



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

MARIA ELIZABETH DE SOUSA RODRIGUES

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OSTEOPENIA SISTÊMICA
E PERDA ÓSSEA ORAL EM RATAS OVARIECTOMIZADAS
POR MEIO DE MICROTOMOGRÁFIA 3D

FORTALEZA

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARIA ELIZABETH DE SOUSA RODRIGUES

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OSTEOPENIA SISTÊMICA
E PERDA ÓSSEA ORAL EM RATAS OVARIETOMIZADAS
POR MEIO DE MICROTOMOGRÁFIA 3D

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Vânia Marilande Ceccatto

FORTALEZA

2009

MARIA ELIZABETH DE SOUSA RODRIGUES

ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OSTEOPENIA SISTÊMICA E
PERDA ÓSSEA ORAL EM RATAS OVARIETOMIZADAS POR
MEIO DE MICROTOMOGRÁFIA 3D

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará como requisito parcial à obtenção do título de mestre.

Aprovada em 18 de dezembro de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Vânia Marilande Ceccatto (Orientadora)
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. José Henrique Leal Cardoso
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Jáder dos Santos Cruz
Universidade Federal de Minas Gerais

Aos meus pais, exemplos vivos de perseverança e coragem. Obrigada por me ensinarem o caminho da dignidade e amor às coisas que realmente importam. Às minhas irmãs Sandra, Elizete e ao meu irmão Eudazio, apoio constante na grande aventura da vida. À Elaine pelo incentivo e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus minha fonte inexaurível de sabedoria e ciência.

À minha orientadora Prof^a Vânia Marilande Ceccato, pela coragem de apoiar e incentivar a conquista de novos desafios.

Especialmente à minha irmã Maria Elizete Kunkel, exemplo de mulher dedicada à ciência, obrigada por mostrar que o mundo é menor do que imaginamos e que a ciência é o caminho para muitas realizações.

Ao Prof. José Henrique Leal Cardoso, pelo apoio constante e sincero.

À professora Andrelina Noronha Coelho, pela ajuda nas análises bioquímicas.

Aos demais professores do Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, por compartilharem tão relevantes experiências.

Particularmente ao amigo Rômulo Porto, pelo incentivo de todas as horas e apoio técnico constante inclusive nos momentos mais difíceis.

Aos colegas André Aciolly, Fleury, Jamile, Rodrigo Adler, Helenir Forte, Patrick e Alex pela ajuda constante e sincera.

À Dra. Régia Vlândia por fazer parte desta conquista.

À Dra. Maria José Feitosa por mostrar que acreditar é o primeiro passo para vencer.

RESUMO

A osteoporose é uma doença que afeta o tecido ósseo sendo caracterizada pela diminuição da massa óssea e pela deterioração da arquitetura deste tecido. Há um crescente interesse na relação entre osteoporose sistêmica e a perda óssea na mandíbula e maxila humana. Neste estudo foi desenvolvido um modelo animal usando a supressão de estrógeno por ovariectomia em ratas Wistar, para avaliação de alterações ósseas osteopênicas orais e sistêmicas. Foram utilizadas técnicas de microtomografia computadorizada para avaliação das alterações da microarquitetura óssea oral. Como técnicas complementares para avaliação da perda óssea foram realizadas análises bioquímicas e radiográficas. Um total de 18 animais foi dividido em três grupos: Controle (SHAM) e ovariectomizados e sacrificados com 30 (OVX 30) e 60 dias (OVX60) após de cirurgia. Foram analisadas amostras de mandíbulas e fêmures. Houve um aumento de fosfatase ácida após a cirurgia de ovariectomia comprovando o aumento da remodelagem óssea. Os resultados indicam a presença de alterações ósseas estruturais orais e sistêmicas nos grupos ovariectomizados. Medidas lineares da crista óssea das raízes mesial e distal do segundo molar inferior direito demonstraram uma perda óssea vertical 32.69% maior no grupo OVX 60 dias e de em 19.23% grupo 30 dias em relação grupo SHAM. Os animais apresentaram alterações na espessura do canal medular dos fêmures estatisticamente significativas nos grupos ovariectomizados em relação ao controle. Os animais OVXs apresentaram redução na radiodensidade óssea de mandíbulas e fêmures (epífise, metáfise e cabeça do fêmur) quando comparados ao grupo SHAM. O presente modelo mostrou-se útil na análise do efeito da restrição de estrógeno sobre o tecido ósseo oral e sistêmico.

Palavras-chave: Osteoporose, ratas Wistar, Microtomografia computadorizada

ABSTRACT

Osteoporosis is a disease that affects the bone tissue being characterized by low bone mass and deterioration of the architecture of this tissue. There is a growing interest in the relationship between systemic osteoporosis and bone loss in human mandible and maxilla. This study has developed an animal model using the suppression of estrogen by ovariectomy in female rats, to assess osteopenic changes at oral and systemic bones. Computed microtomography was used to evaluation of changes in oral bone microarchitecture. As complementary techniques for evaluation of bone loss were performed biochemical and radiographic analysis. A total of 18 animals was divided into three groups: Control (SHAM) and ovariectomized and sacrificed at 30 (30 OVX) and 60 days (OVX60) after surgery. It was analyzed samples of mandibles and femurs. There was an increase of acid phosphatase after surgical ovariectomy showing increase in bone remodeling. The results indicate the presence of bone changes in structural and systemic oral ovariectomized groups. Linear measurements of bone crest mesial and distal roots of lower right second molar showed a vertical bone loss 32.69% higher in OVX 60 days and 19.23% in OVX30 compared to the SHAM group. The animals showed changes in the thickness of the medullar canal of the femurs that was statistically significant in ovariectomized animals compared to control. The OVX60 e OVX30 animals had reduced bone radiodensity in jaws and femur (epiphysis, metaphysis and the femoral head) compared to SHAM group. This model has proven useful in analyzing the effect of the estrogen restriction on bone tissue oral and systemic.

Key – words: Osteoporosis, Wistar rat, microtomography

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representantes dos componentes da macroestrutura óssea	20
Figura 2. Esquema ilustrativo do processo de remodelamento ósseo	23
Figura 3. Microtomografia do corpo vertebral sadio e osteoporótico.....	27
Figura 4. Descrição anatômica da mandíbula humana.....	35
Figura 5. Descrição anatômica da mandíbula de rata wistar.....	38
Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura do osso trabecular.....	53
Figura 7. Descrição esquemática da distribuição dos animais no estudo.....	55
Figura 8. Ilustração fotográfica do procedimento cirúrgico de ovariectomia.....	57
Figura 9. Procedimentos realizados para a obtenção das imagens em 3D das mandíbulas e fêmures por Micro-CT.....	59
Figura 10. Recipientes em acrílico usados para a acomodação de amostras para realização da Micro-CT	59
Figura 11. Posicionamento da amostra para escaneamento no equipamento de Micro-Ct.....	60
Figura 12. Tela inicial do processo de escaneamento da amostra (fêmur) Em aparelho de Micro-CT.	61
Figura 13. Reconstrução em 3D da mandíbula de rata wistar.....	62
Figura 14. Localização da região de interesse (ROI) na mandíbula de rata	62
Figura 15. Localização das medidas lineares de perda de massa óssea na mandíbula	63
Figura 16. Medida linear para verificação da perda óssea vertical na mandíbula.....	64
Figura 17. Medidas de comprimento para cada raiz (CR).....	65
Figura 18. Detalhe do processo de segmentação do osso alveolar	66
Figura 19. Processo de segmentação de imagem para mensuramento do volume ósseo.....	67
Figura 20. Reconstrução 3D do osso alveolar realizada a partir de imagem de Micro-Ct.....	67
Figura 21. Radiografias de mandíbulas e fêmures do grupo de ratas Wistar ovariectomizadas OVX60.....	68

Figura 22. Medidas de comprimento em mandíbula de ratas Wistar.....	70
Figura 23. Imagem radiográfica de mandíbula de rata Wistar.....	71
Figura 24. Delimitação das áreas no fêmur de rata Wistar para a análise da radiodensidade óssea.....	72
Figura 25. Imagem radiográfica com indicação para a medida do canal medular e comprimento do fêmur.	73
Figura 26. Ganho de peso corporal nas ratas dos grupos ovariectomizados e controle	75
Figura 27. Níveis de cálcio sérico encontrados nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados	76
Figura 28. Níveis de fosfatase alcalina encontrados nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados	76
Figura 29. Padrão dos níveis de progesterona encontrados nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados	77
Figura 30. Padrão dos níveis de estradiol sérico encontrados nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados	77
Figura 31. Padrão do comprimento do fêmur das ratas do grupo controle e ovariectomizados	78
Figura 32. Padrão da espessura do canal medular de fêmures encontrados nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados	79
Figura 33. Padrões da altura e comprimento da mandíbula encontrado nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados.....	79
Figura 34. Padrão da espessura do córtex da mandíbula encontrado nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados	80
Figura 35. Perda óssea vertical nas cristas ósseas do 2º molar encontrados nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados.....	81
Figura 36. Perda óssea vertical nas cristas ósseas do 2º molar encontrados nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados	81
Figura 37 Imagens obtidas por microtomografia das alterações do septo interradicular de 2º molar, grupos SHAM, OVX30 e OVX60.	82
Figura 38. Volume ósseo na região de 2º molar nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados	80

Figura 39. Detalhes das regiões de cabeça do fêmur, metáfise proximal e diáfise entre os grupos SHAM, OVX30 e OVX60.....	83
Figura 40. Imagem radiográfica de mandíbula de rata utilizada para análise da radiodensidade.....	84
Figura 41. Radiodensidade óssea em ROI na região de 2º molar em ratas dos grupos controle e ovariectomizados.....	84
Figura 42. Radiodensidade óssea na cabeça do fêmur em ratas dos grupos controle e ovariectomizados	85
Figura 43. Radiodensidade óssea na metáfise do fêmur em ratas dos grupos controle e ovariectomizados.....	86
Figura 44. Radiodensidade óssea na epífise distal do fêmur em ratas dos grupos controle e ovariectomizados	86
Figura 45. Molares do grupo SHAM e OVX60 quanto ao grau de desgaste das cúspides	88
Figura 46. Detalhes da porosidade de osso alveolar.....	89
Figura 47. Imagens 3D evidenciando alterações no osso trabecular sob as raízes do 2º molar de ratas ovariectomizadas.....	89
Figura 48. Imagem 3D de mandíbula de ratas wistar evidenciando alterações trabeculares da região de 1º molar nos grupos OVX30 e OVX60.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos não-invasivos para avaliação do esqueleto.....	31
Tabela 2. Parâmetros usados para o diagnóstico de osteoporose	32
Tabela 3. Estudos realizados para avaliar o uso de radiografias panorâmicas no diagnóstico de osteoporose	39
Tabela 4. Modelos animais para investigação de perda óssea	47
Tabela 5. Efeito da ovariectomia e deficiência e estrógeno na mandíbula de ratas Wistar	49
Tabela 6. Parâmetros mandibulares usados para obtenção de medidas lineares	63
Tabela 7. Médias e desvios - padrão (dp) dos valores de pixel das regiões de interesse no fêmur.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura	Nome
BMPs	Bone morphogenetic proteins
bFGF	Basic fibroblast growth factor
COA	Crista óssea alveolar
DEXA	Densitometria óssea
DMO	Densidade mineral óssea
DPA	Absorciometria por duplo fóton
DTM	Desordens têmporo-mandibulares
DXA	Absorciometria por raios-X com dupla energia
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF-I	Fator de crescimento insulina-I
IL-6)	interleucina-6
ILs	interleucinas
IMC	Índice de massa corporal
JCE	Junção cimento esmalte
Micro-Ct	Microtomografia computadorizada
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos
NF- κ β	Fatores nucleares Kappa β
OVX	Ovariectomizada
PTH	Paratormônio
pQCT	Tomografia quantitativa periférica
QCT	Tomografia computadorizada quantitativa
QMR	Ressonância magnética quantitativa
QUS	Ultrassom quantitativo
RA	Radiografia por Absorciometria
RANKL	Receptor ativador ligante NF-Kappa
RM	Ressonância magnética
Rm	raiz mesial
Rd	raiz distal
ROI	Região de interesse
SPA	Absorciometria por fóton

SSSB	Sistema Suplementar de Saúde Brasileiro
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- β	<i>Transforming growth factor-beta</i>
TNF- α	Fator necrose tumoral α
TRAP	Fosfatase ácida tartarato resistente
OPG	Osteoprotegerina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	166
2 OBJETIVOS	18
2.1 GERAIS:.....	188
2.2 ESPECÍFICOS:.....	188
3 REVISÃO DA LITERATURA	199
3.1 TECIDO ÓSSEO	19
3.1.1 Remodelamento do tecido ósseo.....	222
3.1.2 Estrutura e propriedades mecânicas do tecido ósseo.....	255
3.2 OSTEOPOROSE.....	266
3.2.1 O Impacto social da ocorrência de fraturas.....	27
3.2.2 Deficiência estrogênica e osteoporose.....	299
3.2.3 Diagnóstico	31
3.2.4 Alterações mandibulares associadas à osteoporose	35
3.2.5 Radiografias orais e osteoporose.....	38
3.3 MODELO ANIMAL PARA INVESTIGAÇÃO OSTEOPORÓTICA MANDIBULAR	44
3.3.1 Indução de osteoporose em animais.....	44
3.3.2 Análise perda de massa óssea em animais	46
3.3.3 Ovariectomia e distúrbios orais em ratas	47
3.4 ANÁLISE DA MICROARQUITETURA DO TECIDO ÓSSEO.....	50
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
4.1 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS PARA INDUÇÃO DE OSTEOPENIA..	55
4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	57
4.3 EXTRAÇÃO E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS ÓSSEOS	58
4.4 MICRO-CT: SEGMENTAÇÃO E RECONSTRUÇÃO DE IMAGENS DAS MANDÍBULAS E FÊMURES.....	58
4.4.1 Preparo das amostras para microtomografia	59
4.4.2 Obtenção de imagens por micro-ct	60
4.4.3 Medidas lineares da perda óssea alveolar	63
4.4.4 Medidas volumétricas do osso alveolar.....	65

4.5 ANÁLISE RADIOGRÁFICA	68
4.5.1 Mensuramento mandibular.....	69
4.5.2 MENSURAMENTO NO FÊMUR	72
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	74
5 RESULTADOS	75
5.1 VARIAÇÃO DE PESO CORPORAL NOS ANIMAIS.....	75
5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS	75
5.3 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS	78
5.4 MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA	81
5.4.1 PERDA ÓSSEA VERTICAL	81
5.4.2 VOLUME ÓSSEO.....	82
5.4 RADIODENSIDADE ÓSSEA	84
5.5 ANÁLISE QUALITATIVA POR MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA	88
6 DISCUSSÃO	91
6.1 PESO CORPORAL.....	91
6.2 EXAMES BIOQUÍMICOS.....	92
6.3 MORFOMETRIA ÓSSEA.....	94
6.4 RADIODENSITOMETRIA	96
6.5 MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA	101
7 CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma condição sistêmica progressiva, caracterizada por redução da massa óssea e deterioração de sua microarquitetura, com conseqüente aumento da susceptibilidade a fraturas (WHO, 1994). Trata-se de um importante problema de saúde pública que se agrava com o aumento da expectativa de vida da população mundial. Esta condição afeta, sobretudo, idosos e mulheres no período da pós-menopausa.

Como a osteoporose afeta o metabolismo ósseo, é natural supor que alterações na densidade mineral óssea sistêmica afetem os ossos maxilares. Estas alterações podem interferir no grau de reabsorção óssea comprometendo a permanência dos dentes naturais. Os principais sinais clínicos e radiográficos ligados ao estado osteopênico observados a partir da cavidade bucal são a baixa densidade mineral óssea na mandíbula, doença periodontal progressiva, reabsorção de osso alveolar, reabsorção endosteal do córtex inferior mandibular, além de alterações no padrão do trabeculado (TAGUCHI et al., 2006; LEITE et al., 2008). Estes sinais clínicos, bem como, o número de dentes presentes podem sugerir a ocorrência de osteoporose em adultos, embora não haja um número estatístico que possa indicar tal ocorrência.

A análise de sinais osteopênicos na cavidade oral humana apresenta dificuldades locais e sistêmicas tais como a sobreposição de imagens radiográficas e a similaridade entre o coeficiente de atenuação entre as estruturas orais. Ratas ovariectomizadas tem sido consideradas um bom modelo para estudo de osteoporose na pós-menopausa (WRONSKI et al., 1988). Poucos estudos comparativos tem relacionado o estado de pós-menopausa com a incidência de perda óssea alveolar e possíveis efeitos do estado osteopênico na cavidade bucal.

Alguns estudos realizados para avaliar a condição óssea oral relacionada a restrição estrogênica apresentam resultados controversos (KRIBBS et al., 1990; JEFFCOAT et al., 1993). Correlações positivas entre osteoporose sistêmica e seu efeito na mandíbula de humanos e ratas foi encontrada nos estudos de TANAKA

et al. (2002, 2003) e IRIE et al. (2004). Entretanto, uma correlação negativa foi encontrada em MORIYA et al. (1998).

O desenvolvimento de um modelo animal cujas características possam ser úteis para avaliação da perda óssea oral na osteoporose, é de fundamental importância para a compreensão do efeito da depleção estrogênica na cavidade bucal.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS:

- Desenvolver um modelo animal usando ratas Wistar por supressão estrogênica para o estudo de alterações ósseas osteopênicas com protocolos de 30 e 60 dias pós-ovariectomia.

2.2 ESPECÍFICOS:

- Identificar neste modelo animal alterações no tecido ósseo oral por meio de análises bioquímicas, medidas radiográficas e análise de microtomografia computadorizada.
- Identificar a possibilidade do uso de imagens radiográficas como instrumento de identificação de sinais osteopênicos na mandíbula de ratas

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 TECIDO ÓSSEO

O esqueleto fornece uma estrutura rígida para o corpo, protegendo órgãos vitais, atuando como sitio de ligamento para os músculos, e encapsulando a medula óssea. O tecido ósseo contém 99% do total de cálcio do corpo desempenhando um importante papel na preservação deste mineral e homeostase do fósforo, fornecendo uma reserva para onde esses íons podem ser transportados.

O osso é uma estrutura hierarquicamente complexa e com notável desempenho biomecânico. A resistência desse órgão é influenciada pela sua massa óssea, geometria de sua microarquitetura, bem como, propriedades intrínsecas do material que o compõe. Trata-se de um tecido extremamente bem organizado, com surpreendente baixo peso, cuja estrutura varia dependendo de sua composição, idade, histórico de alimentação e patologias (ROSCHGER et al., 2008). Segundo Kosa et al. (2009), este tecido apresenta comportamento dinâmico capaz de provê suporte para o corpo contra forças externas, refletindo o equilíbrio entre a integridade mecânica para a locomoção e proteção. O osso é o local primário da hematopoese, processo de formação, maturação e liberação de células do sangue, apresentando ainda importante papel como componente do sistema imune.

O tecido ósseo pode ser dividido em componentes macroestruturais, osso cortical e osso trabecular (Figura 1), e microestruturais, células, matriz orgânica, matriz inorgânica e fatores solúveis. O osso cortical é um material denso encontrado nas paredes das diáfises e superfícies externas de ossos longos, apresenta baixa porosidade e reduzida atividade metabólica. O osso trabecular é uma estrutura altamente porosa, cujos espaços irregulares são preenchidos com medula óssea. A porosidade nessa estrutura varia entre 30 a 90% dependendo da localização anatômica e estado de saúde do osso. De acordo com Augat e Schorlemmer (2006) as trabéculas tendem a orientar-se ao longo da direção tensão principal, em adaptação ao carregamento externo do ambiente.

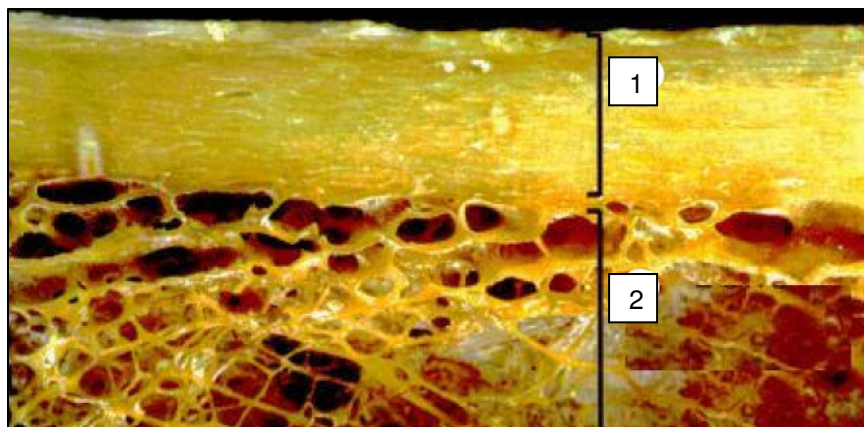


FIGURA 1. Representantes dos dois componentes da macroestrutura óssea. 1) Osso cortical e 2) Osso trabecular. Fonte: HOLLINGER et al., 1999.

O tecido ósseo é formado por aproximadamente 70% de matéria mineral, esta é constituída por 95% de cristais de hidroxiapatita e 5% de impurezas e água. Os demais 30% do tecido ósseo são representados por uma matriz orgânica que apresenta grande contribuição para a função biológica, essa matriz é formada em 98% por colágeno tipo I e uma variedade de proteínas não colagênicas que apresentam importante papel regulatório. Destaca-se neste panorama a osteocalcina.

A osteocalcina é a proteína não colagênica mais prevalente no osso, esta aumenta na formação óssea e decresce com a reabsorção, sendo influenciada pela presença de vitamina D, Hormônio paratormônio (PTH) e corticosteróides. Outra proteína, a osteonectina, regula a concentração de cálcio e aumenta a atração de células de reabsorção. Várias proteínas de matriz tais como osteopoetina, sialoproteína óssea, glicoproteína ácida óssea e fibronectina atuam como proteínas ligantes de células, conhecidas como integrinas que promovem a ancoragem e des-adesão de células à matriz extracelular para que estas expressem suas funções (VAN DAELE et al., 1994).

Segundo Seeman et al. (2006), a matriz óssea possui ainda um pequeno número de moléculas biologicamente ativas tais como: TGF- β (Transforming growth factor-beta), IGF (Insuline-like growth factor), BMPs 2-10 (Bone morphogenetic proteins) e bFGF (basic fibroblast growth factor) bem como citocinas tais com interleucinas (ILs), além de leukotrienos e prostaglandinas.

Interleucinas tem importante efeito na regulação, ativação, crescimento e turnover do tecido. Fatores de crescimento e hormônios interagem com as células regulando o fluxo de íons de cálcio dentro e fora da célula.

O metabolismo ósseo é regulado por células ósseas que respondem a sinais químicos, mecânicos e elétricos. O mecanismo mecanosensorial no osso inclui um sistema formado por células que são estimuladas por carregamento mecânico aplicado no osso, as células que traduzem esse carregamento para um sinal de comunicação e aquelas que transmitem esse sinal para as células efectoras (osteoblastos e osteoclastos) que atuam para a manutenção da homeostase óssea (KLEIN-NULEND, 2005). Cowin (2007) tem evidenciado os osteócitos como as principais células mecanosensoriais, estas são ativadas por amplificação de esforço por meio do fluido em seus canaliculos e estão acoplados eletricamente a uma rede tridimensional de células que incluem as células de revestimento.

Osteoblastos são células de origem mesenquimal que residem na superfície do osso. Estas células são responsáveis por sintetizar os constituintes da matriz, como o colágeno tipo I entre outras proteínas como: osteonectina, osteopontina, sialoproteína óssea e glicoproteína ácida. Os osteoblastos expressam ainda alta concentração de fosfatase alcalina que pode diferenciá-las de outras células ósseas e osteocalcina, que é o mais específico marcador, expresso por osteoblastos maduros (RODAN e RODAN, 1983; SEIBEL, 2006). Osteoblastos atuam no suporte para a mineralização orientada de hidroxapatita e a camada básica de proteoglicanos e glicoproteínas, bem como na regulação da atividade de remoção desempenhada pelos osteoclastos. Tais células ósseas apresentam receptores para o PTH, estrógeno e vitamina D. O osteoblasto maduro, embora incapaz de sintetizar colágeno ou matriz osteóide, tem importante função de proteger a superfície óssea da reabsorção (STELN et al., 1990).

Osteoclastos são células gigantes, multinucleadas encontradas na superfície óssea, que são formados a partir da fusão de células mononucleares (linhagem hematopoiética) que se encaminham do espaço medular próximos a superfície. Eles atuam na reabsorção da matriz óssea inclusive a não mineralizada (osteóide). Sob microscopia eletrônica apresentam uma borda

ondulada que aumenta a área de reabsorção. Estas células ósseas podem ser reconhecidas por liberar fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP). Outros importantes marcadores moleculares para osteoclastos são receptores de calcitonina, receptores ativadores de fatores nucleares Kappa β (NF- $\kappa\beta$) e α -v/ β -3 integrina observados na superfície da célula (MARTIN e SIMS, 2005).

De acordo com KLEIN-NULEND et al. (2003), aproximadamente um terço dos osteoblastos é embebido pela matriz tornando-se osteócitos. Ao contrário dos osteoblastos, estas células não possuem grande atividade secretora, apresentam, no entanto, numerosos canalículos que estendem seus processos através da substância óssea. Osteócitos monitoram ainda os níveis de oxigênio, cálcio, fósforo e outros nutrientes ou moléculas de sinalização do fluido tecidual bem como possíveis danos estruturais.

Outras células osteoblasticas que não sofrem apoptose ou não são embebidos pela matriz como osteócitos tornam-se células de revestimento ósseo. Em áreas de formação ativa de osso a superfície é revestida por osteoblastos. Em áreas de reabsorção essa área é revestida por osteoclastos. A maioria das superfícies trabeculares e endosteais é recoberta por células de revestimentos com potencial para tornar-se osteoblastos ativos. Elas controlam, ainda, fisicamente, a inicialização dos osteoclastos na superfície óssea (PARFITT, 2001).

3.1.1 Remodelamento do tecido ósseo

STELVENSON e LINDASAY (1998) descrevem o osso como um tecido vivo que está continuamente em ação. Aproximadamente 10% do esqueleto é renovado por meio do processo de remodelamento a cada ano (RIZOLLI, 2004). As atividades celulares do tecido ósseo são de três tipos: atividade de modelamento (associada ao crescimento corporal), atividade de reparo (relacionada a reparação da micro e macro estrutura óssea e ligada aos danos provocados pelas tensões físicas recebidas), e atividade de remodelamento (caracteriza-se por ser um processo cíclico, responsável pela renovação do osso ao longo da vida, preservando desta forma a integridade mecânica do esqueleto e homeostasia mineral) (ERIKSEN et al., 1993).

Estima-se que no adulto aproximadamente 25% do osso trabecular e 3% do osso cortical seja renovado anualmente por meio do remodelamento ósseo (DEMPSTER et al., 1995). Com o tempo, ocorre um decréscimo na formação resultando em gradual perda de massa óssea que pode ser de 0,3 a 0,5% ao ano. Em mulheres na pós-menopausa, por exemplo, a perda de massa óssea aumenta dramaticamente de 3 a 5% ao ano o que resulta no aumento do risco de fraturas levando-as ao estado osteoporótico (NEUMANN e SCHETT , 2007).

Durante o processo de remodelamento, após a retração das células de revestimento do osso, uma cascata de sinais originados da ativação dos osteoblastos recruta e diferencia células tronco hematopoiéticas. Ocorre então, a fixação de precursores mononucleados de osteoclastos, que se unem para dar origem aos osteoclastos maduros (Figura 2), que são ativados somente depois de danificar a camada osteóide sob a superfície do osso. Everts et al. (2002) afirmam que o PTH parece promover a retração das células de revestimento e reabsorção da camada orgânica. Outra hipótese é que os osteócitos por meio de seus prolongamentos possam conectar-se diretamente com as células de revestimento para regular esse processo.

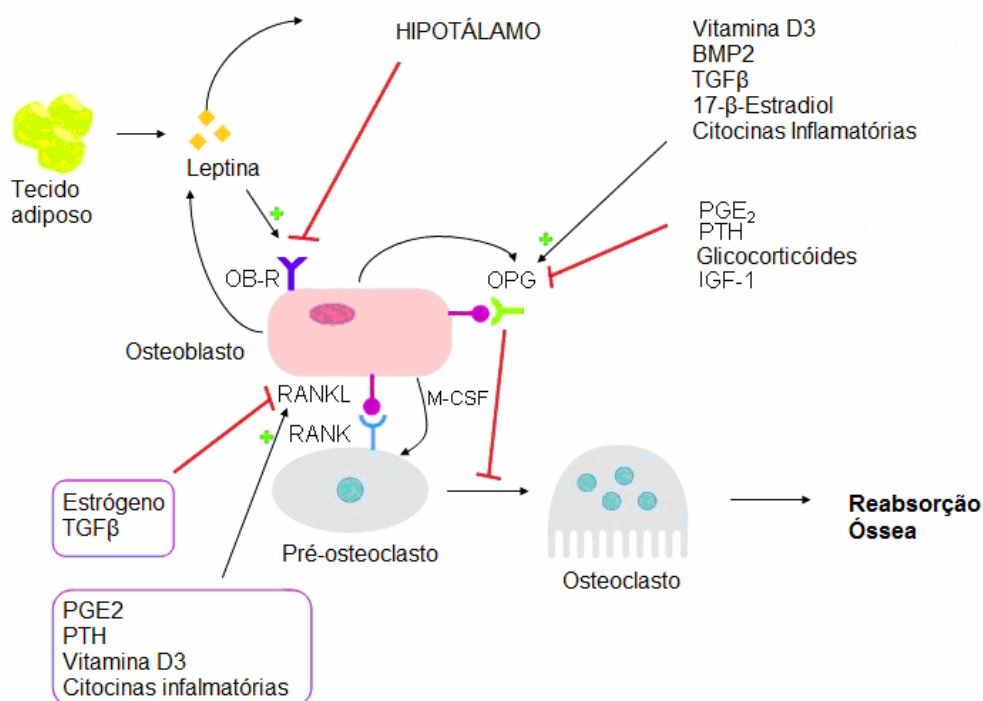


FIGURA 2. Esquema ilustrativo do processo de remodelamento ósseo. Interação de fatores regulatórios envolvidos na osteoclastogênese, reabsorção e formação óssea.

Fonte: http://www.spreumatologia.pt/ficheiro/conteudo/imagens/SPR_20070625155116_Fig4.jpg

Para reabsorver o osso, o osteoclasto adere fortemente à superfície através de algo parecido como um anel rico em actina do citoesqueleto. Isso cria um espaço onde serão secretadas enzimas e ácidos. Intracelularmente dióxido de carbono é convertido em ácido carbônico pela enzima anidrase carbônica II. O ácido é bombeado através da borda ondulada para o espaço de reabsorção. Estas células produzem enzimas degradativas da matriz que vão otimizar o trabalho do ambiente ácido de reabsorção como por exemplo Catepsina K. A ativação de células osteoclásticas está diretamente relacionada aos osteoblastos (HENRIKSEN et al., 2003). Uma das vias mais críticas de interação osteoblasto-osteoclasto é a RANKL-osteoprotegerina. A osteoprotegerina é um membro do receptor da super-família fator de necrose tumoral e seu papel na remodelação óssea é atuar como um receptor chamariz para o peptídeo RANKL, expresso pelos osteoblastos atua inibindo a reabsorção óssea acentuada (Figura 2). Quando livre RANKL se liga ao receptor RANK (Receptor ativador do NFκB ligante) em osteoclastos, iniciando o contato de células necessário para a diferenciação e ativação de osteoclastos e reabsorção óssea (SUDA et al., 1992). A produção de OPG é regulada por sinais osteoblásticos e osteoclásticos, PTH, bem como por promotores de formação óssea tais como estrógeno, cálcio e BMP, além destes ressalta-se os efeitos dos fatores estimulantes de colônia de macrófagos (M-CSF) sobre a proliferação dos osteoclastos (STEJSKAL et al., 2001).

Depois de completada a fase de ativação, os osteoclastos deixam o local da reabsorção e são substituídos por células mononucleares que auxiliam no preparo das superfícies lacunares para a formação de novo osso por precursores dos osteoblastos que começam a secretar e mineralizar uma nova matriz (fase reversa) (MARTIN e SIMS, 2005). A superfície do osso é então recoberta novamente com células de revestimento. Após a ativação de osteoblastos de repouso, essas células sintetizam diversos tipos de colágeno, bem como a elaboração de uma série de fatores de crescimento como IGF-I, IGF-II, TGF-β. Estes, por sua vez, são necessários para o recrutamento de novas células formadoras de osso. Além disso, os osteoblastos depositam fatores de crescimento na matriz óssea, onde são armazenados em forma latente, e liberados durante os ciclos de remodelação posterior (ROSEN, 1997).

Em geral a reabsorção óssea ocorre entre 10 a 13 dias, meia vida do osteoclasto, enquanto a formação pode chegar a três meses. Há vários componentes chaves do ciclo de remodelagem que são susceptíveis a alterações locais e sistêmicas como a ativação da via de remodelagem dos osteoblastos e o recrutamento dos osteoclastos, desacoplamento da remodelagem ocorre na privação de estrógeno, que ocorre na menopausa, frente ao fluxo de hormônio da paratireóide, estimulação por citocina, ondulação de hormônio de crescimento, excesso de glicocorticoide e alterações no cálcio sérico (UDAGAWA et al., 1999).

