

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DOUTORADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA/RADIOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA  
PARA AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA DENSIDADE  
ÓPTICA MANDIBULAR EM RATOS

Celia Regina Winck Mahl

Porto Alegre, RS  
Outubro de 2007

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

M214d

Mahl, Celia Regina Winck

Desenvolvimento de uma metodologia para avaliação longitudinal da densidade óptica mandibular em ratos / Celia Regina Winck Mahl. - 2007. 104 f: il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Clínica Odontológica (Radiologia), Porto Alegre, 2007.

Orientadora: “ Profa. Dra. Vania Regina Camargo Fontanella”.

1. Mandíbula 2. Radiografia 3. Osteoporose 4. Técnica de subtração  
5. Rato I. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia II. Título.

CDU 616-073.75

Bibliotecária: Eloisa Futuro Pfitscher

CRB 10/598

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DOUTORADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA/RADIOLOGIA

DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA PARA  
AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA DENSIDADE ÓPTICA  
MANDIBULAR EM RATOS

**Celia Regina Winck Mahl**

Orientadora: Profa. Dra. Vania Regina Camargo Fontanella

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como parte dos pré-requisitos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Linha de pesquisa: Diagnóstico das Alterações Buco-faciais.

Porto Alegre, RS  
Outubro de 2007

AGRADECIMENTOS

---

A todos que de alguma maneira tiveram participação nesta minha trajetória. Não fosse a participação de cada um, não seria possível atingir os objetivos.

Meu agradecimento especial

À minha orientadora, Profa. Dra. Vania Fontanella, que considero exemplo de competência, comprometimento e dedicação. Pela sua ajuda incondicional em todos os momentos foi possível concretizar mais esta trajetória.

À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, onde fiz a minha formação.

Ao Coordenador do Programa de Pós Graduação da UFRGS, Prof. Dr. Manoel Santana, pela condução eficiente deste.

Aos professores do Programa de Pós Graduação da UFRGS, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos meus colegas do doutorado, pela oportunidade de convívio e amizade.

À Isabel e à Luciana, do Laboratório de Patologia da UFRGS, pela competência na elaboração do material histológico.

À secretária Adriana e ao Leandro, sempre eficientes no apoio.

À Profa. Dra. Dalva Padilha, por ter me indicado um caminho nesta pesquisa, disponibilizando também os animais.

À UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL, onde exerço minha atividade docente.

Ao Coordenador da Área da Saúde da ULBRA, Prof. Dr. Ricardo Prates de Macedo, por todo o apoio e consideração que sempre me dispensou.

Ao Coordenador do Curso de Odontologia da ULBRA, Prof. Dr. Pedro Hernandez, pelo dinamismo de sua direção, pelas oportunidades a mim dispensadas, pelo seu convívio e por ter me dado todas as condições para realização deste trabalho.

À Assessora Pedagógica da Área da Saúde da ULBRA, Profa. Janete Annes, em muitos momentos com palavras e otimismo.

Ao Coordenador da Pesquisa da ULBRA, Prof. Dr. José Oscar Schneider dos Santos, pelo convívio.

Aos Profs. Drs. Cassiano Röesing, Elken Rivaldo, Maria Antonieta Lopes de Souza, por sua participação em banca do projeto, acrescentaram na melhora deste.

Às profas. Dras. Elaine Bauer Veeck e Marilene Fernandes por terem aceito participar da banca da prova de qualificação.

À Profa. Dra. Nilza Pereira da Costa, pelo seu incentivo, ensinamentos, exemplo, presença constante em todas minhas etapas.

À Profa. Dra. Ana Lucia Tolazzi, pelo idealismo e amizade

Às minhas amigas e colegas, Juliana e Renata, por estarem sempre junto.

Aos meus colegas, professores e funcionários da ULBRA. Encontrei em todos um apoio, uma palavra, um gesto, que me fizeram sempre acreditar.

Aos colegas da Radiologia: Profs. André, Carlos, Naiara, Sergio e Vania.

Aos colegas da Propedêutica: Profs. Beti, Marisa, Mieke, Myrian, Sergio e Suzana.

Aos colegas da Clínica Integral I: Profs. Adair, Alexandre, Leandro, Marisa, Reston, Sabrina, Tânia e Viviane.

Às secretárias da ULBRA: Rose, Carla, Malu e Andreia.

Aos alunos bolsistas da Pesquisa: André, Benito, Fabiele e Ana Carolina, , pela sua dedicação e cuidado no tratamento dos animais experimentais, levando-os até o final da melhor forma possível.

