

DANIELLE LEAL VIEIRA

**Avaliação das alterações morfológicas do osso
cortical e trabecular da mandíbula e fêmur em ratas
ovarioriectomizadas: estudo *in vivo***

BRASÍLIA

2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DANIELLE LEAL VIEIRA

**Avaliação das alterações morfológicas do osso
cortical e trabecular da mandíbula e fêmur em ratas
ovarioriectomizadas: estudo *in vivo***

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Professora Nilce Santos de Melo

BRASÍLIA

2016

DANIELLE LEAL VIEIRA

Avaliação das alterações morfológicas do osso cortical e trabecular da mandíbula e fêmur em ratas ovariectomizadas: estudo *in vivo*

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Data da defesa: 2 de dezembro de 2016

BANCA EXAMINADORA

Professora Nilce Santos de Melo (presidente) - Universidade de Brasília

Professor Luíz Augusto Casulari Roxo da Motta - Universidade de Brasília

Professor Sacha Braun Chaves - Universidade de Brasília

Dedico este trabalho à minha família que sempre foi minha fortaleza e apoio.

AGRADECIMENTOS

Ao final dessa jornada não me faltam motivos para agradecer. Agradeço a **Deus** por me acompanhar e iluminar toda a minha caminhada. Ao me formar tive muitas dúvidas, me questionei muitas vezes sobre o que fazer, que caminho percorrer, mas Deus abrindo as portas na hora certa. A minha entrada no mestrado foi um divisor de águas na minha profissão, e nas escolhas que hoje pretendo levar por toda a vida.

Agradeço aos meus pais, **Dalton e Deniusa**, que sempre foram grandes referencias que souberam como ninguém passar os valores que carrego. Ensinarão-me desde cedo que não há vitórias sem trabalho árduo e dedicação. São exemplos de amor à profissão e de constante busca em ser melhor a cada dia. A minha mãe que sempre foi minha parceira e com apoio incondicional, que sempre está pronta para me dar um colinho ou um beijinho, dizendo que sempre tudo ficará bem. Ao meu pai que sempre colocou nós filhos em primeiro lugar, que nunca impediu de voarmos por onde quiséssemos, apoiando sempre nossos sonhos. Aos meus irmãos, **Dalton e Danillo**, com que sempre poderei contar. Sempre zelaram por mim, foram meus ouvintes, conselheiros, amigos e companheiros fiéis.

Ao meu amor, parceiro **Rodrigo** que a vida me presenteou. Voltou esse ano pra socorrer a noiva, foi o meu curinga, mesmo morrendo de dó ajudou nas injeções, nos fins de semana de experimento, meu fotógrafo de todos os momentos. Eu só tenho a agradecer Deus por ter colocado no meu caminho, por sempre ser meu anjo, cuidar e zelar por mim, por ter paciência e aguentar o gênio não muito fácil. Ter você para compartilhar, a vida será muito mais doce e leve. Obrigada por tudo, tudo, e como já me conhece bem, sabe que não sou muito boa nas palavras. Amo-Te e espero te fazer muito feliz!

Aos meus amigos de longas datas que nem sempre estão muito perto, porém mesmo distante me acompanharam e me incentivaram durante todo esse processo. A minha família mineirinha pela distância desse último ano, obrigada por compreenderem a ausência.

Agradeço a minha querida orientadora **Nilce** a oportunidade de cursar essa pós-graduação, como sua orientada. É uma grande honra poder conviver e aprender com você. Profissional de tirar o chapéu, lembro-me da primeira disciplina em que foi minha professora, ainda na graduação, onde sua abordagem me fez ter outra visão em relação ao paciente, o como fazer, como abordar, maneira que eu tento aplicar todos os dias. Inspiradora e eterna curiosa do saber te descrevem bem, pelo menos eu acho. Pessoa que sempre está buscando o “plus”, elétrica e ao mesmo tempo leve que sempre nos motiva para o algo a mais, o ser diferente, a quebrar paradigmas. É um grande privilégio conviver e aprender todos os dias com você. Muito obrigada!

Aos meus co-orientadores de coração professores **Paulo Tadeu** e **André Leite**, o Tico e Teco da Odonto. A vocês, minha eterna gratidão, obrigada por todos esses anos de aprendizado, convivência e parceria. Tenho enorme satisfação e alegria em acompanhar a trajetória sólida que estão construindo. Desejo tudo de melhor para vocês! Ao professor Paulo, obrigada pelos cheques de valores consideráveis, afinal é o pai da nossa pesquisa, o selênio de cada dia no meio da jornada de trabalho. Ao professor André, obrigada pela palavra de conforto na hora do desespero, a ajuda nas dúvidas, aos esclarecimentos e aos conhecimentos adquiridos. Obrigada à vocês pelo apoio durante todo esse tempo.

Obrigada ao professor **Sacha**, pela paciência e conhecimentos passados. Afinal dentista aprender a mexer no Micro-ct, não é uma das missões mais fáceis. Ao professor **Bruzadelli**, muito obrigada, por ser tão solícito, ajudar nas várias etapas no decorrer desse trabalho. Ao professor **Luís Augusto Casulari** pela disposição e por ser tão solícito em participar desta banca. **Ao Rafael e Ana Luiza** veterinários do biotério que nos ajudou durante todo o processo, nos ensinou a realizar as cirurgias, esteve sempre de prontidão quando algo diferente acontecia com os nossos animais. Aos técnicos do biotério pelo zelo com os nossos bichinhos. **Wilson** obrigada pela dedicação, cuidado, preocupação e ajuda no decorrer de todo esse processo, sem você teria sido bem mais complicado.

Aos meus amigos-colegas conquistados e reencontrados durante o mestrado muito obrigada. Não imaginei que fazer pesquisa com animais fosse tão trabalhoso e que necessitaria ter tanta gente envolvida no processo. Cirurgias, Micro-Cts,

medicações, pós-operatórios, e muitas vezes elas juntas e misturadas, nada seria possível se não tivesse essa equipe maravilhosa. Obrigada meninos, **Túlio, Josy, Andréia, Raíza, Fernando** pela ajuda e companheirismo. A minha parceira e dupla dinâmica de todo esse processo **Nathi**, muito obrigada! Afinal voltar de um mestrado e já emendar num projeto trabalhoso não é para qualquer um, você é 10. Obrigada pelos feriados, ou melhor, ausência deles serem compartilhados, almoços de 15 minutos, desespero dividido quando algo não muito bom acontecia com os nossos animais, a expert nas dosagens, histórias não faltarão em nossas lembranças.

A **FAP-DF** pelo subsídio para que esse trabalho fosse viabilizado, a **CAPES** pelo fornecimento da bolsa de mestrado que contribuiu muito para minha formação profissional. Ao **Instituto de Biologia** pela parceria e disponibilidade em utilizar os laboratórios equipamentos imprescindíveis para realização desse trabalho. Ao **Biotério da Faculdade Ciências da Saúde** por disponibilizar alojamento e nos ajudarem a cuidar dos nossos animais. A **pós-graduação em Ciências da Saúde** pelas orientações e ajudas burocráticas ao longo de todo esse processo. A **Universidade de Brasília** pelo apoio e incentivo aos alunos de pós-graduação. Minha eterna gratidão a todos, muito obrigada!

“Se chamares experiências às tuas dificuldades e recordares que cada experiência te ajuda a amadurecer, vai crescer vigoroso e feliz, não importa quão adversas pareçam as circunstâncias.”

Henry Miller

RESUMO

Introdução: A osteoporose é doença esquelética comum, caracterizada pela diminuição na resistência óssea, com predisposição às fraturas por trauma mínimo. Em modelos animais, a diminuição da concentração de estrógeno causada pela ovariectomia pode mimetizar os eventos biopatológicos do processo osteoporótico. **Objetivo:** Avaliar diversos parâmetros ósseos microtomográficos trabeculares e corticais na mandíbula e no fêmur de ratas submetidas à ovariectomia (OVX), comparando-os com os mesmos parâmetros em ratas não submetidas ao procedimento cirúrgico, denominado de grupo controle. **Método:** Quarenta e duas ratas Wistar, com 8 semanas de vida, foram divididas randomizadamente, em grupos controle e cirúrgico (OVX). No oitavo dia do experimento foi realizada a ovariectomia no grupo experimental. Após 12 semanas, a mandíbula e o colo do fêmur foram escaneados por meio da microtomografia computadorizada. Os seguintes parâmetros ósseos trabeculares e corticais foram analisados em cada sítio ósseo escaneado: densidade mineral óssea (DM), espessura trabecular (ET), espaçamento das trabéculas (eT), número de trabéculas (NT), dimensão fractal (DF), porosidade (PO), volume área (VC) e área total (AC). Os dados foram comparados entre os grupos controle (CON) e ovariectomizadas (OVX). **Resultados:** Na mandíbula de ratas submetidas à ovariectomia houve uma redução no número de trabéculas e na densidade mineral óssea trabecular. Um aumento nos valores de porosidade foi verificado no osso trabecular da mandíbula. Em relação ao colo femoral, o número de trabéculas e a área cortical diminuíram. Além disso, foram observados aumentos na porosidade trabecular e no espaçamento das trabéculas. No osso cortical, apenas um aumento na DF da cortical mandibular foi observada. Para todos os outros parâmetros ósseos, as diferenças não foram estatisticamente significantes entre os grupos CON e OVX para cada sítio ósseo escaneado. **Conclusão:** Após 12 semanas da ovariectomia, mudanças no osso trabecular foram observadas similarmente na mandíbula e no fêmur. No entanto, não foram encontradas alterações significantes no osso cortical femoral. Em relação ao osso cortical mandibular, apenas a dimensão fractal estava alterada. Mais estudos poderão esclarecer se a dimensão fractal da cortical mandibular pode demonstrar alterações iniciais

relacionadas à osteoporose. As semelhanças nas alterações na mandíbula e colo femoral sugerem que há fortes indícios de correlação entre estes sítios.

PALAVRAS CHAVES: micro-CT, ovariectomia ratas, modelo animal osteoporose, osso.

ABSTRACT

Osteoporosis is a common skeletal disease characterized by reduced bone strength, predisposing to minimal trauma fractures. In animal models, the decline of estrogen levels caused by ovariectomy may mimic the biopathologic events of the osteoporotic process. **OBJECTIVE:** To evaluate several trabecular and cortical microtomographic bone parameters of rats that underwent ovariectomy (OVX), and also to compare the same bone parameters of rats that did not undergo the surgical procedure. **METHODS:** Forty-two 8-week-old Wistar rats were randomly divided into two groups: Control (CON) and Ovariectomy (OVX). Ovariectomy were performed in the rats of the OVX group on day 8 of the experiment. After 12 weeks, the mandible and the femoral neck were scanned using the microcomputed tomography. The following trabecular and cortical bone parameters were analyzed at each scanned bone site: bone mineral density (BMD), trabecular thickness (TbTh), trabecular separation (TbSp), trabecular number (TbN), fractal dimension (FD), porosity (PO), cortical area (CtAr), total cross-sectional area (TtAR) and cortical thickness (CtTh). The data were compared between the OVX and the CON group for each bone site. **RESULTS:** In the mandible of the ovariectomized rats, the trabecular number and the trabecular bone mineral density were reduced. There was an increase in the porosity value of the trabecular bone. Regarding the femoral neck, the trabecular bone and the cortical area were reduced. In addition, the increasing of the trabecular porosity and of the trabecular separation were observed. In the cortical bone, only the increasing of FD at the mandibular cortex was found. For all of the other bone parameters, the differences were not statistically significant between CON and OVX groups at each scanned bone. **CONCLUSION:** After 12 weeks of ovariectomy, trabecular bone changes were observed similarly at both the mandible and the femoral neck. However, no significant bone changes were found at the femoral cortical bone. Regarding the mandibular cortical bone, only FD was altered. Further studies may clarify whether FD of the mandibular cortex may demonstrate initial changes related to osteoporosis. The similarities of the bone changes between the mandible and the femoral neck suggest a possible strong correlation between both bone sites.

KEYWORDS: microcomputed tomography; ovariectomy; rats; osteoporosis; animal model.

LISTA ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Organograma sequencia de acontecimentos

Figura 2- Tricotomia

Figura 3- Assepsia do campo operatório

Figura 4- Incisão na pele

Figura 5- Incisão peritônio

Figura 6- Órgãos expostos pós- incisão

Figura 7- Separação ovários

Figura 8- Sutura junção dos cornos uterinos

Figura 9- Ovário removido

Figura 10- Sutura interna

Figura 11- Sutura externa

Figura 12A/12B- Localização e aplicação sedação

12C- Posicionamento animal no aparelho

12D- Imagem do software quando o animal está posicionado no escaner.

Figura 13A/13B- Corte axial

Figura 14A/14B- Corte coronal

Figura 15A/15B- Corte sagital

Figura 16A- Imagem phantom 0,25 e 0,75 gr/cm²

16B- Colocação "*phantom*" no aparelho

Figura 17- ROI cortical mandibular

Figura 18- ROI trabecular mandibular

Figura 19- ROI cortical colo femoral

Figura 20- ROI trabecular colo femoral

Figura 21- Análise número de trabéculas mandibular

Figura 22- Análise da densidade mineral óssea mandibular

Figura 23- Análise área cortical mandibular

Figura 24- Análise do volume cortical mandibular

Figura 25- Análise da espessura cortical mandibular

Figura 26- Análise da porosidade cortical mandibular

Figura 27- Análise do número de trabéculas femoral

Figura 28- Análise da dimensão fractal femoral

Figura 29- Análise da densidade mineral óssea cortical femoral

Figura 30- Análise área cortical femoral

Figura 31- Análise da porosidade cortical femoral

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dose ministrada de sedativos

Tabela 2- Diferença nas médias dos parâmetros ósseos mandibulares microtomográficos entre os animais do grupo controle e do grupo experimental

Tabela 3- Diferença nas médias dos parâmetros ósseos mandibulares microtomográficos entre os animais do grupo controle e os do grupo experimental.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ CT: Microtomografia computadorizada
AC/AT: Fracção de área do osso cortical
AC: Área cortical
ACF: Área da cortical do fêmur
ACM: Área cortical mandibular
AT: Área total da secção transversal
BS/BV: osso de superfície específica
CO₂: Dióxido de carbono
CON: Controle
CT: Calcitonina
DCF: Densidade mineral da cortical do fêmur
DCM: Densidade mineral da cortical mandibular
DF: Dimensão fractal
DFCF: Dimensão fractal da cortical femoral
DFCM: Dimensão fractal da cortical mandibular
DFTF: Dimensão fractal do trabeculado do fêmur
DFTM: Dimensão fractal do trabeculado mandibular
DMC: Densidade mineral óssea cortical
DMO: Densidade mineral óssea
DTF: Densidade mineral do trabeculado do fêmur
DTM: Densidade mineral do trabeculado mandibular
DXA: Densitometria óssea por duplo feixe de raio X
EC: Espessura cortical
ECF: Espessura cortical do fêmur
ECM: Espessura cortical mandibular
eT: Espaçamento trabecular
Et: Espessura trabecular
eTf :Espaçamento trabecular femoral
ETF: Espessura das trabéculas do fêmur
eTm: Espaçamento das trabéculas ósseas mandibulares
ETM: Espessura das trabéculas ósseas mandibulares
Micro- CT: Microtomografia computadorizada