Arnett et al. (2003) afirmam que o remodelamento ósseo pode ser influenciado por forças mecânicas aplicadas ao esqueleto e por hipóxia. Outros fatores que podem levar à alteração na remodelagem óssea são afecções renais que elevam ou diminuem os níveis séricos, afecções endócrinas como diabetes, hipertireoidismo, hiperparatireoidismo além de outras afecções relacionadas ao osso, como osteoporose.

3.1.2 Estrutura e propriedades mecânicas do tecido ósseo

Segundo a lei de Wolff (1869) quando as cargas sobre um osso são alteradas, o remodelamento funcional reorienta as trabéculas de modo que elas se alinham com a nova trajetória da tensão principal. As trabéculas são dispostas segundo as orientações que correspondem às linhas de força que o osso suporta. Esse processo explica em parte o mecanismo celular e molecular através do qual o tecido ósseo responde às tensões mecânicas. O osso é um material piezelétrico, ou seja, tem a capacidade de gerar um potencial elétrico quando tensionado. Uma vez que o osso não tem como prever o carregamento mecânico ao qual será submetido, ele adapta a sua resistência e sua densidade de acordo com o seu passado e seu presente de uso mecânico (FROST, 1997).

As propriedades mecânicas dos ossos estão relacionadas com a sua formação orgânica e inorgânica. Currey (1998) afirmou que os componentes inorgânicos (hidroxiapatita) que formam em torno de 60 a 70% do osso adulto, são responsáveis pela rigidez. Os componentes orgânicos que formam o restante do osso são os responsáveis pela sua elasticidade (STEVENSON e LINDASAY, 1998).

3.2 OSTEOPOROSE

A osteoporose é uma condição crônico-degenerativa, incapacitante, causada pela redução da massa óssea e por um distúrbio da microarquitetura esquelética, conduzindo a um aumento da sua fragilidade e do risco de fraturas (WHO, 1994). Embora a osteoporose resulte de um conjunto de processos bioquímicos e fisiológicos, sua manifestação clínica (fratura ou deformação) é puramente mecânica. Essa patologia é a principal causa de fraturas ósseas em mulheres pós-menopausadas e de pessoas idosas em geral (NJEH e LANGTON, 1997).

Além da idade, o sexo e a grupo étnico estão entre os principais determinantes da massa óssea e do risco de fraturas. Mulheres são mais suscetíveis à osteoporose do que homens, pois possuem menor densidade mineral óssea (DMO). A DMO representa a quantidade de mineral numa área do esqueleto, expressa em gramas pela área ou volume medidos. Fatores genéticos também são responsáveis por variações na massa óssea. Indivíduos afro-descendentes possuem maior pico de massa óssea e, portanto, são menos predispostos a sofrerem de osteoporose que brancos e asiáticos. Fatores ambientais como hábitos nutricionais, sedentarismo e tabagismo, além de doenças e drogas, também podem estar associados à redução da DMO (HOLM et al., 2002).

GILSANZ et al. (1995) afirmam que o pico de massa óssea coincide com a secreção máxima do hormônio de crescimento. Ressaltam ainda, que além de altos níveis séricos de IGF-I, o aumento nos níveis de estradiol e testosterona, são importantes na aquisição e manutenção de massa óssea. Essa aquisição sofre interferência do cálcio, vitamina D e fatores genéticos. O índice de massa corporal (IMC) está diretamente relacionado à DMO, deste modo, quanto maior IMC maior proteção contra osteoporose. Este índice é calculado dividindo o peso (em kg) pela altura ao quadrado (em m²).

A osteoporose afeta tanto o esqueleto axial como apendicular ocorrendo em ossos corticais e trabeculares, sendo mais freqüente nesses últimos. A incidência de fratura vertebral é de 4 a 8 vezes maior na mulher quando comparada ao homem. Homens apresentam maior DMO do que das mulheres em

todos os sítios do esqueleto. Essa redução difusa da DMO decorrente de um desbalanço entre as fases de reabsorção e formação óssea pode ser resultante de osteoclastos hiperativos e/ou de atividade osteoblástica reduzida (CUMMINGS et al., 1985).

Segundo Frost et al. (1997), a redução progressiva do conteúdo mineral ósseo caracteriza osteopenia e, em fases mais avançadas, a osteoporose. Na osteopenia, as atividades normais não causam fraturas espontâneas ou dores. Segundo o autor em mulheres de 30 anos é considerada normal a perda de até 10% do cálcio dos ossos. Valores entre 10 e 25% classificam a perda mineral como osteopenia e, acima disso, osteoporose.

Acredita-se que em pacientes osteoporóticos o esqueleto possui maior risco de sofrer microdanos. Com a diminuição de massa óssea as tensões induzidas pelas atividades são maiores e certas mudanças no remodelamento presentes nesses pacientes poderiam resultar em uma reparação ineficaz ou retardada destes microdanos. O provável começo destes microdanos se dá a nível molecular gerando a seguir fendas que podem atravessar as estruturas trabeculares e gerar microfraturas (DEMPSTER et al., 1986) (Figura 3).

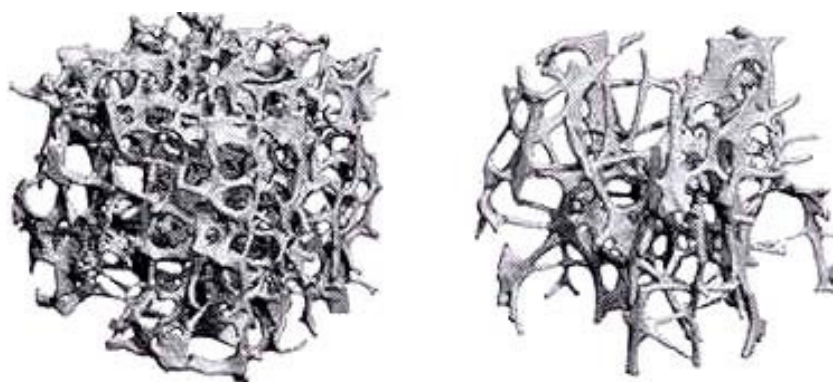


Figura 3. Imagem micro-computadorizada do corpo vertebral de um indivíduo normal (esquerda) e vértebra osteoporótica (direita) na qual observa-se uma redução da massa óssea, da espessura das trabéculas e alteração de conectividade trabecular. Fonte: WHITE, 2002

3.2.1 O Impacto social da ocorrência de fraturas

Segundo Fernandes et al. (2001), a importância clínica da osteoporose reside na maior incidência de fraturas. Estas ocorrem principalmente nas

vértebras, punho, radio distal e fêmur. A incidência de fratura de quadril aumenta exponencialmente com a idade (a mulher tem 15% de risco e o homem de 2 a 5% durante toda a vida). Doze a vinte por cento das fraturas de fêmur levam a morte após um ano. Cerca de 25% dos pacientes com fratura de quadril vão a óbito nos primeiros seis meses e 40% nos primeiros dois anos. Estima-se que 50% das fraturas de fêmur por osteoporose conduzem à incapacidade total ou parcial e que 20-30% desses indivíduos, boa parte constituída de idosos, apresentarão complicações, levando-os à morte nos dois anos seguintes.

Reginster e Burlet (2006) estimam que cerca de 200 milhões de pessoas em todo o mundo têm osteoporose. No Brasil, os avanços da medicina e as melhorias nas condições gerais de vida da população repercutem elevando a média de vida do brasileiro (expectativa de vida ao nascer) de 45,5 anos de idade, em 1940, para 72,7 anos, em 2008. Segundo a projeção de dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o país continuará galgando anos na vida média de sua população, alcançando em 2050 o patamar de 81,29 anos. A proporção de idosos maiores que 65 anos. Em 2050, será de 29,72%, para uma população estimada de 259.769.964 habitantes (IBGE, 2009).

Estudos norte-americanos mostram que a proporção de mulheres brancas com osteoporose identificadas por meio de critérios densitométricos é de aproximadamente 15% entre 50 e 59 anos, elevando-se para 70% nas mulheres com mais de 80 anos. No Brasil, existem poucos dados populacionais gerais sobre a osteoporose. Algumas projeções e levantamentos isolados estimam que a osteoporose acomete cerca de 20% das mulheres brasileiras com mais de 50 anos (COSTA-PAIVA et al., 2003). Estudos regionais apontam para uma incidência anual de fratura proximal de fêmur em mulheres acima de 60 anos na cidade de Sobral, Ceará, nos anos de 1996/2000, de 12,4/10 mil habitantes (CASTRO e RIBEIRO, 2003) e na cidade de Fortaleza, Ceará, no ano 2001/2002 de 21,7/10 mil habitantes (SILVEIRA et al., 2005).

Além de associar-se a maior morbimortalidade, a fratura por osteoporose apresenta impactos sócio-econômicos relevantes. A identificação de mulheres na pós-menopausa com fatores de risco para fratura, facilita a intervenção precoce, auxiliando na manutenção ou no aumento de massa óssea e conseqüente redução no risco de fratura (REGINSTER e BURLET, 2006).

Araújo et al. (2005) em estudo sobre o custo da fratura osteoporótica de fêmur para o Sistema Suplementar de Saúde Brasileiro (SSSB) observaram que no período de um ano, foram registrados 129.611 casos de osteoporose, observando-se fratura de fêmur em cerca de 5% dessa população. Estimando o custo médio da hospitalização em R\$ 24.000,00 por paciente, o montante assumido pelo sistema totalizou R\$ 12 milhões. Na rede pública, onde a maioria não tem acesso à densitometria nem aos medicamentos adequados, o problema é ainda mais difícil de contornar. Silva (2003) estimou que o custo da fratura osteoporótica para o Sistema Único de Saúde (SUS) é de apenas R\$ 1.700,00 considerando a não intervenção terapêutica específica quanto à osteoporose; apenas gastos diretamente relacionados à correção cirúrgica da fratura, internações e fisioterapia.

3.2.2 Deficiência estrogênica e Osteoporose

A idade tem efeito marcante sobre a DMO. Por volta dos 22 anos de idade a maioria das mulheres tem adquirido 99% de sua densidade óssea. Nos primeiros 5 ou 7 anos após a menopausa existe uma perda de cerca de 20% em relação a este conteúdo. Radiografias convencionais só podem indicar perdas entre 30 a 40% de massa óssea, não podendo ser usada como técnica padrão para o diagnóstico da osteoporose (TEEGARDEN et al., 1995). A mulher perde aproximadamente metade do conteúdo de seu osso trabecular e 35% do seu osso cortical durante a vida (RIGGS e MELTON, 1986).

Os eventos moleculares precisos que resultam de mudanças nas concentrações hormonais não são claros. Em alguns modelos animais, a privação de estrogênio está associado com um aumento acentuado na síntese de interleucina-6 (IL-6) a partir de células do estroma e osteoblasticas. Resultados experimentais demonstram que o estrogênio regula a atividade de transcrição do promotor para IL-6. Entretanto, os resultados de outros estudos são conflitantes. RANKL foi identificado como um importante regulador da diferenciação dos osteoclastos. Assim, parece provável que várias citocinas, trabalhando em conjunto, são ativas durante a privação de estrogênio, e cada uma pode acelerar o processo de reabsorção óssea (JILKA et al., 1992).

LINDSAY (1995) afirmou que o estrógeno possui uma importante função na homeostase do esqueleto, ele atua na regulação da frequência de novos ciclos de remodelamento e no equilíbrio entre formação e reabsorção óssea. Os osteoblastos possuem receptores que interagem com o estrógeno liberando mediadores que inibem a atividade dos osteoclastos. Outros hormônios sexuais como a progesterona estimulam a neoformação óssea e bloqueiam a atividade do glicocorticóide no osso. O hormônio andrógeno reduz o turnover osso levando ao aumento da atividade osteoblástica (TENÓRIO et al., 2005).

O estrógeno pode ainda modular a produção de reguladores ósseos liberados local e sistemicamente por monócitos, macrófagos e linfócitos T. Girasole et al. (1992) demonstraram o efeito do estrógeno na secreção de IL-6 e sua relação com diferenciação osteoclástica por estimular a quimiotaxia e diferenciação destas células. Este hormônio induz as células ósseas a secretarem ainda M-CSF e fator estimulador de colônias de macrófagos granulócitos. Estas, por sua vez, regulam a proliferação de precursores osteoclásticos e sua diferenciação em osteoclastos (PACIFICI, 1992).

Estudos demonstraram que monócitos de pacientes osteoporóticos apresentaram maior atividade de IL-1 quando comparados a pacientes saudáveis. A atividade desta citocina aumentava após a menopausa, permanecia elevada por um período maior em mulheres portadoras de osteoporose e retornava a níveis pré-menopausa quando empregado tratamento com estrógeno. Efeito similar foi observado para o fator de necrose tumoral α (TNF- α). Os monócitos humanos secretam simultaneamente IL-1 e um inibidor de IL-1. A deficiência de estrógeno possivelmente desequilibra o nível destas substâncias, diminuindo a secreção do inibidor e elevando o nível de IL-1 (PACIFICI et al., 1983).

Em nível molecular, tem sido demonstrado que a reabsorção óssea ocorre por intermédio de duas moléculas-chave, o ligante ativador do receptor NF-Kappa (RANKL) e OPG. O estrógeno, por sua vez, exerce um importante papel no controle da reabsorção óssea através de sua ação estimulatória em OPG. Dessa forma, tem sido sugerido que a deficiência de estrógeno induz um desequilíbrio no sistema RANKL/OPG, favorecendo assim a reabsorção óssea (LINDBERG et al., 2001). A deficiência estrogênica torna então, os osteoclastos hiperativos e capazes de penetrar profundamente dentro das placas esponjosas, perfurando-

as. Assim, na diminuição deste hormônio, as trabéculas ósseas ficam mais separadas, mais porosas, com a conectividade reduzida, e a diminuição na espessura do osso cortical que ocorre de forma gradual com o avançar da idade é acelerada (DEMPSTER e LINDSAY, 1983).

O estoque inadequado de cálcio parece ser outro fator de risco relacionado a idade, massa óssea e hormônios sexuais. Pesquisas tem demonstrado que a absorção de cálcio difere marcadamente com a idade, se tal modo que, jovens garotas absorvem 38% do seu estoque de cálcio enquanto mulheres absorvem 22%. O pico de idade para retenção de cálcio é antes do começo da menstruação (WASTNEY et al., 1996).

3.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico da osteoporose deve levar em consideração a história clínica do paciente, a execução de exames físicos e complementares tais como avaliação laboratorial, exames radiológicos e medidas de massa óssea. Muitos métodos não-invasivos foram desenvolvidos para avaliar a estrutura do esqueleto (Tabela 1). Essas técnicas variam em precisão, exatidão e discriminação diferem ainda em metodologia fundamental, utilidade clínica. Segundo Njeh et al. (1999), a escolha do melhor sítio esquelético para a predição da osteoporose é um objeto de grande debate. De um modo geral, o consenso é que os sítios com mais alto conteúdo de osso esponjoso (maior taxa de remodelamento) são mais sensíveis às mudanças osteoporóticas sendo assim melhor utilizados para diagnóstico.

Tabela 1. Métodos não-invasivos para avaliação do esqueleto

RA	Radiographic Absorptiometry	Radiografia por Absorciometria
DXA	Dual Photon Absorptiometry	Absorciometria por raio-X com dupla energia
QCT	Quantitative Computed Tomography	Tomografia computadorizada quantitativa
pQCT	Peripheral Quantitative Computed Tomography	Tomografia quantitativa periférica
μCT	Micro Computed Tomography	Micro tomografia computadorizada quantitativa
QUS	Quantitative Ultrasound	Ultrassom quantitativo
QMR	Quantitative Magnetic Resonance	Ressonância magnética quantitativa
μMR	Micro Magnetic Resonance	Micro ressonância magnética

Fonte: NJEH et al., 1999 (modificada)

Atualmente a densitometria óssea (DEXA) é o exame de referência para o diagnóstico da osteoporose. Segundo critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 1994), este diagnóstico é realizado pela avaliação da coluna lombar, em posição ântero-posterior, do fêmur proximal, do colo femoral e/ou do fêmur total e antebraço. Trata-se de um método não-invasivo com radiação extremamente baixa, e é recomendado como o meio mais adequado até o momento para avaliação do risco de se desenvolver osteoporose (SEELEY et al., 1991).

A maioria das técnicas densitométricas fornece a DMO expressa em g/cm^2 para uma região de interesse. A densidade mineral óssea obtida é classificada de acordo com os desvios padrão da média do adulto jovem de referência (Tabela 2). A comparação da DMO com a população harmonizada mostra como esta se apresenta em função do que ela deveria ser no momento da realização do exame (WHO, 1994). Para que o diagnóstico de osteoporose e os riscos de fraturas sejam analisados pelo T-score (medida usada para avaliar DMO por DEXA dado pelo número de desvios padrão abaixo ou acima de um valor de referência), um valor correspondente à diferença entre a DMO média de indivíduos adultos saudáveis e a DMO do indivíduo examinado é dividido pelo desvio-padrão da média de DMO de adultos normais.

Tabela 2. Parâmetros usados para o diagnóstico de osteoporose

Normal	DMO até - 1,0 dp
Baixa massa óssea (osteopenia)	DMO entre -1,1 e -2,5 dp
Osteoporose	DMO abaixo de - 2,5 dp
Osteoporose estabelecida	DMO abaixo de - 2,5 dp e (*)

Valores comparativos para diagnóstico de redução de massa óssea.

Dp – Desvio padrão

(*) pelo menos uma fratura por fragilidade óssea. **Fonte:** WHO 1994

Compston (1995) preconizou que os métodos absorciométricos comumente usados medem o conteúdo mineral ósseo dentro de uma dada área. Clinicamente, a medida da densidade mineral óssea representa uma densidade de área e não uma densidade volumétrica real, esta por sua vez só pode ser obtida por técnicas tomográficas, onde as medidas variam em três dimensões.

Segundo Heaney (1987), a redução de massa no osso osteoporótico não é uma explicação satisfatória para as grandes mudanças aparentes na fragilidade óssea. Por exemplo, nas mulheres a fratura de punho aumenta cerca de 10 vezes entre 45 e 55 anos enquanto nesse período a massa óssea no punho geralmente mantém-se normal.

Radiografia e Qualidade Óssea

Durante as últimas quatro décadas, numerosas pesquisas têm sido realizadas para se identificarem os possíveis parâmetros que permitam associar a radiografia dental com a osteoporose. Alterações convincentes da perda do osso bucal associada com osteoporose se evidenciam, particularmente, como um aumento da porosidade da cortical do osso alveolar e do corpo mandibular.

Radiografias convencionais são pouco utilizadas para o diagnóstico da osteoporose por detectarem em geral perdas de 20 a 40% de massa óssea quando na maioria das vezes as fraturas já estão presentes. No caso do osso alveolar, há uma dificuldade em termos de análise, por não ser fácil a distinção entre tecido dental e tecido ósseo circundante, como resultado na sua similaridade na atenuação de raio x. Esse problema pode ser contornado pelo uso softwares específicos para a análise de imagens médicas (MOYAD, 2003).

Devido ao custo e acessibilidade a estrutura trabecular do osso esponjoso tem sido analisada principalmente por meio de imagens radiográficas convencionais, as quais podem ser mensuradas quantitativamente mediante análise da arquitetura óssea trabecular, tais como, análise de Fourier e dimensão fractal. Tais métodos acusam limitações por se deixarem afetar por ruídos. Para solucionar tais limitações e falhas tem-se desenvolvido um sistema de análise para processamento de imagens digitais. Tais sistemas usam filtros morfométricos e morfológicos para diminuição de tais interferências (KENSUKE et al., 2005).

A esqueletização é um processo utilizado para se obter uma visualização mais detalhada da arquitetura do trabeculado ósseo. Esse método permite, de forma não invasiva, identificar a malha de distribuição das trabéculas, e os microdanos, ou seja, as microfraturas no tecido ósseo. White (2000) realizou

estudo utilizando o referido método para avaliar a diminuição da massa óssea em pacientes com diagnóstico de anemia falciforme, obtendo, assim, uma nova forma de auxílio no diagnóstico da doença. O mesmo tratamento de imagens foi aplicado para dois outros grupos de pacientes, com e sem o diagnóstico de osteoporose, no qual o mesmo pesquisador constatou uma diferenciação na imagem da estrutura trabecular da mandíbula entre os dois grupos (WHITE, 2002).

Imagens radiográficas convencionais podem ser digitalizadas por câmeras digitais e scanners. Tais dispositivos transformam uma imagem radiográfica em digital, oferecendo diferentes resoluções que dependem, basicamente, da capacidade do dispositivo utilizado. Essas imagens podem ser armazenadas em microcomputador estando disponíveis para utilização de diversas ferramentas contidas em softwares específicos para o tratamento de imagens médicas (GONZALEZ et al., 1992).

No processamento, cada imagem representa uma matriz composta por inúmeros pixels que variam de acordo com as dimensões da matriz, sendo que o pixel identifica o elemento básico da imagem, e suas propriedades podem variar em tons de cinza e até em cores. Uma imagem digital pode ser considerada como uma matriz cujos índices de linhas e de colunas identificam um ponto na imagem, e o correspondente valor do elemento da matriz identifica o nível de cinza naquele ponto. Os elementos dessa matriz digital denominam-se elementos da imagem, elementos da figura, pixels ou pels (pictures elements, ou seja, elementos da figura (GONZALEZ et al., 1992; EBERLY, 2001; CENTENO, 2005).

Sob o ponto de vista radiográfico, o osso é radiopaco. Essa radiopacidade pode ser homogênea, linear ou em faixas (quando se observa o osso compacto ou a imagem das corticais ósseas), ou podendo apresentar-se sob o aspecto de trama, rede ou malha ao se considerar o osso esponjoso em sua configuração característica de trabéculas ósseas e espaços medulares. As alterações do aspecto radiográfico normal ou a patologia radiológica do osso, ou, ainda, os sinais radiográficos das lesões ósseas ocorrem em decorrência das modificações na densidade, na textura, no tamanho, na forma do osso e nas reações do periósteo que envolve as superfícies desses mesmos tecidos (ROLDÁN et al., 1998; BODIC, et al., 2004).

Estudos tem apontado para o uso das radiografias panorâmicas como parte de um método de avaliação no auxílio diagnóstico da osteoporose. A espessura da cortical óssea inferior da mandíbula e outros métodos correlacionados podem ser úteis para predizer, em mulheres idosas e na pós-menopausa, pacientes com osteoporose (KLEMETTI, et al., 1993; WOWERN, 2001; DEVLIN et al., 2002; DUTRA et al., 2005).

3.2.4 Alterações Mandibulares Associadas à Osteoporose

Como em todo o esqueleto humano, com o avanço da idade, ocorre uma diminuição do conteúdo ósseo mineral no osso mandibular. A mandíbula é o maior osso facial constituído principalmente por tecido ósseo cortical. Os principais elementos mandibulares são: Processo alveolar, côndilo, processo coronóide, forame mental, ramo e corpo da mandíbula (Figura 4). Após os cinquenta anos, existe um grande aumento na porosidade do osso cortical mandibular, sendo este aumento maior na região alveolar do que no corpo da mandíbula. Com o aumento da porosidade ocorre, concomitantemente, uma redução de massa óssea que aparece de forma mais evidente em mulheres do que em homens (HIATT e GARTNER, 1997).

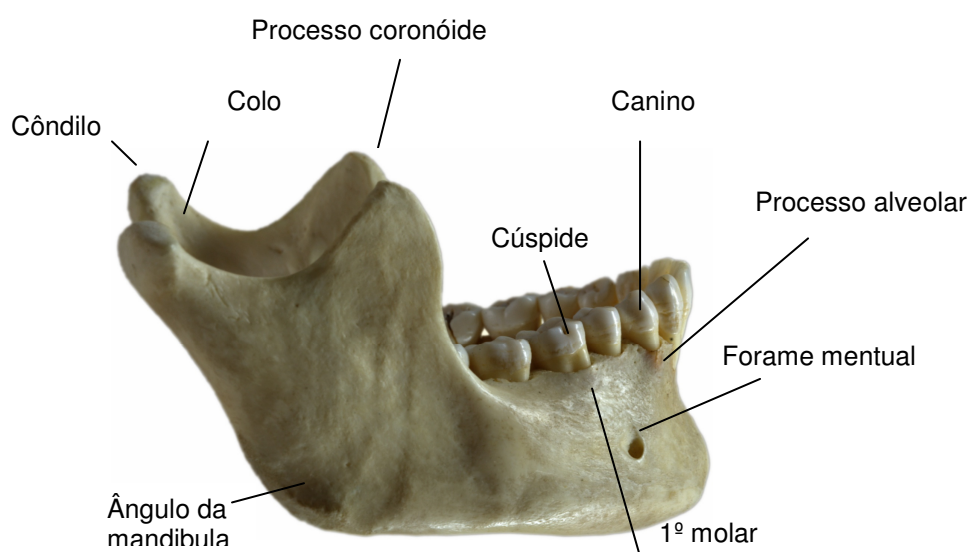


Figura 4. Descrição anatômica da mandíbula humana.

Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Human_jawbone_left.jpg (modificada)

O tecido ósseo dos maxilares apresenta um comportamento metabólico bastante independente, em relação ao resto do corpo, pelo fato da composição mineral dos ossos nos maxilares não ser uniforme. Segundo ROLDÁN et al. (1998) existem sinais que denunciam tais características, como as importantes variações regionais atribuídas à ação mecânica de cada dente, a ação dos músculos regionais, os hábitos de mastigação, e a ação regional da microbiota sobre a osteogênese, entre outros.

De acordo com KINGSMILL e BOYDE (1988), a morfologia, o tamanho e a densidade da mandíbula variam amplamente entre os indivíduos. Esta variabilidade traduz-se em diferenças de respostas ósseas mandibulares a uma dada agressão local ou sistêmica. As alterações ósseas alveolares também variam consideravelmente entre os indivíduos dependendo diretamente de fatores locais.

Estudos realizados em cadáveres utilizando-se microtomografia computadorizada (Micro-CT) tem evidenciado que a mandíbula humana apresenta osso trabecular na região do colo, região de canino e ângulo da mandíbula (Figura 4). As fraturas mandibulares apresentam maior incidência nestas regiões, e ocorrem raramente na região de primeiro molar (BUSUITO et al., 1986; PERCARC e NIKOLIC, 1992).

Em relação ao côndilo mandibular, o tamanho e largura são altamente relevantes para a determinação da direção do crescimento e tamanho do esqueleto crânio-facial. A largura e volume desta estrutura são altamente afetados por fatores genéticos bem como fatores do ambiente pós-natal (WEJS e HILLEN, 1986). Distúrbios no côndilo da mandíbula causam as chamadas desordens têmporo-mandibulares (DTM) cuja prevalência é maior em mulheres (oito a dez vezes mais que em homens). Desordens condilares tem sido encontradas em 68% de adolescentes das quais a grande maioria eram garotas, presume-se que a presença de estrógenos assume importante papel em tais alterações (AUFDEMORTE et al., 1986; GROSFELD et al., 1986).

A largura da cabeça do côndilo é determinada pela espessura de osso trabecular e camada condilar de cartilagem. Estudos reportam que a cabeça condilar diminui com a idade e mudanças podem ser afetadas pela presença de

dentes e estímulos mastigatórios (SUGISAKI et al., 1990). Estudo realizado por Fujita et al. (2001), em camundongos sob ovariectomia, tem evidenciado que a deficiência de estrógeno pode aumentar a ossificação endocondral alterando a remodelagem óssea nesta região, levando a mudanças degenerativas na junção temporomandibular. Tais alterações evidenciam que a deficiência de estrógeno pode causar DTMs freqüentemente observadas em mulheres com osteoporose.

O osso alveolar exerce uma função importante ao fornecer suporte para os dentes. Duas partes do processo alveolar podem ser distinguidas (Figura 4). A primeira consiste em uma fina lamela de osso que circunda as raízes do dentes e que dá ancoragem as principais fibras do ligamento periodontal. A segunda parte consiste em placas corticais formadas de osso compacto e o osso esponjoso que preenche a área entre essas placas e o osso alveolar propriamente dito. Estímulos mecânicos nessa estrutura durante a mastigação impõem-se como cruciais tanto para a permanência dos dentes quanto para a formação de um osso saudável. O osso que forma o alvéolo assim como no restante do corpo sofre constante reabsorção e remodelagem (BODIC et al., 2004).

Mostra-se crescente o interesse na correlação entre o padrão de remodelagem e alterações morfofuncionais em animais correlacionados com humanos. Tais alterações correlacionadas com a senilidade e restrição estrogênica são fundamentais para pesquisas de distúrbios osteometabólicos que afetam seres humanos. Estudos realizados em ratos tem mostram que fatores genéticos e funcionais atuam diretamente no desenvolvimento normal da forma e tamanho de mandíbulas destes animais (Figura 5). No entanto, o papel relativo de cada um destes fatores permanece controverso. A dieta sua quantidade ou consistência e o papel muscular executado durante os movimentos mastigatórios apresentam efeito significativo no desenvolvimento mandibular (KILIARIDIS, 1989; BRIN et al., 1990).

Em um estudo pioneiro, Bernick e Patek (1969) analisaram ratos para a observação do desenvolvimento pós-natal do segmento anterior trabecular da mandíbula. Os resultados mostraram a presença de cartilagem calcificada no osso trabecular alveolar de incisivos e posteriormente primeiro molar.

Estudos realizados em ratos tem mostram que fatores genéticos e funcionais atuam diretamente no desenvolvimento normal da forma e tamanho de mandíbulas destes animais (Figura 5). No entanto, o papel relativo de cada um destes fatores permanece controverso. A dieta sua quantidade ou consistência e o papel muscular executado durante os movimentos mastigatórios apresentam efeito significativo no desenvolvimento mandibular (KILIARIDIS, 1989; BRIN et al., 1990).

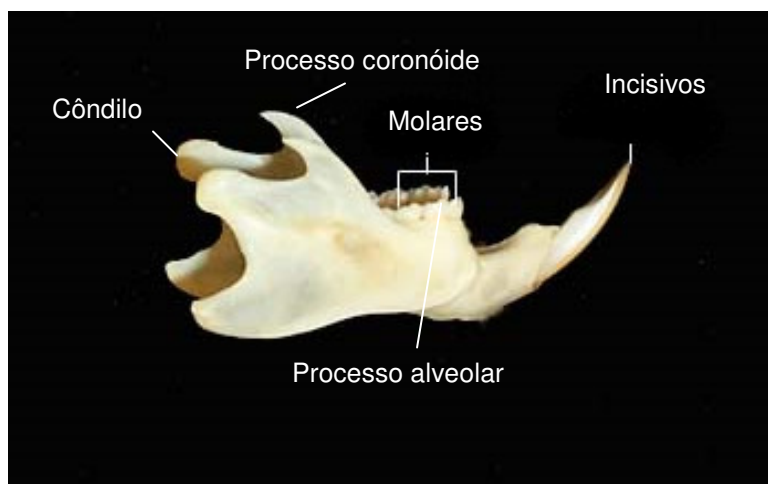


Figura 5. Descrição anatômica da mandíbula de rata wistar

Fonte: <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/digestion/pregastric/ratlatman.jpg>

3.2.5 Radiografias orais e Osteoporose

Na mandíbula humana verifica-se perda óssea a medida que a idade avança. Alguns pesquisadores ressaltam o potencial utilitário da radiografia dental para a seleção de indivíduos com osteoporose, por tratar-se de um assunto de interesse social e de saúde pública (WHITE, 2002). Neste contexto, o resultado de algumas pesquisas indica a radiografia panorâmica como uma modalidade que instrumenta o dentista de condições não apenas para avaliar toda a dentição, mas também os ossos dos maxilares, para a identificação da baixa DMO, associando-a com alterações de massa óssea do esqueleto principalmente em mulheres na pós-menopausa (MOHAMMAD et al., 1996; LEITE,et al., 2008; TAGUCHI et al,2004)

Kribbs et al. (1989) realizaram estudo com mulheres saudáveis e osteoporóticas, edêntulas (desdentadas) ou não, usando radiografias periapical, oclusal e panorâmica. O resultado do estudo mostrou que a osteoporose afeta o osso mandibular com decréscimo da massa e densidade óssea, afinamento do córtex mandibular e uma menor retenção de dentes. Devlin e Horner (2002), em uma avaliação com 74 mulheres brancas, estabeleceram que espessura da cortical mandibular menor ou igual a três milímetros abaixo do forame mental poderia ser considerada parâmetro para diagnóstico de baixa DMO. Em outro estudo, com 134 pacientes entre 45 e 55 anos, Horner et al, também em 2002, verificaram correlação negativa entre baixa densidade mineral óssea (T score menor que -1,0) e o índice mental, com valor igual a -0,22. Este índice radiomorfométrico pode ser aferido por um paquímetro de alta precisão ou por meio de um programa de computador (TAGUCHI et al., 1996).

Uma série de estudos indica que a radiografia panorâmica pode ser útil na identificação de mulheres na pós-menopausa com baixa DMO, alto *turnover* ou alto risco de fraturas osteoporóticas (Tabela 3).

Tabela 3. Estudos para avaliar o uso de radiografias panorâmicas no diagnóstico de osteoporose.