À Profa. Tânia Prochnow, coordenadora do laboratório de anatomia da ULBRA, por ter me disponibilizado todas as condições para a realização da pesquisa no biotério.

À Gabriela, pelo zelo no biotério da ULBRA.

Ao Fernando, da farmácia da ULBRA, pela manipulação da medicação.

À profa. Dra. Maria da Graça Boucinha, veterinária da ULBRA, pelo auxílio no tratamento aos animais.

Ao Tiago, do museu da ULBRA, que realizou a dissecação dos animais.

À Clarence e ao Nelson do Laboratório de Patologia da ULBRA.

À Profa. Simone Echeveste da assessoria estatística da ULBRA, por ter aceito fazer as análises estatísticas com tanta competência.

Ao Prof. Dr. Armando Jorge Padilha da Faculdade de Engenharia Electrotécnica e de Computadores da Universidade do Porto/PT, pela acolhida, dedicação, conhecimentos transmitidos na minha estada, e pelo desenvolvimento de programa de análise de imagem.

Aos meus familiares e amigos, por compreenderem minha ausência em muitos momentos.

Ao Otelo, companheiro de sempre, participando da idéia, pela compreensão e paciência.

Aos meus filhos, Carlos Eduardo e Ana Cristina, por me mostrarem o sentido da vida.

Aos meus pais (in memoriam) pelo exemplo de vida.

“[...] é possível que ele (o sujeito) seja exposto às verdades várias vezes e pode mesmo ocorrer que esteja informado sobre elas. Mas o Ser se apoderará das verdades somente quando suas emoções e suas convicções se apoderarem desse conhecimento[...] só assim, nenhum outro poder externo poderá vir a questionar ou retirar essas convicções”. Kierkegaard (1813-1855)



RESUMO

---



## RESUMO

Esta tese teve como proposta desenvolver uma metodologia para avaliação longitudinal da densidade óptica mandibular por subtração radiográfica em ratos, sendo apresentada na forma de três artigos. O primeiro testou a reprodutibilidade de um dispositivo posicionador para a obtenção de radiografias laterais oblíquas da mandíbula de ratos. Cinco cabeças de ratos preservadas em formol foram radiografadas três vezes cada. As imagens foram digitalizadas e a primeira (G1) foi mantida inalterada. Na segunda (G2) e terceira imagens (G3) foi digitalmente simulada perda óssea de 3% e 5%, respectivamente. As imagens do mesmo animal foram subtraídas na seguinte seqüência: G1 x G2 e G1 x G3. Foram, então, obtidos os valores médios e desvio-padrão da intensidade de pixel nas áreas de perda simulada e em uma área controle. A densidade óptica média das áreas teste, para ambas as intensidades de perda óssea simulada, foi significativamente menor que a da área controle. Concluiu-se que o dispositivo permitiu a realização de radiografias suficientemente padronizadas para identificar perdas ósseas incipientes em imagens de subtração. O segundo artigo avaliou os parâmetros ideais para a obtenção de radiografias laterais oblíquas da mandíbula de ratos, de forma a obter imagens de qualidade, que permitam visualizar as estruturas anatômicas. Foram radiografadas cabeças de quatro ratos mantidas em formol, expostas com 50 kV e 8 mA, filme número 2 de sensibilidades D e E, duas distâncias focais (30 e 60 cm) e sete tempos de exposição (0,6, 0,7, 0,8, 1, 1,5, 2,0 e 2,5 s). As imagens foram avaliadas por dois examinadores e classificadas de acordo com a qualidade: 1, muito ruim; 2, ruim; 3, aceitável; 4, boa e 5, excelente. A reprodutibilidade intra e interobservador foram substanciais. Com 30 cm, filmes de sensibilidade E tiveram escores médios de 4 e 5 com 0,8 e 1 s de exposição e filmes de sensibilidade D com tempos de 1,5, 2 e 2,5 s. Com 60 cm os melhores resultados foram encontrados com filme de sensibilidade E e exposição de 2 e 2,5 s. No terceiro artigo o objetivo foi verificar se a perda de densidade óssea induzida pela metilprednisolona e recuperada pela administração de risedronato se expressa em termos de alteração da densidade óptica em imagens de subtração radiográfica. Foram utilizadas 36 ratas Wistar divididas em três grupos. O primeiro recebeu solução salina, o segundo e o terceiro receberam metilprednisolona por 12 semanas. O terceiro grupo recebeu tratamento adicional de 12 semanas com risedronato sódico. Os animais tiveram a hemimandíbula esquerda radiografada no início do experimento e após as 12 semanas de período experimental. O grupo 3 foi novamente radiografado após o uso de risedronato. As radiografias foram analisadas por subtração radiográfica e a mesma área da mandíbula foi avaliada por microscopia óptica. O grupo que recebeu corticóide apresentou proporção significativamente menor de trabéculas ósseas por campo que os grupos 1 e 3. O glicocorticóide causou perda significativa de densidade radiográfica e o risedronato recuperou-a, sendo estas alterações evidenciadas na subtração radiográfica.