NT: Número de trabéculas

NTF: Número de trabéculas no fêmur

NTM: Número de trabéculas mandíbula

OMS: Organização Mundial da Saúde

OVX: Ovariectomia, ovariectomia, ovariectomizadas

POCF: Porosidade da cortical do fêmur

POCM: Porosidade da cortical mandibular

POTF: Porosidade trabecular do fêmur

POTM: Porosidade trabecular da mandíbula

PTH: Hormônio paratireoide

PVPI: Polivinil pirrolidona

TCFC: Tomografia computadorizada de feixe cônico

V.Ar: Volume cortical

VCM: Volume cortical mandibular

VT/AV: percentagem de volume ósseo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 DEFINIÇÃO DA OSTEOPOROSE	24
2.2 EPIDEMIOLOGIA	24
2.3 CLASSIFICAÇÃO DA OSTEOPOROSE	24
2.4 FATORES DE RISCO	25
2.5 DIAGNÓSTICO	25
2.6 METABOLISMO OSSEO	28
2.7 USO DE MODELOS ANIMAIS	28
2.8 USO MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA	28
3. OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. MÉTODOS	33
4.1 AMOSTRA	33
4.2 CIRURGIA DE OVARIOHISTECTOMIA	34
4.3 MENSURAÇÃO UTILIZANDO MICRO-CT	35
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICA	41
5. RESULTADOS	43
6. DISCUSSÃO	52
7. CONCLUSÃO	58
REFERENCIAS	59
ANEXOS	64

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A osteoporose é caracterizada por resistência óssea reduzida e aumento da suscetibilidade a fraturas por trauma mínimo. A resistência óssea reflete principalmente a integração da densidade mineral óssea e da qualidade óssea (1). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a osteoporose é a segunda doença crônica mais comum na população mundial, atrás apenas de doenças cardiovasculares (2). A osteoporose é um problema crescente na população, já que a expectativa de vida está em linha ascendente (3, 4).

As fraturas representam a sequela mais comum da doença (4-6). As fraturas geram impacto no indivíduo levando à morbidade e, em alguns casos, até à mortalidade. Portanto, as fraturas decorrentes da osteoporose impactam nos serviços de saúde e na economia devido aos seus custos elevados (7, 8).

Nos Estados Unidos, em 2008, cerca de 10 milhões de americanos apresentavam osteoporose, gerando um custo para os cofres públicos por volta de 22 bilhões de dólares. Estima-se que, em 2020, metade dos adultos americanos com mais de 50 anos, será portador de osteoporose (8, 9). No Brasil, estima-se que em 2050 os idosos representarão 23% da população (3). Hoje, cerca de 10 milhões de pessoas sofrem de osteoporose e desses, cerca de 2,4 milhões, a cada ano, sofrem de fraturas(3, 10).

Os fatores que podem contribuir para a patogenia da osteoporose são a idade, estilo de vida, fatores genéticos, fatores hormonais e atividade física reduzida (11-13). A osteoporose pode ser classificada em primária e secundária. A osteoporose primária ocorre em mulheres pós- menopausa e pessoas com mais de 70 anos. Já a secundária está relacionada com outras doenças e/ou medicações (14).

Nessas mulheres ocorre uma redução da produção de estrogênio acarretando grave diminuição da densidade mineral óssea (15, 16). A osteoporose tipo II ocorre em pessoas mais velhas, em ambos os gêneros, quando há redução da síntese de vitamina D, com conseqüente diminuição da absorção gastrointestinal do cálcio e da atividade celular óssea (2, 12).

O diagnóstico da osteoporose tipo I, pós-menopausa, pode ser realizado exclusivamente pelo clínico, quando há ocorrência de fraturas ósseas em decorrência de estímulos de baixa intensidade. No entanto, na maioria dos casos, exames de imagem são necessários para identificar uma diminuição na densidade mineral óssea (DMO) assintomática (3).

O melhor método para identificação da baixa DMO é a densitometria óssea por duplo feixe de raios X (DXA) (17, 18). A DXA é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico da osteoporose. Para a identificação do grupo de risco, a Organização Mundial de Saúde preconiza a avaliação da densidade mineral óssea (DMO) medida pela densitometria óssea por duplo feixe de raios X (DXA). O *T-score* é um desvio padrão da DMO, comparando com um resultado referencial de um adulto jovem, utilizado para mulheres pós-menopausa e homens mais de 50 anos. Para resultados de osteopenia varia -1 a -2,5, ou seja, os desvios padrão varia de 1 a 2,5 do resultado diferencial, sendo a osteoporose confirmada com valores abaixo *T-score* \leq -2,5. No entanto, o exame apresenta limitações pela incapacidade de diferenciar alterações na microarquitetura do osso (19, 20).

Os sítios ósseos recomendados para avaliação por densitometria óssea são a coluna lombar, quadril total e colo femoral. Além desses locais, estudos têm demonstrado que pacientes com histórico de fraturas osteoporóticas tendem a ter aumento da perda óssea na mandíbula e maxila, sendo observadas alterações na densidade e microarquitetura óssea desses dois sítios anatômicos (17, 21, 22).

Novos métodos de rastreamento da osteoporose são desenvolvidos com a intenção de reduzir os custos iniciais da detecção da doença. Na área odontológica, radiografias panorâmicas, e mais recentemente tomografias computadorizadas de feixe cônico (TCFC) muito utilizadas para planejamento de implantes dentários, estão sendo utilizadas para avaliação das alterações na cortical óssea mandibular (21, 23). Entretanto já foi observado que as radiografias panorâmicas apresentam limitações, uma vez que são imagens bidimensionais e apresentam distorções para medidas lineares (24). Já as imagens tridimensionais têm sido utilizadas com o objetivo de melhor conhecimento sobre a microarquitetura óssea. Nos laboratórios de pesquisa o uso da microtomografia computadorizada é considerado o padrão ouro para análises da microarquitetura óssea (25). Com a microtomografia

computadorizada os parâmetros geométricos do osso podem ser detectados com precisão e podem-se obter informações detalhadas sobre o osso trabecular. Entretanto, esse tipo de imagem se limita ao uso em animais devido à pequena gama de varrimento e alta dosagem de radiação. (26).

Ainda no campo da investigação, os modelos animais se constituem um importante instrumento para compreensão dos eventos biopatológicos relacionados à osteoporose (27). Para mimetizar os eventos biopatológicos que ocorrem nos seres humanos no processo osteoporótico, usando modelos animais, os pesquisadores costumam, como comprovado na literatura, provocar a deficiência de estrógeno por meio da ovariectomia e, com isso, induzem osteoporose (2, 28-30). Alguns poucos estudos, usando modelos animais, conseguiram demonstrar no corpo e cabeça da mandíbula diminuição da DMO, num quadro característico do processo osteoporótico (15, 31).

O diagnóstico da osteoporose é, em suma, baseado na análise da DMO. No entanto, muitos indivíduos com DMO normal sofrem fratura por trauma mínimo, considerada como a marca da osteoporose. Portanto, torna-se fundamental a avaliação da qualidade óssea, principalmente relacionada à microarquitetura. A resistência óssea reflete a integração entre a densidade mineral óssea (DMO) e a qualidade óssea. E para avaliar a microarquitetura, mesmo considerando a aplicabilidade da microtomografia computadorizada em modelos animais, ainda há poucos estudos que exploram essas correlações (6, 25, 29, 32-34).

Assim, a compreensão das alterações microarquiteturais ósseas poderá prever a qualidade óssea, servindo como base para a análise da fragilidade óssea. Considerando que a mandíbula é um sítio ósseo predominantemente cortical, assim como o fêmur que é um dos sítios escolhidos para avaliação de risco de fratura, e que, frequentemente, é avaliada em exames por imagem, no exercício da odontologia, a correlação das alterações mandibulares com as alterações femorais pode servir como fase preliminar para a identificação precoce do risco de fratura na população.

Para isso, nos propusemos a avaliar, em modelo animal, as alterações microarquiteturais da mandíbula de ratas submetidas à cirurgia de

ovariohisterectomia e compará-las com as alterações microarquiteturais no fêmur destes animais.

2. REVISÃO

2. REVISÃO

A osteoporose é uma doença silenciosa e seu diagnóstico se assenta, muitas vezes, na ocorrência de fraturas decorrentes de traumas mínimos ou até mesmo nenhum trauma. Estudar sua incidência e prevalência, conhecer a fundo sua etiopatogenia, métodos de diagnóstico precoce e de baixo custo, são fundamentais para as próximas décadas, uma vez que os custos com sequelas consequentes da patologia são altos, e o envelhecimento da população é uma realidade (11, 13, 18).

A osteoporose é classificada em dois tipos: primária e secundária. A classificação foi feita de acordo com a combinação de mudanças fisiológicas e hormonais ocorridas no corpo humano juntamente com as influências do meio. (12).

A osteoporose primária está associada com a redução brusca das concentrações de estrógeno e consequente aumento do ritmo de remodelação óssea, frequente na pós-menopausa, ou relacionada ao envelhecimento, aparecendo por deficiência de cálcio, aumento da atividade do paratormônio e diminuição da formação óssea.

Já a osteoporose secundária é decorrente de processos inflamatórios, como artrites reumatóides, alterações endócrinas, mieloma múltiplo, utilização de medicamentos como heparina e corticosteroides. Nessas situações clínicas há inibição da absorção intestinal do cálcio, aumento de sua eliminação na urina, além da diminuição da formação dos osteoblastos e aumento da atividade osteoclástica (2, 12, 14).

Na Europa espera-se que 1:3 mulheres e 1:6 homens tenham ao menos um episódio de fratura osteoporótica, gerando um custo no valor de 38,7 bilhões de euros(35). Nos Estados Unidos espera-se um aumento do número de fraturas em 48%, gerando custos em torno de 25,3 bilhões de dólares nos próximos 25 anos (36). Na China estimava-se uma prevalência da osteoporose em 27,96% da população entre 2012-2015. Para 2050, a população idosa chinesa deverá alcançar os 400 milhões de pessoas (37). Na América Latina existem poucos dados consistentes sobre a prevalência e a relevância dos fatores de risco para a determinação do maior risco de fratura por osteoporose, bem como sobre a ingestão

de nutrientes relacionados à saúde óssea (38). Mesmo com dados insuficientes, a prevalência da osteoporose na população feminina brasileira fica entre 15%-33% (3).

Com esses índices de grande incidência e prevalência em todo o mundo, trabalhar com métodos de prevenção, avaliação e controle é fundamental. O diagnóstico de osteoporose e osteopenia baseia-se com a junção do exame físico, histórico médico, e/ou exames complementares imaginológicos e sanguíneos. A identificação de pacientes que podem ser considerados como de alto risco para o desenvolvimento da osteoporose é estratégia importante.

Os fatores de risco que devem ser considerados para o desenvolvimento da osteoporose são: sexo feminino, fratura prévia, raça asiática ou branca, idade acima de 70 anos, histórico familiar de fratura de colo femoral por trauma mínimo, menopausa precoce não tratada, amenorreia primária ou secundária, hipogonadismo, anorexia nervosa, quimioterapia para câncer de mama, síndrome de Crohn's, colites. Também compõem o quadro de fatores de risco, hábitos como tabagismo, etilismo, sedentarismo, dieta alimentar, utilização de medicações que induzem a perda de massa óssea: heparina, warfarina, anticonvulsivantes e outros (9, 13, 22).

A identificação de pacientes que compõem o grupo de risco pode aumentar as chances de diagnóstico ou de rastreamento e, pode em última análise, diminuir o impacto biológico, social e econômico da osteoporose. O objetivo é reduzir a incidência da maior consequência dessa doença, as fraturas (11).

O exame padrão ouro de imagem para diagnóstico e avaliação da estrutura óssea é a densitometria óssea (18, 36). A Organização Mundial da Saúde propôs a classificação da osteoporose baseada na DMO, comparando-se com um resultado referencial de um adulto jovem. O *T-score* é um desvio padrão da densidade mineral óssea comparada com esse resultado referencial. É utilizado para mulheres na pós-menopausa e homens com mais de 50 anos. Para indivíduos que não se encontram nesse grupo, o resultado referencial é baseado numa comparação levando-se em conta a idade (*Z-score*). O *T-score* para osteopenia situa-se entre -1 a -2,5, ou seja, varia de 1 a 2,5 desvios-padrão do resultado referencial. Resultados abaixo de -2,5

indicam a presença de osteoporose. O somatório do *T-score* abaixo de -2,5 e presença de fratura indica osteoporose grave segundo a OMS (35).

As fraturas são as consequências mais preocupantes da osteoporose, uma vez que são elas as responsáveis pela mobilidade, mortalidade e pelos custos elevados para os sistemas de saúde. Quando considerado o panorama mundial, as regiões anatômicas mais susceptíveis a fratura são: vertebra, quadril, antebraço e úmero. No Brasil as localizações mais frequentes de fratura são: antebraço e fêmur, seguidas de úmero, costelas e vértebra (35, 38).

O esqueleto é um órgão extremamente especializado e dinâmico que sofre regeneração contínua. A estrutura óssea é preparada para resistir às forças fisiológicas e pode ajustar mais sua resistência mecânica através da remodelação. Este processo é responsável pela formação e a manutenção da forma do osso, iniciando suas atividades desde a fase uterina de um feto e continua até a maturidade esquelética (8, 39).

O osso é composto de colágeno tipo I e endurecido por cristais de hidroxiapatita de cálcio, sendo 60% dele mineralizado. O osso humano é dividido em cortical e trabecular, sendo essa classificação baseada na porosidade e microestrutura de cada um deles. O osso cortical corresponde de 5% -30% volume de um osso, e o trabecular entre 30% -90% (27).

As fibras de colágeno representam vários segmentos repetidos ao longo de todo osso, sendo os cristais de hidroxiapatita encontrados adjacente a cada segmento da fibra e firmemente aderidos a ela. O mecanismo de calcificação óssea apresenta-se na sua fase inicial a secreção de colágeno e líquido extracelular mais proteoglicanos, pelos osteoblastos, que formam as fibras colágenas seguidas pela precipitação de sais de cálcio. Essa íntima ligação é responsável pela resistência óssea, essa podendo suportar mais força tênsil ou compressiva (40).

A remodelação óssea fisiológica normal é fundamental para a manutenção da integridade óssea e para a preservação da sua funcionalidade. Para esse processo ocorrer de maneira plena é necessária uma comunicação direta entre as diferentes células ósseas. As células da linhagem dos osteoblastos (osteoblastos, osteócitos e células de revestimento do osso) e as células de reabsorção óssea (osteoclastos),

juntamente com suas células precursoras precisam estar em constante comunicação (41).