Referência	Parâmetros correlacionados	Correlação
Kribbs, 1990	Osteoporose vs. número de dentes	Boa
Klemetti et al., 1994	Largura e morfologia do córtex inferior da mandíbula vs. DMO (DEXA)	Nenhuma
Taguchi et al., 1996	Espessura do córtex inferior da mandíbula vs. DMO (vértebra L3)	Positiva
Drozdowska et al., 2002	Morfologia do córtex mandibular vs. estruturas periféricas (DEXA)	Nenhuma
Taguchi et al., 2004	Espessura córtex mandibular vs. questionário de avaliação osteoporótica e DMO (DEXA) vértebra	Positiva
F Yasar, F Akgunlu, 2006	Sinais orais vs. dimensão fractal IMC vs. idade (DEXA)	Positiva
Ishii et al., 2007	Perda óssea alveolar vs. espessura do córtex da mandíbula e DMO (DEXA) fêmur	Positiva
Nakamoto et al., 2008	Radiografias panorâmicas vs. erosão do córtex mandibular	Positiva

Em um estudo com 211 pacientes, Halling et al. (2005) demonstraram correlação entre o índice mandibular cortical e a DMO do calcâneo. O índice mandibular cortical é uma medida qualitativa desenvolvida por Klemetti, na qual se utiliza radiografias panorâmicas de mulheres na pós-menopausa, para a avaliação do grau de reabsorção da cortical inferior da base da mandíbula. Os pacientes com erosão acentuada na cortical possuíam DMO de calcâneo significativamente menor do que o grupo sem erosão ou com erosão moderada. De acordo com os autores, a chance de apresentar T escore abaixo de -1,5, na DMO de calcâneo foi 8,04 vezes maior no grupo com erosão acentuada na cortical. O estudo também demonstrou que pacientes com índice abaixo de dois com cortical normal ou com erosões moderadas, possuíam grande chance de apresentar densitometria normal.

Lee et al. (2005) analisaram radiografias panorâmicas e densitometrias ósseas da coluna e do colo femoral em 100 mulheres entre 50 e 84 anos. Considerando que a simples estimativa visual da espessura da cortical mandibular em radiografias panorâmicas poderia ser ferramenta auxiliar na identificação de mulheres na pós-menopausa com baixa densidade mineral óssea, os autores classificaram a cortical em fina e não-fina. Não houve diferença entre a estimativa visual e a mensuração da cortical. Deve ser ressaltado que os autores não consideraram a existência de estágio intermediário que pode ser correlacionado ao diagnóstico densitométrico de osteopenia.

A espessura da cortical mandibular abaixo do forame mental (Figura 4) também apresenta correlação com a DMO da coluna lombar e do fêmur proximal. Taguchi et al. (2006) mostraram que a utilização do índice mandibular cortical resulta a mais alta especificidade (65,6%) e a medida da espessura da cortical é o índice que apresenta a maior sensibilidade (90%) para a avaliação da morfologia da cortical. Os autores demonstraram que o índice mandibular cortical e o índice mental possuem eficácia diagnóstica comparável aos questionários auto-aplicáveis para identificação de mulheres com baixa densidade mineral óssea na coluna e no fêmur proximal, assim como para identificar mulheres com diagnóstico densitométrico de osteoporose. Em outro estudo no mesmo ano, Taguchi et al. preconizaram que os cirurgiões-dentistas deveriam encaminhar para a realização de densitometria óssea pacientes cujas radiografias

panorâmicas evidenciassem erosões extensas na cortical inferior da borda mandibular ou espessura cortical abaixo de 3 mm.

Novos estudos são necessários para verificar se esses índices podem também prever o risco de fraturas por osteoporose e elucidar se, em homens idosos, os índices radiomorfométricos possuem a mesma aplicabilidade que a observada em mulheres na pós-menopausa.

Deficiência de Estrógeno e Alterações Orais

Alterações na DMO podem afetar os ossos maxilares, de maneira a interferir no grau de reabsorção óssea, comprometendo assim a permanência dos dentes naturais e o uso de próteses. Além disto, deve-se considerar a oportunidade mais adequada para realização de intervenções cirúrgicas que envolvem a manipulação de tecido ósseo, como a fixação de implantes. A análise dos fatores de risco e as orientações aos pacientes são necessárias e podem, efetivamente, contribuir para a redução de possíveis complicações (KRIBBS et al., 1990; BECKER et al., 1997).

Alguns estudos sugerem que a deficiência de estrógeno afeta regiões maxilofaciais bem como ossos longos do corpo. Todavia, dentes implantados no osso alveolar transferem alta força oclusal para essa estrutura, tal realidade não ocorre em outros sítios do esqueleto, como por exemplo em ossos longos. Presume-se que esse estímulo mecânico pode induzir respostas diferenciadas nesta região. Deste modo, a redução de massa óssea oral tem sido correlacionada com o aumento do risco de perda óssea oral, o que acarretaria diretamente na estabilidade dentária (ASAI et. al., 2005).

Em diversos estudos animais, sobretudo em coelhos e ratos, tem se verificado reduções na espessura óssea cortical e na DMO mandibular decorrente da deficiência de hormônios sexual (CAO et al., 2001; YANG et al., 2005). Poucos estudos comparativos enfocam, porém, incidência da perda do osso alveolar e deficiência de estrógeno em mulheres (JEFFCOAT et al., 1993; BIRKENFELD et al., 1999). Não há consenso na maioria destes estudos no que se diz a respeito da associação entre osteoporose e perda óssea oral (TAGUCHI et al., 1999; HILDEBOLT, 2001; BODIC et al., 2005).

Mulheres na pós-menopausa apresentam uma série de alterações orais tais como: diminuição na produção do fluxo salivar, aumento do número de cáries e alterações no paladar (STRECKFUS et al., 1998). Mulheres sob restrição estrogênica com osteoporose e periodontite apresentam uma provável resposta exagerada frente a placa dental evidenciada por sangramento sob sondagem, perda na altura óssea dentoalveolar e redução da DMO da crista óssea. Além disso, essas mulheres podem experimentar perda precoce de dentes posteriores em resposta a grande redução de BMD (PAYNE et al., 1999).

Doença periodontal progressiva, reabsorção de osso alveolar, reabsorção endosteal do córtex inferior mandibular, alterações no padrão do trabeculado ósseo e a espessura da cortical mandibular são sinais clínicos e radiográficos que podem ser observados a partir da cavidade bucal. Estes dados, bem como, o número de dentes presentes podem sugerir a ocorrência de osteoporose, embora não haja um número estatístico que possa indicar tal ocorrência.

Estudos clínicos correlacionando DMO e doença periodontal tem apresentado resultados controversos. Alguns estudos sugerem ausência de associação significativa, outros têm demonstrado que uma baixa DMO correlacionada com uma reduzida altura de crista alveolar e maior perda de inserção periodontal (INAGAKI et al., 2001; MOHAMMAD et al., 2003).

A osteoporose é considerada fator de risco para distúrbios temporomandibulares e instabilidade dental devido reabsorções da crista alveolar. Em roedores devido o comportamento alimentar destes animais, o côndilo mandibular está continuamente sujeito a mecânica intermitente de cargas. Este esforço consistente provavelmente ativa a formação do osso da mandíbula do rato, que é apoiada por vários estudos que demonstram que o estímulo mecânico acelera a formação óssea (FROST, 1988). Ao contrário, Tanaka et al. (1999) avaliaram ratas ovariectomizadas verificando que a cirurgia inibiu o ganho ósseo da região central do côndilo mandibular já que o volume ósseo no grupo ovariectomizado foi significativamente menor do que no grupo controle.

Jeffcoat (1998) tem indicado que mulheres na pós-menopausa que se submeteram à terapia de reposição hormonal apresentam menor perda de inserção periodontal, demonstrando que o risco de perda dentária é atenuado na presença de terapia de reposição hormonal. Kribbs et al. (1990), ao analisarem

uma amostra de 112 mulheres entre 50 e 85 anos de idade, observaram que a população osteoporótica apresentou decréscimo da massa, densidade e espessura óssea, além de perda dentária, que foi maior do que na população normal. Resultados similares também foram encontrados por Von Wowern et al. (1994).

A possibilidade da identificação de sinais de osteoporose sistêmica nos ossos maxilares foi enfatizada por Stuart (1999), ao demonstrar que a osteoporose sistêmica pode levar à perda óssea bucal em determinadas regiões dos maxilares. Já a perda dentária na região posterior pode estar associada com a diminuição do nível ósseo e da DMO do osso alveolar, e esta última com a diminuição da DMO da vértebra lombar, havendo relação positiva entre a diminuição da massa óssea mandibular e os dentes perdidos (TAGUCHI et al., 1999). Segundo Krall (2001), a osteoporose e a osteopenia podem influenciar na doença periodontal e na perda dentária.

Earnshaw et al. (1998) analisaram uma amostra de 1.365 mulheres, entre 45 e 59 anos de idade, que foram submetidas ao exame físico para contagem de dentes remanescentes e ao exame de DMO da coluna lombar e da região proximal do fêmur. Não foi detectada relação significativa entre a quantidade de dentes e a DMO sistêmica. No entanto os autores chamam atenção para a baixa faixa etária das mulheres, que tinham recém entrado na menopausa.

Segundo Faine (1995), a correlação entre osteoporose e perda óssea maxilar não é forte, pois existem muitos fatores envolvidos nessa relação. A exodontia, a placa dentária, o fator ativador de osteoclastos, as prostaglandinas e o fator estimulador de reabsorção óssea são componentes que podem ter efeito importante na velocidade da reabsorção óssea.

Ao longo de sete anos, Krall et al. (2001), realizaram estudo longitudinal com 189 mulheres que não faziam terapia de reposição hormonal. A diminuição da massa óssea sistêmica estava associada com o aumento do risco da perda dentária, dando suporte à hipótese de que o aumento da perda óssea sistêmica pode ser um fator de risco para a perda dentária. Em outro estudo estes autores sugerem que a administração de cálcio e vitamina D ajuda a prevenir a osteoporose e tendo um efeito benéfico na retenção dentária.

Estudos realizados em modelos animais evidenciaram que o estado de pós-menopausa pode provocar grandes reabsorções nas cristas residuais durante o processo de cicatrização após extrações dentárias. Esse fato causa inadequados sites para instalações de próteses. A relação entre deficiência de estrogênio, e o sucesso da utilização de implantes é controverso. Pan et al. (2000) colaboradores estudaram o efeito da menopausa e a contínua osteointegração de implante em modelo animal e encontraram uma redução no volume de osso trabecular ao redor do implante e uma diminuição do contato dos implantes com o osso recém formado em comparação com animais não ovariectomizados.

3.3 MODELO ANIMAL PARA INVESTIGAÇÃO OSTEOPORÓTICA MANDIBULAR

A osteoporose é observada naturalmente em humanos e em primatas não humanos. Estes apresentam entre si o mesmo padrão de amadurecimento do esqueleto. Os principais aspectos incluem: a diminuição de massa óssea sistêmica semelhante aos humanos, a presença de sistemas orgânicos semelhantes, o fato das fêmeas destes animais apresentam ciclo mensal de 28 dias além de declínio da função ovariana e escassez menstrual na perimenopausa. Por exemplo, estudos com macacas mostram que o avanço da idade, pode ocasionar fraturas espontâneas nas vértebras desses animais. Entretanto, estudos com esses mamíferos de grande porte são caros e apresentam complicações éticas. (CERRONI et al., 2000; JEROME e PETERSON, 2001).

Osteoporose em humanos é definida como uma redução de DMO abaixo de 2.5 desvios padrão em relação ao adulto jovem normal (WHO, 1994). O uso desta definição para determinação de osteoporose em modelos animais é questionada por alguns autores desde que não há T score disponível para eles. Para estes autores, essa situação é melhor identificada em estudos longitudinais observando-se a diminuição de massa óssea, sem usar o termo osteoporose.

3.3.1 Indução de Osteoporose em Animais

A indução de osteoporose em animais é muito útil para a pesquisa de fármacos, avaliação de risco de fraturas e melhor entendimento das alterações metabólicas em diversos sites anatômicos. A indução promovida somente com

restrição dietética de cálcio e fósforo é rara e poucos estudos demonstram a presença de fraturas ligadas à osteoporose em animais neonatos alimentados com dietas modificadas. A reprodutibilidade desses estudos é questionada. Teófilo et al. (2003) observaram que quando se associa a ovariectomia à dieta pobre em cálcio, ocorre a diminuição da massa óssea após 5 semanas, 2 vezes maior na maxila do que na metáfise proximal da tíbia.

Drogas como glicocorticóides são conhecidas por alterarem metabolismo ósseo e induzirem osteoporose pelo decréscimo da formação e massa óssea. Sabe-se que osteoporose induzida por corticóides difere da osteoporose senil e na pós-menopausa. Parâmetros biomecânicos e histomorfométricos de metabolismo somente indicam um decréscimo na formação óssea e mínimas mudanças na reabsorção óssea. Por exemplo, para se estudar a fragilidade óssea e a fixação de implantes o modelo de indução com glicocorticóide é mais útil que outros modelos. Já que não se faz necessário reproduzir todos os aspectos da doença. A redução de DMO e competência biomecânica é mais pronunciada quando o esteróide está associado a ovariectomia. O uso prolongado desta substância pode afetar o sistema imune (LILL et al., 2002; SCHORLEMMER, et al., 2003).

O efeito da imobilização no osso tem sido estudado tanto no tecido trabecular como cortical. Muitos estudos relatam uma redução da mineralização e parâmetros histomorfométricos para osteoporose. No entanto, os resultados desses estudos não são comparáveis devido os diferentes métodos usados para a indução e diferentes períodos de imobilização. Ao contrário da osteoporose, a imobilização causa uma perda óssea local e não sistêmica, não sendo assim apropriada para simular osteoporose humana (YOUNG et al., 1986; DAMROGRUNGRUANG et al., 2004).

Ducy et al. (2000) mostram que existe um controle central de formação óssea que pode ser usado para a indução de osteoporose. Esta regulação envolve leptina e sistema nervoso simpático. Trata-se de um hormônio que controla peso, reprodução e remodelagem óssea após ligação com um receptor localizado no núcleo hipotalâmico. A ação da leptina na formação óssea é mediada via cascata de sinalização neural que envolve o sistema beta-

adrenérgico. A perda do gene codificador de leptina em camundongos leva a um aumento maciço de massa óssea.

Outro forte candidato envolvendo osteoporose é a melatonina secretada pela glândula pineal. Há evidências que a menopausa está associada com substancial declínio na secreção de melatonina e aumento na taxa de calcificação da pineal. Esse provável efeito causado pela melatonina está relacionado a uma baixa regulação de RANKL (receptor ativador de NF kappa- beta ligante) mediador da formação e ativação osteoclástica (KOYAMA et al., 2002)

Estudos em animais ovariectomizados indicam que tratamentos sistêmicos para a osteopenia influenciam tecidos orais e progressão das doenças dentais. Em modelos de depressão de estrógeno agentes antiresorptivos usados sozinhos no tratamento da osteopenia influenciam a taxa de formação óssea na superfície endosteal a periosteal da mandíbula similar ao observado em ossos longos. A administração intermitente de paratormônio em combinação com drogas antiresorptivas promove formação óssea na mandíbula e ossos longos (BAUMANN e WRONSKI, 1995; HUNZIKER et al., 2000)

3.3.2 Análise perda de massa óssea em animais

Egermann et al. (2005) realizaram levantamento comparativo entre diversos estudos envolvendo vários modelos animais avaliados por métodos diversos (Tabela 4). Segundo os autores não houve similaridade de resultados em relação à redução óssea realizada com mesmos métodos em diferentes animais. Provavelmente devido à diversidade de sítios estudados e ao carregamento mecânicos associado a diferentes estruturas.

Ovelhas ovariectomizadas apresentam padrão de turnover semelhante ao humano. Pesquisas com cadelas ovariectomizadas não revelam significativas diferenças quanto a perda óssea (Martin et al., 1987). Estudos para avaliação da condição osteometabólica em ratos devem levar em consideração que estes animais apresentam um padrão de modelagem da infância até a idade adulta enquanto os humanos mostram um padrão de modelagem no estágio de crescimento que muda para padrão de remodelagem depois da maturidade (FROST & JEE, 1992).

Tabela 4. Modelos animais para investigação de perda óssea

Referência	Animal	Indução	Sítio	Avaliação	Alterações ósseas
Martin et al., 1987	Cadela	OVX	Crista ilíaca	Histomorfo-metria	↑ turnover ósseo
Kiney et al., 2000	Rata	OVX	Vértebra Tíbia	Micro-CT e simulação	Alterações trabeculares
Cao et al., 2001	Coelho	OVX	Mandíbula	Micro-CT	↓ DMO e densidade trabecular
Fujita et al., 2001	Camundongo	OVX	Côndilo mandibular	Histomorfo-metria	↑ Condilar ↓ volume ósseo
Schorlemmer et al., 2003	Ovelha	OVX	Tíbia Vértebra lombar	pQCT Teste Bio-mecânico	↓ Qualidade e formação óssea
Asai et al., 2005	Macaca	OVX	Mandíbula	Análise radiográfica	Relação positiva entre espessura cortical
Anwar et al., 2007	Macaca	OVX	Septo 2º Molar Vértebras	Micro-CT	Danos entre as estruturas
Parck et al., 2007	Rata	OVX	Crista óssea alveolar	Micro-CT	Correlação entre doença periodontal osteoporose

OVX - ovariectomia

3.3.3 Ovariectomia e Distúrbios Orais em Ratas

A busca por modelos de animais ovariectomizados vem de encontro a necessidade de avaliações mais precisas da perda de massa óssea oral. Muitas discrepâncias são observadas nos estudos sobre distúrbios ósseos orais ligados a osteopenia devido a grande variedade de condições associadas ao estresse mecânico nos ossos mandibulares, tais como diferenças na dentição, patologias associadas e histórico de tratamentos dentais. Por outro lado, a sobreposição da imagem mandibular com as raízes dentais, vértebras cervicais e vias aéreas

complica os mensuramentos da densidade mineral oral em humanos usando imagens de raios-X ou densitométricas (VON WOWERN, 1985; MOHAJERY e BROOKS, 1988).

Segundo Frost e Jee (1992), os principais mecanismos biológicos responsáveis pelo ganho e perda de massa óssea durante o crescimento normal e na vida adulta, assim como na osteoporose, são os mesmos em ratos e humanos. De maneira similar às mulheres após a menopausa, ratas ovariectomizadas apresentam alterações na formação e reabsorção óssea, com um turnover (velocidade de remodelamento) aumentado resultando em perda de massa óssea (THOMPSON et al., 1995). Apesar da perda de DMO em ratos ser menor que em humanos, o mecanismo de desequilíbrio no turnover, com um aumento de reabsorção e diminuição da formação, frente a depleção estrogênica é semelhante ao visto em mulheres na pós-menopausa (THOMPSON et al., 1995).

Diversos estudos apontam ratas ovariectomizadas (OVX) como um modelo adequado para o estudo da osteoporose relacionada com tecidos osseos orais (Tabela 5). Após a cirurgia, esses animais mostram uma perda óssea bifásica, com uma inicial e rápida perda de massa óssea até 100 dias seguida de um período intermediário de relativa estabilização no volume ósseo em um nível osteopênico. Após 270 dias ocorre uma lenta fase de perda óssea durante o qual o volume de osso trabecular declina (WRONSKI et al., 1989).

No entanto, ratas OVX ainda não foram estabelecidas como um modelo para osteoporose nos maxilares. Estudos realizados com este modelo tem mostrado que a dureza mandibular é maior em ratas ovariectomizadas do que nas ratas do grupo controle. Estes resultados tem sugerido que a forma irregular desses ossos e a presença do incisivo com erupção contínua e as raízes dos molares no interior do corpo da mandíbula são as razões para os resultados incongruentes (KALU, 1991; ELOVIC et al., 1995). Esse modelo animal para estudo de osteoporose apresenta limitações como, por exemplo, ausência de sistema haversiano no osso cortical, ausência do comprometimento funcional dos osteoblastos em estágios tardios além de ausência de unidades multicelulares de remodelagem em ratos jovens (MILER e WRONSKI, 1993).

Tabela 5. Efeito da ovariectomia e deficiência de estrógeno na mandíbula de ratas Wistar

Referência	Sítio	Método de Análise	Conclusão
Tanaka et al., 1999	Côndilo	Histomorfo-metria	Perda óssea (subcondral condilar) influenciado pelo stress oclusal
Hunziker et al., 2000	Mandíbula Húmero	Histomorfo-metria	Efeito positivo da terapia
Kawamoto et al., 2001	1º Molar	Imunohisto-química	Osteoclastogênese e mudanças quantitativas no periodonto
Sakakura et al., 2001	Processo condilar e tíbia	Histologia Raios-X	↓ Turnover ósseo sem alteração da massa óssea
Yamashiro & Yamamoto, 2001	Mandíbula	Histomorfo-metria	↑ na movimentação dentária OVX pode afetar tratamento ortodôntico
Tanaka et al., 2002	Trabecular Volume ósseo alveolar	Histomorfo-metria	↓ do osso alveolar região distal
Lee et al., 2004	Vértebra Lombar Fêmur Tíbia	Espectrofotometria Arquimedes	Prevenção da perda óssea usando Isoflavona
Neto et al., 2006	Tíbia	Radiodensitometria Microscopia eletrônica	Alterações biomecânicas Fossas de reabsorção no grupo OVX
Duarte et al., 2006	Região de furca 1º Molar	Histomorfo-metria	Afeta negativamente densidade do osso de suporte

OVX- Ovariectomia

Yang et al. (2003) compararam as mandíbulas e tíbias de ratas confirmando a relação entre osteoporose sistêmica e perda óssea mandibular. Os autores utilizaram 24 ratas divididas em grupo ovariectomizadas e controle (SHAM), verificaram alterações no padrão trabecular de mandíbulas e tíbias esquerdas com diminuição do volume ósseo e aumento de espaço intertrabecular nas ratas OVX. Além disto, notaram alterações similares no padrão trabecular tanto da mandíbula quanto do osso longo analisado nos modelos osteoporóticos.

Elovic et al. (1995) estudaram o efeito da ovariectomia em ratas adultas e idosas por meio de densitometria óssea e testes mecânico na mandíbula, a ovariectomia levou a uma diminuição de 8% na área de fração óssea da mandíbula de ratas idosas. A rigidez óssea caiu 20% e a fração de área óssea caiu 7% na mandíbula se comparado o grupo OVX em relação a ratas OVX idosas. Embora estudos clínicos não tenham sugerido que a osteoporose é um fator de risco para o insucesso dos implantes, estudos em ratas ovariectomizadas praticamente demonstram que a deficiência de estrógeno ocasiona menor área de contato com os implantes interferindo no êxito final do procedimento cirúrgico (WRONSKI et al., 1989; DAO et al., 1993).

3.4 ANÁLISE DA MICROARQUITETURA DO TECIDO ÓSSEO

A análise óssea está diretamente envolvida na possibilidade de se prever fraturas ligadas a osteoporose, visando essa possibilidade, várias técnicas tem sido desenvolvidas para avaliação da qualidade do osso, seja pela medida da DMO ou pela avaliação da microestrutura trabecular. Durante décadas, o estudo da osteoporose restringiu-se à perda de massa óssea, contudo, com o avanço das pesquisas nesta área do conhecimento percebeu-se a importância da participação das alterações da microarquitetura no ciclo de remodelagem óssea e seu envolvimento no quadro osteoporótico. Por um longo tempo este tipo de análise foi determinado usando-se métodos esteriológicos a partir de imagens 2D de análises histológicas.

A histologia oferece a análise de aspectos tais como superfície não mineralizada de osteóides, contagem de células e a taxa de formação óssea através dos níveis de fluorescência. Essa técnica acarreta, porém, na destruição da amostra. Já a histomorfometria é uma técnica padrão de avaliação da microarquitetura óssea que apresenta, contudo, desvantagens no que se refere ao consumo de tempo, o fato de ser invasiva e sujeita a artefatos durante a preparação. Por ser embebida em metilmetacrilato a amostra submetida a histomorfometria é impossibilitada de ser utilizada em testes biomecânicos (UCHIYAMA et al., 1999) .

Geralmente a estrutura 3D do tecido ósseo é inferida indiretamente pela histomorfometria e estereologia, em um limitado número de sessões 2D baseadas em modelos paralelos. Entre os principais parâmetros investigados estão: Volume ósseo, espessura trabecular, separação trabecular e número de trabéculas. Durante o envelhecimento e em doenças tais como osteoporose trabéculas ósseas são perfuradas e a conectividade entre elas é parcialmente dissolvida (UCHYAMA et al., 1997).

Yamashiro e Yamamoto (2001) realizaram estudo com ratas ovariectomizadas onde os parâmetros histomorfométricos foram utilizados para avaliar a movimentação dentária nesses animais correlacionando-a com a movimentação ortodônticos observada em humanos. Os achados sugerem que a deficiência de estrógeno provoca uma aceleração da movimentação dentária o que pode refletir negativamente no prognóstico desse tipo de tratamento dentário.

Segundo Iida (2002), a tomografia computadorizada quantitativa (QCT) oferece muitas oportunidades para a investigação da biomecânica do osso porque determina alguns indicadores das propriedades ósseas para resistência, massa óssea e qualidade mecânica. A pQCT (tomografia computadorizada quantitativa periférica) foi desenvolvida para pequenos campos sendo uma extensão da QCT e pode ser útil para estudos em animais bem como para uso clínico humano. A DEXA não pode separar compartimentos trabeculares e corticais e Micro-CT não pode determinar valores de densidade óssea.

Outro método utilizado para mensuramentos ósseos é a biópsia virtual, na qual por meio da imagem obtida por ressonância magnética (RM), se consegue visualizar a parte microscópica do osso, captar medidas, espessuras e capacidade de entrelaçamento das trabéculas. A coleta desses dados dá ensejo a uma simulação de testes de parâmetros sobre a qualidade do osso, contando com a ajuda do computador (BODIC et al., 2005).

A ultra-sonometria óssea é uma técnica que oferece uma medida indireta da anisotropia e qualidade óssea, é um método realizado, sobretudo, nos ossos periféricos (calcâneo, patela e tíbia). Consiste em medir a velocidade de propagação e atenuação do som no osso analisado que se altera linearmente de acordo com o alinhamento trabecular e conectividade do osso. Apesar de apresentar baixo custo tem limitações na acurácia. Ross (1990) e outros autores

mostraram que os valores obtidos por ultra-sonometria óssea são semelhantes aos observados para a densitometria óssea de coluna lombar e quadril, sugerindo que, nesses casos, a técnica avalia o risco de fratura com a mesma eficiência que a densitometria óssea (CASTRO et al., 2000).

Muitos parâmetros relacionados com a arquitetura do tecido ósseo trabecular tem sido propostos para analisar a qualidade óssea e assim prever o risco de fraturas, para muitos deste não é muito clara relação de suas propriedades mecânicas e o risco de fraturas. A anisotropia do osso trabecular parece um dos melhores parâmetros a ser utilizado neste tipo de análise, devido a relação entre a fragilidade estrutural em relação a direção do carregamento mecânico (CIARELLI et al., 2000; HOMMINGA et al., 2004).

O uso de imagens médicas para a análise da estrutura óssea apresenta inúmeras vantagens. São métodos imparciais, abeis no mensuramento da estrutura tridimensional das trabéculas, sua conectividade e orientações arbitrárias, o método pode ser completamente automatizado e dispensa métodos específicos para preparação das amostras. Além disto, pode-se usar um grande número de amostras e, portanto diminuir erros de amostragem. Atualmente modelos biomecânicos gerados por meio de imagem médicas, permitem múltiplas simulações sem destruir as amostras ósseas permitindo assim a redução do número de animais utilizados. Estes métodos requerem potentes algoritmos de processamento para a segmentação, reconstrução e quantificação da estrutura óssea.

Rodrigues (2003) realizou pesquisa avaliando o osso calcâneo de 11 cadáveres com a finalidade de analisar o potencial preditivo da ultrasonometria no risco de fratura osteoporótica. Neste estudo a microscopia eletrônica de varredura foi utilizada como teste complementar para identificar modificações na microarquitetura das amostras de ossos saudáveis e osteopênicos (Figuras 6a e b) Segundo as avaliações a técnica de ultrasonometria mostrou-se útil como método indireto de averiguação de determinantes do risco de fratura, correlacionando-se com parâmetros biomecânicos tais como, a tensão máxima suportada pelo material durante ensaios de compressão.

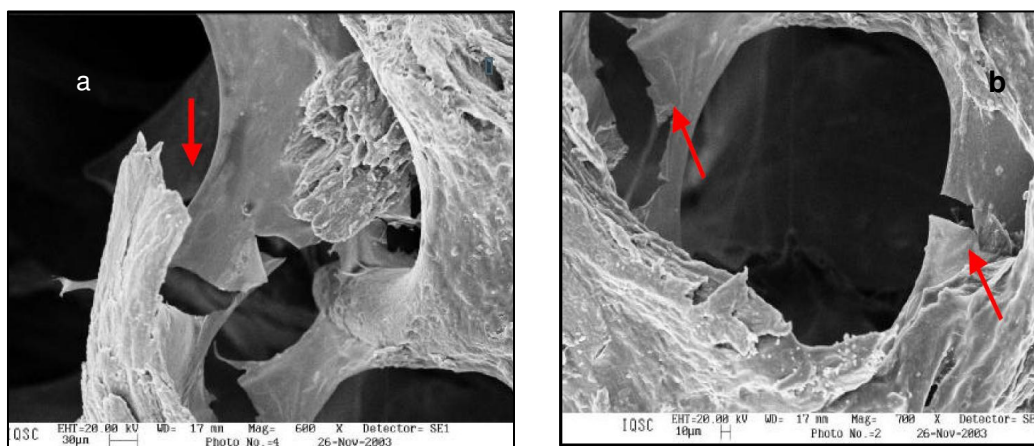


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura do osso trabecular de um calcânhar humano osteopênico. a) Trabécula individual totalmente fraturada e desconectada da rede trabecular (600X). b) Aspecto de trincas formadas nas bordas dos poros (700X). Fonte: Rodrigues (2003)

Por outro lado, o uso de imagens médicas na análise óssea não provem informações sobre a atividade celular ou sobre a dinâmica do processo de mineralização. Ao invés de substituir histomorfometria estas técnicas podem complementar a avaliação na osteoporose e outras desordens ósseas. A escolha da região de interesse (ROI) é importante porque leva a necessidade de escolha de um algoritmo adequado para cada tipo de análise (JIANG, et al., 2000).

Segundo Ding et al. (2002), o desenvolvimento de técnicas tridimensionais permite a utilização de apurados modelos quantificação da propriedades microestruturais do osso trabecular. Em alguns casos o próprio remodelamento ósseo leva à perfuração das placas trabeculares e a conectividade entre as hastes ósseas é dissolvida. As características de importância fundamental para a descrição da microarquitetura normal do tecido ósseo são: Fração de volume ósseo, tipo de estrutura, anisotropia arquitetural, conectividade e espessura trabecular.

A tomografia computadorizada tem sido usada desde 1973 como uma versátil técnica de investigação não-invasiva do tecido ósseo. A tomografia microcomputadorizada (Micro-CT) é uma versão miniaturizada desta técnica anterior, e por muito tempo, vem sendo utilizada na área de pesquisa de materiais. Na pesquisa óssea esta técnica é especialmente útil na visualização

macro e micro estrutura óssea, sem provocar danos a amostra. A Micro-CT é bastante utilizada na investigação da perda de osso trabecular em pacientes osteoporóticos ou em modelos animais de osteoporose (DAVIS e WONG, 1996; PARK et al., 2007).

Nesta técnica, as imagens ósseas são segmentadas e representadas por meio de voxels. Os valores de cinza de cada voxel representam o coeficiente de atenuação em unidades Hounsfield em imagens binárias do que representa osso e não-osso. Para se otimizar essa questão deve-se usar um valor global de *threshold*. Em outras palavras, para cada voxel do conjunto de dados é necessária uma decisão a ser feita se um voxel representa tecido osso outro tecido. Quando as imagens possuem baixa qualidade a definição de *threshold* é mais difícil de ser determinada (WAARSING et al., 2004; 2005).

A Micro-CT pode ser utilizada para acompanhar mudanças na arquitetura do osso trabecular durante o envelhecimento ou restrição de estrógeno. Por meio desta técnica, pode-se avaliar importantes parâmetros como fração de volume ósseo, espessura trabecular, curvatura de Gause e dimensão fractal (RUTTIMANN et al., 1992). Visto que a própria definição de qualidade óssea é um assunto de alta complexidade, é necessária, a padronização de critérios para se avaliar o que realmente pode ser útil para a avaliação da qualidade óssea e prever possíveis riscos de fraturas (JIANG et al., 2000). No entanto Libouban et al. (2001) avalia que a Micro-CT associado à histomorfometria contribui para o estudo do remodelamento ósseo e questões estruturais do tecido ósseo .

Uchiyama et al. (1997) realizaram um estudo comparativo entre o uso de Micro-CT e histomorfometria na avaliação da estrutura trabecular do íleo humano. Os resultados deste estudo indicam uma boa entre os parâmetros investigados pelos dois métodos concluíram, porém, que o Micro-CT não permite a avaliação de dinâmica do osso tal como taxa de aposição óssea, formação, reabsorção ou reparação de superfícies ósseas. A Micro-CT não possibilita ainda a análise tecidual da arquitetura do colágeno ou fibrose medular. Por outro lado a Micro-CT é uma técnica mais rápida, simples e menos destrutiva de reprodução da microarquitetura óssea. Visto que no presente estudo foi realizada a análise de imagens obtidas por Micro-Ct uma descrição detalhada da técnica é fornecida no capítulo de materiais e métodos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Dezoito ratas da linhagem Wistar, apresentado $160 \pm 29,0$ g de peso corpóreo, com 90 dias de idade foram adquiridos no Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos no Biotério da Universidade Estadual do Ceará (UECE). O protocolo usado para esse procedimento experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para uso de animais CEUA/UECE, nº 08387130-6 (Anexo A). Os animais foram randomicamente distribuídos em três grupos (n=6): grupo controle (SHAM), ovariectomizadas e sacrificadas após 30 (OVX30) e 60 (OVX60) dias após o procedimento cirúrgico (Figura 7).

