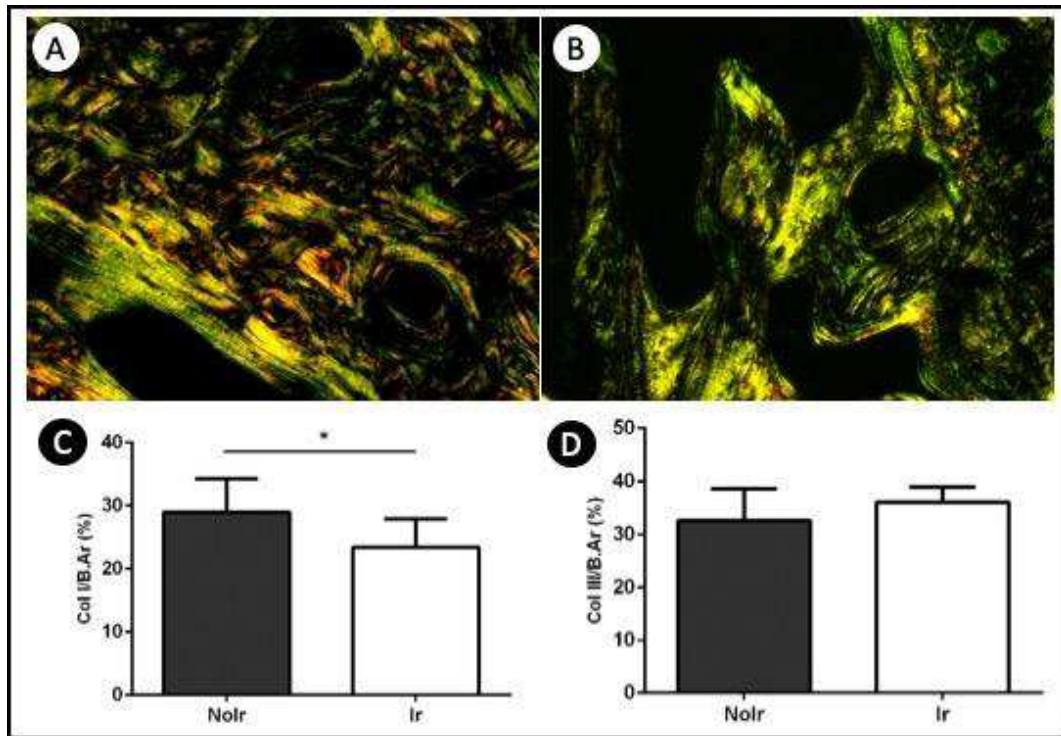


Fig. 3 Photomicrograph of the collagen quantification (PicroSirius Red stained, original magnification 20x); **A**, amount of type I (reddish birefringence) and type III collagen (greenish birefringence) in Nolr group; **B**, amount of type I (reddish birefringence) and type III collagen (greenish birefringence) in Ir group; **C**, mean values and standard deviation of the amount of type I collagen (reddish birefringence) in both Ir and Nolr groups; **D**, mean values and standard deviation of the amount of type III collagen (greenish birefringence) in both Ir and Nolr group. *represent significant difference

C onclusão

Efeitos da radiação ionizante no tecido ósseo: influência na rede de osteócitos, padrão de colágeno e microarquitetura – EDUARDO MOURA MENDES- Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Uberlândia.

4. Conclusão

Os resultados evidenciam atraso no processo de reparo do osso irradiado, 14 dias após a radioterapia, com morte de osteócitos e maior número de lacunas vazias, arranjo trabecular mais estreito e alongado, além da pouca quantidade de colágeno maduro.

Referências

Efeitos da radiação ionizante no tecido ósseo: influência na rede de osteócitos, padrão de colágeno e microarquitetura – EDUARDO MOURA MENDES- Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Uberlândia.

Referências

Ägren E, Arwill T. High-speed or conventional dental equipment for the removal of bone in oral surgery. 3. A histologic and microradiographic study on bone repair in the rabbit. **Acta Odontol Scand**. 1968 Aug;26(3):223–46.

<https://doi.org/10.3109/00016356809026135>

Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. **J Dent Res**. 2008 Feb;87(2):107-18.