Os osteoblastos são células de origem mesenquimal, responsáveis pela formação óssea e pela regulação da diferenciação dos osteoclastos. Essas células maduras podem ter três destinos: a apoptose, a diferenciação para osteócitos ou para células de revestimento do osso. Os osteócitos se encontram aderidos na matriz óssea, onde permanecem até sofrer apoptose. Têm como função primordial a manutenção da estrutura óssea, atuando como receptores de estímulos mecânicos, fazendo a sinalização da ocorrência de micro fraturas, através da apoptose, levando à reabsorção do osso estimulado ou lesionado e a uma nova aposição mineral.

Os osteoclastos são células encontradas na superfície externa óssea que secretam enzimas proteolíticas e vários ácidos, promovendo a dissolução da matriz orgânica mineral, levando a desmineralização no local de atuação (9, 13). Essas células são controladas por diversos fatores locais e sistêmicos de uma forma bem organizada. A calcitonina (CT), o hormônio paratireóide (PTH), a vitamina D3 e o estrogênio são os principais reguladores hormonais da reabsorção óssea osteoclástica (41).

O estrógeno é um dos principais reguladores hormonais do metabolismo ósseo em mulheres e em homens. A sua deficiência, ou seja, sua redução aumenta a taxa de remodelação e do volume de osso que é reabsorvido, pelo prolongamento da vida dos osteoclastos. Também diminui o volume de osso que é formado pela redução da vida dos osteoblastos, desequilibrando o processo de reabsorção e aposição mineral provocando mudança estrutural do osso após a menopausa (27, 40).

O envelhecer esquelético, condições ambientais e doenças ósseas também acarretam alteração na integridade mecânica provocando alterações na micro e macro estrutura óssea, havendo variações no diâmetro e espessura da cortical e destruição do trabeculado ocasionando em fraturas (40).

O osso trabecular é o primeiro a ter consequências da perda do equilíbrio do processo de remodelação. O motivo para tal fato é presença de mais superfícies estruturais, ou seja, mais locais de remodelação por unidade de volume, fazendo

com que haja perda das placas trabeculares e rompimento da ligação das fibras de colágeno (conexão). Esse processo acarreta fragilidade óssea ao produzir maior déficit de força e enfraquecimento trabecular. O afinamento trabecular pode ser observado, ou não, em casos de alteração pela deficiência de estrógeno (42).

Já a mudança na cortical e porosidade ocorre uma vez que, com o tempo, a absorção do osso se mantém e a deposição é reduzida. Com esse processo contínuo, as trabéculas se afinam, e muitas vezes desaparecem completamente, fazendo com que o processo de remodelação fique mais próximo do osso cortical (40). A limitação da possibilidade de se avaliar, em humanos, os processos moleculares da remodelação óssea tornam os modelos animais grande alvo de estudos.

A utilização de ratos para estudo do metabolismo ósseo é possível uma vez que se esses apresentam alto grau de conservação de fatores relevantes como moléculas reguladoras, receptores, moléculas secretadas e/ou proteínas. Entretanto, muitas vezes os resultados não podem ser transportados para os seres humanos (27). Os ratos apresentam um metabolismo muito mais rápido comparado ao do ser humano. Eles apresentam a infância breve e acelerada, chegando à maturidade sexual em cerca de 6 semanas. Assim, na fase adulta, um mês de vida do rato corresponde a 2,5 anos humanos (43).

Mesmo com as limitações descritas, os modelos animais são aceitos e frequentemente utilizados (27, 44, 45). Modelos animais são alternativas para o estudo de temas complexos, como a osteoporose. Considerando a área de interesse do cirurgião-dentista, há trabalhos que apontam a correlação entre osteoporose, a diminuição da DMO e outros parâmetros geométricos em mandíbula de ratas (2, 15, 16, 29, 34). Nestes trabalhos, a ovariectomia (OVX), com a remoção dos ovários bilateralmente, é adotada para induzir a perda de massa óssea, causada pela deficiência de estrógeno (28, 30, 46).

A verificação dessa perda de massa óssea pode ser alcançada com o uso da microtomografia computadorizada (33). Nesse exame, os parâmetros geométricos ósseos, tanto corticais quanto trabeculares, podem ser precisamente detectados. Parâmetros como área total da secção transversal (AT), a área cortical (AC), a fracção de área de osso cortical (AC/AT) e a espessura cortical (EC), relativas ao

osso cortical. Já no osso trabecular podem ser avaliados os parâmetros: percentagem de volume ósseo (VT/AV), osso de superfície específica (BS/BV), espessura trabecular (ET), espessamento trabecular (eT) e número de trabéculas (Nt) entre outros (26).

Essas ferramentas são muito utilizadas para análise de microestrutura e morfologia; avaliar as alterações metabólicas ósseas; observar as primeiras alterações sofridas pelo osso; avaliar mudanças após intervenções medicamentosas e outros. Yang et al, em 2005, usando amostra de 12 ratas, induziu à deficiência de estrógeno. Os animais, nesse estudo, foram submetidos à ovariectomia, e, por meio de radiografias periapicais, os autores avaliaram a espessura da cortical, no período de um ano. Para a avaliação da espessura da cortical os autores utilizaram três pontos de referência região protuberância mental, ângulo mandíbula, e outra entre estas duas. Seus resultados mostraram redução da espessura cortical nas regiões avaliadas.

As possibilidades metodológicas são muitas, num modelo animal é possível desenhar estudos com pequenas variações, inclusive do fator tempo. Liu et al, 2015, se propuseram a avaliar as alterações ósseas em 10 sítios distintos, em cinco diferentes tempos (29). Os autores observaram que a alteração na densidade mineral óssea na mandíbula iniciou-se após 36 semanas decorridas da ovariectomia.

Um estudo recente utilizou 12 animais para avaliar, através do micro-CT, os efeitos da ovariectomia após 12 semanas, no osso trabecular e cortical no colo femoral e mandíbula. Os autores demonstraram que não houve mudança na cortical óssea, entretanto, houve correlação em relação à perda do osso trabecular, em ambos os sítios (2).

Considerando que a mandíbula é um sítio ósseo predominantemente cortical, assim como o fêmur, e que frequentemente é objeto de avaliação imaginológica, como rotina na prática odontológica, a correlação das alterações mandibulares com as alterações femorais pode servir como fase preliminar para a identificação precoce do risco de fratura na população. Para isso, nos propusemos a avaliar em um modelo animal as alterações microarquiteturais da mandíbula e colo de fêmur em

ratas submetidas à cirurgia de ovariectomia e comparar com as alterações microarquiteturais.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Comparar as alterações microarquiteturais na mandíbula e colo femoral de ratas submetidas à cirurgia de ovariectomia com as alterações de animais que não realizaram a cirurgia.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1 Comparar parâmetros ósseos na cortical e no trabeculado ósseo mandibular por meio de microtomografia computadorizada de animais submetida à cirurgia de ovariectomia com os mesmos parâmetros em animais que não realizaram a cirurgia.

3.1.2. Comparar parâmetros ósseos na cortical e no trabeculado ósseo femoral por meio de microtomografia computadorizada de animais submetida à cirurgia de ovariectomia com os mesmos parâmetros em animais que não realizaram a cirurgia.

4 MÉTODOS

4 MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

A amostra foi composta de 42 fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com peso aproximado entre 240- 270g (oito semanas de vida). Os animais foram alocados no Biotério de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília e climatizados por duas semanas, antes do início do experimento.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos de acordo com a data de chegada, em caixas de polipropileno com tampa zincada, mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12h (ciclo claro com início às 7:00h AM), em temperatura média de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e com acesso à ração e água à vontade. Após período de adaptação no biotério, os animais foram divididos randomizadamente em dois grupos, sendo grupo 1: Controle (CON) e grupo 2: Ovariohistectomia (OVX). (Figura1).

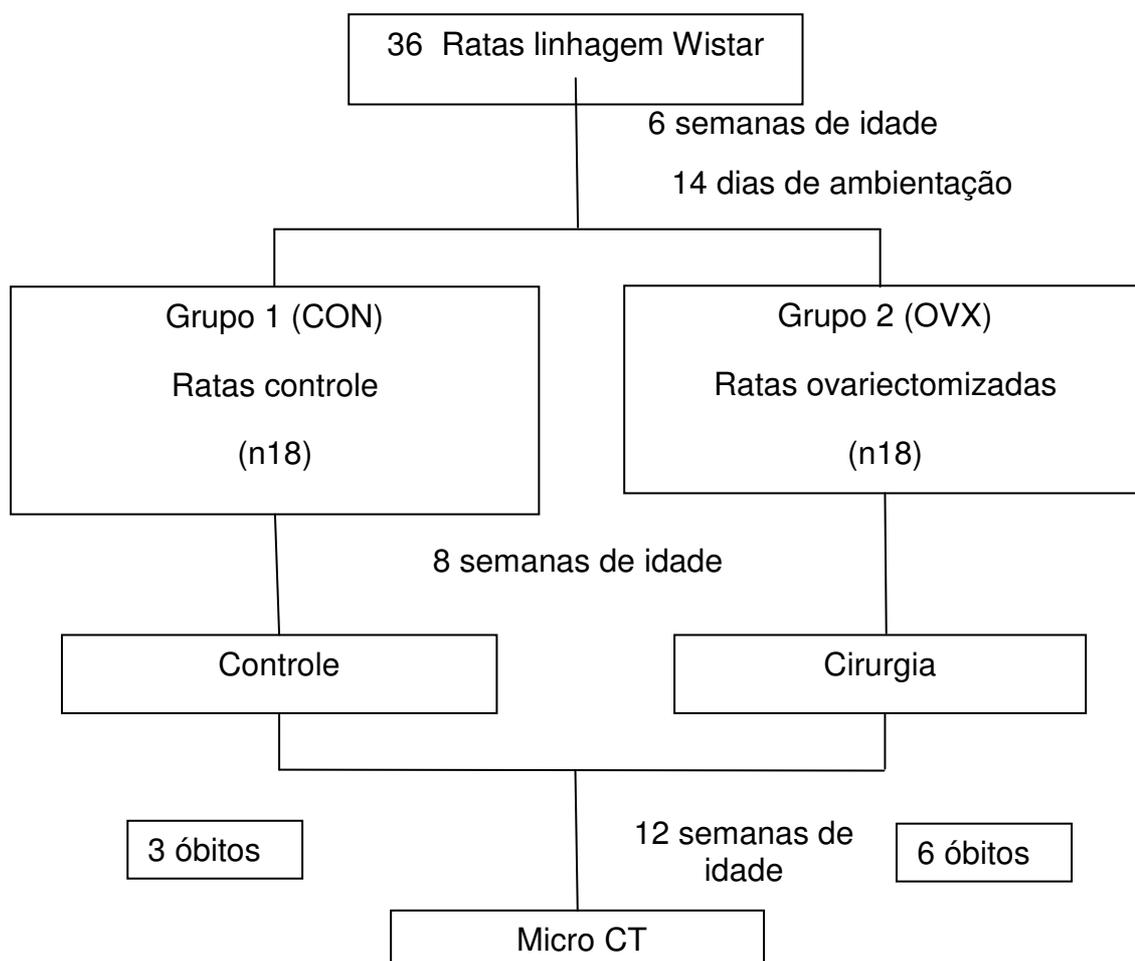


Figura1-Organograma seqüência de acontecimentos

4.2 CIRURGIA DE OVARIOHISTECTOMIA

A cirurgia de ovariectomia ocorreu no oitavo dia do experimento. Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina 10% e sedados com xilazina 2% (doses de 90 e 15mg/Kg respectivamente), aplicados por via intramuscular, com agulha hipodérmica 0,30 X 13mm.

Após a sedação e confirmação da efetividade da mesma, com a compressão do rabo e das patas para avaliar os reflexos periféricos, procedeu-se a remoção do pelo na região abdominal, seguido de assepsia com polivinil pirrolidona iodo (PVP-I), 1% (Figura 2-3). Colocou-se o animal na posição de decúbito dorsal e isolou-se a região com um campo fenestrado estéril sobre o abdômen do animal. Iniciou-se a incisão, usando lâmina nº15, na camada mais superficial da pele, continuada por uma tesoura de ponta romba, cortando o tecido por cerca de 5cm, em direção ao terço inferior do abdômen. Uma segunda incisão foi realizada na camada peritoneal, ao longo da primeira incisão, deixando os órgãos expostos (Figura 4-5).

Os ovários se encontram próximos à camada de tecido adiposo. Ao serem encontrados, bilateralmente, uma sutura com fio absorvível Catgut simples, 2.0, foi realizada na junção das trompas uterinas, sendo então, removidas as trompas e os ovários (Figuras 6-9). A sutura da camada do peritônio foi iniciada, posteriormente, à remoção das trompas e dos ovários, sendo feito uma sutura simples contínua (Figura 10). Uma outra sutura foi realizada na pele utilizando fio de sutura nylon, 4.0 e pontos simples (Figura 11).

No pós-operatório os animais foram medicados com Tramol, 5mg/Kg, 12/12 horas, por 48 horas, e com dipirona monoidratada (xarope), diluída em água filtrada, 50mg/litro, por 72 horas. Após dez dias, os pontos externos da sutura abdominal não eliminado espontaneamente, foram removidos pela pesquisadora.

Após 24 horas da cirurgia, três animais foram a óbito, nos quais foi observado o rompimento da sutura externa. Esse rompimento gerou instabilidade e a sutura interna também se rompeu o que gerou a morte dos animais. Cerca de 40 dias depois da cirurgia, outros três animais tiveram septicemia e morreram. Dentre os

animais do grupo controle, três foram eutanasiados com CO₂, pois apresentaram problemas neurológicos.

Os animais de ambos os grupos foram observados e monitorados por 12 semanas. Nesse período, os animais ganharam peso (300-360gr).

4.3 MENSURAÇÃO UTILIZANDO MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μCT)

O escaneamento foi realizado após a décima segunda semana pós-cirurgia já que trabalhos apontam já ocorrer alterações na microarquitetura óssea (29, 31, 47). O aparelho utilizado foi Skyscan 1076 in-vivo micro-CT Bruker Micro-CT (Figuras 12 A-D), seguindo os parâmetros: 100Kv, 100μA, resolução voxel 18, filtro Alumina 1.0mm (dia zero do experimento). O protocolo sedativo utilizado foi o mesmo realizado no procedimento de ovariectomia.