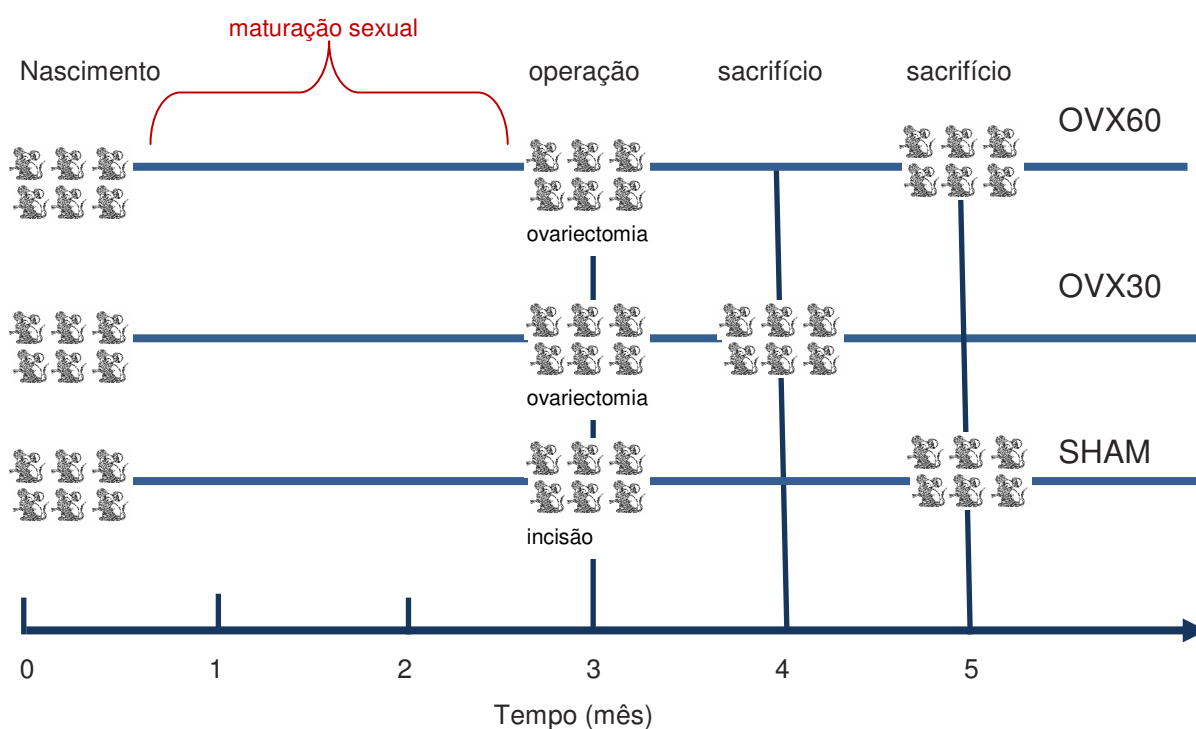


Figura 7. Descrição esquemática da distribuição dos animais utilizados nesse estudo.

4.1 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS PARA INDUÇÃO DE OSTEOPENIA

O modelo animal desenvolvido nesse estudo para avaliação da perda óssea oral foi baseado no protocolo desenvolvido por RODRIGUES e CERQUEIRA (2001), YAMASHIRO e YAMAMOTO (2001), TAGUCHI (2004), NETO et al. (2006); ORRICO et al. (2007), com implementações de algumas modificações que serão descritas nesse capítulo.

Com a finalidade de comprovação da maturidade sexual das ratas foi realizado esfregaço vaginal antes da realização da ovariectomia, através do método de Shorr (NETO et al., 2006), com a finalidade de confirmação da maturidade sexual das fêmeas (idade adulta). Um dos critérios propostos para modelos animais em osteoporose é que o animal apresente ciclos sexuais estrais. A rata sexualmente madura apresenta este ciclo dividido em quatro períodos distintos com características próprias: Proestro, estro, metaestro e diestro. Faz-se necessário a identificação citológica das características do período de estro (presença de células anucleadas, com corneificação completa) que é seguido por espessamento vaginal. Este período corresponde à etapa de ovulação do animal (MOREIRA et al., 2005). Todas as ratas foram submetidas à citologia vaginal esfoliativa, com escovinhas de endocérvice embebidas em solução de soro fisiológico, em seguida o conteúdo espalhado em lâmina, e logo submersa em álcool absoluto para fixação. Sendo encaminhadas para caracterização do ciclo estral.

Ante do procedimento cirúrgico, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina 50 mg/Kg (Ketamina Agener União, São Paulo, SP, Brasil) e Xylazina 10 mg/Kg (Rompum Bayer, São Paulo, SP, Brasil), administradas por via intraperitoneal (HUNZIKER et al., 2000). Iniciando-se o procedimento cirúrgico, por meio de acesso dorsal por uma incisão de 1 cm, procedeu-se a remoção bilateral dos ovários (Figura 8 a-d) como descrito por Kalu (1991). Após a localização e exteriorização dos ovários, a retirada dos mesmos foi realizada após ligadura da extremidade da tuba uterina com fio reabsorvível catigut 2.0, seccionando-se a seguir entre a ligadura e o ovário procedendo-se a seguir a sua excisão e remoção. No caso das cirurgias realizadas no grupo SHAM, os ovários das ratas foram exteriorizados, mas não removidos, sendo assim novamente reposicionados na cavidade intraperitoneal, em sua posição original simulando-se deste modo o stress cirúrgico.

Após as cirurgias, as ratas foram mantidas em gaiolas acrílicas individuais à temperatura ambiente de $24 \pm 1^{\circ}$ C, em um ciclo de 12 horas claro-escuro. Durante o período do experimento, os animais foram alimentados com uma dieta comercial padrão (LABINAPURINA / Agribrands do Brasil LTDA) e água *ad libitum*. Nenhum fármaco foi administrado no período pós-operatório. O ganho de

peso dos animais foi monitorado uma vez por semana durante o período do estudo. As ratas foram sacrificadas por decapitação sob anestesia profunda usando-se Ketamina/Xilasina

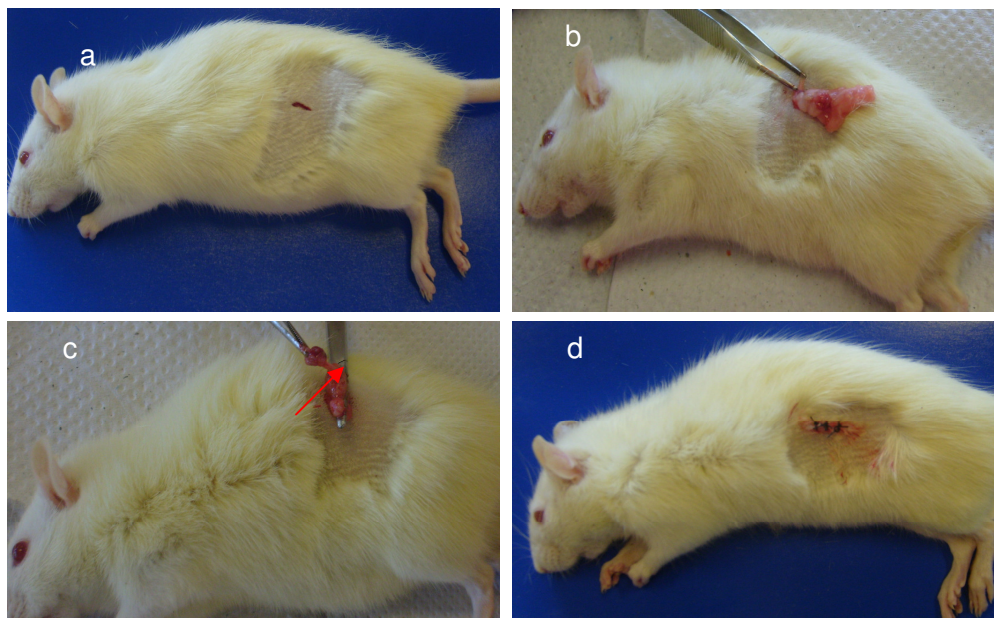


FIGURA 8. Ilustração fotográfica do procedimento cirúrgico de ovariectomia bilateral em ratas wistar realizados nos grupos OVX30 e OVX60. Remoção do ovário esquerdo. a) Local da incisão cirúrgica lateralmente à linha mediana (1 cm), b) Localização do ovário em meio ao tecido adiposo, c) Exposição e excisão do ovário, d) Sutura externa. No grupo SHAM foram realizados todos os passos acima descritos menos a excisão do ovário.

4.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A análise de marcadores bioquímicos juntamente com a utilização de métodos de imagens desempenha importante papel na avaliação e diagnóstico diferencial de doenças osteometabólicas. Algumas substâncias produzidas por osteoblastos (fosfatase alcalina, osteocalcina) e osteoclastos (fosfatase ácida tartarato-resistente e catepsinas) são utilizadas como marcadores bioquímicos para investigação da modelagem e remodelagem óssea (SEIBEL, 2006; LELOVAS et al., 2008). Neste estudo realizou-se a dosagem dos níveis de fosfatase alcalina, enquanto marcador de remodelagem óssea, e dos níveis de cálcio sérico, estradiol e progesterona nos três grupos: SHAM, OVX30, OVX60. A coleta de sangue foi realizada via plexo orbital momentos antes do sacrifício e sob anestesia como anteriormente descrito.

A determinação do estradiol sérico e progesterona foi realizada por quimioluminescência (ADVIA Centaur®). O cálcio sérico e a fosfatase alcalina foram analisados por método colorimétrico (Lab Max 240- Lab Test). Todas as análises foram realizadas no Laboratório Dr. Edilson Gurgel, Fortaleza-Ce.

4.3 EXTRAÇÃO E PREPARAÇÃO DOS TECIDOS ÓSSEOS

Este estudo realizou uma análise óssea usando microtomografia computadorizada e radiografias de mandíbula e fêmur. O fêmur é reconhecido na literatura como sítio submetido à grande remodelagem sob alterações endócrinas. Este estudo realizou uma análise óssea comparativa utilizando-se microtomografia computadorizada e radiografias. O fêmur foi utilizado como um controle para a avaliação do efeito da restrição estrogênica no osso mandibular (BERNES et al., 2001; STECHOW et al., 2003). Os fêmures e mandíbulas (esquerdo e direito) foram extraídos, sendo removida cuidadosamente a maior quantidade possível de tecido mole. Neste estudo, não foram realizados testes biomecânicos dispensando assim maiores cuidados com a conservação dos tecidos. As amostras foram congeladas sem nenhum tipo de conservante a -20°C até o momento da realização da obtenção das imagens.

4.4 MICRO-CT: SEGMENTAÇÃO E RECONSTRUÇÃO DE IMAGENS DAS MANDÍBULAS E FÊMURES

A obtenção, segmentação e reconstrução das imagens dos tecidos ósseos das ratas utilizadas para a realização de medidas lineares e volumétricas seguiram uma série de procedimentos (Figura 9). Estes procedimentos foram realizados no Instituto de Pesquisas Ortopédicas e Biomecânicas da Universidade de Ulm, Ulm, Alemanha.

As imagens bidimensionais obtidas nos planos axial, sagital e frontal foram utilizadas para a produção de imagens tridimensionais. Para esta etapa foi utilizado software específico para manipulação e análises de imagem.

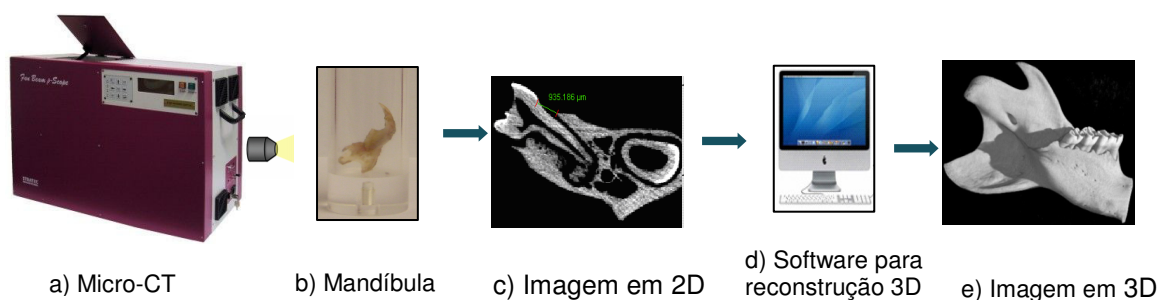


Figura 9 Procedimentos realizados para a obtenção das imagens em 3D das mandíbulas e fêmures por Micro-CT (aqui representada a mandíbula). a) Equipamento de Micro-Ct b) As amostras da mandíbula exposta a radiação em plataforma giratória, c) Imagem em 2-D da estrutura óssea submetida a radiação e d) Um software específico é usado para reconstrução de imagens, e) Imagem 3D da mandíbula reconstruída.

4.4.1 Preparo das amostras para microtomografia

Cada amostra foi retirada previamente da temperatura de -20° cerca de três a quatro horas antes da realização da obtenção das imagens. As amostras foram acondicionadas neste período em câmara refrigerada especialmente adaptada para o ajuste de temperatura. Para o acondicionamento da amostra no equipamento de Micro-CT foi usado um recipiente cilíndrico em acrílico (Figura 10).

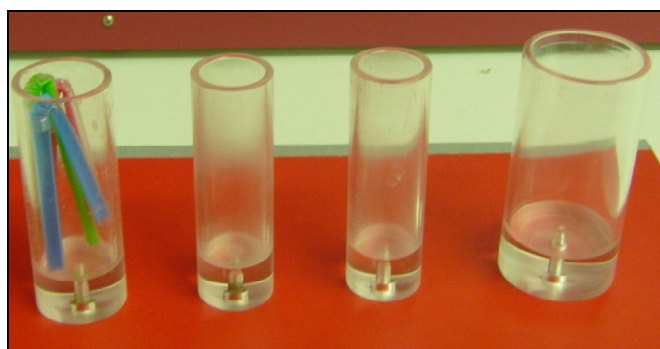


Figura 10. Recipientes em acrílico usados para a acomodação de amostras para realização da Micro-CT. Pequenas hastes plásticas podem ser utilizadas para evitar trepidações durante os movimentos da plataforma o que provocariam distorções nas imagens obtidas após o escaneamento.

Deve-se observar a correlação entre altura e diâmetros do recipiente utilizado já que variações nestes parâmetros provocavam erros capazes de abortar a operação de escaneamento, tornando impossível o ajuste da resolução desejada. A base do recipiente é encaixada na plataforma giratória do equipamento de Micro-CT. Para evitar o deslocamento da amostra durante o escaneamento pode-se utilizar hastes plásticas ou gaze de modo a se garantir a estabilidade das mandíbulas e fêmures.

4.4.2 Obtenção de imagens por micro-ct

As amostras dos diferentes grupos foram colocadas individualmente nos recipientes sempre respeitando o mesmo posicionamento. A região de interesse (ROI) escolhida na mandíbula foi a região de segundo molar direito. Em relação ao fêmur, foram analisadas as região de epífise e metáfise proximal. As mandíbulas foram posicionadas com o incisivo voltado para cima (Figura 11a), no caso dos fêmures, a epífise distal foi posicionada para baixo. Cada amostra foi envolvida em gaze saturada com formalina a 10% (Figura 11b). Esse procedimento visou à conservação do tecido ósseo, já que período de cada escaneamento variou entre 4 a 9 horas dependendo do tamanho da amostra.



Figura 11. Posicionamento da amostra para escaneamento no equipamento de Micro-CT (a foto mostra uma mandíbula). a) Posicionamento da mandíbula no interior do recipiente em acrílico, b) Amostra posicionada na plataforma giratória dentro do equipamento de Micro-CT.

Mandíbulas e fêmures direitos foram escaneados sob resolução de 40 μm , usando o equipamento de Micro-CT FanBeam μ -Scope System (Stratec, Pforzheim, Alemanha) operando sob pico de voltagem de 40kV e amperagem de

140 μ A. Durante essa fase de posicionamento e definição da região de interesse é possível visualizar a amostra completa (Figura 12).

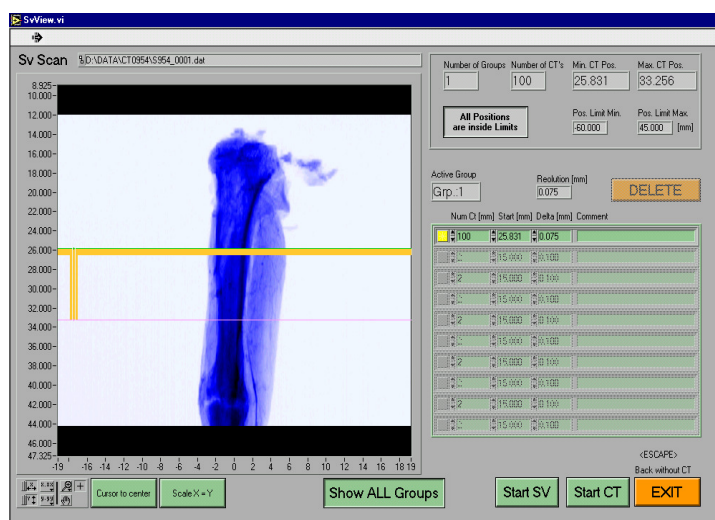


Figura 12. Tela inicial do processo de escaneamento da amostra (fêmur) em aparelho de Micro-CT.

A segmentação e reconstrução tridimensional das imagens foram realizadas utilizando-se o software de imagens 3D VG Studio Max 1.0 (Volume graphics, Heidelberg, Alemanha). Para a obtenção das imagens tridimensionais (3D), foram manipulados inúmeros parâmetros tais como: propriedades do objeto, renderização, intensidade de luz, bem como histogramas de escala de cinza, através dos quais foi realizada a classificação do tipo de tecido a ser reconstruído. Neste estudo a representação de tecido mole foi desprezada. Para cada imagem 3D reconstruída (Figura 13d), foram utilizadas 450 ± 60 imagens 2D que podem ser individualmente visualizadas nos planos axial, sagital e frontal (Figura 13).

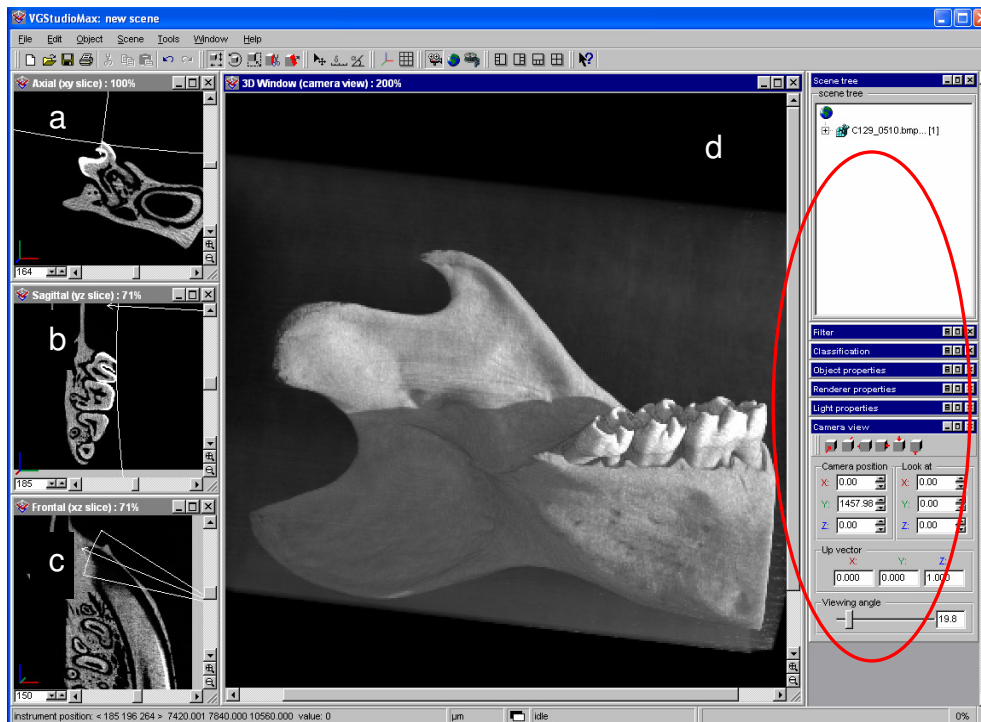


Figura 13. Reconstrução em 3D da mandíbula de rata wistar. Foi utilizando o software de imagens VG Studio Max 1.0 para a reconstrução de imagens bidimensionais nos planos axial (a), sagital (b) e frontal (c). No círculo vermelho tem-se a representação dos parâmetros manipulados para a obtenção da imagem reconstruída em 3D, d) Imagem 3D da mandíbula

A (ROI) selecionada para o mensuramento do volume ósseo e da perda óssea vertical das cristas ósseas na mandíbula foi a região de segundo molar inferior direito (Figura 14). Outras áreas mandibulares foram excluídas pela dificuldade no que se refere ao número e disposição de raízes, bem como, pelo carregamento mecânico envolvido

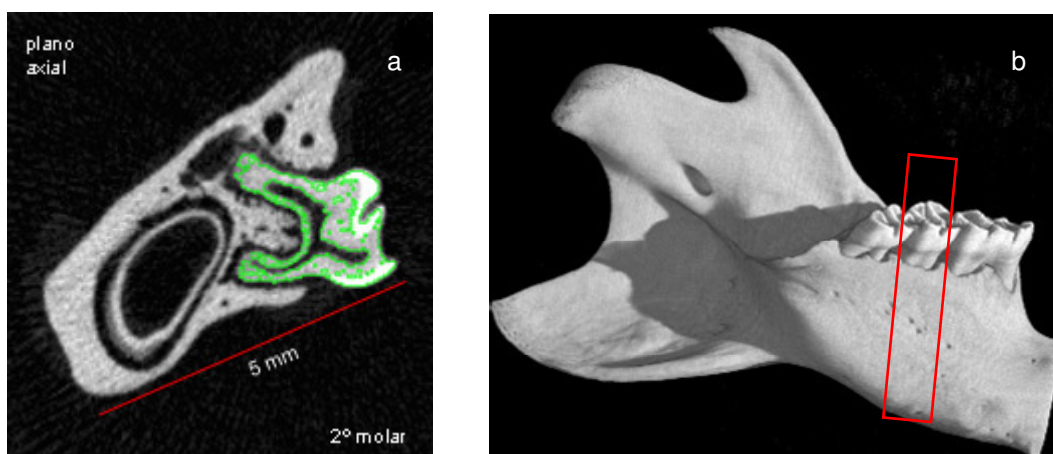


Figura 14. Localização da região de interesse (ROI) na mandíbula de rata Wistar para a realização de medidas lineares da perda óssea vertical ao nível de crista óssea. a) Imagem bidimensional no plano axial da região de 2º molar inferior direito (ROI). b) Imagem tridimensional ressaltando a ROI.

4.4.3 Medidas lineares da perda óssea alveolar

Vários parâmetros mandibulares foram considerados para a o cálculo das medidas lineares da perda óssea alveolar em cada grupo (SHAM, OVX30, OVX60) (Tabela 6). A representação destes parâmetros pode ser observada na figura 15b.

Tabela 6. Parâmetros mandibulares usados para obtenção de medidas lineares

Parâmetros	Abreviatura
Junção Cimento-Esmalte	JCE
Crista Óssea Alveolar	COA
Medidas de Comprimento	CR
Ápice radicular	AR
Mesial	m
Distal	d

As raízes do 2º molar direito foram consideradas para realização das medidas lineares. A Raiz mesial (Rm) é a raiz que se encontra mais próxima da linha mediana que passa entre os dentes incisivos da rata, e raiz distal (Rd) é aquela mais afastada desta linha (Figura 15a).

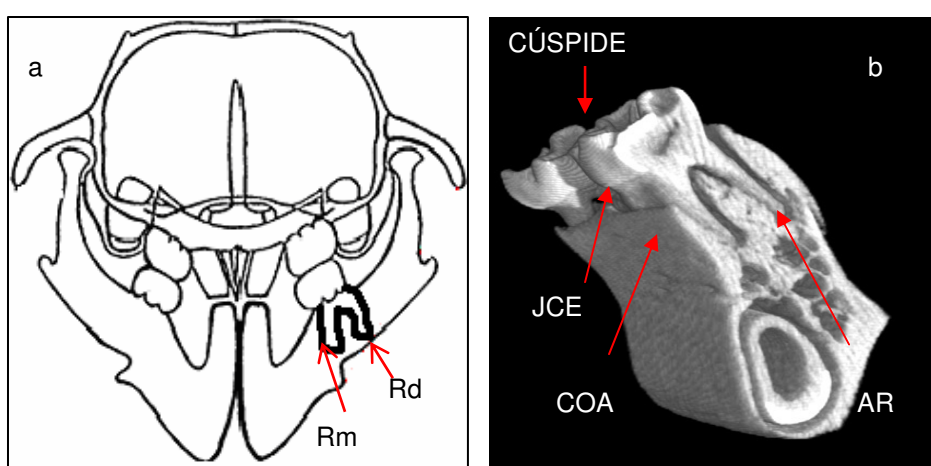


Figura 15. Localização das medidas lineares de perda óssea vertical na mandíbula. Esquema de RODRIGUES & CERQUEIRA, 2001, com modificações. a) Localização das raízes mesial (Rm) e distal (Rd) na mandíbula de rato Wistar, b) Descrição das partes anatômicas do 2º molar inferior direito: Junção cimento-esmalte (JCE), Crista óssea alveolar (COA), e Ápice radicular (AR).

As medidas da perda óssea alveolar (em mm) foram realizadas diretamente nas imagens bidimensionais (2D), considerando-se a ROI e utilizando-se uma ferramenta do software de Imagens VGstudio Max 1.0. apropriada para esse fim. A acuraria destas medidas foi alcançada por meio de observação dos mensuramentos nos planos axial, frontal e sagital (Figura 16a). As medidas fornecidas poderão ser observadas na imagem 3D correspondente (Figura 16b).

Medidas lineares foram tomadas da junção cimento-esmalte (JCE) até a crista óssea alveolar (COA) na altura das raízes mesial e distal. Para verificar a percentagem de perda óssea alveolar, foram tomadas as medidas das alturas das raízes medidas da COA ao ápice radicular (Ar) de cada raiz.

Foram realizados cortes na imagem 3D para verificar a precisão do método escolhido observando-se a medida ao nível de ápice radicular (AR) (Figura 17). Todas as imagens foram orientadas de tal modo que a JCE e o AR aparecessem em todas as fatias de micro-CT a serem analisadas.

As medidas foram realizadas duas vezes em cada sítio por dois examinadores independentes. Depois de 24 horas a distância linear da medição foi repetida por ambos examinadores para avaliação intra e inter variabilidade dos examinadores.

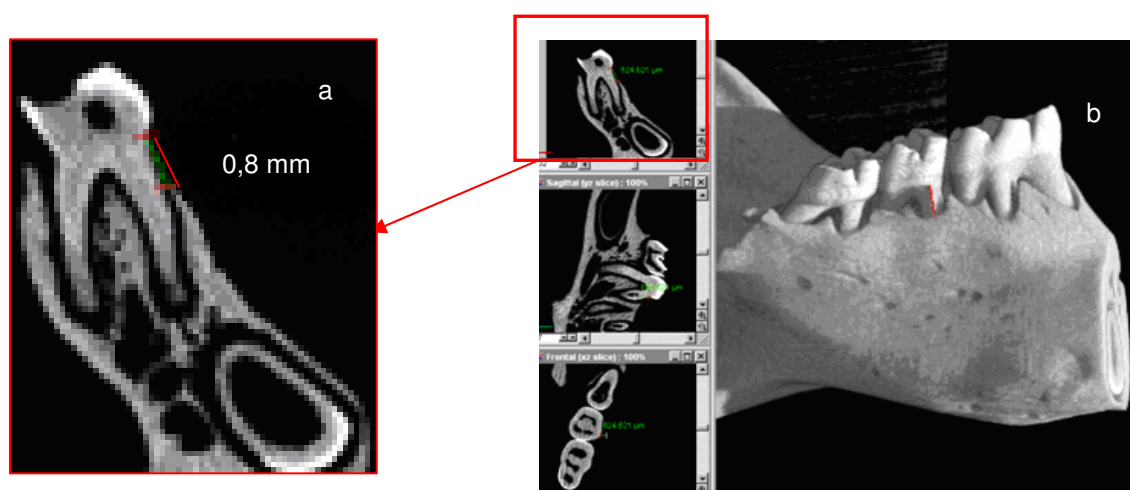


Figura 16. Medida linear para verificação da perda óssea vertical na mandíbula. A medida foi realizada da junção cimento-esmalte até crista óssea alveolar em 2º molar inferior direito de rata wistar ovariectomizada. a) Medidas lineares realizadas em milímetros em imagem 2D (axial). b) Medida linear automaticamente projetada na imagem 3D a partir do mensuramento realizado em 2D. Imagem obtida por Micro-CT.

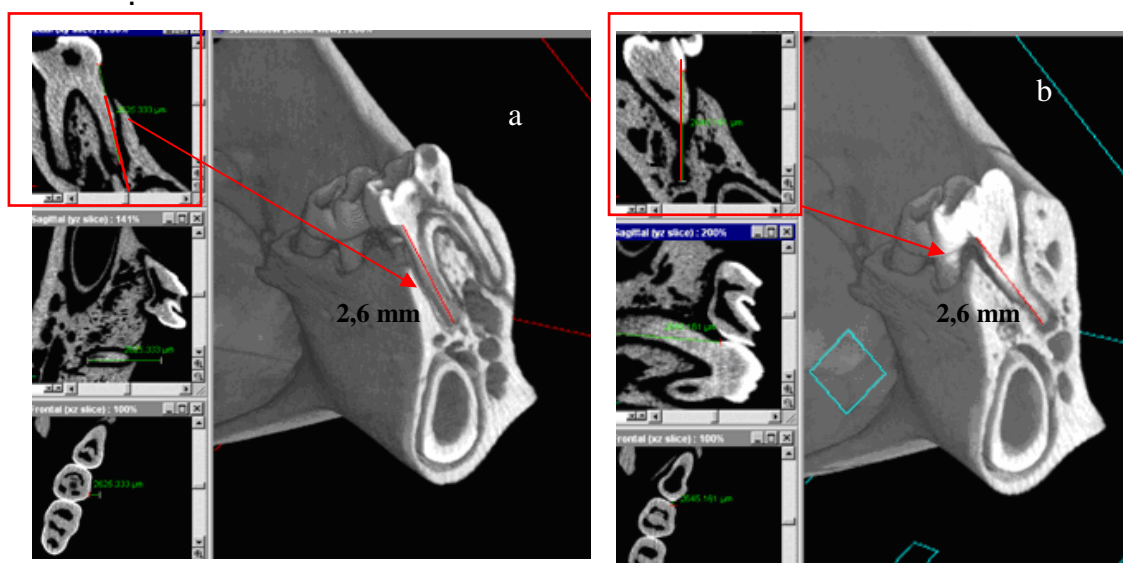


Figura 17. Medidas de comprimento para cada raiz (CR). As medidas foram obtidas da junção cimento-esmalte (JCE) até o ápice radicular (AR). As medidas foram obtidas em milímetros para avaliar a percentagem vertical de osso remanescente. Imagem obtida por Micro-CT.

4.4.4 Medidas volumétricas do osso alveolar

As medidas ósseas volumétricas foram realizadas de modo a garantir a repetibilidade do processo. Dois examinadores foram guiados por marcos morfológicos enquanto delimitavam ROI, marcos artificiais poderiam ter sido colocados antes para escaneamento de imagens, foi mais conveniente e mais reprodutível, porém, a utilização de recursos morfológicos. A raiz mesial do 2º molar inferior direito e a raiz distal da mesma unidade dentária serviram de pontos finais para a ROI.

Apesar de alguns estudos preferirem delinear a ROI com ferramentas específicas para esse propósito (ANWAR et al., 2007), no presente estudo, preferiu-se proceder o corte das estruturas laterais delimitando a ROI evitando-se assim maiores variações. Esse procedimento foi realizado selecionando-se entre o total de fatias escaneadas aquelas correspondentes ao 2º molar, cujas imagens foram observadas e comprovadas nas fatias bidimensionais axial, sagital e frontal.

Seguiu-se então a reconstrução 3D para a realização dos mensuramento do volume ósseo.

Por meio de segmentação foi possível diferenciar voxels que correspondem a diferentes tecidos, tais como, tecido ósseo, esmalte, dentina e tecidos moles; existiam também voxels que não representavam tecidos e sim outras substâncias como água ou ar. Durante a segmentação estes voxels foram descartados. Quando necessário foi realizada uma segunda segmentação para separar os eventuais voxels que não foram localizados na primeira etapa do processo (Figura 18). Voxels mais claros significam alta quantidade de cálcio (alta densidade óssea), os voxels escuros representam tecidos moles ou menor quantidade de cálcio.

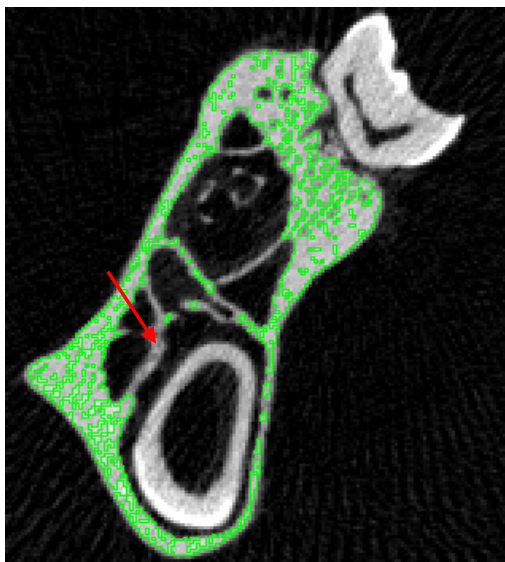


Figura 18. Detalhe do processo de segmentação do osso alveolar para obtenção do volume ósseo. Correção manual envolvendo voxels que escaparam da segmentação automática (seta vermelha).