<https://doi.org/10.1177/154405910808700215>

Bartlow CM, Mann KA, Damron TA, Oest ME. Limited field radiation therapy results in decreased bone fracture toughness in a murine model. **PLoS One**. 2018 Oct 3;13(10):e0204928.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204928>

Barth HD, Zimmermann EA, Schaible E, Tang SY, Alliston T, Ritchie RO. Characterization of the effects of x-ray irradiation on the hierarchical structure and mechanical properties of human cortical bone. **Biomaterials**. 2011 Dec;32(34):8892–904.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.013>

Baselet B, Sonveaux P, Baatout S, Aerts A. Pathological effects of ionizing radiation: endothelial activation and dysfunction. **Cell Mol Life Sci**. 2018 Oct 30.

Batista JD, Zanetta-Barbosa D, Cardoso SV, Dechichi P, Rocha FS, Pagnoncelli RM. Effect of low-level laser therapy on repair of the bone compromised by radiotherapy. **Lasers Med Sci**. 2014 Nov;29(6):1913-8.

<https://doi.org/10.1007/s10103-014-1602-8>

Bellido T. Osteocyte-Driven Bone Remodeling. **Calcif Tissue Int**. 2014 Jan;94(1):25-34.

<https://doi.org/10.1007/s00223-013-9774-y>

Bonewald LF. The amazing osteocyte. **J Bone Miner Res.** 2011 Feb;26(2):229-38.

<https://doi.org/10.1002/jbmr.320>

Borrelli J, Pape C, Hak D, Hsu J, Lin S, Giannoudis P, et al. Physiological challenges of bone repair. **J Orthop Trauma.** 2012 Dec;26(12):708–11.

<https://doi.org/10.1097/BOT.0b013e318274da8b>

Brandi ML. Microarchitecture, the key to bone quality. **Rheumatol (Oxford).** 2009 Oct;48 Suppl 4:iv3-8.

<https://doi.org/10.1093/rheumatology/kep273>

Carbonare LD, Valenti MT, Bertoldo F, Zanatta M, Zenari S, Realdi G, et al. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. **Micron.** 2005;36(7-8):609-16.

<https://doi.org/10.1016/j.micron.2005.07.007>

Chappard D, Baslé MF, Legrand E, Audran M. Trabecular bone microarchitecture: A review. **Morphologie.** 2008 Dec;92(299):162-70.

<https://doi.org/10.1016/j.morpho.2008.10.003>

Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. **Clin J Am Soc Nephrol.** 2008 Nov; 3(Suppl 3): S131–S139.

<https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>

Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The Osteocyte: An Endocrine Cell ... and More. **Endocr Rev.** 2013 Oct;34(5):658-90.

<https://doi.org/10.1210/er.2012-1026>

Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury.** 2005 Dec;36(12):1392-404.

<https://doi.org/10.1016/j.injury.2005.07.019>

Donnelly E. Methods for assessing bone quality: a review. **Clin Orthop Relat Res.** 2011 Aug;469(8):2128-38.

<https://doi.org/10.1007/s11999-010-1702-0>

Donneys A, Nelson NS, Page EE, Deshpande SS, Felice PA, Tchanque-Fossuo CN, et al. Targeting angiogenesis as a therapeutic means to reinforce osteocyte survival and prevent nonunions in the aftermath of radiotherapy. **Head Neck.** 2015 Sep;37(9):1261-7.

<https://doi.org/10.1002/hed.23744>

Du T, Niu X, Li Z, Li P, Feng Q, Fan Y. Crosslinking induces high mineralization of apatite minerals on collagen fibers. **Int J Biol Macromol.** 2018 Jul 1;113:450-457.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.136>

Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, Steinbrech DS, Greenwald JA, Gittes GK, et al. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. **Plast Reconstr Surg.** 2000 Oct;106(5):1049-61.

<https://doi.org/10.1097/00006534-200010000-00015>

Fonseca H, Moreira-Gonçalves D, Coriolano HJ, Duarte JA. Bone quality: the determinants of bone strength and fragility. **Sports Med.** 2014 Jan;44(1):37-53.