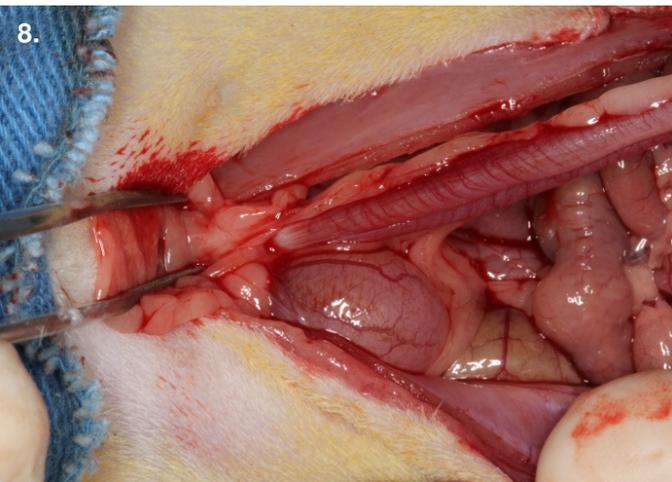
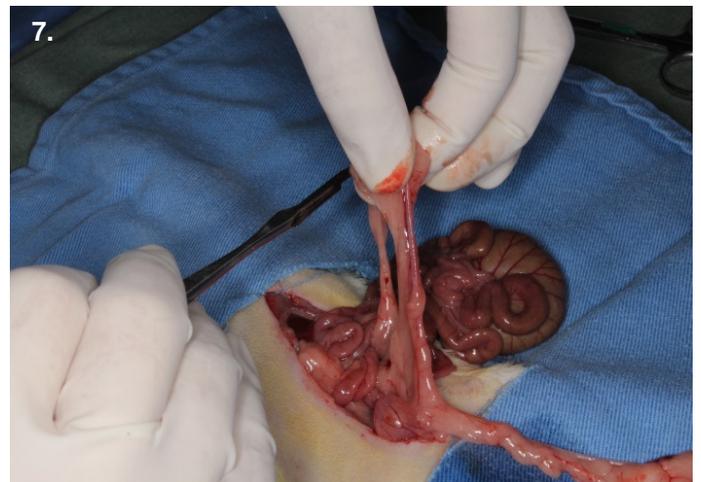
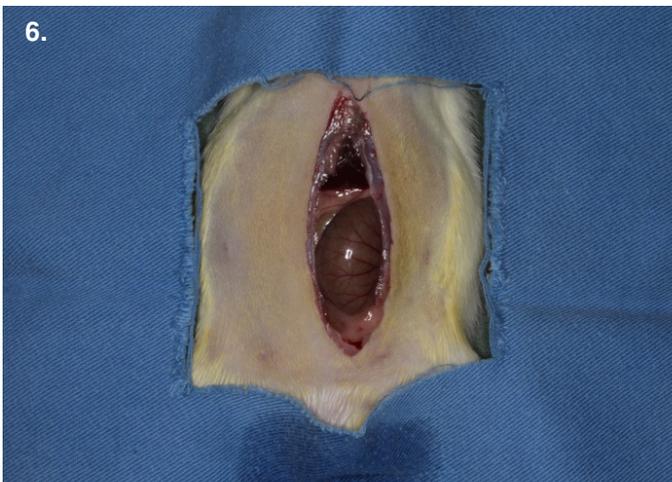
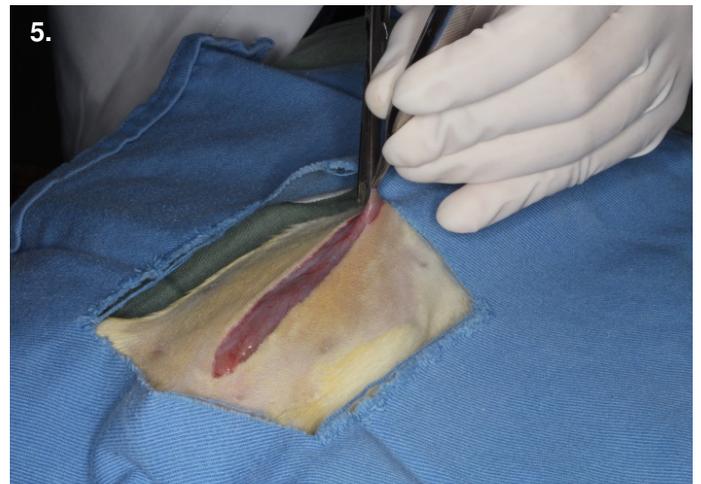
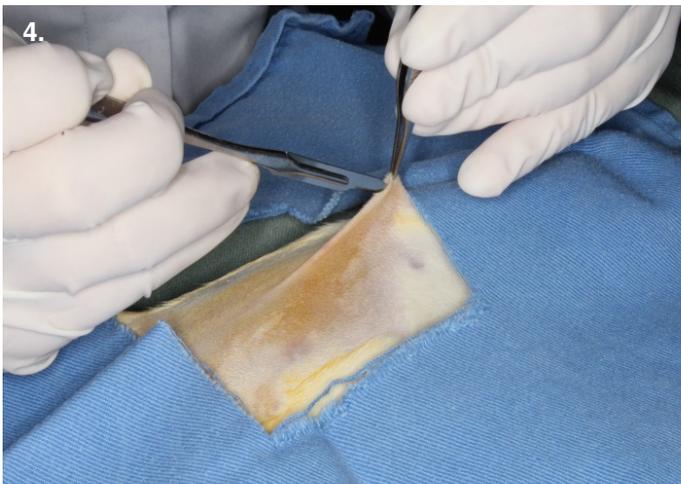
A mandíbula e o colo do fêmur foram escaneados em sequência. As imagens obtidas foram reconstruídas através do software do próprio equipamento NRecon Reconstruction. Após essa etapa, os arquivos foram manipulados no software DataViewer, onde foram rotacionadas as imagens de mandíbula, fazendo que ficassem paralelas ao longo eixo do dente referente ao lado direito, padronizando a posição da amostra. O mesmo foi feito com o fêmur para posicionar de maneira que se conseguisse obter o corte do colo do fêmur (Figura13-15).

Após a rotação das imagens foi utilizado o software CT analyser (CtAn) para mensurar a densidade e morfologia óssea da mandíbula e fêmur. Para calibração da densidade é utilizado padrões de hidroxiapatita, "*phantom*", com os valores padrões de 0,75 e 0,25 g/cm² (Figura 16).

A região de interesse (ROI) em mandíbula e cabeça de fêmur foi determinada. Na mandíbula foi escolhido o ROI na região pós primeiro molar, acima do forame mentoniano para avaliação do osso trabecular. Já o osso cortical teve como referência o comprimento da crista óssea do masseter ambos com o diâmetro de 832,8x 832,8μm na forma circular, selecionando 10 imagens de interesse por animal. (Figura17- 18).

O ROI utilizado na cabeça do fêmur separou o osso trabecular do cortical. O osso trabecular foi mensurado em todo seu diâmetro e o cortical formando uma meia lua na região que apresentou maior volume cortical (Figura 19-20).

Os parâmetros avaliados no osso trabecular foram densidade mineral óssea trabecular mandibular (DTM), densidade mineral óssea trabecular femoral (DTF), dimensão fractal (DF), espessura osso trabecular (Et), espaçamento trabecular (et), número trabecular (NT). No osso cortical foi mensurada densidade mineral óssea cortical mandibular (DMC), densidade mineral óssea cortical femoral (DCF), volume cortical (V.Ar), espessura cortical (Ec), e dimensão fractal (DF).





Figuras Preparação pré-cirúrgica: 2: tricotomia; 3: assepsia do campo operatório; 4: incisão na pele; 5: incisão peritônio; 6: órgãos expostos pós-incisão; 7: separação do ovário; 8: sutura na junção dos cornos uterinos; 9: ovário removido; 10: sutura interna; 11: sutura externa.

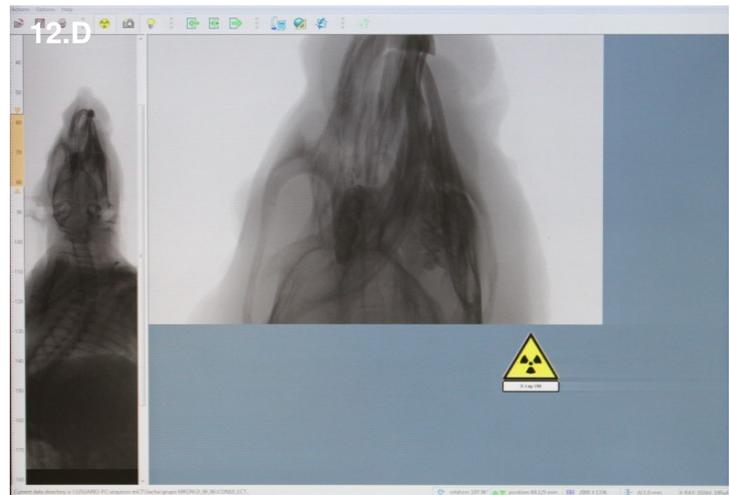
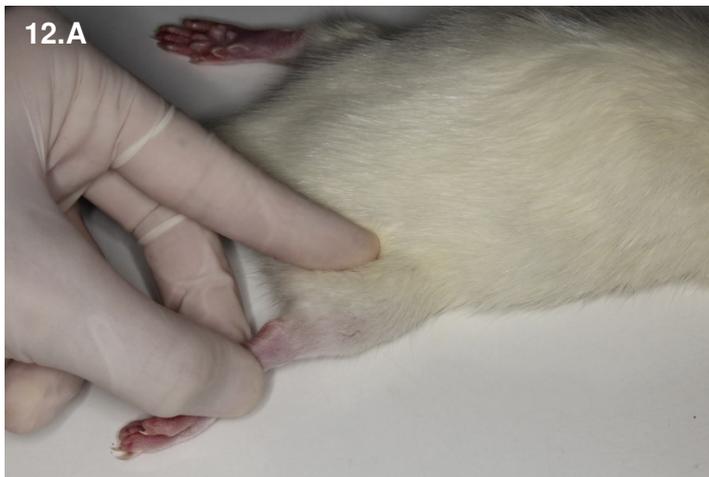


Figura 12. A-B- Localização e aplicação sedação; 12C- Posicionamento animal no aparelho; 12D- imagem do software quando o animal está posicionado no escaner.

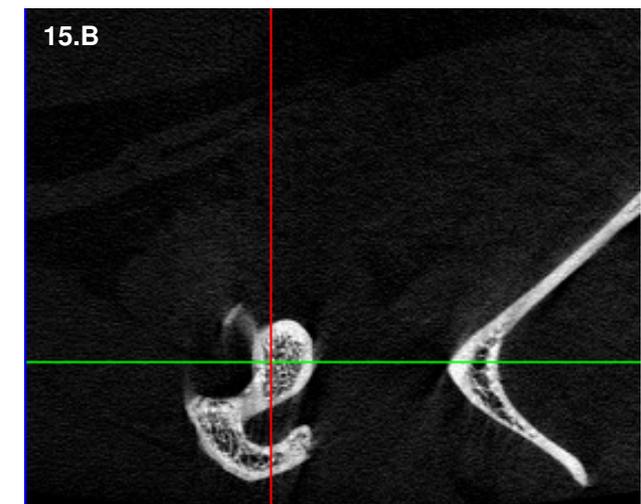
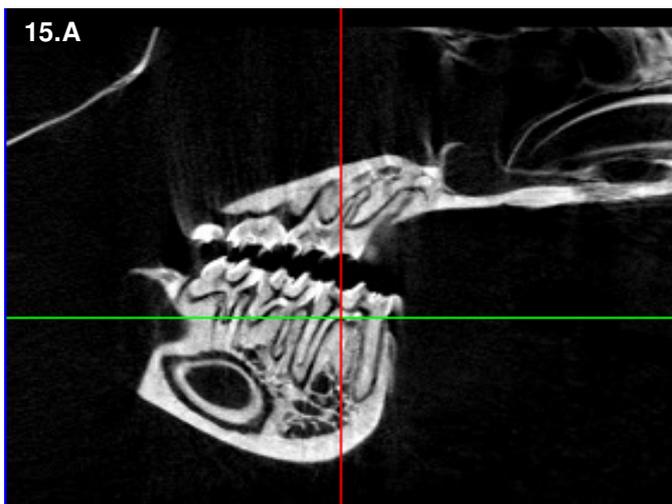
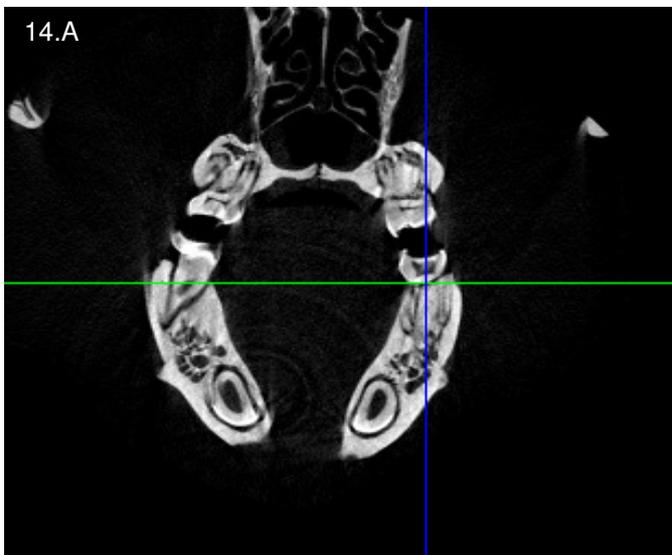
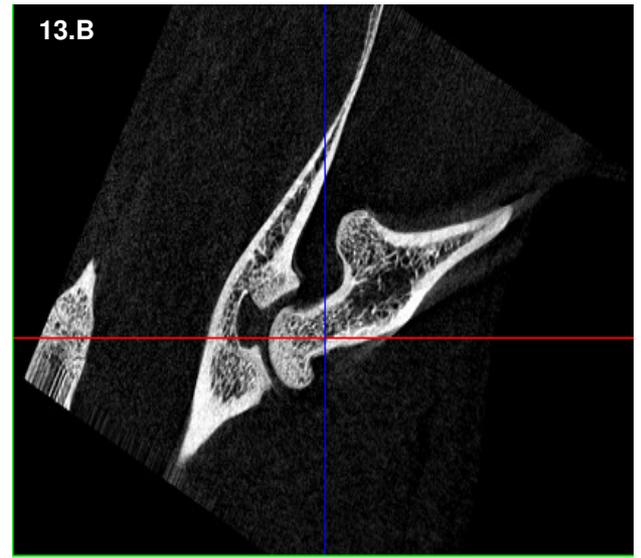
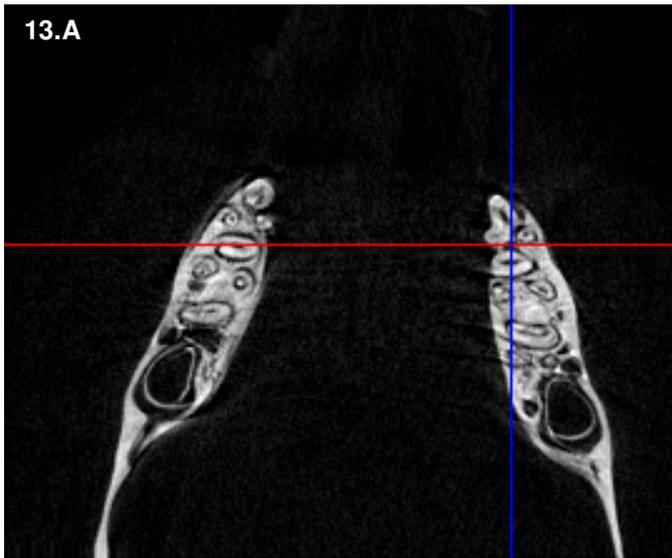


Figura 13(A-B): corte axial; Figura 14 (A-B) - corte coronal; Figura 15 (A-B) - corte sagital. Sendo A mandíbula e B colo femoral.