Para obtenção do volume ósseo foram eliminados pelo processo de segmentação a coroa e raiz dentária do segundo molar inferior, bem como a raiz do incisivo que passa por baixo desta unidade dentária. Para esse processo escolheu-se o *threshold* que determinou e diferenciou o tecido ósseo dos demais materiais (Figura 19), procedeu-se a partir de então a correção manual de pixels

em cada fatia 2D (Figura 18) para a seguir obter-se a reconstrução 3D do osso remanescente sem a unidade dentária (Figura 20).

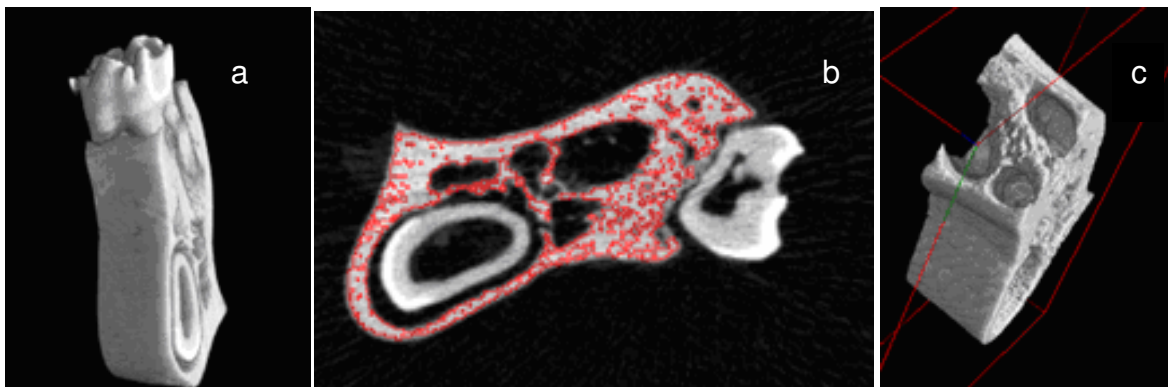


Figura 19. Processo de segmentação de imagem de 2º molar para mensuramento do volume ósseo. a) Região de interesse, b) Detalhes do processo de segmentação na imagem 2D no plano axial, c) Estrutura óssea sem material dentário pronta para quantificação.

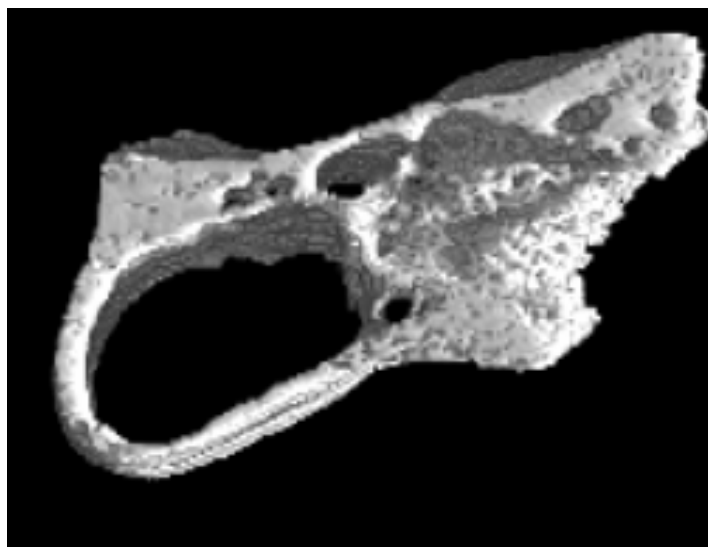


Figura 20. Reconstrução 3D do osso alveolar realizada a partir de imagem de Micro-Ct. As imagem possuem resolução de 40µm. Detalhes da porosidade óssea e ausência do 2º molar.

4.5 ANÁLISE RADIOGRAFICA

A análise radiográfica foi realizada a partir de 36 imagens (18 de mandíbulas e 18 dos fêmures) no Instituto de Pesquisas Ortopédicas e Biomecânicas da Universidade de Ulm, Ulm, Alemanha.

Foram utilizadas 06 películas radiográficas onde foram distribuídas 6 amostras (Figura 21) provenientes de cada grupo (SHAM,OVX30,OVX60). Os filmes utilizados foram da Kodak 15 x 30 cm, chassi de polietileno, fabricado pela Yoshida, equipado com ecran Lanex da Kodak de base verde (terras raras) do mesmo tamanho. As amostras foram radiografadas com X-ray apparatus (Gendex, Des Plaines, IL, USA) usando os seguintes parâmetros: 7 mA, 28 kV, tempo de exposição de 5 minutos. As radiografias foram processadas em câmara escura, com lanterna de segurança, em temperatura controlada de 28°C, com tempo de revelação de 5 minutos. As soluções químicas de processamento radiográfico, revelador e fixador foram da marca Kodak.

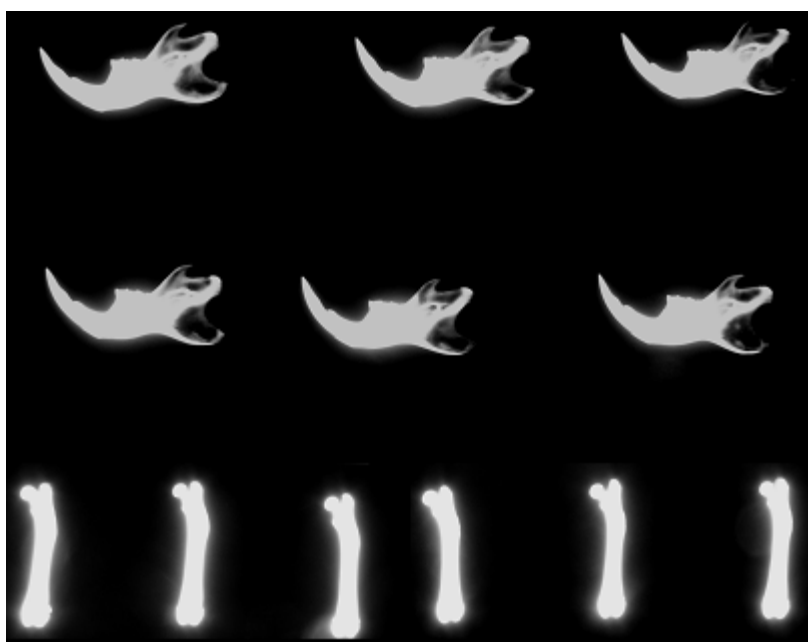


Figura 21. Radiografias de mandíbulas e fêmures do grupo de ratas Wistar ovariectomizadas (OVX60)

O processo de digitalização das radiografias foi realizado com o auxílio de uma câmara digital. As imagens foram capturadas a partir da exposição em mesa dotada de iluminação especial para esse fim. Optou-se por esse modelo

especialmente fabricado para se digitalizarem radiografias, por possuir uma fonte de luz acoplada evitando obscuridade na imagem devido à transparência da radiografia. Com estas vantagens pôde-se evitar a maior parte dos problemas de digitalização, como os ruídos na imagem, obtendo um padrão de resolução satisfatório.

Para a análise das imagens utilizou-se o software Image J (Image Processing and Analysis in Java / National Institute of Health - Bethesda, MD, USA) para a realização do processamento e quantificação das imagens. O software ImageJ possui ferramentas pré-programadas para as principais formas de manipulação de imagens e filtragens. Com a utilização desse programa foi possível a aplicação de filtros de imagens, manipulação de níveis de cinza e mensuramentos sobre as imagens. O ImageJ permite a manipulação de algumas variáveis de processamento conforme a escolha do usuário. Esse programa é de acesso livre e gratuito, podendo ser obtido pela internet. As imagens foram salvas em formato TIF (*tagged image file*), não compactadas, com área máxima de 100% e curva total para a seguir realizar-se os mensuramentos.

4.5.1 Mensuramento mandibular

Foram realizadas medidas de comprimento das mandíbulas e fêmures das ratas Wistar para avaliação do efeito comparativo da restrição do estrógeno na modelagem óssea processo que atua diretamente no crescimento ósseo dos animais. As medidas incluem a medida de comprimento na mandíbula da inserção de incisivo (II) até o processo angular (PA) e da altura da face distal do terceiro molar até a incisura antegônica. Essas medidas foram realizadas por dois métodos: usando-se paquímetro de precisão e por meio do software ImageJ para investigação da acurácia de cada método. As medidas foram tomadas pelo mesmo examinador com um intervalo de 15 dias para verificar a concordância entre as medidas obtidas. A tabela x mostra pequena variação entre os dados obtidos. A escolha do córtex mandibular como região de interesse deve-se a vasta literatura que relaciona alterações na morfologia e espessura desta região com o quadro osteopênico (TAGUCHI et al., 2004; ISHII et al., 2007; NAKAMOTO et al., 2008).

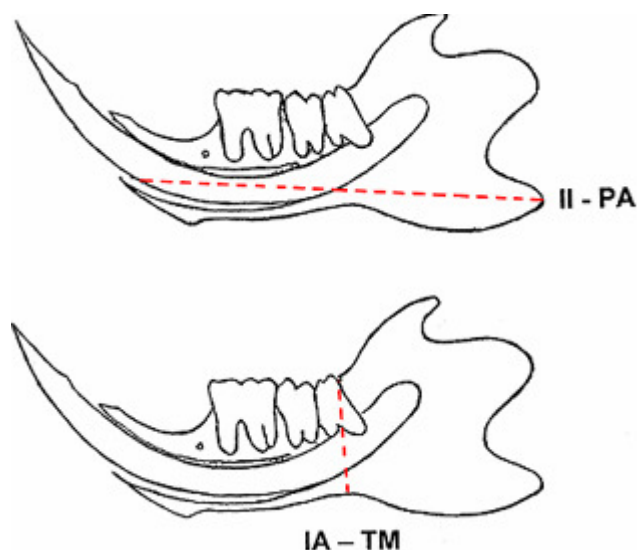


Figura 22. Medidas de comprimento em mandíbula de ratas Wistar. Medida da inserção de incisivo (II) até o processo angular (PA) e da altura da face distal do terceiro molar até a incisura antegônica. Fonte: RODRIGUES e CERQUEIRA, 2001

As medidas foram realizadas por meio do software ImageJ, localizando o ponto abaixo da raiz mesial do 2º molar inferior esquerdo de todas as radiografias de cada grupo (Figura 23a). Não foram encontrados na literatura dados relacionados a esse parâmetro em animais. Realizou-se deste modo investigação na tentativa de se estabelecer correlação positiva entre esta avaliação morfométrica e o estado osteopênico ratas ovariectomizadas.

Foram realizadas análises da densidade radiográfica expressas em valores de escala de cinza. Densidade radiológica é um conceito que relaciona os tons de cinza da imagem com a densidade dos tecidos do corpo humano. Uma imagem tomográfica é capaz de captar imagens em até 16 bits por pixel, que é igual a 2^{16} , igual a 65.536 tons de cinza. Hounsfield estabeleceu uma escala arbitrária de densidades radiológicas (unidade uH). Em programas de imagens médicas, os valores dos pixels são expressos na escala de Hounsfield, e não em tons de cinza brutos. (ANBINDER et al., 2007).

Foi selecionada uma região entre as raízes da mesma unidade dentária onde foi delimitada uma circunferência correspondente a 1768 pixels (Figura 23b). Foram realizadas quantificações da escala arbitrária de pixels desta região para

obtenção da radiodensitometria óssea (HAITER-NETO 2005; WENZEL, 2005). Um cuidado especial foi tomado para não envolver a região de ligamento periodontal por tratar-se de região com atenuação radiográfica semelhante ao dente, outra razão de se evitar essa região deve-se ao fato grande proximidade desta estrutura com a raiz dentária.

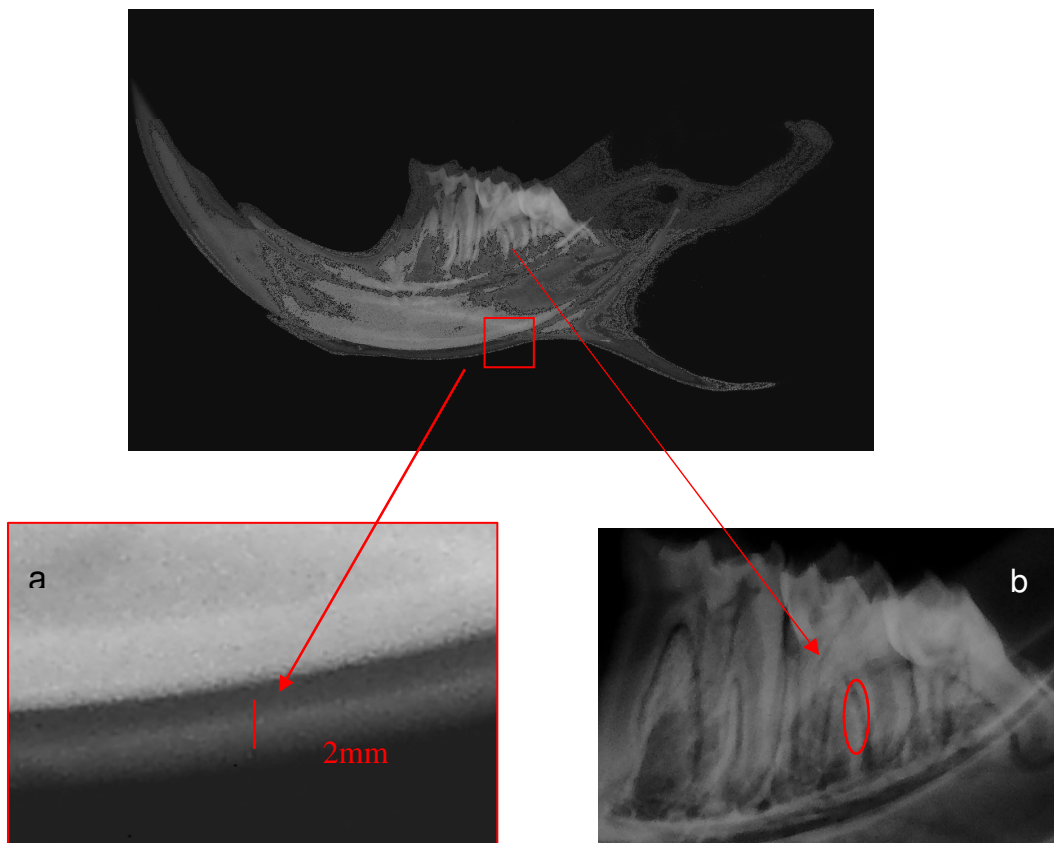


Figura 23. Imagem radiográfica de mandíbula de rata Wistar. a) Medida da espessura do córtex mandibular em milímetro tomando-se como referência raiz mesial do segundo molar inferior, b) Delimitação de área de interesse para análise da radiodensidade óssea.

4.5.2 MENSURAMENTO NO FÊMUR

Nas amostras de fêmur foram realizadas análises em diferentes sítios desta estrutura com a finalidade de se verificar a resposta dos mesmos diante do estado de restrição estrogênica. Deste modo, foi calculada a densidade radiográfica (NETO et al., 2006) em três regiões de interesse: cabeça, metáfise distal e epífise distal (Figura 24). A região delimitada foi arrastada para cada imagem sem alterações e correspondia em respectivamente; 33888 pixels para a circunferência na cabeça do fêmur, 35376 pixels para o retângulo na metáfise e 15808 pixels para o retângulo na epífise distal do fêmur.

O Software forneceu para cada sitio (Figura 24) a medida e histogramas obtendo-se a seguir a radiodensidade média de cada grupo, dados relativos a média de valores dos pixels foram tabulados. O histograma do software forneceu os dados sobre média dos valores dos pixels numa escala de 8 bits

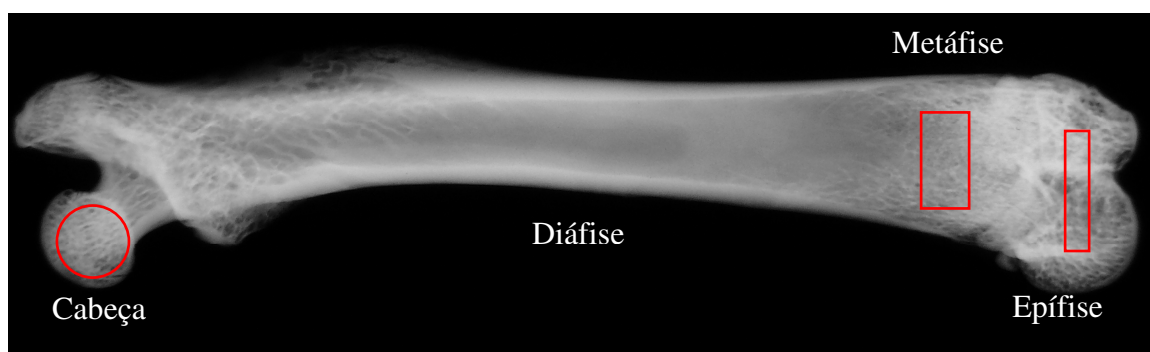


Figura 24. Delimitação das áreas no fêmur de rata Wistar para a análise da radiodensidade óssea.

Para se observar o possível efeito da depleção estrogênica no osso cortical de ratas ovariectomizadas, realizou-se a medida do canal medular nas radiografias dos fêmures das ratas de cada grupo (Figura 25). O mensuramento foi realizado com o software ImageJ com ferramenta específica para essa finalidade. A medida foi tomada na ROI correspondente a um ponto médio da diáfise, para a seguir realizar-se a obtenção de um índice relacionando-se a medida do canal medular e comprimento do fêmur.

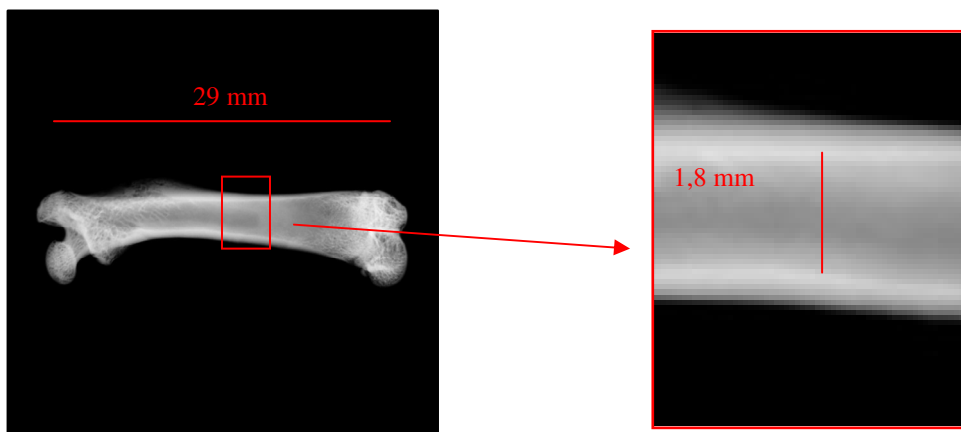


Figura 25. Imagem radiográfica com indicação para a medida do canal medular e comprimento do fêmur.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As diferenças entre os grupos controle (SHAM) e ovariectomizados foram testadas para a significância pelo teste de Tukey. As análises entre os grupos OVX e SHAM foram realizadas quanto a significância pela análise de variância ANOVA. Os dados foram tabulados e receberam tratamento estatístico por meio do software GraphPad Prism, versão 5.0. Todos os valores de $p < 0.05$ foram considerados como sendo significantes usando-se o ANOVA.

5 RESULTADOS

5.1 VARIAÇÕES DE PESO CORPORAL NOS ANIMAIS

O ganho de peso das ratas controle (SHAM) e ovariectomizadas (OVX30 e OVX60) foi significativamente diferente entre os grupos ($p < 0.05$). Houve um aumento de peso maior nas ratas do grupo OVX60 (Figura 26).

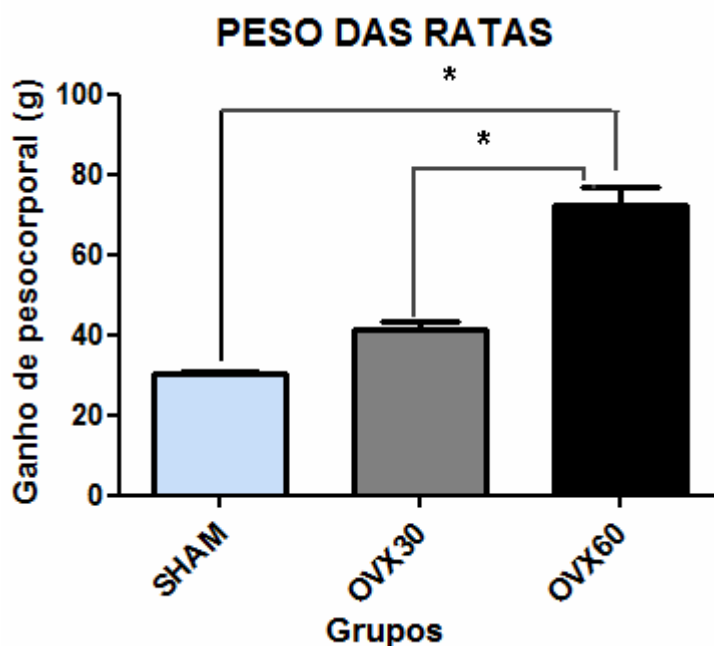


Figura 26. Ganho de peso corporal nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados após 30 e 60 dias da cirurgia (valores médios e desvio padrão) * diferença significativa $p < 0.05$

5.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A Figura 27 apresenta os níveis de cálcio sérico sanguíneo. Não houve diferença estatística em relação aos níveis de cálcio sérico entre os grupos SHAM, OVX30 e OVX60. A fosfatase alcalina, como marcador de remodelagem óssea, mostrou diferença observável ($p < 0.05$) entre o grupo SHAM e o grupo OVX30, (Figura 28).

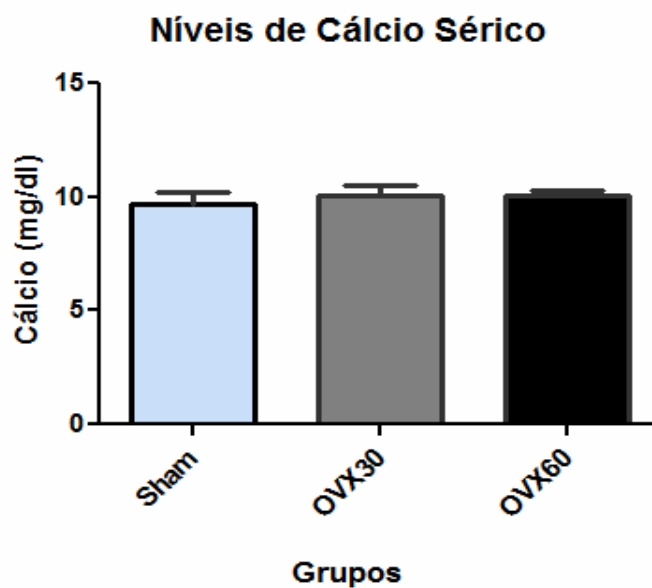


Figura 27. Níveis de cálcio sérico encontrados nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados (valores médios e desvio padrão). Não houve diferença estatística entre os grupos.

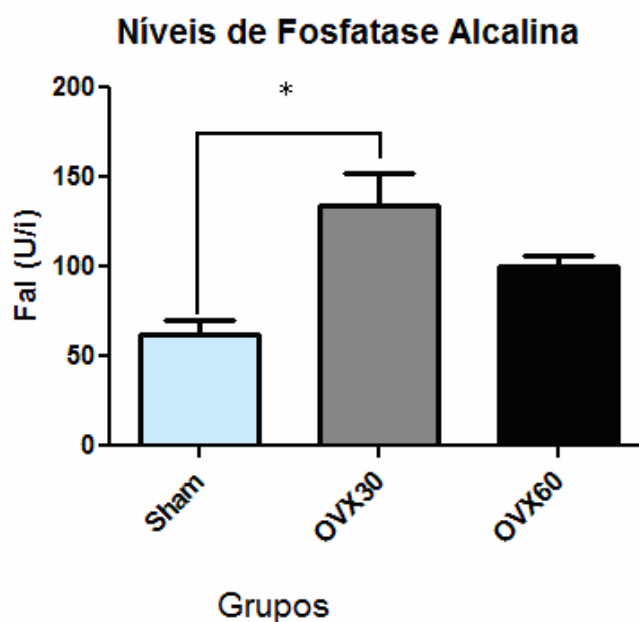


Figura 28. Níveis de fosfatase alcalina encontrados nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados (valores médios e desvio padrão) * diferença significativa $p < 0.05$.

Foi possível verificar, através das alterações observadas no perfil hormonal, que os procedimentos cirúrgicos de ovariectomia obtiveram sucesso. Dessa forma, com relação aos níveis de progesterona obteve-se diferença estatística significativa entre o grupo SHAM com relação ao grupo OVX 30 e

OVX60 ($p < 0.05$). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos ovariectomizados, a redução de progesterona observada no grupo sacrificado aos 30 dias de cirurgia se manteve quase sem alteração no grupo sacrificado aos 60 dias (Figura 29).

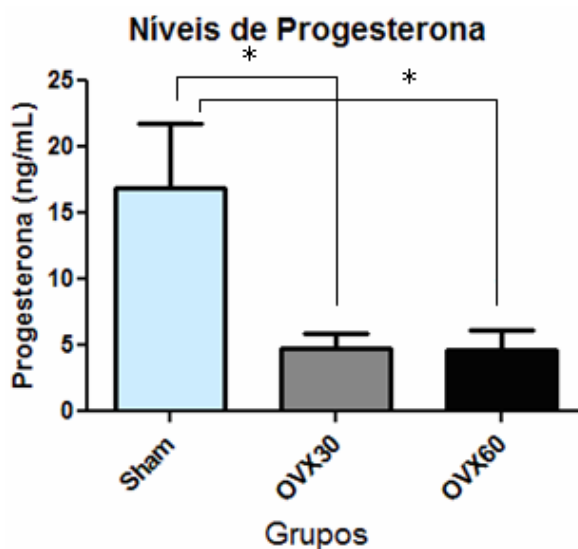


Figura 29. Níveis de progesterona encontrados nas ratas dos grupos controle e ovariectomizadas. (Valores médios e desvio padrão) * diferença significativa $p < 0.05$

O estradiol sérico apresentou redução nos grupos submetidos a ovariectomia, após as cirurgias, com diferença estatística significativa entre o três grupos (Figura 30).

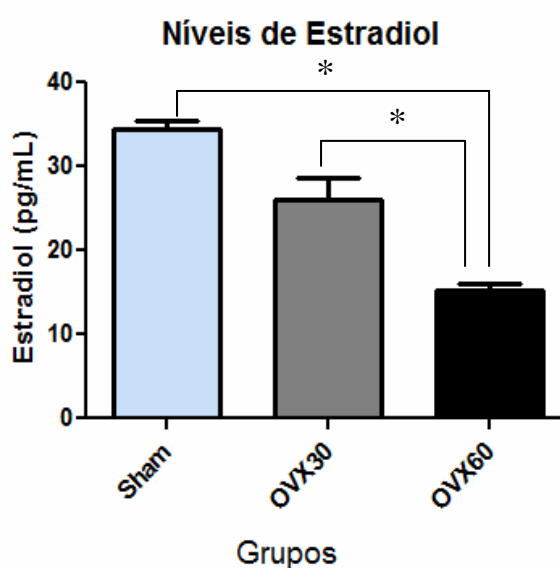


Figura 30. Níveis de estradiol sérico encontrados nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados (valores médios e desvio padrão) * diferença significativa $p < 0.05$

5.3 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

As análises morfométricas foram obtidas a partir de medidas das amostras de fêmur e mandíbula. No caso dos fêmures foi realizada a medida direta de comprimento usando paquímetro, conjuntamente com medidas por meio de análise de imagem, usando o software ImageJ. As medidas efetuadas foram: diâmetro do canal medular do fêmur, comprimento da mandíbula, altura mandibular e altura do córtex da mandíbula.

No que se refere ao comprimento do fêmur não foi observada diferença estatística entre os grupos SHAM e aqueles submetidos à ovariectomia (Figura 31). Os resultados indicam que a deficiência de estrógeno não desempenhou papel no processo de modelagem óssea nestas estruturas destes animais.

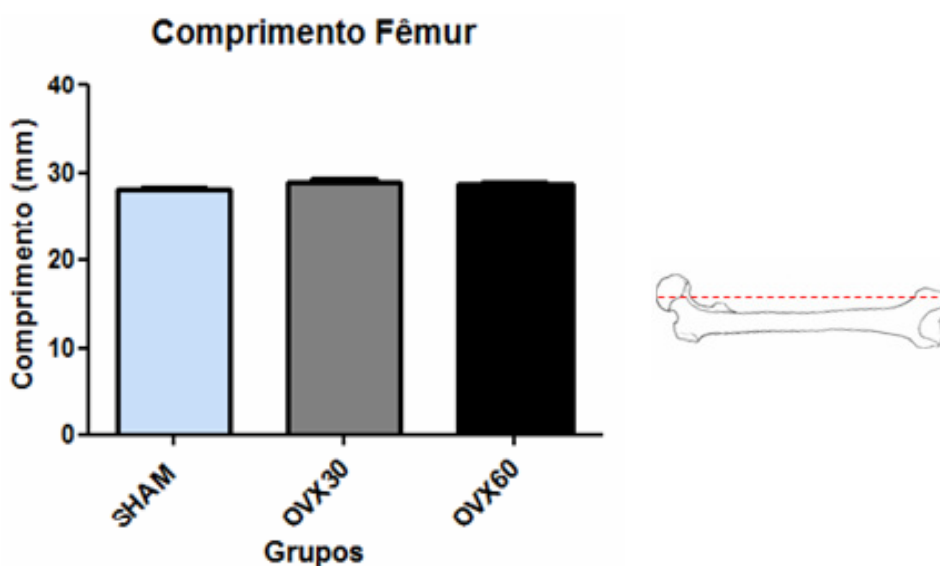


Figura 31. Comprimento do fêmur das ratas do grupo controle e ovariectomizadas. (valores médios e desvio padrão). Não houve diferença estatística entre os grupos.

Os resultados obtidos para a medida do canal medular do fêmur indicam um aumento de espessura gradual após o procedimento cirúrgico de remoção dos ovários, este se apresenta maior no grupo OVX60 (Figura 32) apresentando uma diferença significativa entre os grupos comparados.

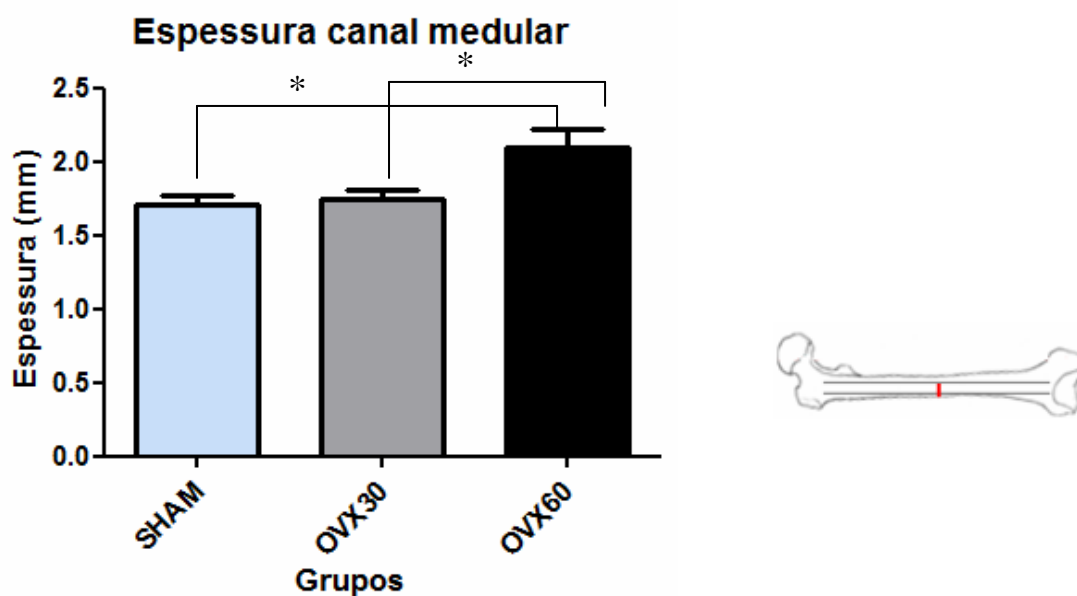


Figura 32. Espessura do canal medular de fêmures encontrados nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados (valores médios e desvio padrão) * diferença significante $p < 0.05$.

Os valores obtidos para a espessura do córtex mandibular mostraram-se menores no grupo OVX30 quando comparados ao grupo SHAM e OVX60 (Figura 33), os resultados não apresentaram, porém, valor significativo quando submetido a avaliação por ANOVA e teste de Tukey.