<https://doi.org/10.1007/s40279-013-0100-7>

Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. **Injury.** 2007 Sep;38 Suppl 4:S3-6.

[https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(08\)70003-2](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(08)70003-2)

Guda T, Labella C, Chan R, Hale R. Quality of bone healing: perspectives and assessment techniques. **Wound Repair Regen.** 2014 May;22 Suppl 1:39-49.

<https://doi.org/10.1111/wrr.12167>

Heinonen V, Ruotsalainen TJ, Paavola L, Mikkonen JJ, Asikainen P, Koistinen AP, et al. Alveolar bone remodeling after tooth extraction in irradiated mandible: An experimental study with canine model. **Ultrastruct Pathol.** 2018 Mar-Apr;42(2):124–32.

<https://doi.org/10.1080/01913123.2017.1422829>

Hvid I, Horn J, Huhnstock S, Steen H. The biology of bone lengthening. **J Child Orthop.** 2016 Dec;10(6):487–92.

<https://doi.org/10.1007/s11832-016-0780-2>

Inyang AF, Schwarz DA, Jamali AM, Buchman SR. Quantitative histomorphometric assessment of regenerate cellularity and bone quality in mandibular distraction osteogenesis after radiation therapy. **J Craniofac Surg.** 2010 Sep;21(5):1438–42.

<https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e3181ec693f>

Irie MS, Rabelo GD, Spin-Neto R, Dechichi P, Borges JS, Soares PBF. Use of micro-computed tomography for bone evaluation in dentistry. **Braz Dent J.** 2018 May-Jun;29(3):227-238.

<https://doi.org/10.1590/0103-6440201801979>

Kalpakcioglu BB, Morshed S, Engelke K, Genant HK. Advanced imaging of bone macrostructure and microstructure in bone fragility and fracture repair. **J Bone Joint Surg Am.** 2008 Feb;90 Suppl 1:68-78.

<https://doi.org/10.2106/JBJS.G.01506>

Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. **Oral Dis.** 2002 May;8(3):147-59.

<https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.01829.x>

Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. **Eur J Cancer Care (Engl)**. 2017 Nov;26(6).

<https://doi.org/10.1111/ecc.12740>

Knott L, Bailey AJ. Collagen cross-links in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance. **Bone**. 1998 Mar;22(3):181–7.

[https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(97\)00279-2](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(97)00279-2)

Lambert EM, Gunn GB, Gidley PW. Effects of radiation on the temporal bone in patients with head and neck cancer. **Head Neck**. 2016 Sep;38(9):1428–35.

<https://doi.org/10.1002/hed.24267>

Lima F, Swift JM, Greene ES, Allen MR, Cunningham DA, Braby LA, Bloomfield SA. Exposure to Low-Dose X-Ray Radiation Alters Bone Progenitor Cells and Bone Microarchitecture. **Radiat Res**. 2017 Oct;188(4):433-442.

<https://doi.org/10.1667/RR14414.1>

Limirio PHJO, Soares PBF, Emi ETP, Lopes CCA, Rocha FS, Batista JD, et al. Ionizing radiation and bone quality: time-dependent effects. **Radiat Oncol**. 2019; 14: 15.

<https://doi.org/10.1186/s13014-019-1219-y>

Lucatto SC, Guilherme A, Dib LL, Segreto HR, Alves MT, Gumieiro EH, et al. Effects of ionizing radiation on bone neoformation. Histometric study in Wistar rats tibiae. **Acta Cir Bras**. 2011 Dec;26(6):475-80.

<https://doi.org/10.1590/S0102-86502011000600012>

Ma Y-L, Dai R-C, Sheng Z-F, Jin Y, Zhang Y-H, Fang L-N, et al. Quantitative associations between osteocyte density and biomechanics, microcrack and microstructure in OVX rats vertebral trabeculae. **J Biomech**. 2008;41(6):1324–32.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.01.017>

Mackiewicz Z, Niklińska WE, Kowalewska J, Chyczewski L. Bone as a source of organism vitality and regeneration. **Folia Histochem Cytobiol.** 2011;49(4):558–69.

<https://doi.org/10.5603/FHC.2011.0079>

McKibbin B. The Biology of fracture healing in long bones. **J Bone Joint Surg Br.** 1978 May;60-B(2):150-62.