**Palavras-chave:** Rato; Mandíbula; Radiografia, Técnica de Subtração; Osteoporose.

## SUMÁRIO

---

## SUMÁRIO

1 Introdução.....	11
2 Proposição.....	14
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 Referencial Teórico.....	16
3.1 Tipos de osteoporose.....	17
3.2 Fatores de risco.....	18
3.3 Fisiopatologia.....	19
3.4 Dados sócio-econômicos/Epidemiologia.....	21
3.5 Osteoporose induzida por glicocorticóides.....	21
3.6 Tratamento da osteoporose.....	23
3.6.1 Medicamentos.....	23
3.6.1.1 Bifosfonatos.....	24
3.6.1.1.1 Osteonecrose dos maxilares.....	25
3.7 Métodos de diagnóstico.....	26
3.7.1 Marcadores Bioquímicos.....	27
3.7.2 Histomorfometria.....	27
3.7.3 Medidas de densidade mineral óssea.....	28
3.7.3.1 Radiografia convencional.....	28
3.7.3.2 Absorciometria Radiográfica.....	28
3.7.3.3 Absorciometria por fóton simples.....	28
3.7.3.4 Absorciometria por fóton duplo.....	28
3.7.3.5 Absorciometria de energia simples de raios X.....	29
3.7.3.6 Absorciometria de energia dupla de raios X.....	29
3.7.3.7 Ultrasonografia quantitativa.....	29
3.7.3.8 Tomografia computadorizada.....	29
3.7.3.9 Microtomografia computadorizada.....	30
3.7.3.10 Ressonância magnética.....	30

3.8 Osteoporose e Odontologia.....	30
3.8.1 Exames radiográficos.....	32
3.9 Modelos animais no estudo de osteopenia/osteoporose.....	34
4 Artigo 1.....	40
5 Artigo 2.....	46
6 Artigo 3.....	59
7 Considerações Finais.....	78
8 Bibliografia.....	81
9 Apêndices.....	91
Imagens do artigo 1.....	92
Imagens do artigo 2.....	93
Detalhamento da metodologia do artigo 3.....	95
10 Anexos.....	101
Termo de aprovação pelo CEP-FO/UFRGS.....	102
Correspondência de aceite do artigo 2.....	103
Correspondência de submissão do artigo 3.....	104



## 1 INTRODUÇÃO

O homem vem aprendendo a controlar os fatores externos que atuam negativamente sobre a sua sobrevivência. O século XX foi marcado, principalmente nos países desenvolvidos, por significativo aumento na expectativa de vida, decorrente dos avanços em saúde pública - que determinaram importantes mudanças no comportamento, associados aos avanços da medicina. Até mesmo nos países em desenvolvimento foi possível observar os benefícios destas mudanças. No Brasil, por exemplo, segundo dados do IBGE (2006), a expectativa de vida do brasileiro ao nascer chegou aos 71,9 anos em 2005, contrastando com 33,4 anos em 1910. Para 2010 e 2020, as projeções indicam que esta expectativa será de 73,4 e 76,1 anos, respectivamente.

Esse aumento na expectativa de vida vem causando profundo impacto na sociedade, afetando fundamentalmente o modo como alguns de seus setores se organizam, pois existe a necessidade de contemplar a qualidade de vida, ou seja, a longevidade saudável. Desta forma, os avanços para aumentar a longevidade devem ser acompanhados por melhora na saúde e bem-estar geral dos idosos. No século XXI, o desafio se concentra na compreensão do processo de envelhecimento e na solução dos problemas que as pessoas enfrentam em decorrência do mesmo.

Um destes problemas é a osteoporose, que tem sido considerada uma questão mundial de saúde pública. No Brasil, estima-se que cerca de um milhão de mulheres poderão ficar inválidas nos próximos anos se a doença não for combatida (IBGE, 2006). Desta forma, muito se tem pesquisado sobre como prevenir e tratar esta doença. No Pubmed, a busca “*osteoporosis OR osteopenia*” no título das publicações resultou, em setembro de 2007, em 28 mil artigos publicados nos últimos 10 anos, sendo 3.500 deles em 2007.