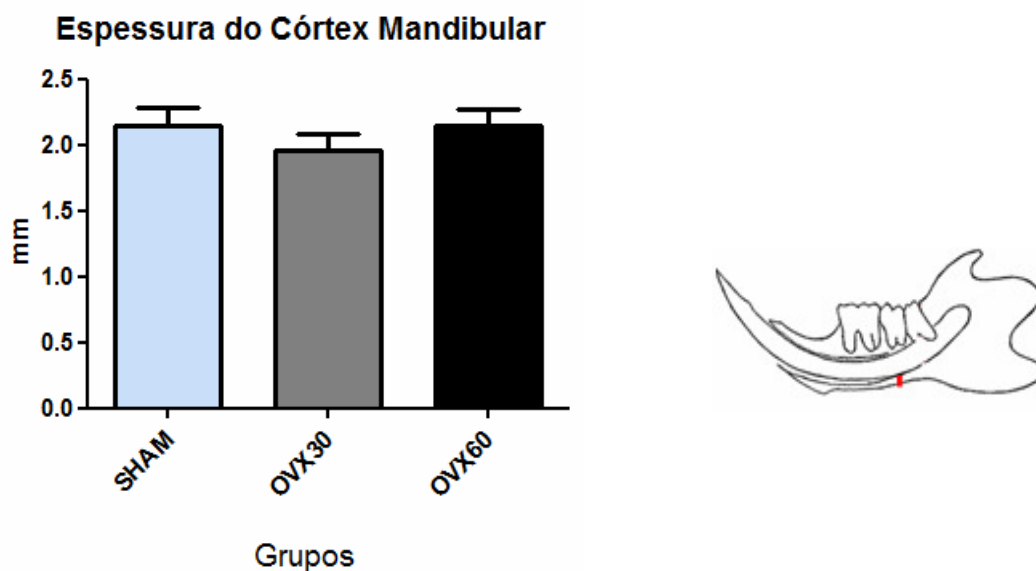


Figura 33. Espessura do córtex da mandíbula encontrado nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados. Valores médios e desvio padrão. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Os valores do comprimento e altura da mandíbula não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos SHAM e ovariectomizados (Figura 34).

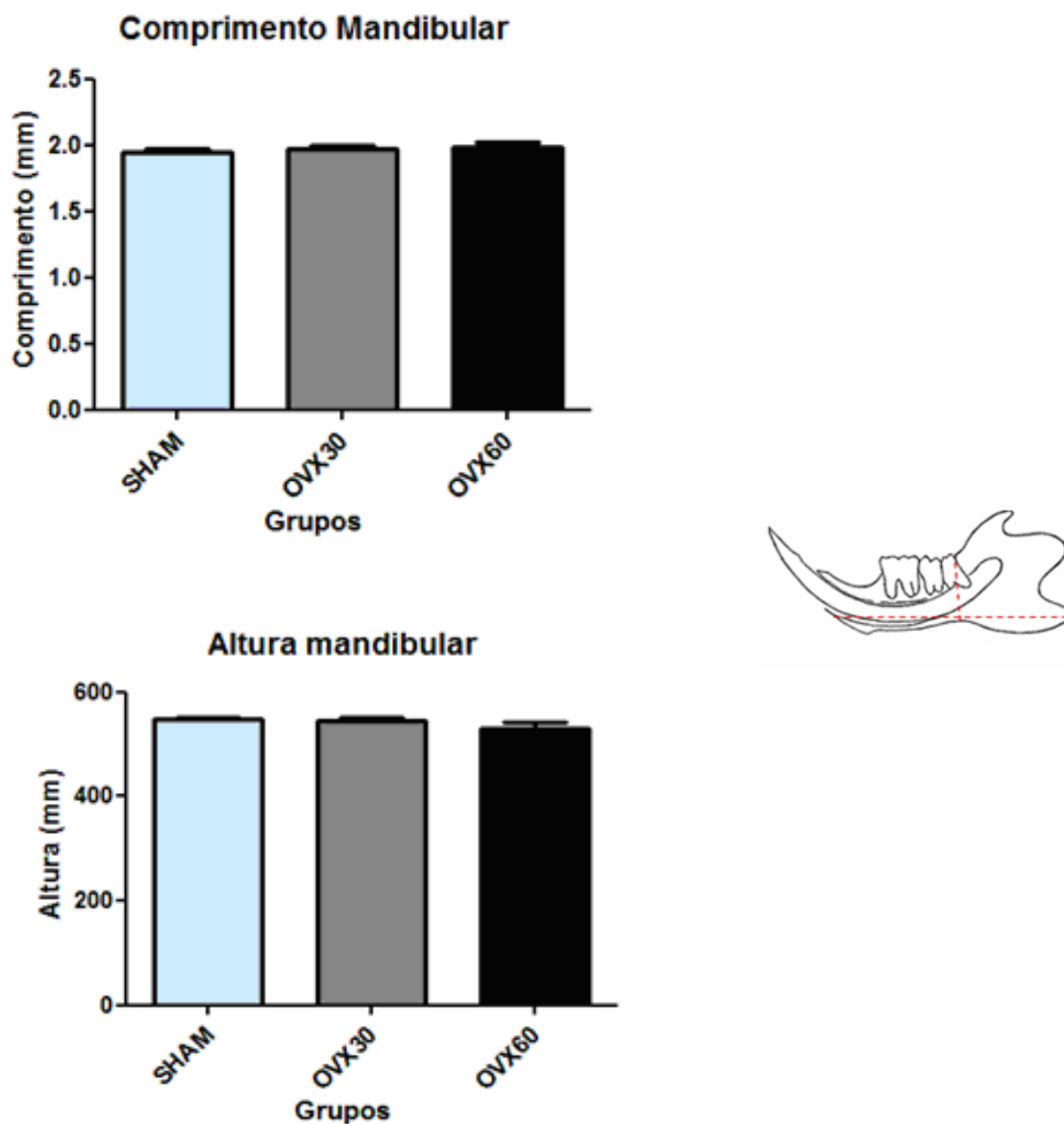


Figura 34. Altura e comprimento da mandíbula encontrados nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados (valores médios e desvio padrão). Não houve diferença estatística entre os grupos.

5.4 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

5.4.1 PERDA ÓSSEA VERTICAL

A média entre as medidas realizadas na raiz mesial e distal realizadas para crista óssea mandibular, revelou uma perda óssea vertical significativa, no grupo OVX60 em relação ao grupo controle (Figura 35). Na raiz distal houve uma maior perda óssea vertical no grupo OVX60 que mostrou ser significativa em relação grupo SHAM. Não houve diferença estatística com relação à raiz mesial em análise comparativa entre os grupos (Figura 36 a e b)

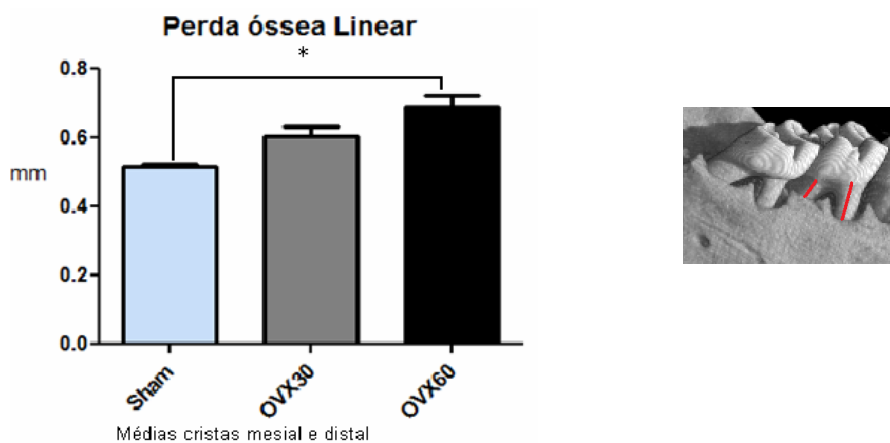


Figura 35. Perda óssea vertical nas cristas ósseas do 2º molar encontrados nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados por meio de Micro-CT (Valores médios e desvio padrão) * diferença significante $p < 0.05$.

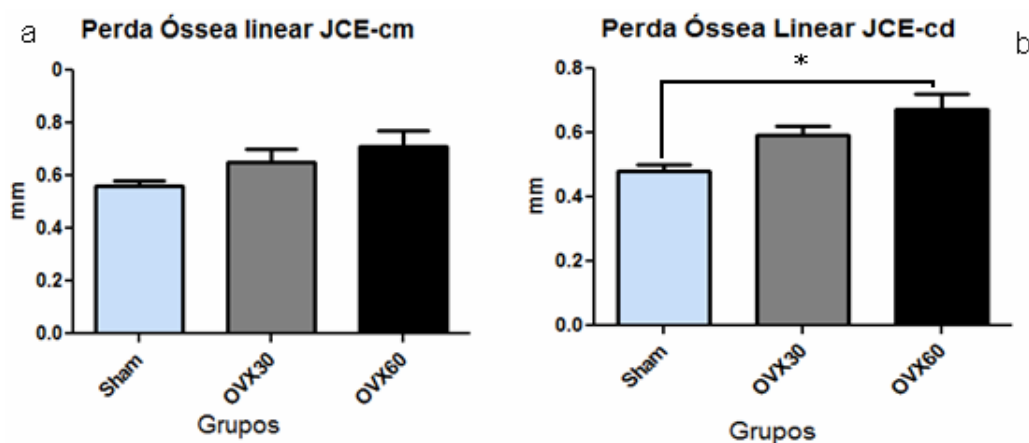


Figura 36. Perda óssea vertical nas cristas ósseas do 2º molar encontrados nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados mensurados por meio de Micro-CT (Valores médios e desvio padrão) a) Valores obtidos na raiz mesial, b) Valores obtidos na raiz distal. * diferença significante $p < 0.05$.

5.4.2 VOLUME ÓSSEO

Algumas imagens de Micro-CT em 3D mostram alterações ósseas ao nível de septo interradicular nos três grupos, tais como, alterações na porosidade do osso trabecular, diminuição na altura do septo interradicular e espessamento do espaço periodontal nas ratas ovariectomizadas (Figura 37, seta vermelha). No entanto, não foi encontrada diferença estatística significativa entre o volume ósseo entre os grupos controle e ovariectomizados (Figura 38).

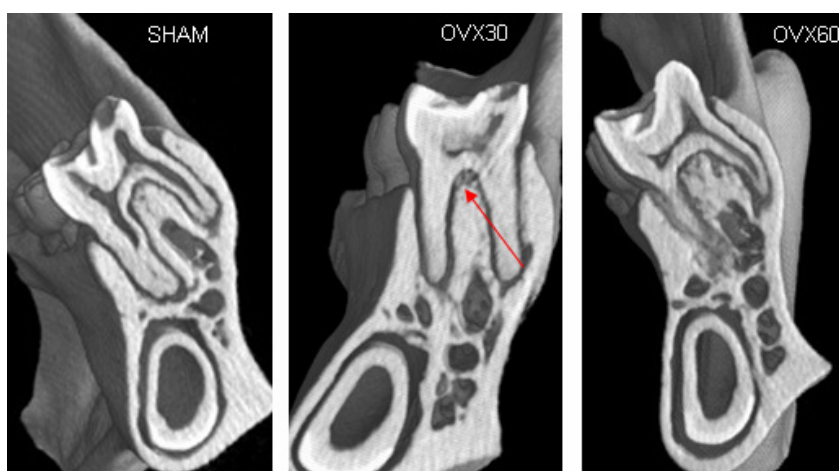


Figura 37. Imagens obtidas por microtomografia computadorizada mostrando alterações ósseas na região de septo do 2º molar (seta) entre os grupos SHAM, OVX30 e OVX60. Imagem obtida por Micro-CT (resolução 40µm).

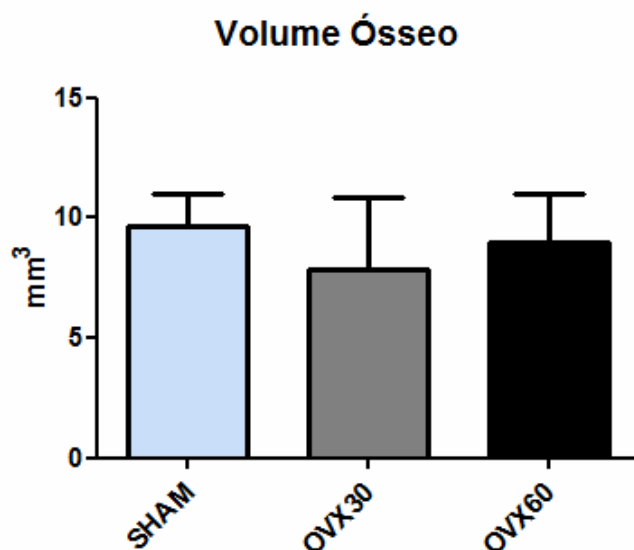


Figura 38. Alterações do volume ósseo na região de 2º molar nas ratas dos grupos controle e ovariectomizados por meio de Micro-CT (Valores médios e desvio padrão) Não houve diferença estatística entre os grupos.

Na figura 39 é possível visualizar imagens microtomográficas do fêmur, as quais revelaram diferenças qualitativas na sua estrutura óssea interna. O osso trabecular de regiões tais como: metáfise proximal, cabeça do fêmur e diáfise, revelou no grupo SHAM trabéculas espessas e bem orientadas, formando uma rede interconectada, com espaços medulares regulares. Em contraste nos grupos ovariectomizados o osso trabecular desta região mostrou lamelas mais finas, irregulares e com espaços medulares maiores.

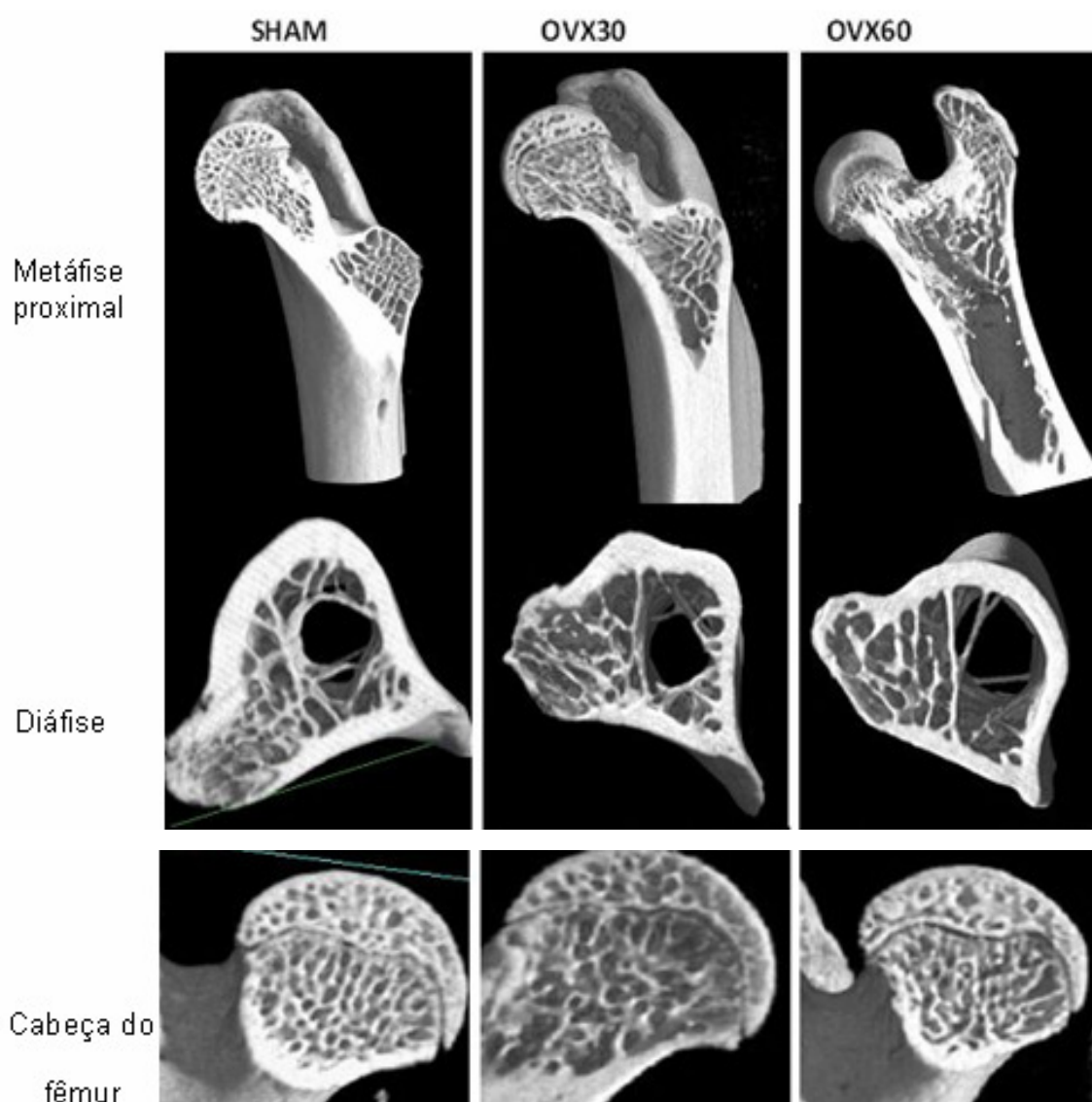


Figura 39. Detalhes das regiões de cabeça do fêmur, metáfise proximal e diáfise entre os grupos SHAM, OVX30 e OVX60. Imagem obtida por Micro-CT (resolução 40 μ m.)

5.5 RADIODENSIDADE ÓSSEA

As análises da radiodensidade das mandíbulas e fêmures foram obtidas a partir de histogramas fornecidos pelo software ImageJ, através dos quais foram calculadas as médias dos valores de pixels entre os grupos.

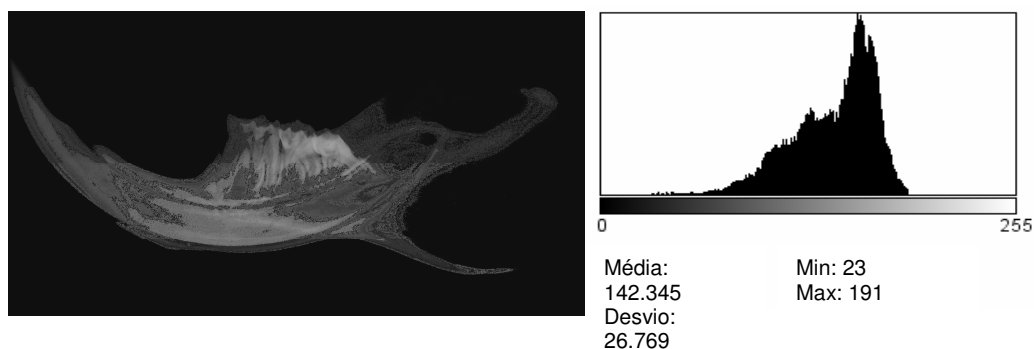


Figura 40. a) Imagem radiografia da mandíbula de rato Wistar utilizada para análise da radiodensidade óssea. b) Histograma utilizado para a análise da radiodensidade em mandíbulas e fêmures dos grupos Controle (SHAM) e ovariectomizados.

A radiodensidade analisada na mandíbula foi obtida em ROI entre as raízes do segundo molar inferior esquerdo. Houve uma diminuição na intensidade de pixels nos grupos OVX30 e OVX60 em comparação ao grupo SHAM (Figura 41) indicando uma diminuição de densidade óssea. Estas alterações não se mostraram significativas.

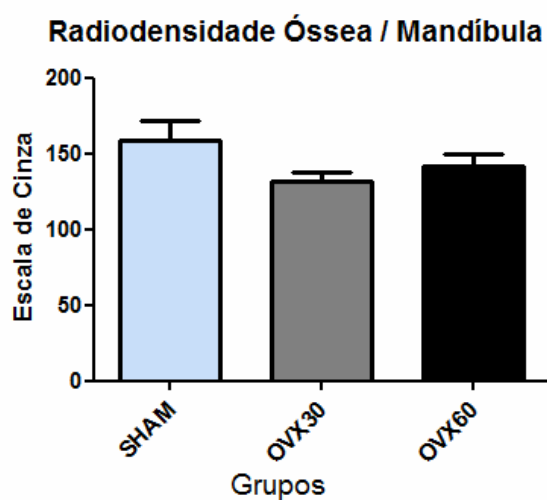


Figura 41. Padrão da radiodensidade óssea em ROI na região de 2º molar em ratas dos grupos controle e ovariectomizados. Não houve diferença estatística entre os grupos. Valores médios e desvio padrão.

Medidas do fêmur

As análises das médias relativas à radiodensidade óssea de cada grupo estão apresentadas na Figura 42, revelando menores valores de pixel nos grupos ovariectomizados (OVX30 e OVX60) indicando perda óssea após o procedimento de ovariectomia. A comparação das médias de valores de pixels na cabeça do fêmur pelo teste de múltipla comparação de Tukey mostrou diferença estatística entre a média de densidade óssea do grupo OVX30 em relação ao grupo SHAM.

A Figura 43 apresenta os valores médios referentes à radiodensidade óssea na metáfise do fêmur. A metáfise do fêmur mostrou ser um sítio ósseo sensível à restrição estrogênica. Ocorreu uma redução nos valores de pixel nos grupos ovariectomizados estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

Houve alterações na radiodensidade na epífise distal (Figura 44) do fêmur das ratas do grupo OVX30 que foi significativa em relação ao grupo SHAM.

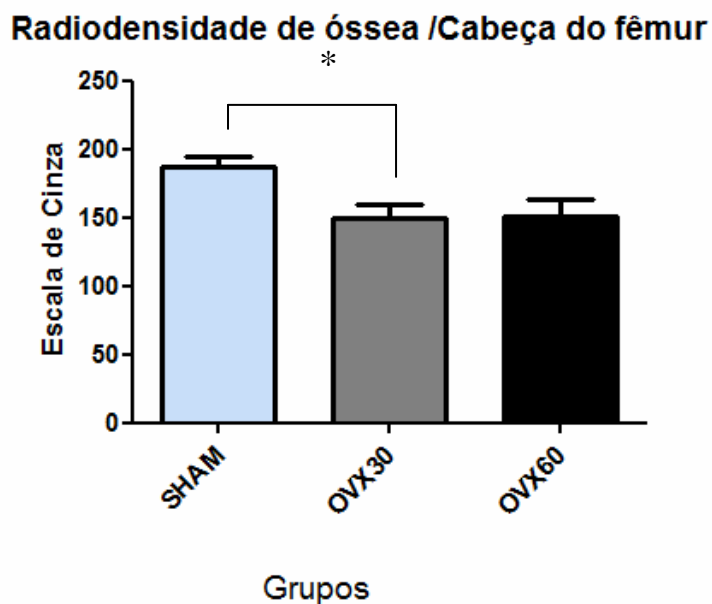


Figura 42. Padrão da radiodensidade óssea na cabeça do fêmur em ratas dos grupos controle e ovariectomizadas (Valores médios e desvio padrão). * diferença significativa $p < 0.05$.

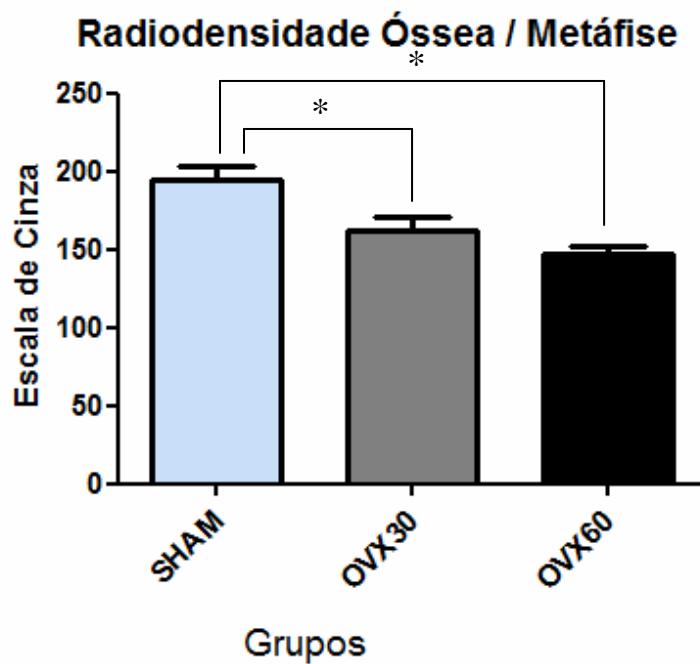


Figura 43. Padrão da radiodensidade óssea na metáfise do fêmur em ratas dos grupos controle e ovariectomizados. Valores médios e desvio. * diferença significante $p < 0.05$.

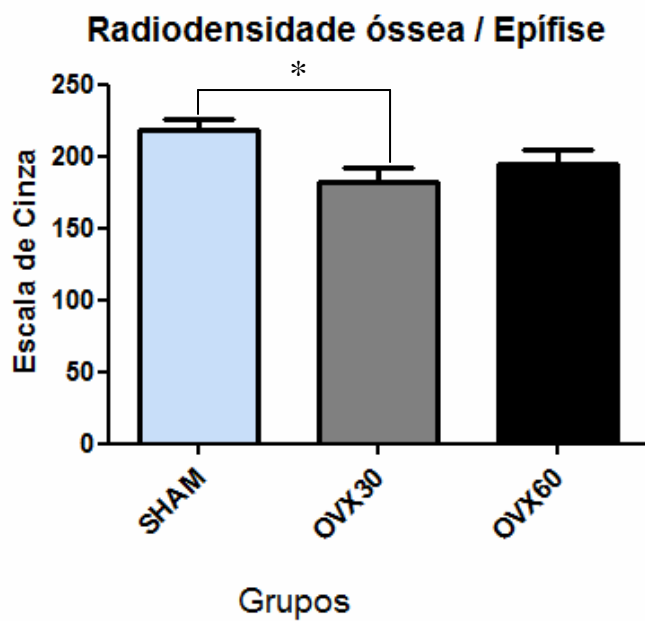


Figura 44. Padrão da radiodensidade óssea na epífise distal do fêmur em ratas dos grupos controle e ovariectomizados. Valores médios e desvio. * diferença significante $p < 0.05$.

Uma análise comparativa das estruturas do fêmur nos três grupos indicou que a epífise distal é a estrutura menos sensível a restrição estrogênica (Tabela 7).

Tabela 7. Médias e desvios-padrão (dp) dos valores de pixel correspondentes a radiodensidade das regiões de interesse no fêmur.

Grupo	Estrutura	Média (pixel)	dp (pixel)	n
SHAM	Cabeça do fêmur	186,7	21,64	6
OVX30	Cabeça do fêmur	149,5	28,87	6
OVX60	Cabeça do fêmur	151,0	35,39	6
SHAM	Epífise distal	217,8	23,25	6
OVX30	Epífise distal	181,9	29,06	6
OVX60	Epífise distal	194,5	29,92	6
SHAM	Metáfise distal	194,4	24,59	6
OVX30	Metáfise distal	161,9	26,68	6
OVX60	Metáfise distal	146,9	13,29	6

5.5 ANÁLISE QUALITATIVA POR MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

Algumas imagens radiográficas e microtomográficas revelaram um padrão de desgaste nos molares das ratas do grupo OVX60 quando comparadas ao grupo SHAM cujas ratas também foram sacrificadas após 60 dias (Figura 45). As cúspides foram desgastadas de modo a alterar a anatomia original das unidades dentárias.

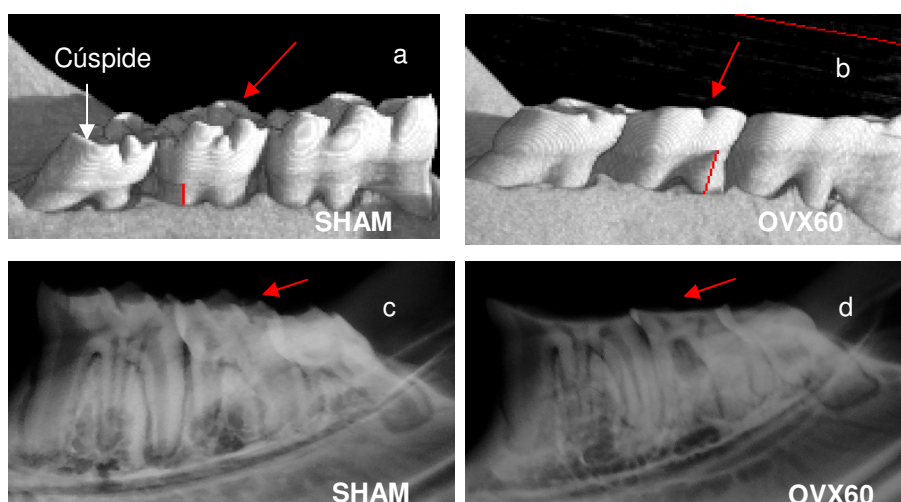


Figura 45. Molares do grupo SHAM e OVX60 quanto ao grau de desgaste das cúspides (setas vermelhas). a) e b) Evidências de desgaste e diminuição estrutural das unidades dentárias no grupo OVX60 obtidas por microtomografia computadorizada, c) e d) Observação radiográfica do desgaste dos molares das ratas do grupo OVX60.

A análise das imagens 3D, obtidas após segmentação e retirada do 1º molar inferior direito e fragmento da raiz do incisivo (Figura 46), permitiu a observação de uma estrutura mais compacta no grupo SHAM em relação aos grupos ovariectomizados. A crista óssea alveolar se apresentou menos volumosa e menos definida nos grupos OVX30 e OVX60.

No presente estudo algumas imagens 3D, obtidas por microtomografia computadorizada, mostraram visíveis alterações no osso trabecular sob as raízes das unidades dentárias no grupo OVX60 (Figura 47). A análise das imagens obtidas neste estudo permitiu ainda, a observação de um aumento na porosidade no osso trabecular na região de 2º molar (Figura 48) que se apresentou maior no grupo OVX60 com relação aos demais grupos.



Figura 46. Detalhes da porosidade de osso alveolar. Imagem microtomográfica 3D para análise de volume ósseo. Resolução 40 μm .



Figura 47. Imagens 3D evidenciando alterações no osso trabecular sob as raízes do 2º molar de ratas ovariectomizadas. Imagens obtidas por microtomografia computadorizada. Corte axial. Resolução 40 μm .



Figura 48. Imagem 3D de mandíbula de ratas wistar evidenciando alterações no osso trabecular da região de 1º molar entre os grupos OVX30 e OVX60. Corte frontal. Resolução 40 μm .

6 DISCUSSÃO

6.1 PESO CORPORAL

Neste estudo com ratas ovariectomizadas observou-se um ganho de peso corporal significativamente maior nos grupos ovariectomizados em relação ao grupo SHAM (Figura 26). Esses resultados confirmam dados encontrados na literatura para ganho de peso corpóreo em caso de restrição estrogênica (MELTON et al., 2000; VASCONCELLOS et al., 2004).

Mulheres na menopausa apresentam um aumento da massa corporal e lipídica relacionadas com a alteração da distribuição de gordura corporal (LEY et al., 1992). Bernardi et al. (1998) relacionaram esse quadro clínico às alterações da função do eixo somatotrófico, segundo o qual mulheres na pós-menopausa apresentam níveis séricos de hormônio de crescimento menores quando comparadas com mulheres na perimenopausa.

No caso de ratas, sabe-se que hormônios ovarianos desempenham importante papel na regulação do consumo de alimento e peso corporal destes animais. Tendo sido notado que durante o ciclo estral o consumo de alimento tende a ser menor no período de ovulação, quando o estrógeno está mais alto, e maior no diestro quando o nível de estrógeno está mais baixo. O diestro seria, portanto, uma etapa do ciclo sexual das ratas que se assemelha ao estado hormonal encontrado no período de pós-ovariectomia (ROY & WADE, 1977; WRONSKI et al., 1987).

Esses dados indicam que o aumento de massa corpórea em ratas é primariamente conseqüência de uma hiperfagia (aumento na ingestão de alimentos). Chen e Heiman (2001) relacionam esse aumento de peso à elevação de leptina, já que, encontraram altos níveis desta substância em ratas ovariectomizadas. A leptina é um hormônio protéico que age no cérebro inibindo o apetite e estimulando o gasto de energia. Para esses autores essa elevação ocorre para informar a disponibilidade de combustível nesses animais. Outros estudos relacionam diretamente a redução dos níveis de leptina ao possível ganho de peso de ratas após ovariectomia (YONEDA et al., 1998; SHIMOMURA et al., 2002).

Em relação aos tecidos orais, algumas ratas ovariectomizadas deste estudo apresentaram sinais de hiperfagia evidenciados por alterações morfológicas dentárias bilaterais. Algumas imagens radiográficas (hemi-mandíbula esquerda) e microtomográficas (hemi-mandíbula direita) revelaram alterações estruturais nos molares das ratas OVX60 em relação aos demais grupos. Em metade dos animais deste grupo foi evidenciado intenso desgaste das cúspides dos dentes, apontando para um possível aumento no número de ciclos mastigatórios. Esse fenômeno deve ter se iniciado após a ovariectomia e não foi observado nas ratas SHAM sacrificadas também com 60 dias de após o procedimento cirúrgico.

Anwar (2002) realizou estudo semelhante a este, tendo como objeto macacas ovariectomizadas. Este autor relacionou a perda óssea vertical em cristas ósseas alveolares com o grau de desgaste das cúspides dentárias destes animais. Não houve diferença significativa entre os grupos. Foi encontrada, porém, correlação positiva entre esses os dois critérios observados dentro do mesmo grupo.

6.2 EXAMES BIOQUÍMICOS

Os resultados obtidos mostraram um aumento nos níveis de fosfatase alcalina no grupo OVX30 significativamente maior ($p < 0.05$) em relação ao grupo SHAM (Figura 28). Esses dados indicam o sucesso da ovariectomia pela alteração do perfil bioquímico destes animais. A fosfatase alcalina tem sido descrita como um importante marcador da elevação do *turnover* ósseo sendo usado para refletir mudanças ósseas durante o diagnóstico da osteoporose. Essas indicações estão de acordo com a literatura que mostra um aumento no remodelamento ósseo no início da pós-menopausa. Estes resultados são similares a outros estudos realizados com ratas osteopênicas que indicam esse tipo de alteração metabólica após ovariectomia (SONES et al., 1986; MAWATARI et al., 2000). Estudos clínicos apontam para um aumento aproximado deste marcador em cerca de 20% de mulheres no período da menopausa (CHRISTIANSEN et al., 1984).