<https://doi.org/10.1302/0301-620X.60B2.350882>

Najjar TA, Kahn DS. Experimental Model for the Study of Osteogenesis and Remodeling. **J Dent Res.** 1971 Jul-Aug;50(4):960–5.

<https://doi.org/10.1177/00220345710500042801>

Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. **Nat Med.** 2011 Sep 11;17(10):1231-4.

<https://doi.org/10.1038/nm.2452>

Nango N, Kubota S, Hasegawa T, Yashiro W, Momose A, Matsuo K. Osteocyte-directed bone demineralization along canaliculi. **Bone.** 2016 Mar;84:279-288.

<https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.12.006>

Oest ME, Damron TA. Focal Therapeutic Irradiation Induces an Early Transient Increase in Bone Glycation. **Radiat Res.** 2014 Apr;181(4):439-43.

<https://doi.org/10.1667/RR13451.1>

Oest ME, Gong B, White KE, Mann KA, Zimmerman ND, Damron TA, et al. Parathyroid Hormone Attenuates Radiation-Induced Increases in Collagen Crosslink Ratio at Periosteal Surfaces of Mouse Tibia. **Bone.** 2016 May;86:91–97.

<https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.03.003>

Oh D, Huh SJ. Insufficiency fracture after radiation therapy. **Radiat Oncol J** 2014;32:213–20.

<https://doi.org/10.3857/roj.2014.32.4.213>

Pacheco R, Stock H. Effects of radiation on bone. **Curr Osteoporos Rep.** 2013;11(4):299–304.

<https://doi.org/10.1007/s11914-013-0174-z>

Rabelo GD, Beletti ME, Dechichi P. Histological Analysis of the Alterations on Cortical Bone Channels Network After Radiotherapy: A Rabbit Study. **Microsc Res Tech.** 2010 Oct; 73 (11): 1015-8.

<https://doi.org/10.1002/jemt.20826>

Rauch F. The brains of the bones: How osteocytes use WNT1 to control bone formation. **J Clin Invest.** 2017 Jun 30;127(7):2539-2540.

<https://doi.org/10.1172/JCI95386>

Reznikov N, Shahar R, Weiner S. Bone hierarchical structure in three dimensions. **Acta Biomater.** 2014 Sep;10(9):3815–26.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.05.024>

Rho JY, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Med Eng Phys.* 1998 Mar;20(2):92-102.

[https://doi.org/10.1016/S1350-4533\(98\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S1350-4533(98)00007-1)

Rocha FS, Dias PC, Limirio PH, Lara VC, Batista JD, Dechichi P. High doses of ionizing radiation on bone repair: is there effect outside the irradiated site? **Injury.** 2017 Mar;48(3):671-673.

<https://doi.org/10.1016/j.injury.2016.11.033>

Rosset P, Deschaseaux F, Layrolle P. Cell therapy for bone repair. **Orthop Traumatol Surg Res.** 2014 Feb;100(1 Suppl):S107-12.

<https://doi.org/10.1016/j.otsr.2013.11.010>

Shah FA, Thomsen P, Palmquist A. A Review of the Impact of Implant Biomaterials on Osteocytes. **J Dent Res**. 2018 Aug;97(9):977-986.

<https://doi.org/10.1177/0022034518778033>

Soares PBF, Soares CJ, Limirio PHJO, de Jesus RNR, Dechichi P, Spin-Neto R, et al. Effect of ionizing radiation after-therapy interval on bone: histomorphometric and biomechanical characteristics. **Clin Oral Investig**. 2018 Oct 27.

<https://doi.org/10.1007/s00784-018-2724-3>

Tzaphlidou M. The role of collagen in bone structure: An image processing approach. **Micron**. 2005;36(7–8):593–601.

<https://doi.org/10.1016/j.micron.2005.05.009>

Varga P, Hesse B, Langer M, Schrof S, Männicke N, Suhonen H, et al. Synchrotron X-ray phase nano-tomography-based analysis of the lacunar–canalicular network morphology and its relation to the strains experienced by osteocytes in situ as predicted by case-specific finite element analysis. **Biomech Model Mechanobiol**. 2015 Apr;14(2):267–82.