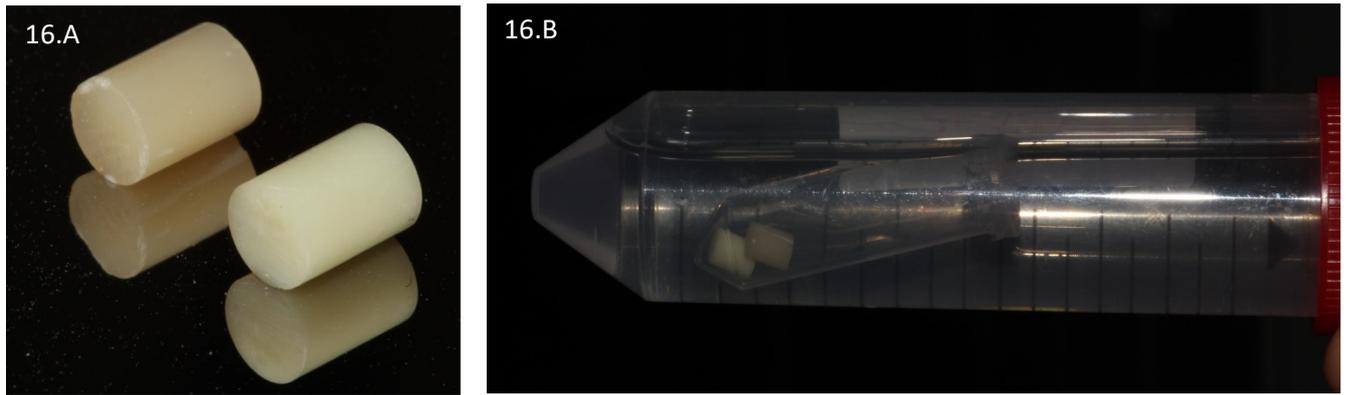


Figura 16 A- Imagens "phantom" 0.25 e 0.75; B- Colocação "phantom" no aparelho.

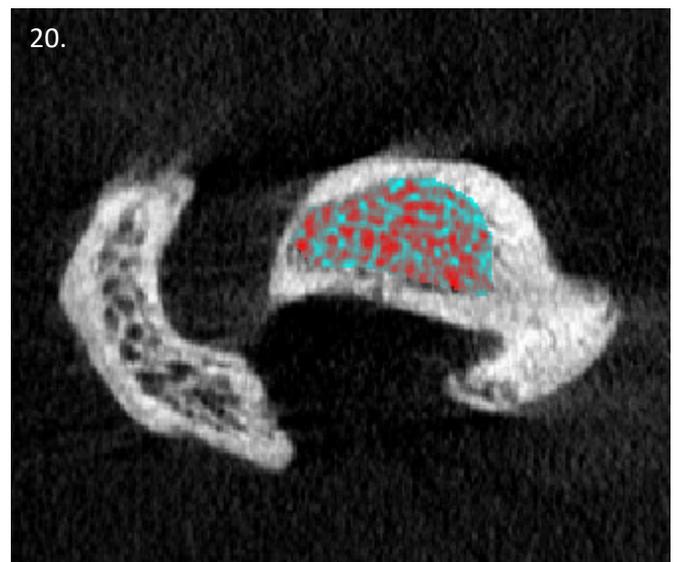
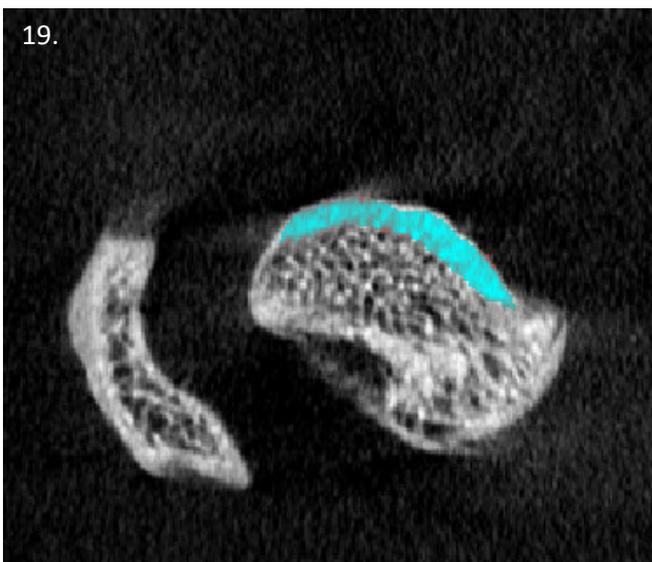


Figura: 17 ROI cortical mandibular; Figura: 18 ROI trabecular mandibular; Figura: 19 ROI cortical femoral; Figura: 20 ROI trabecular femoral.

4.4 ANALÍSES ESTATÍSTICA

A distribuição normal dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. Foram analisadas diferenças nos parâmetros ósseos entre os animais do grupo controle (n=18) e do grupo que realizou ovariectomia (n = 15). O teste ANOVA foi utilizado para avaliar as diferenças da densidade antes e após a cirurgia.

Para os parâmetros ósseos com distribuição normal, o teste t de Student foi utilizado para análise das diferenças. Os parâmetros com essa distribuição foram: densidade mineral do trabeculado antes da cirurgia (DTMi), densidade do trabeculado mandibular após a cirurgia (DTMf), espessura das trabéculas ósseas mandibulares (ETM), espaçamento das trabéculas ósseas mandibulares (eTM), dimensão fractal do trabeculado mandibular (DFTM), porosidade trabecular da mandíbula (POTM), dimensão fractal da cortical mandibular (DFCM), densidade mineral do trabeculado do fêmur (DTF), espessura das trabéculas do fêmur (ETF), porosidade trabecular do fêmur (POTF), espessura cortical do fêmur (ECF) e dimensão fractal da cortical do fêmur (DFCF).

Para os parâmetros ósseos cuja distribuição não foi normal, o teste Mann-Whitney foi utilizado para análise das diferenças entre o grupo controle e o grupo ovariectomizado. Os parâmetros com essa distribuição foram: número de trabéculas na mandíbula (NTM), densidade mineral da cortical mandibular (DCM), área cortical mandibular (ACM), volume cortical mandibular (VCM), espessura cortical mandibular (ECM), porosidade da cortical mandibular (POCM), espaçamento entre as trabéculas no fêmur (eTF), número de trabéculas no fêmur (NTF), dimensão fractal do trabeculado do fêmur (DFTF), densidade mineral da cortical do fêmur (DCF), área da cortical do fêmur (ACF), porosidade da cortical do fêmur (POCF).

Em todas as análises foi utilizado um nível de significância de 0,05. As análises foram realizadas no programa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2004. STATISTICA - data analysis software system, version 7. www.statsoft.com).

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de ética no Uso Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UnBDoc n 162977/14.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Da amostra inicial de 42 animais e com a perda de nove animais, a amostra final foi constituída por 33 animais. Então, foram avaliados 18 animais do grupo controle e 15 do grupo experimental. Foram analisados diversos parâmetros ósseos microtomográficos na mandíbula e no fêmur e realizada a comparação dos dados obtidos nesses dois sítios avaliados.

A comparação dos parâmetros ósseos microtomográficos mandibulares entre os animais do grupo controle (CON) e os animais do grupo experimental (OVX) foi o primeiro objetivo desse estudo.

As figuras 21 a 26 mostram a comparação dos seguintes parâmetros ósseos mandibulares entre os animais CON e os OVX: número de trabéculas na mandíbula (NTM), densidade mineral da cortical mandibular (DCM), área cortical mandibular (ACM), volume cortical mandibular (VCM), espessura cortical mandibular (ECM) e porosidade da cortical mandibular (POCM).

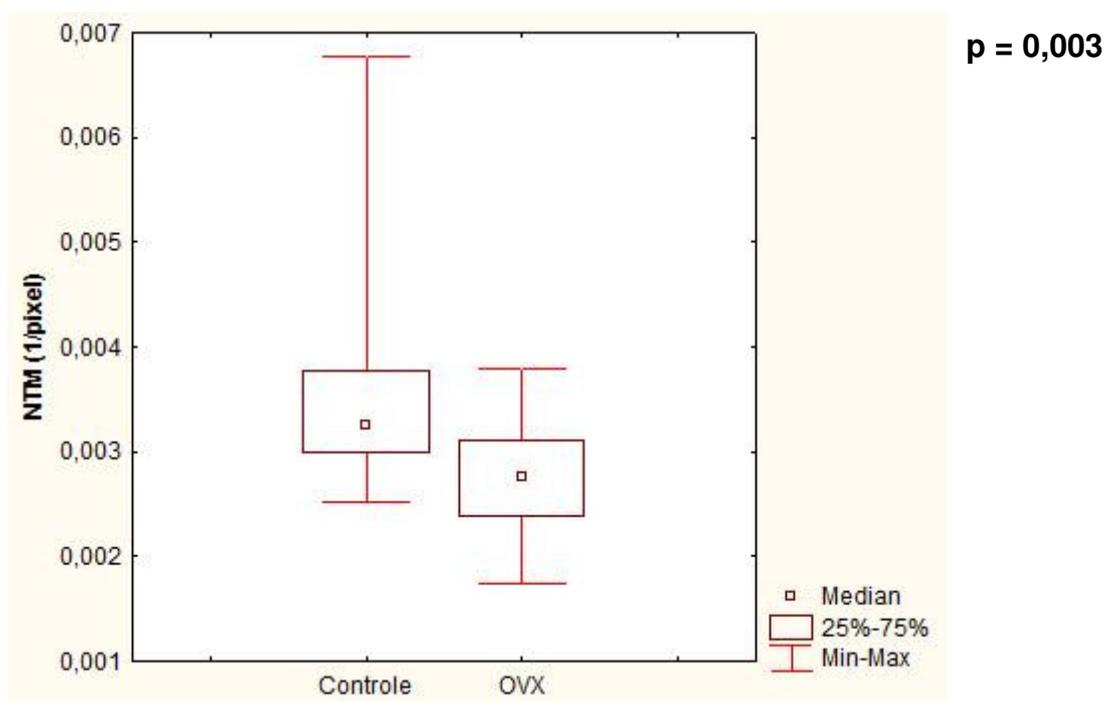
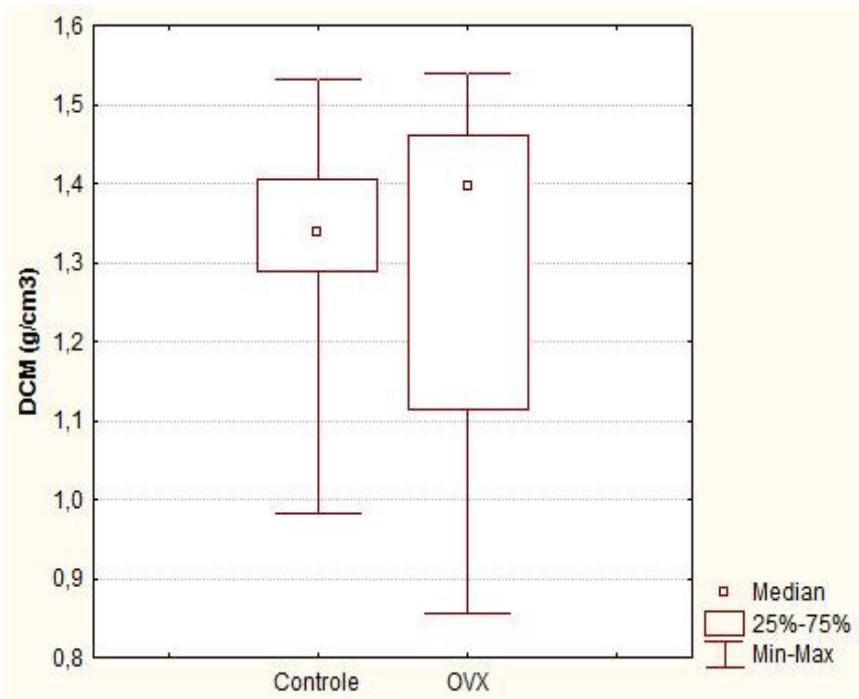
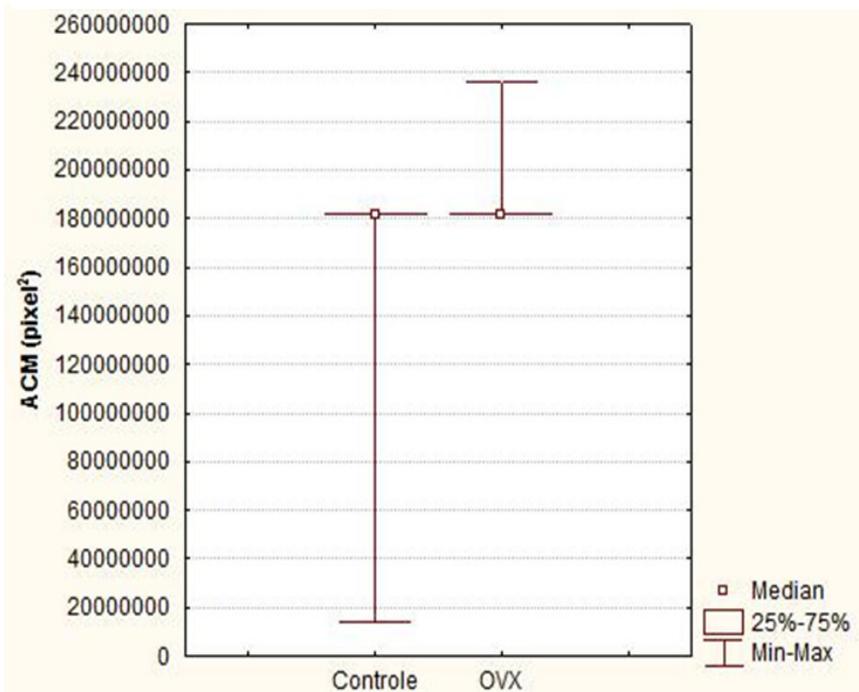


Figura 21- Análise do valor de número de trabéculas mandibular: Verificação da mudança do número de trabéculas entre o grupo OVX e CON.