Sabe-se que as alterações metabólicas no remodelamento ósseo apresentadas no início da menopausa tendem a se estabilizar com o passar do

tempo. Lee et al. (2004) demonstraram em estudo com ratas ovariectomizadas que a taxa de fosfatase alcalina foi maior no grupos ovariectomizados que no grupo SHAM com tendência a diminuir nos dois grupos, com a continuidade do experimento (110 dias). MAWATARI et al. (2000) observaram aumento nos níveis deste marcador do metabolismo ósseo no grupo ovariectomizado com 8 semanas de cirurgia. Já Sakakura et al. (2001) estudando o efeito da atividade física em mandíbulas de ratas ovariectomizadas, observaram um índice menor de fosfatase alcalina no grupo ovariectomizado em relação ao grupo controle.

Não houve variação significativa quanto ao cálcio sérico entre os grupos. Esta condição está de acordo com a literatura que indica a estabilidade dos níveis desta substância após ovariectomia visto que, somente em circunstâncias extremas, como desnutrição ou hiperparatireoidismo, a concentração sérica desse mineral ionizado sofre alterações, ficando acima ou abaixo do normal. O osso tampona o cálcio sérico usando esse mineral no processo de remodelamento (TAKADA et al., 1997; MAWATARI et al., 2000).

A progesterona apresentou, como esperado, uma queda significativa entre os grupos ovariectomizados em relação ao grupo controle SHAM (Figura 29). Sabe-se que esse hormônio apresenta importante papel na manutenção da massa óssea diminuindo a reabsorção enquanto mantém ou aumenta a formação do osso em condições de baixa hormonal de estrógeno como ocorre, por exemplo, no início da gravidez (BOWMAN e MILLER, 1996). Alguns estudos pioneiros indicam a manutenção dos níveis de progesterona em ratas após ovariectomia. Essa condição teria como provável fonte a resposta do córtex da adrenal para essa situação metabólica (FEDER et al., 1968, PIVA et al., 1973).

Apesar da confirmação da eficácia do procedimento cirúrgico de ovariectomia, pela ausência dos ovários e atrofia dos cornos uterinos, verificada por ocasião do sacrifício dos animais, os níveis de estrógeno dos grupos ovariectomizados caíram em relação ao grupo SHAM permanecendo, porém, em níveis detectáveis (Figura 30). Como estas alterações bioquímicas ocorrem, ainda não está satisfatoriamente esclarecido na literatura (WRONSKI et al., 1988).

6.3 MORFOMETRIA ÓSSEA

Em mulheres na pós-menopausa a medida do córtex mandibular em radiografias tem sido amplamente estudada, numa tentativa de estabelecer esse índice como auxílio diagnóstico para osteoporose (Tabela 3). Os resultados do presente estudo apontam para uma discreta diminuição na espessura do córtex mandibular, ao ser analisado abaixo da região de 2º molar esquerdo. Alguns estudos encontram correlação positiva quando se compara essa medida realizada em mulheres com outros métodos de avaliação óssea como DEXA, ultrasonometria, questionários de avaliação do risco de fratura, entre outros.

No atual estudo, observou-se que esta discreta diminuição da espessura cortical, foi maior nas ratas ovariectomizadas sendo esse fenômeno mais visível no grupo OVX30 (Figura 34). Os dados obtidos, no entanto, não apresentaram significância estatística. Não foi encontrado na literatura dados de avaliação deste índice em ratas ovariectomizadas.

Pode-se apresentar como possível fator de interferência na análise nesta região, a proximidade da raiz do incisivo junto ao córtex da mandíbula e a semelhança na atenuação radiográfica entre estas estruturas conforme pode ser visualizado na Figura 46. O uso de radiografias digitais poderia ter possibilitado a avaliação de um maior número de parâmetros na mandíbula além da espessura do córtex e densidade óssea. Como por exemplo, avaliações realizadas no côndilo (Figura 46) poderiam trazer muitas informações sobre o crescimento e desenvolvimento mandibulares (KLEMETTI et al., 1994, TAGUCHI et al., 1996, TANAKA et al., 1999; NAKAMOTO et al., 2008). Não foram observadas diferenças qualitativas tais como erosões e reabsorções do córtex que pudessem caracterizar algum dos três grupos.

No presente estudo foram verificadas alterações similares no mensuramentos lineares das mandíbulas entre os três grupos. As alturas e comprimentos da mandíbula, visualizados na Figura 34, não apresentaram diferenças estatísticas entre grupos SHAM e ovariectomizados. Os dados obtidos indicam que a restrição estrogênica não desempenhou papel relevante no modelamento da mandíbula. É bem conhecido que humanos e ratos apresentam

padrão de crescimento mandibular que se assemelham. Nos ratos há um aumento de peso contínuo acompanhado de crescimento crânio mandibular. Esse crescimento depende da interação de vários fatores tais como: dimorfismo sexual, carregamento mecânico proveniente da contração mandibular e fatores genéticos.

A quantidade e consistência da dieta tem significativo efeito no desenvolvimento mandibular. A integridade da dentição e mastigação normal durante o crescimento e envelhecimento agem sobre a estrutura óssea mandibular em humanos e em ratos (BERNICK e PATEK, 1969)

As medidas obtidas a partir do mensuramento do canal medular do fêmur visualizadas na Figura 32 mostraram um alargamento significativo desta estrutura nos animais OVX60, esses dados encontram apoio na literatura. Sabe-se que em relação à espessura do canal medular no osso cortical, o alargamento da cavidade medular é um mensuramento indireto de perda óssea. Esse alargamento em diáfises de ossos longos é devido ao aumento da reabsorção endosteal (TURNER et al., 1987) e aposição periosteal (MILER et al., 1991). Esses processos resultam em uma taxa muito lenta de perda óssea cortical que em longo prazo pode levar a um aumento no risco de fraturas (KIMMEL e WRONSKI, 1990).

Outros estudos, porém, indicam que as primeiras mudanças na largura do osso cortical e cavidade da medula do eixo femoral e tibial são observadas entre 90 e 120 dias após ovariectomia (DANIELSEN et al., 1993; JEE et al., 1993). Jee e Yao (2001) preconizaram um período mais longo para avaliação desta estrutura, segundo estes autores, o osso cortical requer 180 dias ou mais após a cirurgia para alcançar um estado de equilíbrio. A tentativa de se estabelecer um índice entre comprimento do fêmur e a espessura do canal medular não mostrou boa correlação (dados não apresentados).

As medidas de comprimento do fêmur não apresentaram diferenças significantes entre os grupos. Deste modo, parece não haver uma ação direta do estrógeno no crescimento destes animais. Para realização das análises, o fator tempo foi considerado na escolha das ratas para este estudo. Ratas jovens foram escolhidas para evitar que os efeitos do envelhecimento pudessem alterar a obtenção dos resultados de diversos parâmetros aqui analisados. (BODNER et al., 1998). Desta forma, torna-se claro que durante este estudo houve crescimento

dos animais. Segundo Kalu et al. (1989) ratos wistar alcançam sua total maturidade por volta de seis meses de idade, no presente estudo esse crescimento mostrou ter ocorrido de forma uniforme entre os animais dos três grupos.

6.4 RADIODENSITOMETRIA

Enquanto a radiografia convencional é formada por um arranjo de cristais de prata sobre uma emulsão, a imagem digital é formada por pixels, que são os pontos da imagem. Cada imagem contém uma informação sobre a cor ou nível de cinza ao qual corresponde aos pontos que formam essa imagem. Estes pontos podem ser analisados numericamente.

Os resultados deste estudo para a mensuração de valores de pixel indicaram um padrão similar para todos os grupos, mostrando valores menores para os grupos ovariectomizados em relação ao grupo SHAM. Alguns fatores externos poderiam interferir negativamente nas análises realizadas, alterando os resultados obtidos. O principal destes seria a inserção de ruídos provenientes da não padronização na obtenção das imagens radiográficas. Estes ruídos podem ainda ser provenientes do processamento e escaneamento das radiografias convencionais.

A metodologia efetuada neste trabalho minimizou essas interferências na qualidade das imagens. Optou-se, para isto, pela tomada radiográfica em película única para cada grupo, ao invés de se utilizar películas periapicais odontológicas como seria a idéia original. Desta forma, as imagens pertencentes a cada grupo foram submetidas a mesma intensidade de raios-X, mesmo tempo de exposição e mesma condição de processamento, revelação e processo de digitalização.

Mandíbula:

A radiodensidade da mandíbula na região de septo interradicular (2º molar inferior esquerdo), verificada por análise radiográfica, revelou uma diminuição de densidade óssea pela redução do número de pixels. Essa redução mostra-se visualmente mais intensa nos grupos ovariectomizados em relação ao grupo controle (Figura 41). Apesar de haver indícios positivos da ação da deficiência

estrogênica nesta região, essa alteração não se mostrou significativa. A mandíbula de ratas, em virtude de sua morfologia, impede reflexões mais conclusivas nos experimentos. Como anteriormente referido, a presença do incisivo erupcionando constantemente sob as raízes dos molares, pode afetar as propriedades da mandíbula e sua resposta frente a diversas condições experimentais (ORRICO et al., 2007).

Elovic et al. (1994) tentou explicar a pouca diferença na densidade óssea obtida em seu estudo entre os grupos SHAM e ovariectomizados pelo fato da cirurgia de ovariectomia afetar, de forma mais específica, o osso trabecular. Em ratas, a mandíbula em seu total, se apresenta constituída apenas por cerca de 11% deste osso, mudanças na fração de área óssea pode se apresentar menor na mandíbula que nas vértebras. Outra forma de se explicar o fato de que a mandíbula apresenta uma resposta diferenciada à depleção de estrógeno em relação ao fêmur e vértebras, é a atividade mecânica, proveniente da mastigação, ao qual a mandíbula é submetida constantemente.

Em relação ao fator tempo e às alterações orais após ovariectomia, a literatura mostra resultados conflitantes. TANAKA et al. (2002) avaliando o efeito da depleção de estrógeno na perda óssea alveolar, reportaram a redução do septo interradicular no primeiro molar inferior em um período de 60 dias de ovariectomia. Yang et al. (2003) indicam o período de três meses para a avaliação do efeito da ovariectomia em mandíbulas.

Outros autores, porém, não encontraram alterações periodontais e alveolares resultantes de ovariectomia neste período. Teófilo et al. (2003) relataram em seu estudo que a deficiência de estrógeno não é suficiente para promover osteoporose na mandíbula após 11 semanas de procedimento cirúrgico. Os autores indicam que a ovariectomia deve ser associada à restrição de cálcio na dieta dos animais para obtenção de melhores resultados. O presente estudo avaliou as alterações ósseas em um período máximo de 60 dias.

Fêmur:

Quanto à radiodensidade do fêmur, a análise dos valores de pixel revelou valores menores nos grupos ovariectomizados. Pôde-se notar uma diminuição mais expressiva no grupo OVX30 indicando uma maior perda óssea nas ratas que

alcançaram este período. Essa conclusão apóia-se ainda, no aumento dos níveis de fosfatase alcalina observada neste grupo, indicando que o desequilíbrio no remodelamento ósseo afetou negativamente os animais deste grupo, conforme se pode observar na Figura 28. A fosfatase alcalina é produzida pelos osteoblastos, seu aumento marca uma elevação na produção óssea. Por outro lado, sabe-se que no ciclo de remodelagem (Figura 2) o período de reabsorção ocorre dramaticamente mais rápido que a formação óssea. No estado de restrição estrogênica, o *turnover* ósseo entra em desequilíbrio levando a um balanço final de perda de densidade óssea.

Como foi dito, a perda óssea em mulheres na pós-menopausa ou mulheres e ratas ovariectomizadas está associado a elevado *turnover*. Todavia essa perda óssea não é uniforme. O osso trabecular corre mais risco de perda mineral que o osso cortical. Adicionalmente, há sítios específicos para perda óssea no osso trabecular.

Esse estudo realizou investigação em diferentes estruturas do fêmur para avaliar as respostas destas áreas frente às alterações hormonais causadas pelo procedimento de ovariectomia. Com relação à epífise distal houve uma redução nos valores de pixel que se mostrou significativa no grupo OVX30 com relação ao grupo controle. Não houve, no entanto, alterações expressivas entre os grupos OVX30 e OVX60, conforme mostrou a Figura 44. A perda óssea no osso trabecular em mulheres mostra-se mais rápida nos estágios iniciais da pós-menopausa, continuando em estágios mais tardios da condição de restrição de estrógeno. Este padrão assemelha-se àquele encontrado nas diversas avaliações da radiodensidade por valores de pixel realizados no presente estudo. Wronski et al. (1988) concordam que a perda óssea é maior nos primeiros estágios da restrição estrogênica.

Alguns estudos indicam que a epífise parece ser resistente a alterações frente à ovariectomia. Bells (1997) analisou a parte distal do fêmur não verificando significativa mudança no osso trabecular da epífise em 11,5 meses, já metáfise tornou-se osteopênica durante esse período, as primeiras alterações foram observadas aos dois meses de procedimento cirúrgico. O procedimento de ovariectomia pareceu não induzir perda óssea nas epífises de ossos longos, metáfise de tíbia distal ou vértebras caudais (JEE et al., 1991; LI et al., 1996).

A região de metáfise distal do fêmur mostrou ser uma região óssea extremamente sensível ao estado de depleção estrogênica (TURNER et al., 1995,). Todos os grupos ovariectomizados apresentaram decréscimo dos valores de pixel nesta região, indicando redução de densidade óssea significativa para ambos os grupos em comparação ao grupo SHAM. Esta alteração foi mais expressiva no grupo OVX 60, conforme pode ser visto na Figura 43. Essas observações estão de acordo com literatura (WRONSKI et al., 1985; YAMAMSHIRO e YAMAMOTO, 2001).

Segundo Cummings et al. (2002) osso trabecular se perde mais rapidamente na metáfise proximal de tíbias que nos corpos vertebrais no caso de restrição estrogênica. Esta observação é esperada para outros ossos longos sob esta mesma condição. WESTERLIND et al. (1997) em estudo da ação do estrógeno no osso trabecular não encontrou alterações significantes na epífise. Entretanto, notou-se uma dramática alteração na metáfise, com notáveis modificações na arquitetura do osso trabecular desta estrutura.

As análises realizadas na cabeça do fêmur mostraram médias de pixels menores nos grupos OVX30 e OVX60, conforme pode ser visto na Figura 42. Estes valores aumentam discretamente no grupo OVX60. A perda óssea ocorre aliada a uma resposta compensatória para o aumento da energia de deformação, fenômeno ainda pouco explicado. Este fenômeno parece relacionado à sobrevivência do osso trabecular. Uma possível explicação para esse efeito na homeostase do osso seria a capacidade do estrógeno de aumenta o limiar mecanostático nas células que respondem à deformação mecânica.

Segundo Rodan (1989), uma hipótese seria que as trabéculas inicialmente submetidas à baixa tensão mecânica estão em maior risco de serem reabsorvidas na ausência de estrogênio. Isso explicaria a discreta elevação na densidade óssea das estruturas submetidas a carregamento mecânico avaliadas no grupo OVX60 em relação ao grupo OVX30, conforme pode ser observado nos gráficos das Figuras 41 e 43.

Neto et al. (2006) em estudo utilizando a tíbia de ratas ovariectomizadas, analisaram a epífise deste osso por meio de medições de escala de cinza. As ratas OVT apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) quando comparadas aos animais do grupo controle.

Verifica-se por outros autores, à semelhança do presente estudo, a avaliação de alterações ósseas em diversas estruturas de ratas após ovariectomia. Wronski et al. em dois trabalhos (1989, 1990) mostraram diferenças estatísticas na tíbia proximal e metáfise depois de 14 dias após a cirurgia, corpo da vértebra lombar depois de 60 dias e pescoço do fêmur após 30 dias de ovariectomia. Neste estudo preferiu-se usar vários locais no fêmur para avaliação do efeito da restrição de estrógeno em ratas ovariectomizadas. Uma análise comparativa dos dados obtidos revela que a cabeça do fêmur e epífise distal desta estrutura são locais indicados para a investigação de alterações na densidade óssea, por valores de pixel, nos estágios iniciais da restrição estrogênica. A metáfise distal do fêmur mostra-se boa estrutura para avaliação de alterações ósseas em estudos a longo prazo (Tabela 12).

Westerlind et al. (1997) realizaram estudo em ratas ovariectomizadas utilizando-se avaliação mecânica por elementos finitos, histomorfometria e técnicas moleculares por cDNA. Segundo os autores, há um aumento do *turnover* ósseo tanto em sítios mais sensíveis quanto naqueles mais resistentes a perda óssea. Por outro lado, em suas análises, a perda óssea foi maior em regiões que experimentaram menor carregamento mecânico.

No presente estudo foi tomado o cuidado de se evitar regiões de modelagem óssea, ao se delinear a região de interesse para as medidas de radiodensidade no fêmur. Deve-se levar em consideração que em ossos longos pode-se encontrar atividade de modelagem óssea (relacionado ao crescimento do animal) e atividade de remodelamento (relacionado a alterações do metabolismo ósseo).

De acordo com Lelovas et al. (2008) o pico de massa óssea em ratos geralmente situa-se por volta de 10 meses de idade. Estes autores recomendam que mensuramentos densitométricos, tomográficos ou histomorfométricos não devem ser realizados próximos a placa de crescimento na epífise proximal da tíbia onde prevalece atividade de modelagem e sim devem ser conduzidos a 1 mm distal da placa de crescimento onde prevalece a atividade de remodelagem.

6.5 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

Os dados obtidos no presente estudo, a partir da análise da perda óssea vertical nas cristas do osso alveolar, revelaram uma perda óssea vertical crescente entre os grupos OVX30 e OVX60, sendo esta última significativa em relação ao grupo SHAM, conforme vemos na Figura 35. Em uma análise individual a raiz distal apresentou maior grau de reabsorção que a raiz mesial sendo essa perda significativa no OVX 60 em relação ao SHAM (Figura 36). Quando se realizou a análise percentual entre a dimensão da crista óssea com sua respectiva raiz não houve diferença significativa entre os três grupos (dado não mostrado).

Orrico et al. (2007) realizaram medidas com parâmetros semelhantes ao presente estudo, para avaliação da perda óssea vertical em cristas alveolares de ratas ovariectomizadas. Os autores usaram radiografias digitais e softwares para realização dos mensuramentos. Os autores avaliaram os animais por um período de 51 a 150 dias usando DEXA e radiografias, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos OVX e SHAM.

Park et al. (2007) em estudo para avaliação da relação entre o desenvolvimento da doença periodontal e a restrição estrogênica, analisaram a região de 1º molar de ratas ovariectomizadas por microtomografia computadorizada. Uma perda óssea vertical foi observada no osso alveolar de ratas ovariectomizada com doença periodontal. Não foi encontrada diferença significativa entre o grupo controle e ovariectomizado

A técnica de Micro-Ct foi fundamental para a identificação da perda óssea vertical ao nível de crista óssea alveolar, sobretudo, no grupo OVX60. Estes dados indicam a possibilidade de alterações no osso alveolar capazes de interferir na retenção dentária. Este tipo de distúrbio ósseo na cavidade oral foi identificado por alguns autores em estudos com mulheres na pós-menopausa (HILDEBOLT et al., 1997; BIRKENFELD et al., 1999; Dutra et al., 2005)

As análises de volume ósseo mostraram uma discreta redução observada no grupo OVX30, esta alteração não se mostrou significativa entre os grupos. Analisando os dados para os grupos SHAM e OVX60 (Figura 38), sacrificados no mesmo período, observa-se grandes semelhanças. Estes resultados podem estar correlacionados ao stress mecânico aos quais os dois grupos se submeteram durante o período. De acordo com Shozushima et al. (1996) o carregamento mecânico local na mandíbula promove uma alta remodelagem resultando no aumento da massa óssea no osso alveolar. Segundo esses autores este aumento na remodelagem pode ser observado na região de segundo molar. Jiang et al. (2003) observaram grandes alterações no osso trabecular e cortical de ratas ovariectomizadas após 3 a 6 meses de procedimento cirúrgico, principalmente sob primeiro molar.

Alguns estudos preconizam que a cavidade oral não é adequada para estudar sinais osteoporóticos por conta do carregamento mecânico oclusal, sugerindo a remoção dos molares para obtenção de resultados mais precisos (ZAFFE et al., 1999).

Alguns estudos realizados para avaliar o volume mandibular em ratas ovariectomizadas mostraram diferença significativa no volume das ratas entre os grupos controle e ovariectomizados (DUARTE et al., 2004; IRIE et al., 2004). Tanaka et al. (2002) em estudo realizado por histomorfometria observaram diferenças no volume, espessura e número de trabéculas no osso alveolar entre ratas do grupo SHAM e ovariectomizadas. Houve uma redução de todos os parâmetros no grupo submetido à restrição estrogênica.

Neste estudo foi escolhida a região de 2º molar para a realização de mensuramentos lineares e volumétricos. A escolha da melhor região de interesse para alterações osteopênicas em mandíbulas de ratas ovariectomizadas é assunto controverso. Alguns autores, porém, preferiram realizar estudos para avaliação de alterações ósseas na região de 1º molar inferior (TANAKA et al, 2002; TEÓFILO et al, 2003; Park et al., 2007). os resultados obtidos não se apresentaram uniformes, sendo que em alguns estudos as alterações só foram observadas quando a ovariectomia foi aliada a uma dieta pobre em cálcio.

Algumas imagens 3D obtidas por microtomografia computadorizada mostram visíveis alterações no osso trabecular sob as raízes das unidades dentárias no grupo OVX60 (Figura 47). A análise das imagens obtidas neste estudo permitiu a observação de um aumento na porosidade também na região de 1º molar (Figura 48) entre os grupos OVX30 e OVX60. Tais alterações mostram-se como aumento da porosidade do osso alveolar entre as raízes destas unidades dentárias

O presente estudo utilizou imagens microtomográficas para investigação das alterações osteopênicas orais ligadas a restrição de estrógeno em ratas Wistar. Esta técnica mostrou inúmeras vantagens no que se refere à manipulação e avaliação de um campo tão diminuto como a cavidade oral destes animais. Quando comparada com outras técnicas de análises ósseas a Micro-CT tem como vantagem a possibilidade de utilização das imagens para diferentes tipos de análises sem a destruição da amostra. Isto é possível devido a possibilidade de obtenção, sempre que necessário, das imagens 3D a partir da manipulação das imagens 2D armazenadas por ocasião do escaneamento das amostras ósseas. Os mais diversos tipos de cortes e visualizações podem ser obtidos nos planos axial, frontal e sagital. Nenhum tipo específico de preparo foi realizado nas amostras ósseas antes da obtenção das imagens. Faz-se necessário, porém, o uso de softwares de análise para imagens que são bastante caros e nem sempre estão disponíveis em versão livre para *download*. Sem estes programas se torna impossível a utilização de tais imagens

A técnica de Micro-CT não permite a avaliação de alterações no padrão de remodelamento ósseo e alterações celulares que podem ser obtidas diretamente no tecido oral por histomorfometria. Não foi possível a realização de análises de parâmetros trabeculares tais como: espessura de trabéculas, números de trabéculas, número e espessura de espaços medulares nas imagens 3D dos fêmures e mandíbulas. Esta dificuldade ocorreu pela resolução escolhida para este estudo (40µm) que foi insuficiente para visualização mais precisa e separação de voxels necessária para a realização deste tipo de análise. A resolução necessária para estudos trabeculares em ratas é da ordem de 10 a 15 µm, não foi possível se conseguir este tipo de resolução com o tipo de equipamento utilizado

Perspectivas:

O modelo de estudo aqui desenvolvido mostra-se útil para a avaliação da interação entre alterações osteopênicas orais e diversas situações experimentais. Uma possibilidade de investigação seria a interação da progressão da doença periodontal (que leva a uma perda óssea local aliada ao quadro inflamatório) e o estado osteopênico causado por restrição de estrógeno. Este tipo de avaliação permitiria a avaliação de fármacos sistêmicos para o controle de perda de massa óssea e sua ação nas alterações periodontais que atingem o osso alveolar. Possibilitaria ainda a avaliação de substâncias como óleos essenciais para o possível controle do quadro orais de doença periodontal associados à osteopenia sistêmica. Este modelo seria útil, ainda, na investigação do efeito da atividade física no estado osteopênico e sua ação na cavidade oral de ratas ovariectomizadas.

7 CONCLUSÕES

Ratas Wistar ovariectomizadas apresentaram sinais osteopênicos orais e sistêmicos nos protocolos de 30 e 60 dias.

O protocolo de 30 dias pós-ovariectomia revelou alterações no perfil bioquímico dos animais indicando aumento dos ciclos de remodelagem óssea. Este período foi suficiente para a identificação de sinais osteopênicos orais e sistêmicos por meio de análises radiográficas.

Os animais submetidos ao protocolo de 60 dias mostraram maiores evidências de perda óssea alveolar. A microtomografia computadorizada foi fundamental na identificação no mensuramento das cristas ósseas alveolares, indicando a possibilidade de interferência da restrição de estrógeno na retenção dentária destes animais. Essa nova abordagem permitiu estabelecer medidas da altura da crista óssea usando imagens tridimensionais com grande precisão, evitando a interferência das atenuações radiográficas observadas em imagens radiográficas convencionais.

Os dados obtidos pela análise bioquímica e por imagens mostraram correlações positivas entre a perda óssea oral e sistêmica tanto nos animais OVX30 quanto OVX60.

O modelo de restrição estrogênica por ovariectomia desenvolvido no presente estudo mostrou-se útil na análise do estado osteopênico, sobretudo no que se refere aos sinais orais deste processo. A microtomografia computadorizada foi fundamental para a realização das análises da estrutura óssea mandibular e a quantificação da perda óssea alveolar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANBINDER, A.L.; PRADO, F.A.; PRADO, M.A.; IBALDUCCI, I.; ROCHA, F.R. The influence of ovariectomy, simvastatin and sodium alendronate on alveolar bone in rats. **Braz. Oral Res.** vol.21 no.3, São Paulo, 2007.

ANWAR, R.B.; TANAKA, M.; KOHNO, S.; IKEGAME, M.; WATANABE, N.; NOWAZESH, M.; EJIRI, S. Relationship between Porotic Changes in Alveolar Bone and Spinal Osteoporosis. **J Dent Res**, 86(1):52-57, 2007.

ARAÚJO, D.V.; OLIVEIRA, J.H.A.; BRACCO, O.L. Custo da fratura osteoporótica de fêmur no sistema suplementar de saúde brasileiro. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 49 / 6: 897-901, 2005.

ARNETT, T.R.; GIBBONS, D.C.; UTTING, J.C. Hypoxia is a major stimulator of osteoclast formation and bone resorption. **J Cell Physiol**, 196:2-8, 2003.

ASAI, H.; KOZAI, Y.; MATSUMOTO, Y.; KAWAMATA, R.; KUMASAKA, S.; SAKURAI, T.; KASHIMA, S. Radiological Morphometric Analysis of the Mandibular Bone Structure after Ovariectomy in Mature Cynomolgus Monkeys. **Oral Science International**, p.54-63, May, 2005.

AUGAT, P.; SCHORLEMMER, S. The role of cortical bone and its microstructure in bone strength. **Age and Ageing**, 6; 35-S2: ii27-ii31, 2006.

AUFDEMORTE, T.B.; VAN SICKELS, J.E.; DOLWICK, M.F.; SHERIDAN, P.J.; HOLT, G.R.; ARAGON, S.B.; GATES, G.A. Estrogen receptors in the temporomandibular joint of the baboon (*Papio cynocephalus*): an autoradiographic study. **Oral Surg**, 61:307-14, 1986.

BAUMANN, B.D., WRONSKI, T.J. Response of cortical bone to antiresorptive agents and parathyroid hormone in aged ovariectomized rats. **Bone** 16:247-253. 1995.

BECKER, A.R.; HANDICK, K.E.; ROBERTS, W.E.; GARETTO, L.P. Osteoporosis risk factors in female dental patients. A preliminary report. **J Indiana Dent Assoc.** 76(2):15-9, 1997.

BELL, NH, Johnson RH. Bisphosphonates in the treatment of osteoporosis. **Endocrine** 6:203-206. 1997

BERNARDI, F. et al. Somatotropic axis and body weight in pre-menopausal and postmenopausal women: evidence for a neuroendocrine derangement, in absence of changes of insulin-like growth factor binding protein concentrations. **Oxford**, v.13, n.2, p.279-284, Feb. 1998.

BERNES, T.; HAUFMANN, C.; GOTZEN, L. Strength testing of pins made of human femur cortical bone. **Unfallchirg.** 104: 64-8, 2001.

BERNICK, S, PATEK, P.Q. Postnatal Development of the Rat Mandible. **J Dent Res**, 48; 1258, 1969.

BIRKENFELD, L. MATAN YEMINI, NATHAN G. KASE, ARIE BIRKENFELD. Menopause-Related Oral Alveolar Bone Resorption: A Review of Relatively Unexplored Consequences of Estrogen Deficiency. **Menopause**, vol 6, nº 2, 1999.

BODIC, F.; HAMEL, L.; LEROUXEL, E.; BASLE, F.M.; CHAPPARD, D. Bone loss and teeth. **Joint Bone Spine**, March, 2004.

BODIC, F.; HAMEL, L.; LEROUXEL E.; BASLE, M.F.; CHAPPARD, D. Bone loss and teeth. **Joint Bone Spine**, 72(3)215-21, May, 2005.

BODNER, L.; GABOR, D.; KAFFE, I. Characteristics of the aging rat mandible. **Archives of Gerontology and Geriatrics.** 27 147–157, 1998.

BOWMAN, B.M., MILLER, S.C. Elevated progesterone during pseudopregnancy may prevent bone loss associated with low estrogen. **J Bone Miner Res** 11:15–21, 1996.

BRIN, I., MICHAELI, Y., STEIGMAN, S. Long-term effect of orthodontic forces on the morphology of the rat incisor socket and its location in the mandible. **J. Dent. Res.** 69, 1834–1838, 1990.

BUSUITO, M.J.; SMITH, D.J.; ROBSON, M.C. Mandibular fractures in an urban trauma center. **The Journal of Trauma** 26: 826-829, 1986.

CAO T, SHIROTA T, YAMAZAKI M, OHNO K, MICHIKI KI. Bone mineral density in mandibles of ovariectomized rabbits. **Clin Oral Implants Res.** 12(6):604-8. 2001.

CASTRO DA ROCHA FA, RIBEIRO AR. Low incidence of hip fractures in an equatorial area. **Osteoporos Int**; 14(6):496-9, July, 2003.

CASTRO, C.H.M.; PINHEIRO, M.M.; SZEJNFELD, V.L. (2000). Prós e contras da ultrasonometria óssea de calcâneo (artigo de revisão). Ver. Ass. Med. Brasil. São Paulo, jan/mar, p.63. Disponível em: <[HTTP://amb.connectmed.com.br/site/publicações/ramb/janmarco00/pag63.htm](http://amb.connectmed.com.br/site/publicações/ramb/janmarco00/pag63.htm)> Acesso em: 28 jan. 2009.

CENTENO, T. M. Processamento de Imagens, 2005. Disponível em <<http://www.cpgei.cefetpr.br/~mezzadri/PDI/PDITec.html>>. Acesso em: 05 Mai.2008

CERRONI, A.M.; TOMLINSON, G.A.; TURNQUIST, J.E.; GRYNPAS, M.D. Bone mineral density, Osteopenia, and osteoporosis in the rhesus macaques of Cayo Santiago. **Am J Phys Anthropol** 113:389-410, 2000.

CHEN, Y., HEIMAN, M.L. Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 280:E315-22, 2001.

CHRISTIANSEN, C.; RODBRO, P.; TJELLESEN, L. Serum alkaline phosphatase during hormone treatment in early postmenopausal women. **Acta Med Scand** 216: 11-17, 1984.

CIARELLI, T.E.; FYHRIE, D.P.; SCHAFFLER, M.B.; GOLDSTEIN, S.A. Variations in three-dimensional cancellous bone architecture of the proximal femur in female hip fractures and in controls. **J Bone Miner Res**, 15:32-40, 2000.

COMPSTON, J.E. Bone density; BMD, or corrected BMD? **Bone**, v.16, nº1.p.5-7, 1995.

COSTA-PAIVA, L. HOROVITZ, A.P.; SANTOS, A.O.; FONSECHI-CARVASAN, G.A.; PINTO-NETO, A.M. Prevalência de Osteoporose em Mulheres na Pós-menopausa e Associação com Fatores Clínicos e Reprodutivos. **RBGO** - v. 25, nº 7, 2003.

COWIN, S.C. The significance of bone mecrostructure in mechanotransduction. **Journal of Biomechanics** 40, S105-S109, 2007.

CUMMINGS, S.R. et al. Epidemiology of osteoporosis and osteoporotic fractures. **Epidemiology Reviews**, 7:178-208, 1985.

CURREY, J.D. The mechanical properties of bone. **Clin Orthop**,73:210-31,1998.

DAMROGRUNGRUANG, T.; KURODA, S.; KONDO, H.; AOKI, K., OHYA, K.; KASUGAI, S. A simple murine model for immobilization Osteopenia. **Clin Orthop** 244-251, 2004.

DANIELSEN, C.C.; MOSEKILDE, L.; SVENSTRUP, B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. **Calcif Tissue Int** 52:26–33. 1993.

DAO, T.T.; ANDERSON, J.D.; ZARB, G.A. Is osteoporosis a risk factor for osseointegration of dental implants? **Int J Oral Maxillofac Implants**; 8:137-144, 1993.

DAVIS, G.R., WONG, F.S. X-ray microtomography of bones and teeth. **Physiol Meas** 17, 121-146, 1996.

DEMPSTER, D.W., LINDSAY, R. Pathogenesis of osteoporosis. **The Lancet**, v.341, p.797-780., 1983.