<https://doi.org/10.1007/s10237-014-0601-9>

Wagermaier W, Klaushofer K, Fratzl P. Fragility of Bone Material Controlled by Internal Interfaces. **Calcif Tissue Int**. 2015 Sep;97(3):201–12.

<https://doi.org/10.1007/s00223-015-9978-4>

Williams HJ, Davies AM. The effect of X-rays on bone: A pictorial review. **Eur Radiol**. 2006 Mar;16(3):619–33.

<https://doi.org/10.1007/s00330-005-0010-7>

Yeh S-CA, Wilk K, Lin CP, Intini G. In Vivo 3D Histomorphometry Quantifies Bone Apposition and Skeletal Progenitor Cell Differentiation. **Sci Rep.** 2018 Apr 3;8(1):5580.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-23785-6>

Yi H, Ur Rehman F, Zhao C, Liu B, He N. Recent advances in nano scaffolds for bone repair. **Bone Res.** 2016;4:16050.

<https://doi.org/10.1038/boneres.2016.50>

Zhang J, Wang Z, Wu A, Nie J, Pei H, Hu W, et al. Differences in responses to X-ray exposure between osteoclast and osteoblast cells. **J Radiat Res.** 2017 Nov 1;58(6):791-802.

<https://doi.org/10.1093/jrr/rrx026>

Zheutlin AR, Deshpande SS, Nelson NS, Polyatskaya Y, Rodriguez JJ, Donneys A, et al. A Histomorphometric Analysis of Radiation Damage in an Isogenic Murine Model of Distraction Osteogenesis. **J Oral Maxillofac Surg.** 2015 Dec;73(12):2419–28.

<https://doi.org/10.1016/j.joms.2015.08.002>

Anexos

Efeitos da radiação ionizante no tecido ósseo: influência na rede de osteócitos, padrão de colágeno e microarquitetura – EDUARDO MOURA MENDES- Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Uberlândia.

Parecer do Comitê de Ética



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 156/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 093/12

Projeto Pesquisa: "Análise do efeito da radioterapia e oxigenoterapia hiperbárica na interação biológica e mecânica de implantes dentais".

Pesquisador Responsável: Darcey Zanetta Barbosa

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 03 de Dezembro de 2012

Prof. Dra. Ana Elizabeth Iannini Custódio
Vice Coordenadora *Pro tempore* da CEUA/UFU

Release para imprensa

Modalidade: Pesquisa Científica.

Assunto: Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Faculdade de Odontologia – UFU.

Autores: Eduardo Moura Mendes; Orientadora: Prof.^a Dr.^a Priscilla Barbosa Ferreira Soares.

O câncer é uma doença que cresce em toda população mundial. Uma pesquisa do Instituto Nacional do Câncer (Inca) aponta que, para 2019, a estimativa é que surjam cerca de 600 mil novos casos de câncer no Brasil.

Pacientes acometidos por câncer apresentam marcante redução na qualidade de vida e quando são submetidos à radioterapia os efeitos colaterais parecem ser ainda maiores. Esses pacientes muitas vezes passam por cirurgias mutiladoras em regiões que posteriormente necessitam ser reconstruídas. Porém, o resultado da cirurgia pode não ser o esperado porque o osso irradiado pode sofrer necrose. Uma eventual solução seria a realização da cirurgia reconstrutiva previamente à radioterapia. Por isso, nosso grupo desenvolveu esse trabalho preliminar, para conhecer como o osso em fase de cicatrização se comporta quando submetido à radiação ionizante. Nossa pesquisa comprovou por meio de estudos em coelhos que a radioterapia afeta negativamente o tecido ósseo levando ao atraso de sua cicatrização. Sendo assim, a descoberta dos efeitos da radiação no osso pode melhorar nosso conhecimento para conduzir novas pesquisas, que devem ser incentivadas, com o objetivo de prevenir e recuperar a qualidade do osso irradiado e, conseqüentemente, melhorar a qualidade de vida do paciente.

Contato: Secretaria PPG Odontologia, Sra. Maria das Graças, fone: 3225-8108.