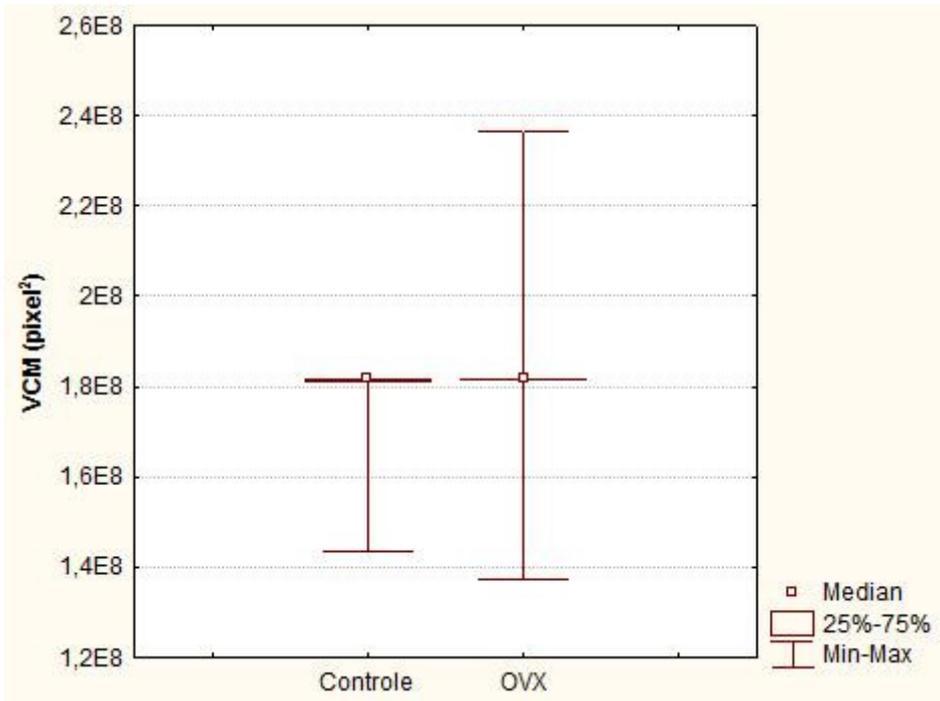
p = 0,385

Figura 22- Análise da densidade mineral óssea mandibular. Verifica-se que houve uma redução da densidade no grupo OVX comparado ao grupo CON.



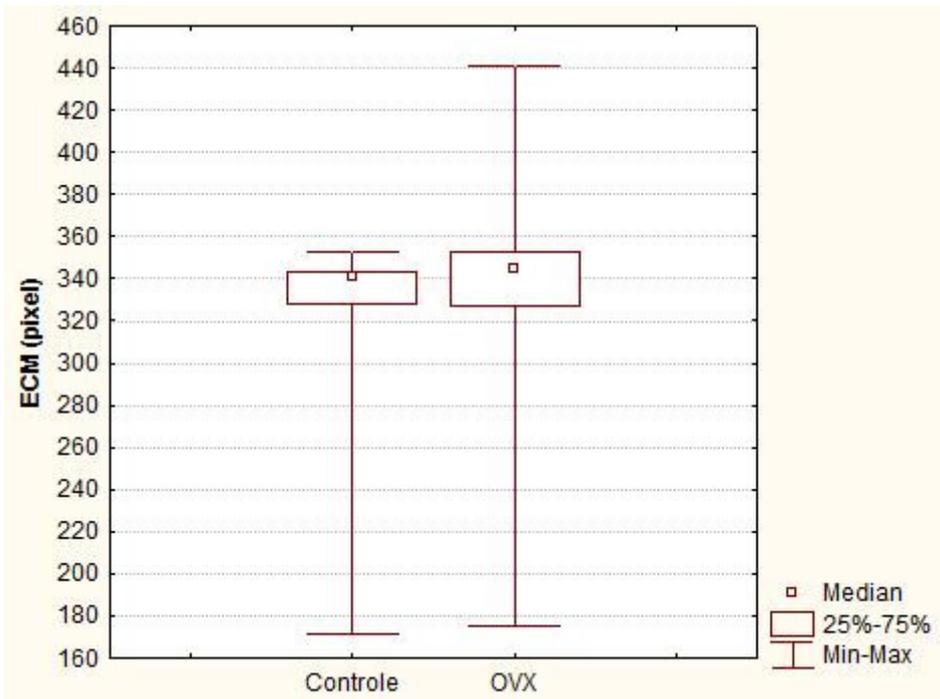
p = 0,060

Figura 23- Análise área cortical mandibular. Observa-se que não houve mudanças estatisticamente significantes.



p = 0,145

Figura 24- Análise de volume cortical Mandibular. Observa-se que não houve mudanças estatisticamente significantes.



p = 0,218

Figura 25- Análise da espessura cortical mandibular. Observa-se que não houve mudanças estatisticamente significantes.

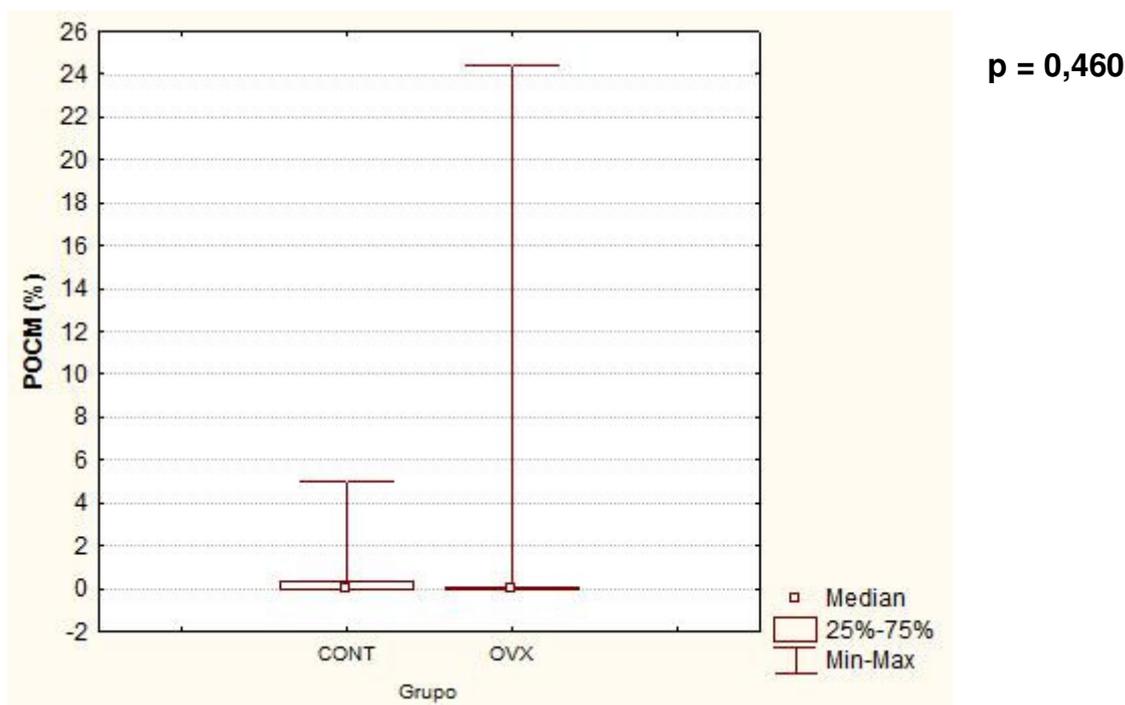


Figura 26- Análise da porosidade cortical mandibular. Observa-se que não houve mudanças estatisticamente significantes.

Tabela 2 – Diferenças nas médias dos parâmetros ósseos mandibulares microtomográficos entre os animais do grupo controle e os do grupo experimental

Parâmetros ósseos microtomográficos	Grupo controle Média ± DP	Grupo OVX Média ± DP	p-valor
DTM	0,879 ± 0,059	0,839 ± 0,049	0,049*
ETM	166,288 ± 35,721	171,379 ± 30,206	0,665
eTM	175,204 ± 55,691	199,067 ± 43,438	0,186
DFTM	1,508 ± 0,390	1,436 ± 0,374	0,596
POTM	41,272 ± 14,048	52,769 ± 12,422	0,019*
DFCM	1,379 ± 0,401	1,704 ± 0,314	0,016*

*Diferença estatisticamente significativa (teste t de Student)

OVX = grupo experimental; DTM = densidade do trabeculado mandibular após a cirurgia; ETM = espessura das trabéculas ósseas mandibulares, eTM = espaçamento das trabéculas ósseas mandibulares; DFTM = dimensão fractal do trabeculado ósseo mandibular; POTM = porosidade total do trabeculado ósseo mandibular; DFCM = dimensão fractal da cortical mandibular.

Percebe-se que o número de trabéculas ósseas mandibulares reduziu nos animais do grupo OVX (Figura 21). Na microtomografia foi observado redução da DTM nos animais do grupo OVX (Tabela 2). A tabela também demonstra que porosidade total do trabeculado ósseo mandibular e a dimensão fractal da cortical mandibular foram significativamente maiores nos animais do grupo OVX em relação ao grupo controle. Para os demais parâmetros ósseos mandibulares, a diferença entre o grupo controle e o grupo OVX não foi estatisticamente significativa.

A comparação dos parâmetros ósseos microtomográficos femorais entre os animais do grupo controle e os animais do grupo experimental (OVX) constitui-se no segundo objetivo desse estudo. As figuras 27 a 31 mostram a comparação dos seguintes parâmetros ósseos femorais entre os animais do grupo controle e os animais do grupo OVX: número de trabéculas no fêmur (NTF), dimensão fractal do trabeculado do fêmur (DFTF), densidade mineral da cortical do fêmur (DCF), área da cortical do fêmur (ACF), porosidade da cortical do fêmur (POCF).

A tabela 3 apresenta as diferenças em relação às médias dos seguintes parâmetros ósseos do fêmur: densidade mineral do trabeculado do fêmur (DTF), espessura das trabéculas do fêmur (ETF), porosidade trabecular no fêmur (POTF), razão área/volume fêmur (RAVF), espessura cortical do fêmur (ECF) e dimensão fractal da cortical do fêmur (DFCF).

Percebe-se que o número e o espaçamento entre as trabéculas ósseas femorais reduziram nos animais do grupo OVX (Figura 27). A Figura 30 mostra que a área da cortical óssea no grupo OVX também reduziu. A Tabela 3 demonstra que a porosidade do trabeculado ósseo femoral aumento no grupo OVX. Não houve diferença estatisticamente significativa para os demais parâmetros ósseos microtomográficos.

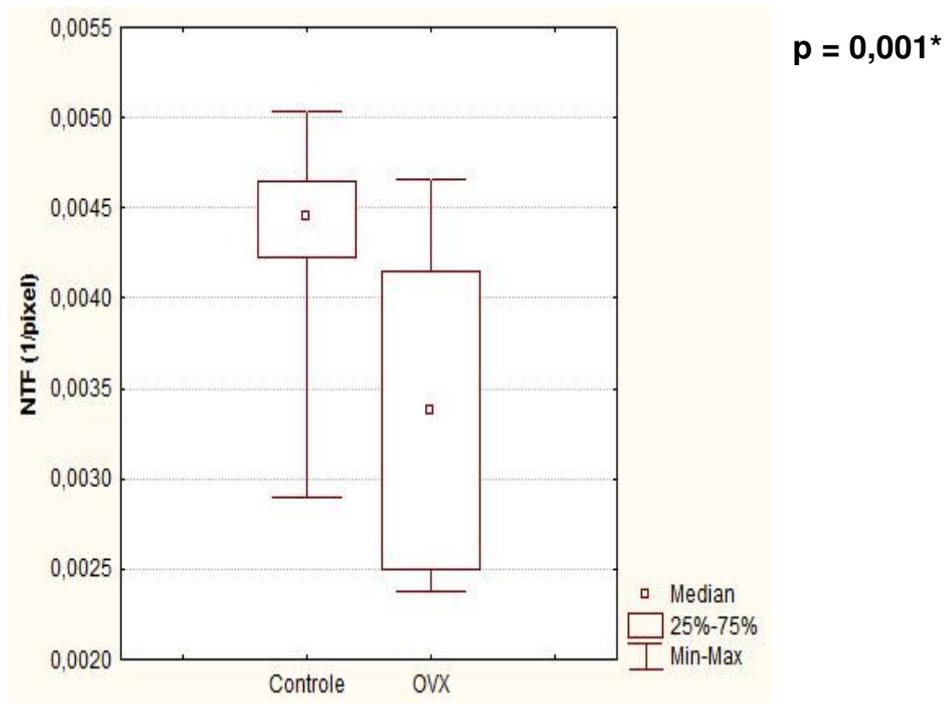


Figura 27- Análise número de trabéculas no osso femoral

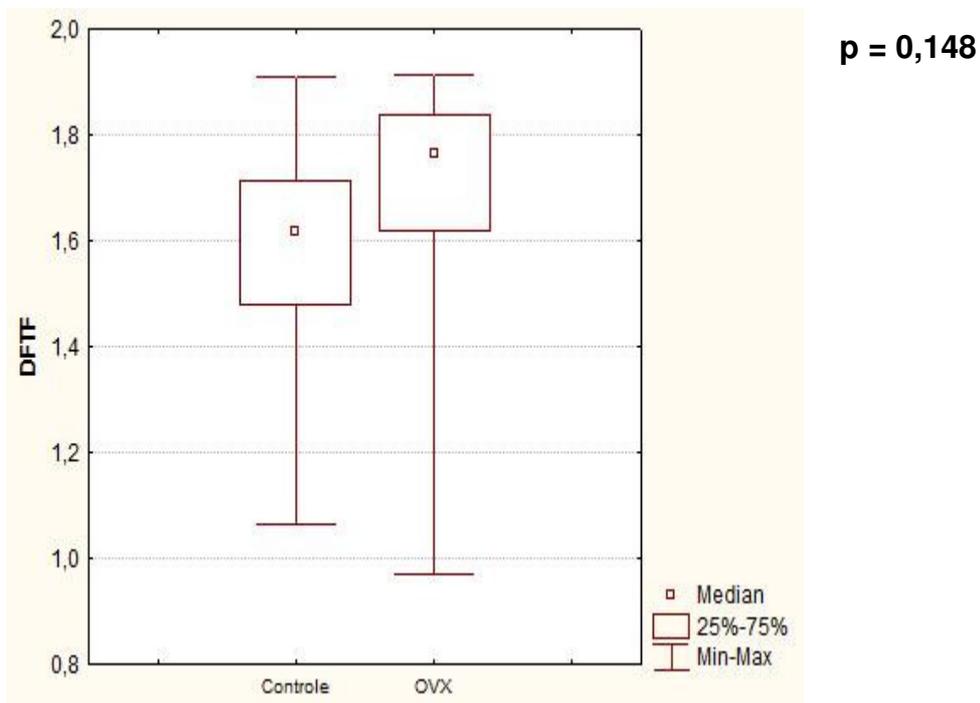


Figura 28- Análise valores dimensão fractal colo femoral.