DEMPSTER, D.W., SHANE, E.S.; HORBERT, W. et al. A simple method for correlative light and scanning electron microscopy of human iliac crest bone biopsies: qualitative observations in normal and osteoporotic subjects. **J Bone Miner Res** 1:1521, 1986.

DEMPSTER, D. W.; BIRCHMAN, R.; XU, R. et al. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. **Bone**, 16(1);157-61, 1995.

DEVLIN, H., HORNER, K. Mandibular radiomorphometric indices in the diagnosis of reduced skeletal bone mineral density. **Osteoporos Int** 13(5): 373-8, 2002.

DING, M.; ODGAARD, A.; DANIELSEN, C.C.; HVID, I. Mutual associations among microstructural, physical and mechanical properties of human cancellous bone. **J Bone joint surg**, 84-B:900-7, 2002.

DUARTE, P.M.; GONCALVES, P.F.; SALLUM, A.W.; SALLUM, E.A.; CASATI, M.Z.; NOCITI, F.H. Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. **J Periodontal Res**;39:107- 2005.

DUCY, P., AMLING, M., TAKEDA, S., PRIEMEL, M., SCHILING, A.F., BEIL, F.T., SHEN, J., VINSON, C., RUEGER, J.M., KARSENTY, G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay a central control of bone mass. **Cell** 100:197-207.thetic nervous system. **Cell** 11:305-317, 2000.

DUTRA, V.; YANG, J.; DEVLIN, H.; SUSIN, C. Radiomorphometric indices and their relation to gender, age, and dental status. **Oral Surg Oral Med pathol Oral Radiol Endod**, v. 99, n. 4, p. 479-484, april, 2005.

EARNSHAW, A.S.; KEATING, N.; HOSHING, D.J.; CHIVERS, C.E.; RAVN, P., MCCLUNG, M. Tooth counts do not predict bone mineral density in early postmenopausal Caucasian women. EPIC study group. **Int J Epidemiol** ;27(3):479-83, 1998.

EBERLY, D. Skeletonization of 2D Binary Images. Magic Software, Inc. 2001. Disponível em: <http://www.magic-software.com>. Acessado em 13/09/2009.

EGERMANN, M.; GOLHAHN, J.; SCHNEIDER, E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. **Osteoporosis Int**, 16: S219-138, 2005.

ELOVIC, R.P.; HIPPI, J.A.; HAYES, W.C. Maxillary molar extraction decreases the stiffness of the mandible in ovariectomized rats. **JDR** 73(11): 1735-1741, 1994

ELOVIC, R.P., J.A.HIPPI; HAYES, W.C. Ovariectomy Decreases the bone area fraction of the rat mandible. **Calcif Tissue Int** 56:305-310, 1995.

ERIKSEN, E.F.; VESTERBY, A.; KASSEM, M.; MELSEN, F. MOSEKILDE, L.. Bone remodeling and bone structure. In MUNDY, G.R.; MARTIN, T.J. **Physiology and pharmacology of bone**. Berlin: Springer-Verlag. Cap.2, p.67-109. 1993.

EVERTS V, DELAISSE JM, KORPER W, JANSEN DC, TIGCHELAAR-GUTTER W, SAFTIG P, et al. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. **J Bone Miner Res** 17:77-90. 2002

FAINE, M.P. Dietary factors related to preservation of oral and skeletal bone mass in women. **J Prosthet Dent**. 73(1):65-72,1995.

FEDER, H.H; RESKO, J.A.; GOY, R.W. Progesterone levels in the arterial plasma of pre-ovulatory and ovariectomized rats. **J Endocrinol** 41:563–569, 1968.

FERNADES, I.C.; SILVA, A.M.S.P.; CAVALCANTE, P.F.; DINK, S.M.F.; BORGES, Z.M.; MACHADO, M.S.; ALENCAR,V.M.R. Osteoporose fatores de risco e tratamento. **JBMM**, v.80-92, 2001.

FRANCIS, R.M.;SUTCLIFF, A.M.; SCANE, A.C. (1998). **Pathogenesis of osteoporosis**. In: STELVENSON, J.C.; LINDASAY, R. Osteoporosis. London: Chapman and Hall Medical

FROST, H.M. Defining osteopenia and osteoporosis: Another view (with insights from a new paradigm). **Bone**, 20(5)385-91, 1997.

FROST, H. M. Vital biomechanics: Proposed general concepts for skeletal adaptations to mechanical usage. **Calcif Tissue Int**, 42:145–156; 1988

FROST, H.M., JEE, W.S.S. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses, **Bone and Mineral** 18: 227-236,1992.

FUJITA, T.; KAWATA, T.; TOKIMASA, C.; TANNE, K. Influence of oestrogen and androgen on modelling of the mandibular condylar bone in ovariectomized and orchietomized growing mice. **Archives of Oral Biology** 46 57–65, 2001.

GILSANZ, V.; LORO, M.L., ROE, T.F.; et al. Gender differences in vertebral size in adults: biomechanical implications. **J clin Invest** , 95:2332-2337, 1995.

GIRASOLE, G.; JILKA, R.L.; PASSERI, G.; BOSWELL, S.; BODER, G.; WILLIAMS, D.C. *et al.* 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone

marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. **J Clin Invest** 89(3): 883-91, Mar, 1992.

GONZALEZ, R. C., WOODS, R. E. *Processamento de Imagens Digitais*. Ed. **Edgard Blücher Ltda**, São Paulo, 1992.

GROSFELD, O.; JACKOWSKA, M.; CZARNECKA B. Results of epidemiological examinations of the temporomandibular joint in adolescents and young adults. **J Oral Rehabil** 12:95–105, 1985.

HALLING, A., PERSSON, G.R., BERGLUND, J., ET AL. Comparison between the Klemetti index and heel DXA BMD measurements in the diagnosis of reduced skeletal bone mineral density in the elderly. **Osteoporos Int** 16(8): 999-1003, 2005.

HAITER-NETO, F.; WENZEL, A. Noise in subtraction images made from pairs of bitewing radiographs: a comparison between two subtraction programs. **Dentomaxillofac Radiol**, Houndsmills, v.34, p.357-361, Nov. 2005.

HEANEY, R.P. Qualitative factors in osteoporotic fractures: the state of the question. **Osteoporosis**. P.281-87, 1987.

HENRIKSEN K, KARSDAL M, DELAISSE JM, ENGSIG MT: RANKL and vascular endothelial growth factor (VEGF) induce osteoclast chemotaxis through an ERK1/2-dependent mechanism. **J Biol Chem** 2003, 278:48745–48753

HIATT, J. L., GARTNER, L. P. *Histology*. ed: **wb Saunders Company**, cap 7, p. 109-30 Philadelphia, 1997.

HILDEBOLT, C.F. Osteoporosis and oral bone loss. **Dentomaxillofac Radiol** 26(1):3-15, 2001.

HOLLINGER, J.O.;BUCK, D.C.; BRUDER, S.P. **Biology Of Bone Healing: Its impact on Clinical Therapy**. In LYNCH, S.E.; GENCO, R.J.; MARX, R.E. *tissue Engineering*. Quintessence Publishing Co, Inc. (1999)

HOLM, K.; DAN, A.; WILBUR, J. A longitudinal study of bone density in midlife women. **Health Care Women Int** 23:678-91, 2002.

HOMMINGA, J.; VAN-RIETBERGEN, B.; LOCHMULLER, I.; WEINANS, H.; ECKSTEIN, F.; HUISKES, R. The osteoporotic vertebral structure is well adapted to the loads of daily life, but not to infrequent "error" loads. **Bone** 34:510-516, 2004.

HORNER, K.; DEVLIN, H.; HARVEY, L. Detecting patients with low skeletal bone mass. **J Dent** 30(4): 171-5, 2002.

HUNZIKER, J.; WRONSKI, T.J.; MILLERL, S.C. Mandibular Bone Formation Rates in Aged Ovariectomized Rats Treated with Anti-resorptive Agents Alone and in Combination with Intermittent Parathyroid Hormone. **J Dent Res** 79(6):1431-1438, 2000.

ILDA, H., FUKUDA, S. Age-related changes in bone mineral density, cross-sectional area strength at different skeletal sites in male rats. **J. Vet. Med. Sci.** 64(1): 29-34, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Banco de dados (on-line). Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 09 out. 2009.

INAGAK, I. K.; KUROSU, Y.; KAMIYA, T. et al. Low metacarpal bone density, tooth loss, and periodontal disease in Japanese women. **J Dent Res.** 80(9):1818-22, Sep 2001.

IRIE K, SAKAKURA Y, TSURUGA E, HOSOKAWA Y, YAJIMA T. Threedimensional changes of the mandible and alveolar bone in the ovariectomized rat examined by micro-focus computed tomography. **J Jpn Soc Periodontol** 46:288-293. 2004.

ISHII K, et al.: Visual assessment of the mandibular cortex on panoramic radiographs to identify postmenopausal women with low bone mineral densities. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 100(2): 226-31, 2007.

JEE, W.S.S., YAO, W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. **J Musculoskelet Neuronal Interact** 1:193–207, 2001.

JEFFCOAT, M.K.; CHESTNUTI, C.H. Systemic osteoporosis and oral bone loss: evidence shows increased risk factors. **J Am Dent Assoc**; 124,49-56,1993.

JEFFCOAT, M.K. Osteoporosis: a possible modifying factor in oral bone loss. **Ann Periodontol**; 3(1):312-21, 1998.

JEROME C.P., PETERSON P.E. Nohuman primate models in skeletal research. **Bone**, 29:1-6, 2001.

JIANG, Y.; ZHAO, J.; WHITE, D.L.; GENANT, H.K. Micro CT and Micro MR imaging of 3D architecture of animal skeleton. **J Musculoskel Neuron Interact**; 1:45-51, 2000.

JILKA, R.G.; GIRSOLE, G.H.; PASSERI, G.; WILLIAMS, D.; ABRAMS, J.; BOYCE, B.,; BROXMEYER, H.; MANOLOAGAS, S. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by IL-6. **Science** ;257:88-91, 1992

KALU, D.N.;LIU, C-C, HARDIN, R.R.; HOLLIS, B.W. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. **Endocrinology** 124:7–16, 1991

KAWAMOTO, S.; EJIRI, S.; NAGAOKA, E.; OZAWA, H. Effects of oestrogen deficiency on osteoclastogenesis in the rat periodontium. **Archives of Oral Biology** 47 , 67–73, 2001.

KENSUKE, A.; KUMASAKA, S.; SAKURAI, T. Evaluating two - dimensional skeletal structure parameters using radiological bone morphometric analysis. **Oral Radiol**, v. 21, p. 30-37, 2005.

KILIARIDIS, S. Muscle function as a determinant of mandibular growth in normal and hypocalcaemic rat. **Eur. J. Orthodont.** 11, 298–308, 1989

KIMMEL DB, WRONSKI TJ. 1990. Nondestructive measurement of bone mineral in femurs from ovariectomized rats. **Calcif Tissue Int** 46:101–110

KINGSMILL, V., BOYDE, A. Variation in the apparent density of human mandibular bone with age dental status. **J Anat.** 192:233-44, 1998.

KINNEY, J.H.; HAUPT, D.L.; BALOOCH, M.; LADD, A.J.C.; RYABY, J.T.; LANE, N.E. Three-Dimensional Morphometry of the L6 Vertebra in the Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis: Biomechanical Implications. **J Bone Miner Res** 15:1981–1991, 2000.

KLEIN-NULEND, J.; NIJWEIDE, P.J.; BURGER, E.H. Osteocyte and bone structure. **Curr Osteoporos Rep.** 1(1):5-10, 2003.

KLEMETTI, E., VAINIO, P. Effect of bone mineral density in skeleton and mandible on extraction of teeth and clinical alveolar height. **J Prosthet Dent** 70(1): 21-5, 1993.

KLEMETTI E, KOLMAKOV S, KROGER H: Pantomography in assessment of the osteoporosis risk group. **Scand J Dent Res** 102(1): 68-72, 1994.

KOSA, J.P.; BALLA, B.; KISS, J.; et al. Postmenopausal expression changes of immune system-related genes in human bone tissue. **J Clin Immunol**, 2009.

KOYAMA, H.; NAKADE, O.; TAKADA, Y.; KAKU, T.; LAU, K.H. Melatonina t pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down regulation of RANKL-mediated osteoclasts formation and activation. **J Bone Miner Res** 17:1219-1229, 2002.

KRALL, E.A. The periodontal-systemic connection: implications for treatment of patients with osteoporosis and periodontal disease. **Ann Periodontol**;6(1):209-13, 2001.

KRIBBS, P.J.; CHESNUT, C.H.^{3RD}.; OTT, S.M.; KILCOYNE, R.F. Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. **J Prosthet Dent** 62(6):703-7, 1989.

KRIBBS, P.J. Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. **J Prosthet Dent** 53(6):218-22, 1990.

LEE, YB; LEE, H.J.; KIM, K.S.; LEE, JY.; NAM, SY.; CHEON SH. E SOHN, HS. Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 68 (5), 1040-1045, 2004.

LEE, K.; TAGUCHI, A.; ISHII, K. et al. Visual assessment of the mandibular cortex on panoramic radiographs to identify postmenopausal women with low bone mineral densities. **Oral Surg Oral Med Oral** 100(2): 226-31, 2005.

LEITE, A.E.; FIGUEIREDO, P.T.S.; GUIA, C.M.; et al. Radiografia panorâmica - instrumento auxiliar no diagnóstico da osteoporose **Rev. Bras. Reumatol.** v. 48, n.4, p. 226-233, jul/ago, 2008

LELOVAS, P.P.; XANTHOS, T.T.; THOMA, S.E.; LYRITIS, G.P.; DONTAS, I.A. The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. **Comp Med.** 58(5): 424–430, Oct, 2008.

LEY, C.J.; LEES, B.; STEVENSON, J.C. Sex- and menopause-associated changes in body-fat distribution. **Am J Clin Nutr** 55: 950–954, 1992.

LI, M.; SHEN, Y.; WRONSKI, T.J. . Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. **Bone** 20:55–61, 1996,

LIBOUBAN, H. et al. Osteolytic bone lesions in the 5T2 multiple myeloma model: radiographic, scanning electron microscopic and microtomographic studies. **J. Histotechnol.** 24, 81-86, 2001.

LII, M.; SHEN, Y.; QI, H.; WRONSKI, T.J. Comparison study of skeletal response to estrogen depletion at red and yellow marrow sites in rats. **Anat Rec** 245:472–480. 1996.

LILL, C.A.; GERLACH, U.V.; ECKHARDT, C.; GOLDHAHN, J.; SCHNEIDER, E. Bone Changes due to glucocorticoid application in ovariectomized animal model for fracture treatment in osteoporosis. **Osteoporos Int** 13:407-414, 2002.

LINDBERG, M.K.; ERLANDSSON, M.; ALATALO, S.L. et al. Estrogen receptor alpha, but not estrogen receptor beta, is involved in the regulation of the OPG/RANKL (osteoprotegerin/receptor activator of NF-kappa B ligand) ratio and serum interleukin-6 in male mice. **J Endocrinol** 171(3):425-433, 2001.

MARTIN, R.B.; BUTCHER, R.L.; SHERWOOD, L.L.; BUCKENDAHL, P.; BOYD, R.D.; FARRIS, D.; SHARKEY, N.; DANNUCCI, G. Effects of ovariectomy in beagles dogs. **Bone** 8: 23-31, 1987

MARTIN T.J., SIMS, N.A. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. **Trends Mol Med** 11:76–81, 2005.

MAWATARI, T.; MIURA, H.; HIGAKI, H.; MORO-OKA, T.; KURATA, K.; TERUO MURAKAMI, T.; IWAMOTO, Y. Effect of Vitamin K2 on Three-Dimensional Trabecular Microarchitecture in Ovariectomized Rats. **J Bone Miner Metab** 19:159–167, 2001.

MELTON, S.A. et al. Swimming eliminates the weight gain and abdominal fat associated with ovariectomy in the retired breeder rat despite high-fat diet selection. **Appetite**, London, v.35, n.1, p.1-7, Aug. 2000.

MILER SC, WRONSKI TJ . Long Term osteopenic changes in cancellous bone structure in ovariectomized rats. **Anat Anat ec** 236:433-411.1993.

MOHAJERY, M. ,BROOKS, S. L. Oral radiographs in the detection of early signs of osteoporosis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 73:112–117; 1988.

MOHAMMAD, A .R. ;ALDER, M.; McNALLY, M. A. A pilot study of panoramic film density at selected sites in the mandible to predict osteoporosis. **Int J Prosthodont**, Lombard, v. 9, n. 3, p.290-294, may-jun, 1996.

MOHAMMAD, A.R.; HOOPER, D.A.; VERMILYEA, S.G.; MARIOTTI, A.; PRESHAW, P.M. An investigation of the relationship between systemic bone density and clinical periodontal status in postmenopausal Asian-American women. **Int Dent J.**; 53(3): 121-5, 2003.

MOREIRA, M.A.; BRITO, M.V.H.; BRITO, N.M.B.; FREIRE-FILHO, M.S.F. Skeletal muscle histomorphometric study of rats in anestrus. **Acta Cirúrgica Brasileira** - Vol 20 (4) 2005.

MORIYA Y, ITO K, MURAI S. Effects of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. **J Oral Sci** 1998;40:171-175.

MOYAD MA. Osteoporosis: a rapid review of risk factors and screening methods. **Urol Oncol.** Sep-Oct:21(5):375-9, 2003.

NETTO, C.C.; FRANCO, M.; DA CUNHA, M.S.C.A.; KENJI MIYASAKA, K. R. Efeitos da ovariectomia experimental no metabolismo ósseo de ratas wistar adultas: um modelo para estudo da osteoporose. **Ci. méd. biol.**, Salvador, v. 5, n. 3, p. 231-238, set./dez. 2006.

NJEH, C.F.; LANGTON, C.M. The effect of cortical endplates on ultrasound velocity through the calcaneus an in vitro study. **The british journal of radiology**, 70:504-510, 1999.

NEUMANN, E.; SCHETT, G. Bone Metabolism: Molecular Mechanisms. **Rheumatol.** 66(4):286-9, 2007.

ORRICO,S.R.P.; GIRO, G.; DANIELA GONÇALVES, D.; TAKAYAMA, L.; PEREIRA, M.R.M. Influence of the Period After Ovariectomy on Femoral and Mandibular Bone Density and on Induced Periodontal Disease. **J Periodontol** ;78:164-169, 2007.

PACIFICI R. Is there a causal role for IL-1 in postmenopausal bone loss? **Calcif Tissue Int** ;50:295-299, 1992.

PAN J, SHIROTA T, OHNO K, MICHI K. Effect of ovariectomy on bone remodeling adjacent to hydroxyapatite-coated implants in the tibia of mature rats. **J Oral Maxillofac Surg** ,58:877-82, 2000.

PARFITT, A.M. The bone remodeling compartment: a circulatory function for bone lining cells. **J Bone Miner Res**, 16:1583–1585, 2001.

PARK,C.H.; ABRAMSON, Z.R.; TABA JR, M.; JIN,Q.; KREIDER J.M.; GOLDESTSTEIN,S.A.; GIANOBILE,W.V. Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. **J Periodontol**, 78:273-281, 2007.

PAYNE JB, REINHARDT RA, NUMMIKOSKI PV, PATIL KD. Longitudinal alveolar bone loss in post menopausal osteoporotic/osteopenic women. **Osteoporosis Int** ,10:34-40 , 1999.

PERCAC, S., NIKOLID, V. Structural analysis of the mandible by quantitative computed tomography. **Surg Radiol Anat** 14 : 155, 1992.

PIVA, F.; GAGLIANO, P.; MOTTA, M.; MARTINI, L. Adrenal progesterone: factors controlling its secretion. **Endocrinology** 93:1178– 1184, 1973

REGINSTER JY, BURLET N: Osteoporosis: a still increasing prevalence. **Bone** 38(2 Suppl 1): S4-9, 2006.

Riggs BL, Melton LJ. Involutional osteoporosis. **N Engl J Med** 1986; 314:676-86.

,RODAN, G.A.; RODAN, S.B. Expression of osteoblast phenotype. **Bone Mineral Research**, 2, 244-262, 1983.

RODRIGUES, L., CERQUEIRA, J.G. Conseqüências da remoção do côndilo mandibular no crescimento da maxila e da mandíbula, estudo experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.** vol.16 n.1 São Paulo Jan./Feb./Mar. 2001.

RODRIGUES, M.E.S. (2003). Análise da fratura óssea por ultrasonometria e ensaio mecânico de compressão. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

ROSCHGER, P.; PASCHALIS, E.P.; FRATZL, P.; et al. Bone mineralization density distribution in health and disease. **Bone** 42 456-466, 2008.

ROSEN, C.J. Growth hormone, IGF-I and the elderly: Clues to potential therapeutic intervention. **Endocrine**, 7:39-40, 1997.

ROSS, P.D.; DAVIS, J.W.; VOGEL, J.M.; WARNISH, R.D. A critical review of bone mass and the risk of fractures in osteoporosis. **Calcif. Tissue Int.** v.46, n.3, p. 149-61,1990.

ROY, E.J., WADE, G.N. Role of food intake in estradiol-induced body weight changes in female rats. **Horm Behav** 8: 265–274, 1977.

RUTTIMANN, E.; WEBBER, R.L.; HAZELRIG, J.B., BIRMINGHAM, A. Fractal dimension from radiographs of peridental alveolar bone A possible diagnostic indicator of osteoporosis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** ,74:98-110, 1992.

SAKAKURA, Y.; SHIDE, N.; I TSURUGA, I.; IRIE,K.; YAJIMA, T. Effects of running exercise on the mandible and tibia of ovariectomized rats. **J Bone Miner Metab** 19:159–167, 2001.

SCHORLEMMER, S.; GOHL, C.; IWABU, S, IGNATIUS, A.; CLAES, L.; AUGAT, P. Glucocorticoid Treatment of Ovariectomized Sheep Affects Mineral Density, Structure, and Mechanical Properties of Cancellous Bone. **J Bone Miner Res** 18:2010–2015, 2003.

SEELEY D G, BROWNER W S, NEVITT M C. Which fractures are associated with low appendicular bone mass in elderly women? **Ann Intern Med** 1991; 115: 837-42

SEEMAN, E.; DELMAS, P.D. Bone quality - the material and structural basis of bone strength and fragility. **N Engl J Med**, 354 2250–2261, 2006.

SEIBEL, M.J. Clinical application of biochemical markers of bone turnover. **Arq Bras Endocrinol Metab** 50 (4):603-620, 2006.

SHIMOMURA, K. et al. Is leptin a key factor which develops obesity by ovariectomy? **Endocr. J.**, Tokyo, v.49, n.4, p.417-423, Aug. 2002.

SHOZUSHIMA, M.; NAKANO, H.; KUBOTA, M.; KAMEGAI, T.; ISHIKAWA, F.; SAITO, H.; SAKAMAKI, K.. Bone mineral content of human mandible related to bite force and occlusal contact area. **Dent J late Med Univ** 21:215-222, 1996.

SILVA, LK. Avaliação tecnológica em saúde: densitometria óssea e terapêuticas alternativas na osteoporose pós-menopausa. **Cad Saúde Pública** 19:987-1003, 2003.

SILVEIRA V.A.; MEDEIROS, M.M.; COELHO-FIHO, J.M.; MOTA, R.S.; NOLETO, J.C.; COSTA, F.S.; PONTES, F.J.;SOBRAL, J.B.; AGUIAR, R.F.; LEAL, A.C.,

CLEMENTE, C.M. Hip fracture incidence in an urban area in Northeast Brazil. *Cad Saude Publica* 21(3): 907-12, 2005.

SONES,, A.D; WOLINSKY, L.E.; KRATOCHVIL, F.J. Osteoporosis and mandibular bone resorption in the Sprague Dawley rat. **Calcif Tissue Int**; 39(4):267-70, 1986

STEJSKAL, D.; BARTEK, J.; PASTORKOVA, R. Osteoprotegerin, RANK, RANKL. **Biomed Papers** 1(145):61-4, 2001.

STECHOW, D. et al. Does simvastatin stimulate bone formation in vivo? *BMC Musculoskeletal Disorders* 2003, 4. Disponível em : <http://www.biomedcentral.com/1471-2474/4/8>. Acesso em: 01 jan 2007.

STELN, G.S.; LIAN, J.B.; OWENT, T.A. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblastic differentiation. **FASEB Journal**, 4 (13) 311-3123,1990.

STRECKFUS, C.F., BAUR, U.; BROWN, L.J.; BACAL, C.; METTER, J.; NICK, T. Effects of estrogen status and aging on salivary flow rates in healthy. Caucasian women. **Gerontology**;44:32-9, 1998.

STELVENSON, J.C.; LINDASAY, R. Pathogenesis of osteoporosis. **Osteoporosis**. London: Chapman and Hall Medical, 1998.

STUART, C.W. (1999) Alterations of trabecular patten of the jaws in patients with osteoporosis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**;88(5):628-35.

SUDA, T.; TAKAHASHI, N.; MARTIN, T.J. Modulation of osteoclast differentiation. **Endocrine Rev** 12:66-80, 1992.

SUGISAKI, M.; SUZUKI, K.; IKAI, A.; TANABE, H.; KATO, S. Study of the temporomandibular joint of Japanese dry skull, Part I: sexual differences of masticator structure. **J Jpn Stomatol Soc** ;39:52–63, 1990.

TAGUCHI, A., SUEI, Y., OHTSUKA, M., et al.: Usefulness of panoramic radiography in the diagnosis of postmenopausal osteoporosis in women. Width and morphology of inferior cortex of the mandible. **Dentomaxillofac Radiol** 25(5): 263-7, 1996.

TAGUCHI, A.; SUEI, Y.; OHTSUKA, M.; OTANI, K.; TANIMOTO, K. HOLLENDER, L.G. Relationship between bone mineral density and tooth loss in elderly Japanese woman. **Dentomaxillofac Radio** 28(4):219-23, 1999.

TAGUCHI, A., TSUDA, M., OHTSUKA, M., et al.: Use of dental panoramic radiographs in identifying younger postmenopausal women with osteoporosis. **Osteoporos Int** 17(3): 387-94, 2004.

TAGUCHI, A.; OHTSUKA, M.; NAKAMOTO, T.; TANIMOTO, K: Screening for osteoporosis by dental panoramic radiographs. **Clin Calcium** 16(2): 291-7, 2006.

TAKADA, Y. et al. Milk whey protein enhances the bone breaking force in ovariectomized rats. *Nutr. Res.*, Tarrytown, v.17, n.11, p.1709- 1720, Nov. 1997.

TANAKA M, EJIRI S, KOHNO S, OZAWA H. The effect of aging and ovariectomy on mandibular condyle in rats. **J Prosthet Dent** ;79:685-90, 2002.

TANAKA,M.; EJIRI, S.; NAKAJIMA, M; KOHNO, S.; OZAWA, H. Changes of Cancellous Bone Mass in Rat Mandibular Condyle Following Ovariectomy. **Bone** Vol. 25, No. 3 ,339–347, 1999.

TEEGARDEN, D.; PROULX, W.R.; MARTIN, B.R., et al. Peak bone mass in young women. **J Bone Miner Res** 10(5):711-5, 1995.

TENÓRIO, D.M.H.; SANTOS, M.F.; ZORN, T.M.T. Distribution of biglycan and decorin in rat dental tissue. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.36, n.8, p.1061-1065, Aug, 2005.

TEÓFILO, J.M.; AZEVEDO, A.C.B.; PETENUSCI, S.O.; MAZARO, R; TERESA LÚCIA LAMANO-CARVALHO,T.L. Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxila and tibia of female rats. **Pesqui Odontol Bras**. 17;4:302-06, 2003.

THOMPSON, D.D.; SIMMONS, H.A.; PIRIE, C.M.; KE, H.Z. FDA guidelines and animal models for ostoporosis. *Bone*, v.17, n.4, p.125-33, oct, 1995.

TURNER, RT.; B.L.VANDERSTEENHOVEN, J.J.; BELL, N.H.Oral osteoporosis. **J. Bone Miner. Res.** 2, 115-122, 1995.

UCHYAMA, T.; TANIZAWA, T.; MURAMATSU,H.; ENDO,N.; TAKAHASHI, H.E.; HARA,T. A Morphometric Coparison of Trabecular Structure of Human Ilium Between Microcomputed Tomography and Conventional Histomorphometry. **Calcif Tissue Int** 61:493-498, 1997.

UCHYAMA, T.; TANIZAWA,T.; MURAMATSU,H.; ENDO,N.; TAKAHASHI, H.E.; HARA, T. A. Three-Dimensional Microstructural Analysis of Human Trabecular Bone in Relation to Its Mechanical Properties. **Bone** Vol. 25, N^o 4, 487-491, 1999.

UDAGAWA, N.;TAKAHASHI, N.; JIMI, E.; et al. Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony stimulating factor. **Bone** 25:517-523, 1999.

VAN DAELE, P.L.; BIRKENHÄGER, J.C.; POLS, H.A. Biochemical markers of bone turnover: an update. **Neth J Med**. 44(2):65-72, 1994.

VASCONCELLOS, L.S. et al. Influência da ooforectomia na variação ponderal em ratas jovens e adultas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, Rio de Janeiro, v.48, n.2, p.299-304, abr. 2004.

VON WOWERN, N. In vivo measurement of bone mineral content of mandibles by dual-photon absorptiometry. **Scand J Dent Res** 93:162–168; 1985

VON WOWERN N.; KLAUSEN, B.; KOLLERUP, G. Osteoporosis: a risk factor in periodontal disease. **J Periodontol** 65(12):1134, 1994.

WAARSING, J.H.; DAY, J.S.; WEINANS, H. An improved segmentation method for in vivo micro-CT imaging. **J Bone Miner Res** 19:1640-1650, 2004.

WAARSING, J.H., DAY, J.S., WEINANS, H. Longitudinal micro-CT scans to evaluate bone architecture. **J Musculoskelet Neuronal Interact** 5(4):310-312, 2005.

WASTNEY ME, NG J, SMITH D, MARTIN BR, PEACOCK M, WEAVER CM. Differences in calcium kinetics between adolescent girls and young women. **Am J Physiol** 271(1 Pt 2):R208-16, 1996.

WEJS WA, HILLEN B. Correlations between the cross-sectional area of the jaw muscles and craniofacial size and shape. **Am J Phys Anthropol** 70:423–31, 1986.

WHITE, C.S., COHEN, M. J., MOURSHED, A. F. Digital analysis of trabecular pattern in jaws of patients with sickle cell anemia. **Dentomaxillofacial Radiology**, n. 19, p. 119-124, 2000.

WHITE, C.S. Oral radiographic predictors of osteoporosis. **Dentomaxillofacial Radiology**, 31(2): 84-92, 2002.

WHO. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. World Health Organ Tech Rep Ser. 1994;843:1-129.

WOLFF, J.(1869). Zentralblatt für die Medizinische Wissenschaft, VI, 223.

WORWEN, V. N. General and oral aspects of osteoporosis: a review. **Clin Oral Invest**, n. 5, p. 71-82, 2001.

WRONSKI, T.J.; WALSH, C.C.; IGNASZEWSKI, L.A. Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. **Bone** 7:119-123. (1986).

WRONSKI, T.J.; SCHENCK, P.A.; CINTRÓN, M., WALSH, C.C. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. **Calcif Tissue Int** 40:155–159, 1987.

WRONSKI, T.J., CINTRÓN, M.; DOHERTY, A.L.; et al. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. **Endocrinology** 123:681–686, 1988.

WRONSKI, T.J.; DANN, L.M.; SCOTT, K.S., CINTRON, M. Long term effects of ovariectomy and aging on the rats skeleton. **Calcif Tissue Intern** 45:360-366, 1989..

THOMPSON DD, SIMMONS HÁ, PIRIE CM(1995) FDA guidelines and animal models for osteoporosis. **Bone** 17:125S-133S

YAMASHIRO, T., TAKANO-YAMAMOTO, T. Influences of Ovariectomy on Experimental Tooth Movement in the Rat. **J Dent Res** 80(9):1858-1861, 2001.

YANG, J., PHAM, S.M.; CRABBE, D.L. Effects of estrogen deficiency on rat in mandibular and tibial microarchiteture. **Dentomaxilofac. Radiol** 32:247-251, 2003.

YANG, J.; FARNELL, D.; DEVLIN, H.; HORNER, K.; GRAHAM, J. The effect of ovariectomy on mandibular cortical thickness in the rat. **J Dent.** ;33(2):123-9, 2005.

YASAR, F., AKGUNLU, F. The differences in panoramic mandibular indices and fractal dimension between patients with and without spinal osteoporosis. **Dentomaxillofac Radiol** 35(1): 1-9, 2006

YONEDA, N. et al. The influence of ovariectomy on ob gene expression in rats. *Horm. Metab. Res., Stuttgart*, v.30, n.5, p.263-265, May 1998.

YOUNG DR, NIKLOWITZ WJ, BROWN RJ, JEE WS. Immobilization-associated osteoporosis in primates. **Bone** 7:109-117, 1986.

ZAFFE, D.; PAGANELLI, C.; COCCHI, D. Induction and pharmacological treatment of oral osteopenia in rats. **Minerva Stomatol** 1999;48:45-62.

R696e Rodrigues, Maria Elizabeth de Sousa.
Estudo da associação entre osteopenia sistêmica e perda óssea oral em ratas ovariectomizadas por meio de microtomografia 3D / Maria Elizabeth de Sousa Rodrigues – Fortaleza, 2009.
122p;il.
Orientadora: Vânia Marilande Ceccatto.
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas).
Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde.
1. Osteoporose. 2. Microtomografia computadorizada.
3. Perda óssea oral. Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde.

CDD: 618.97671

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)