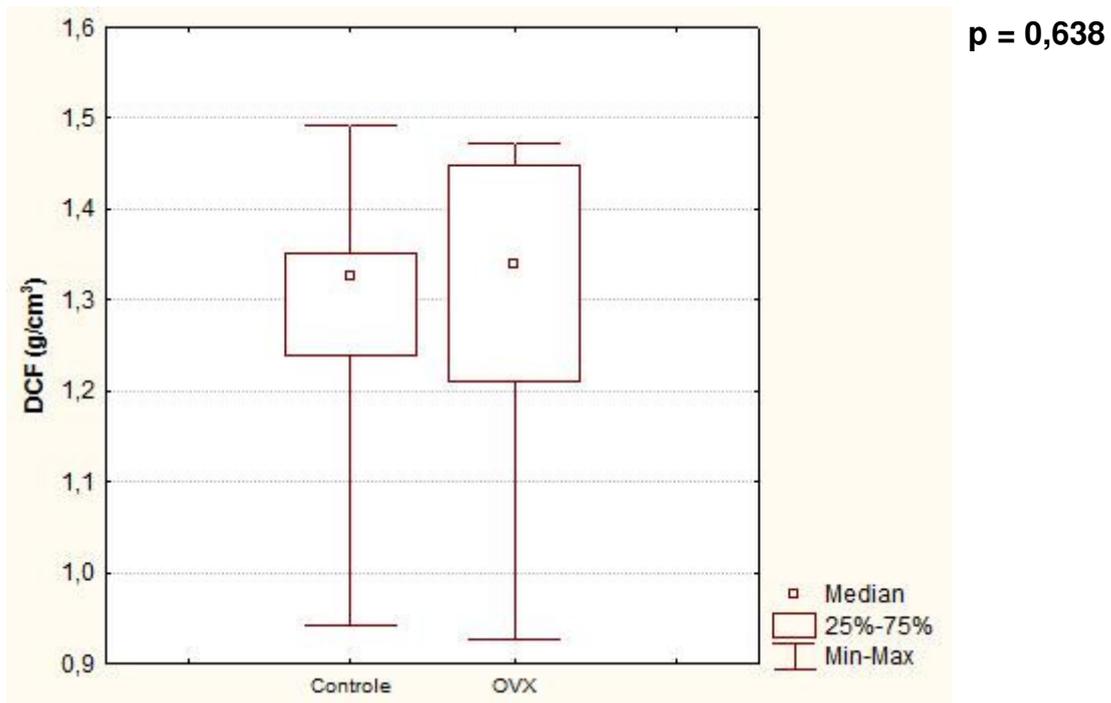


Figura 29- Análise densidade mineral óssea cortical femoral.

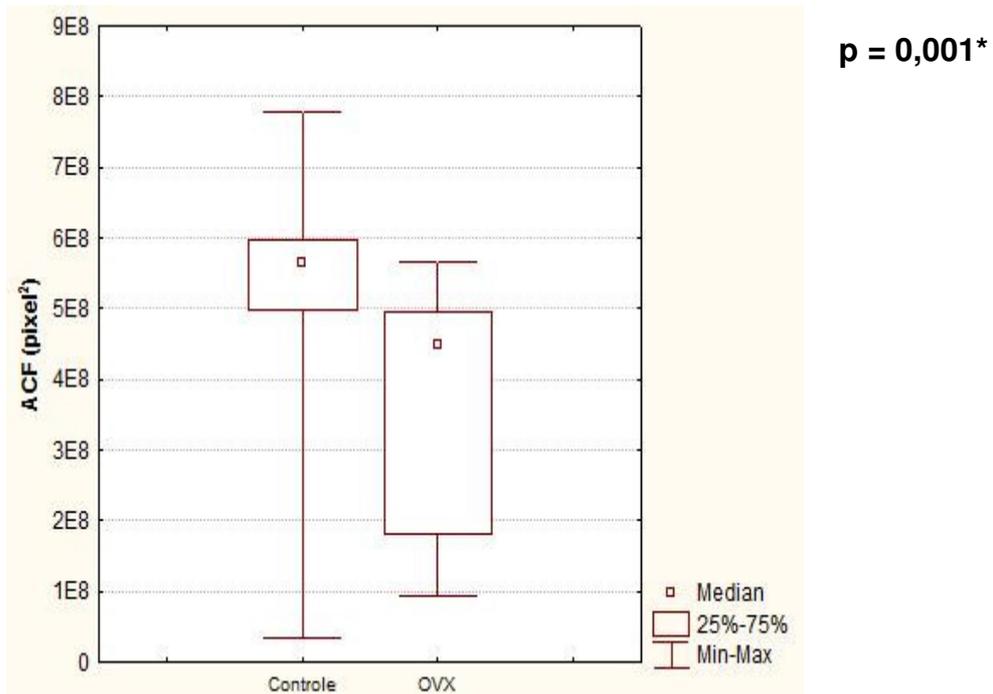


Figura 30- Análise área cortical femoral.

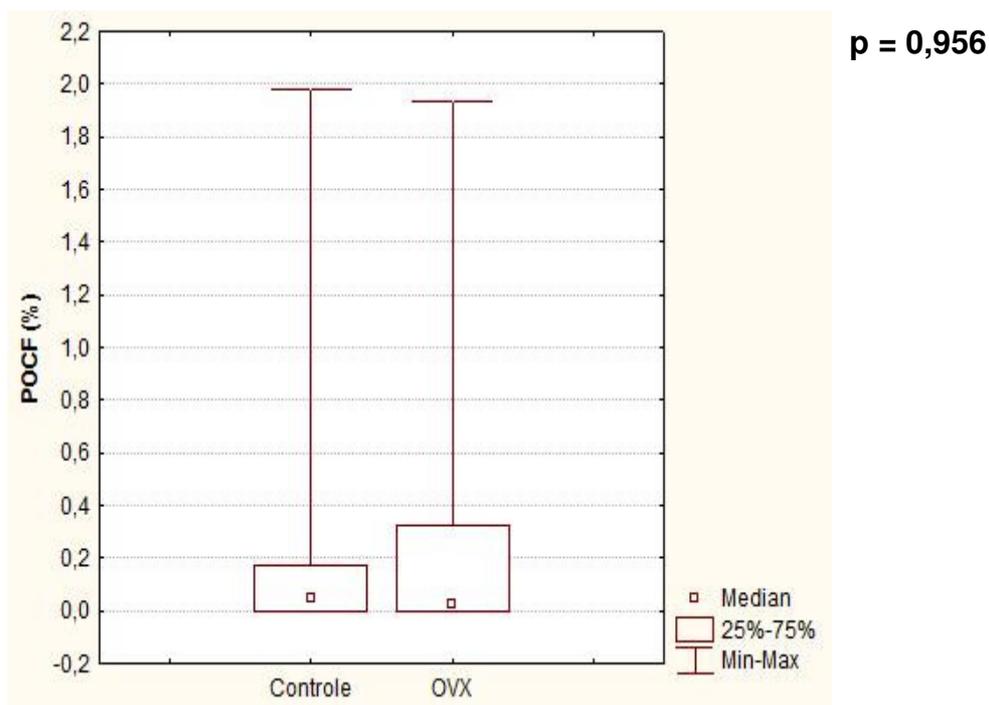


Figura 31- Análise porosidade cortical do colo femoral.

Tabela 3 – Diferença nas médias dos parâmetros ósseos mandibulares microtomográficos entre os animais do grupo controle e os do grupo experimental.

Parâmetros ósseos microtomográficos	Grupo controle Média ± DP	Grupo OVX Média ± DP	p-valor
DTF	0,828 ± 0,049	0,797 ± 0,066	0,068
ETF	147,172 ± 15,661	140,846 ± 29,649	0,438
POTF	35,131 ± 51,684	51,684 ± 15,577	0,001*
ECF	283,939 ± 39,142	285,860 ± 36,934	0,886
DFCF	1,554 ± 0,185	1,533 ± 0,272	0,800

*Diferença estatisticamente significativa (teste t de Student)

OVX = grupo experimental; DTF = densidade mineral do trabeculado do fêmur; ETF = espessura do trabeculado ósseo do fêmur; POTF = porosidade total do trabeculado ósseo do fêmur, ECF = espessura da cortical do fêmur; DFCF = dimensão fractal da cortical do fêmur.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Pela análise dos resultados, o presente estudo verificou uma diminuição na densidade mineral óssea trabecular na mandíbula dos animais submetidos à OVX, quando comparada à densidade dos animais do grupo controle. Essa diminuição da densidade mineral óssea trabecular também foi perceptível no fêmur. No entanto, para esse sítio ósseo podemos considerar apenas como uma tendência, visto que não foi encontrada significância estatística. Com a avaliação dos demais parâmetros ósseos microtomográficos, percebe-se que as alterações das microestruturas foram semelhantes na mandíbula e no fêmur. Essas alterações foram detectadas apenas no trabeculado ósseo desses sítios, com exceção da dimensão fractal da cortical mandibular.

A detecção das mudanças ósseas estruturais apenas no trabeculado ósseo é justificada na literatura, uma vez que esse tipo ósseo apresenta taxa de *turn over* mais acelerado (27). Além disso, em modelos animais, a literatura já mostrou que alterações da DMO mandibular são consistentes apenas após 36 semanas de indução da osteoporose (29). No presente estudo, o escaneamento microtomográfico dos animais ocorreu após 12 semanas da realização da cirurgia de ovariectomia, e foi observada redução da densidade mineral mandibular não sendo o mesmo encontrado no colo femoral.

O único parâmetro ósseo cortical que mostrou aumento após a cirurgia de OVX foi à dimensão fractal mandibular. Ainda que pouco analisada na literatura nesse sítio ósseo, outros estudos são necessários para verificar se esse parâmetro permite avaliar alterações microestruturais na cortical precocemente, ou seja, em um período inferior a 24 semanas.

A utilização de modelos animais, principalmente o uso de ratas são utilizadas para simular e avaliar as mudanças do metabolismo ósseo pós-redução de estrógeno sistemicamente. Alguns estudos demonstram que animais pós ovariectomia apresentam redução da densidade mineral óssea sistemicamente, assim como aconteceu no presente estudo.

A utilização de estudos em modelos animais para avaliar e simular as mudanças do metabolismo ósseo é amplamente aplicado. Há muitos protocolos

experimentais que levam a perda óssea, como por exemplo, as intervenções hormonais (ovariectomia, hipofisectomia, paratireoidectomia) e a imobilização (45). Modelos utilizando a remoção do ovário como técnica de escolha para redução da massa óssea são mencionados em vários trabalhos, assim como no presente estudo (2, 15, 28, 29, 31, 32, 45, 48, 49).

A escolha de se utilizar ratos para analisar metabolismo ósseo é válida, uma vez que o seu esqueleto mostra uma transição gradual da modelagem para remodelação óssea relacionada à progressão da sua idade, além de custos menores e maior facilidade de aquisição (45).

A idade dos animais utilizados nos trabalhos que induzem a deficiência de estrógeno varia entre seis e 26 semanas (6, 15, 16, 29, 31, 34, 47). Sabe-se que as ratas entram na menopausa entre 15 a 18 meses, e que intervenções para acelerar a redução da massa óssea, podem ser feitas pós seis semanas de vida, quando já há maturidade sexual do animal (43, 45). Em nosso trabalho optamos em realizar o procedimento cirúrgico após oito semanas de vida, uma vez que trabalhos apresentaram resultados de mudanças microarquiteturais já com esse tempo menor (2, 34, 47).

A quantidade de animais utilizados também é uma questão a ser avaliada. A maior parte dos trabalhos traz quantidade por grupo, de no máximo 8 animais (15, 16, 29, 31, 34). Entretanto, em nosso trabalho, observou-se que um pouco mais de 20% da amostra veio a óbito por motivos variados, ou seja, se tivéssemos trabalhado com esses números iniciais não teríamos resultados estatísticos significantes.

Trabalhos comparando sítios como fêmur, tíbias e a correlação das mudanças no osso mandibular têm sido verificados (2, 29, 31, 50). Entretanto, as diferenças metodológicas entre esses poucos trabalhos, principalmente relacionadas aos diferentes sítios analisados, bem como distintos parâmetros ósseos escolhidos, dificultam a comparação dos resultados com o presente trabalho. A escolha do fêmur como sítio de comparação de parâmetros ósseos com a mandíbula no presente estudo, se justifica pelo fato de que a análise do fêmur é o instrumento mais utilizado para predição de fraturas relacionadas à osteoporose, principal consequência da doença. Além disso, considerando que a mandíbula é um sítio

ósseo predominantemente cortical, assim como o fêmur e que, frequentemente, é avaliada em exames por imagem, no exercício da odontologia, a correlação das alterações mandibulares com as alterações femorais pode servir como fase preliminar para a identificação precoce do risco de fratura na população.

Outro aspecto que se difere dos estudos anteriores relaciona-se à seleção da região de interesse para análise dos parâmetros ósseos microtomográficos. Neste estudo, optou-se pela região pós primeiro molar mandibular, logo acima do forame mental, como uma precaução para que apenas o osso trabecular fosse incluído na análise. Com isso, evitou-se a seleção de regiões que introduzissem o viés anatômico, tais como o ligamento periodontal e as raízes dentárias. Além disso, nos ratos, a região posterior possui maior quantidade de osso trabecular quando comparada à região anterior, dos incisivos.

Vários trabalhos avaliaram as alterações ósseas trabeculares em ratas ovariectomizadas em diversos sítios, em diferentes tempos e diferentes grupos. Alguns trabalhos dividem seus grupos em cirurgia e cirurgia *SHAM* ou “falsa cirurgia”, esta com o intuito simular o estresse, processo inflamatório, dor e outras alterações oriundas do procedimento cirúrgico (16, 29, 31, 34). Outros dividem em cirurgia e controle (2, 50). Optamos pela não simulação cirúrgica, com o intuito de minimizar a perda amostral. O grupo controle não recebeu nenhuma intervenção. A nossa maior perda foi nos animais que foram operados. As perdas ocorreram tanto por ruptura de pontos, como por septicemia tardia. Muito provavelmente, a utilização de antibioticoterapia teria minimizado esses ocorridos.

Há trabalhos que avaliaram regiões ósseas mandibulares, como o realizado por Du et al. em 2014. Neste trabalho, os autores demonstraram que, após 12 semanas de cirurgia (OVX), houve redução da espessura trabecular, do número de trabéculas, do volume ósseo e aumento do espaçamento trabecular (31). Já Jiang et al. 2008, avaliou no osso cortical área, espessura, após quatro semanas da cirurgia (OVX) associada à dieta pobre em cálcio e observou apenas redução da densidade mineral total, não houve redução da densidade cortical, nem área e espessura cortical (50). Em nosso trabalho, não foi observado redução da densidade mineral, nem espessura cortical nos sítios mandibular e femoral. Entretanto no fêmur teve uma diferença estatística no parâmetro área.

Outros trabalhos correlacionaram regiões distintas e suas semelhanças, como Yang et al. em 2003. Nesse trabalho, os autores verificaram, após 16 semanas da ovariectomia, alterações na mandíbula e na tíbia. Nesses locais houve aumento do espaçamento trabecular, redução da espessura trabecular e da razão volume por área. Já recentemente, Hsu et al. 2016, propuseram avaliar e comparar a região mandibular e femoral, após 12 semanas da OVX, analisando ambos, osso cortical e trabecular. Concluíram que não houve mudanças no osso cortical. No osso trabecular, tanto mandibular como femoral, houve redução da razão volume por área, e um aumento do espaçamento das trabéculas, sendo que os parâmetros de espessura e número trabecular foram inconsistentes (2).

Assim como o trabalho de Hsu et al. 2016, o presente estudo comparou os sítios fêmur e mandíbula com análise do osso cortical e femoral pós 12 semanas da OVX. Os resultados dos parâmetros corticais e de espessura trabecular foram semelhantes. Entretanto, diferentemente dele, houve redução do número de trabéculas significativa estatisticamente. Além disso, parâmetros adicionais foram avaliados como porosidade e dimensão fractal cortical.

Pela análise dos resultados, o presente estudo verificou diminuição na densidade mineral óssea trabecular na mandíbula dos animais submetidos à OVX, quando comparada à densidade dos animais do grupo controle. Essa diminuição da densidade mineral óssea trabecular também foi perceptível no fêmur. No entanto, para esse sítio ósseo podemos considerar apenas como uma tendência, visto que não foi encontrada significância estatística. Com a avaliação dos demais parâmetros ósseos microtomográficos, percebeu-se que as alterações microarquiteturais foram semelhantes na mandíbula e no fêmur. Essas alterações foram detectadas apenas no trabeculado ósseo desses sítios, como já avaliados em outros trabalhos (2, 15, 31, 34, 47, 50). A grande peculiaridade deste trabalho veio da análise da dimensão fractal da cortical mandibular.

O aumento da dimensão fractal no grupo OVX na mandíbula sugere possível relação com fases iniciais de alteração na microarquitetura cortical, ou seja, uma possível detecção precoce de alteração microarquitetural. Já que essa é uma análise estatística de textura, descrevendo matematicamente as formas complexas e padrões estruturais, ou seja, avalia rugosidade e textura (51).

Esse parâmetro não foi analisado até então na literatura nos modelos animais com redução de estrógeno, uma vez que ainda há poucos trabalhos que avaliam as condições corticais em fêmur e mandíbula de ratas ovariectomizadas. Na década de 80, iniciaram-se os primeiros trabalhos utilizando a microtomografia computadorizada para avaliação do tecido ósseo. Desde então o seu emprego é utilizado para avaliações de diversos tipos. Sua utilização para avaliação do metabolismo ósseo é considerado padrão ouro, entretanto limita-se ao uso em animais. Através das imagens captadas por ele é possível verificar detalhes do trabeculado e cortical óssea (Hsu et al. 2014).

As limitações desse estudo se devem à impossibilidade do uso de micro-Ct em humanos e a não mensuração em outros sítios importantes no estudo da osteoporose, como as vértebras. Entretanto esse trabalho tem sua importância por ser realizado em *in vivo*, por ter trabalhado parâmetros ósseos significativos para a compreensão das alterações microarquiteturais e, conseqüentemente, por sugerir o uso desses parâmetros como ferramenta auxiliar na predição precoce das condições ósseas mandibulares.

Considerando o impacto que a osteoporose apresenta atualmente e as perspectivas de sua expansão em função do envelhecimento da população, resta claro a importância de se somar ao seu arsenal diagnóstico, novas ferramentas. Ferramentas que sejam mais baratas, que não sejam invasivas, que possam ser aplicadas a grande número de pessoas e que sejam capazes de prever ou avaliar o risco de fraturas osteoporóticas. Os resultados desse trabalho permitem-nos apontar que a análise de parâmetros microarquiteturais na mandíbula pode representar mais uma alternativa nesse arsenal, como um auxiliar no enfrentamento do desafio que se avizinha com o crescimento dos casos de osteoporose.

7.CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Podemos concluir nesse estudo experimental que, em 12 semanas pós ovariectomia, há alterações no osso trabecular mandibular e femoral, sendo que em ambos foram observadas a redução do número de trabéculas, porosidade e espaçamento trabecular. Em relação ao osso cortical o único parâmetro com alteração significativa foi o de dimensão fractal na mandíbula. Esse parâmetro deve ser avaliado por outros trabalhos para sua confirmação e possível correlação com fases iniciais de mudança na microarquitetura do osso cortical. As alterações em mandíbula e colo femoral se apresentaram semelhantes, inferindo que há fortes indícios de correlação entre estes sítios.

REFERENCIAS

1. NIH. Consensus Statement. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. JAMA. 2001;285((6)):785-95.
2. Hsu PY, Tsai MT, Wang SP, Chen YJ, Wu J, Hsu JT. Cortical Bone Morphological and Trabecular Bone Microarchitectural Changes in the Mandible and Femoral Neck of Ovariectomized Rats. PloS one. 2016;11(4):e0154367.
3. Baccaro LF, Conde DM, Costa-Paiva L, Pinto-Neto AM. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. Clinical interventions in aging. 2015;10:583-91.
4. Kim TI, Choi JH, Kim SH, Oh JH. The Adequacy of Diagnosis and Treatment for Osteoporosis in Patients with Proximal Humeral Fractures. Clinics in orthopedic surgery. 2016;8(3):274-9.
5. Pazianas M, Abrahamsen B, Ferrari S, Russell RG. Eliminating the need for fasting with oral administration of bisphosphonates. Therapeutics and clinical risk management. 2013;9:395-402.
6. Luu AN, Anez-Bustillos L, Aran S, Araiza Arroyo FJ, Entezari V, Rosso C, et al. Microstructural, densitometric and metabolic variations in bones from rats with normal or altered skeletal states. PloS one. 2013;8(12):e82709.
7. Robert PH. Remodeling and skeletal fragility. Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA. 2003;14 Suppl 5:S12-5.
8. Saha PK, Liu Y, Chen C, Jin D, Letuchy EM, Xu Z, et al. Characterization of trabecular bone plate-rod microarchitecture using multirow detector CT and the tensor scale: Algorithms, validation, and applications to pilot human studies. Medical physics. 2015;42(9):5410-25.
9. Blum L, Cummings K, Goulet JA, Perdue AM, Mauffrey C, Hake ME. Atypical femur fractures in patients receiving bisphosphonate therapy: etiology and management. European journal of orthopaedic surgery & traumatology : orthopedie traumatologie. 2016;26(4):371-7.
10. Metabologia SBEE. 2016.

11. Cosman F, de Beur SJ, LeBoff MS, Lewiecki EM, Tanner B, Randall S, et al. Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2014;25(10):2359-81.
12. GALI JC. Osteoporosis. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2001;9(2):53-62.
13. Gómez de Tejada Romero MJSH, M. Osteoporosis: definition, epidemiology trend, advances in phisiopathology and clinic Medicine. 2014;11(60):3527-34.
14. Marcucci G, Brandi ML. Rare causes of osteoporosis. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : The official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*. 2015;12(2):151-6.
15. Jiang GZ, Matsumoto H, Hori M, Gunji A, Hakozaki K, Akimoto Y, et al. Correlation among geometric, densitometric, and mechanical properties in mandible and femur of osteoporotic rats. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2008;26(2):130-7.
16. Yang J, Farnell D, Devlin H, Horner K, Graham J. The effect of ovariectomy on mandibular cortical thickness in the rat. *Journal of dentistry*. 2005;33(2):123-9.
17. Erdogan O, Incki KK, Benlidayi ME, Seydaoglu G, Kelekci S. Dental and radiographic findings as predictors of osteoporosis in postmenopausal women. *Geriatrics & gerontology international*. 2009;9(2):155-64.
18. Hoiberg MP, Rubin KH, Hermann AP, Brixen K, Abrahamsen B. Diagnostic devices for osteoporosis in the general population: A systematic review. *Bone*. 2016;92:58-69.
19. Kling JM, Clarke BL, Sandhu NP. Osteoporosis prevention, screening, and treatment: a review. *Journal of women's health*. 2014;23(7):563-72.
20. Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. *Lancet*. 2006;367(9527):2010-8.
21. Alonso MB, Vasconcelos TV, Lopes LJ, Watanabe PC, Freitas DQ. Validation of cone-beam computed tomography as a predictor of osteoporosis using the Klemetti classification. *Brazilian oral research*. 2016;30(1).
22. Dagistan S, Bilge OM. Comparison of antegonial index, mental index, panoramic mandibular index and mandibular cortical index values in the panoramic radiographs of normal males and male patients with osteoporosis. *Dento maxillo facial radiology*. 2010;39(5):290-4.

23. Leite AF, Figueiredo PT, Guia CM, Melo NS, de Paula AP. Correlations between seven panoramic radiomorphometric indices and bone mineral density in postmenopausal women. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2010;109(3):449-56.
24. Calciolari E, Donos N, Park JC, Petrie A, Mardas N. Panoramic measures for oral bone mass in detecting osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of dental research*. 2015;94(3 Suppl):17S-27S.
25. Particelli F, Mecozzi L, Beraudi A, Montesi M, Baruffaldi F, Viceconti M. A comparison between micro-CT and histology for the evaluation of cortical bone: effect of polymethylmethacrylate embedding on structural parameters. *Journal of microscopy*. 2012;245(3):302-10.
26. Hsu JT, Chen YJ, Ho JT, Huang HL, Wang SP, Cheng FC, et al. A comparison of micro-CT and dental CT in assessing cortical bone morphology and trabecular bone microarchitecture. *PloS one*. 2014;9(9):e107545.
27. Raska O, Bernaskova K, Raska I, Jr. Bone metabolism: a note on the significance of mouse models. *Physiological research*. 2009;58(4):459-71.
28. Elsubeihi ES, Bellows CG, Jia Y, Heersche JN. Ovariectomy of 12-month-old rats: effects on osteoprogenitor numbers in bone cell populations isolated from femur and on histomorphometric parameters of bone turnover in corresponding tibia. *Cell and tissue research*. 2007;330(3):515-26.
29. Liu XL, Li CL, Lu WW, Cai WX, Zheng LW. Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: change in bone density and microarchitecture. *Clinical oral implants research*. 2015;26(4):392-8.
30. Shoji K, Elsubeihi ES, Heersche JN. Effects of ovariectomy on turnover of alveolar bone in the healed extraction socket in rat edentulous mandible. *Archives of oral biology*. 2011;56(2):114-20.
31. Du Z, Steck R, Doan N, Woodruff MA, Ivanovski S, Xiao Y. Estrogen Deficiency-Associated Bone Loss in the Maxilla: A Methodology to Quantify the Changes in the Maxillary Intra-radicular Alveolar Bone in an Ovariectomized Rat Osteoporosis Model. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2015;21(5):458-66.
32. Johnston BD, Ward WE. The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women. *BioMed research international*. 2015;2015:635023.

33. Wu Y, Adeeb S, Doschak MR. Using Micro-CT Derived Bone Microarchitecture to Analyze Bone Stiffness - A Case Study on Osteoporosis Rat Bone. *Frontiers in endocrinology*. 2015;6:80.
34. Yang J, Pham SM, Crabbe DL. Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture. *Dento maxillo facial radiology*. 2003;32(4):247-51.
35. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2013;24(1):23-57.
36. O'Connor KM. Evaluation and Treatment of Osteoporosis. *The Medical clinics of North America*. 2016;100(4):807-26.
37. Chen P, Li Z, Hu Y. Prevalence of osteoporosis in China: a meta-analysis and systematic review. *BMC public health*. 2016;16(1):1039.
38. Pinheiro MM, Reis Neto ET, Machado FS, Omura F, Yang JH, Szejnfeld J, et al. Risk factors for osteoporotic fractures and low bone density in pre and postmenopausal women. *Revista de saude publica*. 2010;44(3):479-85.
39. Zimmermann EA, Busse B, Ritchie RO. The fracture mechanics of human bone: influence of disease and treatment. *BoneKEy reports*. 2015;4:743.
40. Seeman E, Delmas PD. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *The New England journal of medicine*. 2006;354(21):2250-61.
41. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology*. 2016;31(3):233-45.
42. van der Linden JC, Homminga J, Verhaar JA, Weinans H. Mechanical consequences of bone loss in cancellous bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2001;16(3):457-65.
43. Andreollo NA, Santos EF, Araujo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva : ABCD = Brazilian archives of digestive surgery*. 2012;25(1):49-51.
44. Jee WS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2001;1(3):193-207.

45. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comparative medicine*. 2008;58(5):424-30.
46. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Description of a new method of ovariectomy in female rats. *Revista brasileira de reumatologia*. 2012;52(3):462-70.
47. Dai QG, Zhang P, Wu YQ, Ma XH, Pang J, Jiang LY, et al. Ovariectomy induces osteoporosis in the maxillary alveolar bone: an *in vivo* micro-CT and histomorphometric analysis in rats. *Oral diseases*. 2014;20(5):514-20.
48. Fujita Y, Watanabe K, Uchikanbori S, Maki K. Effects of risedronate on cortical and trabecular bone of the mandible in glucocorticoid-treated growing rats. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2011;139(3):e267-77.
49. Lespessailles E, Hambli R, Ferrari S. Osteoporosis drug effects on cortical and trabecular bone microstructure: a review of HR-pQCT analyses. *BoneKEy reports*. 2016;5:836.
50. Jiang L, Shen X, Wei L, Zhou Q, Gao Y. Effects of bisphosphonates on mandibular condyle of ovariectomized osteoporotic rats using micro-ct and histomorphometric analysis. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2016.
51. Mostafa RA, Arnout EA, Abo El-Fotouh MM. Feasibility of cone beam computed tomography radiomorphometric analysis and fractal dimension in assessment of postmenopausal osteoporosis in correlation with dual X-ray absorptiometry. *Dento maxillo facial radiology*. 2016;45(7):20160212.

ANEXOS

ANEXO I


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 26 de fevereiro de 2015.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**EFEITO DO RISEDRONATO ORAL NA MANDÍBULA DE RATAS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA**", UnBDoC n.º 162977/2014, sob responsabilidade da Professora Nilce dos Santos Melo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília.



Prof. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB




*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

ANEXO II

Brasília, 13 de maio de 2016.



DECLARAÇÃO – Prorrogação de Prazo

Declaramos que o projeto intitulado "**EFETO DO RISEDRONATO ORAL NA MANDÍBULA DE RATAS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA**", UNBDOC n.º 162977/2014, sob responsabilidade da Professora Nilce dos Santos Melo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de Rattus norvegicus: 60. A presente aprovação é válida pelo período de 15/01/2015 a 30/12/2016

Prof. Dra. Paula Diniz Galera
Coordenadora da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.