Nestas pesquisas, destacam-se os estudos experimentais em animais, que empregam principalmente ratos da linhagem Wistar. Contudo, em decorrência de dificuldades na obtenção de imagens *in vivo*, o estudo da reabsorção óssea nesses modelos experimentais é realizado a partir de imagens do material de necrópsia, permitindo apenas estudos de corte, limitando avaliações longitudinais. Além disso, a maioria dos estudos emprega métodos avançados de imagem, tais como a absorciometria por raios X de dupla energia e a microtomografia computadorizada, os quais implicam em instalações especiais para uso em animais e alto custo operacional, determinando que muitos estudos em ratos realizados em nosso meio deixem de realizar a avaliação por imagens para a obtenção de medidas longitudinais e avaliação da densidade óssea.

Com base nas evidências de que a perda óssea sistêmica pode estar relacionada com a perda óssea mandibular, existe a possibilidade de se realizar estudos longitudinais em ratos avaliando o osso mandibular. Busca-se, então, desenvolver um método simples, eficaz e de custo acessível para a determinação da densidade do tecido ósseo em mandíbula de ratos.





## **2 PROPOSIÇÃO**

### **2.1 Objetivo geral**

Desenvolver uma metodologia para avaliação longitudinal da densidade óptica mandibular por subtração radiográfica em ratos.

### **2.2 Objetivos específicos**

Desenvolver um dispositivo que permita a obtenção de radiografias de qualidade e reprodutíveis da mandíbula de ratos vivos.

Estabelecer os parâmetros ideais de tempo de exposição, distância focal e tipo de filme para a obtenção de radiografias que permitam a visualização de estruturas anatômicas da mandíbula de ratos.

Verificar se a perda de densidade óssea induzida pela metilprednisolona e recuperada pela administração de risedronato se expressa em termos de alteração da densidade óptica em imagens de subtração radiográfica da mandíbula de ratas.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

---

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

A osteoporose é definida como doença esquelética sistêmica, caracterizada por diminuição da massa óssea e deteriorização microarquitetural do tecido ósseo, com conseqüente aumento na fragilidade do osso e suscetibilidade à fratura (CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, 1993).

O *National Institute of Health* a define como doença esquelética caracterizada por resistência óssea comprometida, que aumenta o risco de fratura. Esta definição integra duas características: a quantidade de massa óssea - componente quantitativo - e o conceito resistência/fragilidade - componente qualitativo (MENDOZA, 2003).

A Organização Mundial da Saúde (WHO, 1994) definiu os critérios de diagnóstico de osteoporose, baseados na medida de densidade mineral óssea (DMO). Os resultados são expressos em valores absolutos ou gramas de mineral por unidade de superfície ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ), e em valores relativos ou desvios-padrão (DP). Os valores relativos são expressos pelos índices T e Z, a seguir descritos:

*T-score* é o número de desvios-padrão acima ou abaixo da média da densidade mineral óssea de indivíduos do mesmo sexo, raça e peso corporal. Este índice declina em paralelo com a constante diminuição em massa óssea que ocorre com a idade;

*Z-score* é o número de desvios-padrão acima ou abaixo da média para pessoas da mesma idade, sexo, raça e peso corporal. Este índice pode identificar pessoas atingidas por causas secundárias de osteoporose.

A definição fixa o paciente a *T-score*, número de desvios-padrão da DMO do paciente:

- Normal: DMO *T-score* entre +2,5 e -1,0, inclusive;
- Osteopenia: DMO *T-score* entre -1,0 e -2,5;
- Osteoporose: DMO *T-score* igual ou menor que -2,5; e
- Osteoporose grave: DMO *T-score* abaixo de -2,5 e história de fratura.

Neste critério, a densidade óssea é usada como substituto de resistência óssea, que reflete a integração das características de densidade e qualidade óssea, determinada pelas propriedades estruturais (tamanho, forma e microarquitetura), materiais (mineralização, composição do colágeno e microfraturas) e afetada pelo remodelamento ósseo (LANE 2006).

#### 3.1 Tipos de osteoporose

O estabelecimento da osteoporose se dá pelo predomínio da reabsorção sobre a formação óssea. A razão primária desta condição inclui pouca aquisição de osso e perda acelerada na idade madura, diminuindo a densidade mineral óssea e aumentando a fragilidade, resultando em deformidade ou fraturas, principalmente na coluna, quadril e carpo. Estes processos são regulados por fatores ambientais e genéticos. A perda de massa óssea pode ser

devida à combinação de deficiências hormonais ou nutricionais, diminuição da atividade física e vários agentes farmacológicos. É prevalente em populações idosas e freqüentemente resulta na fragilidade a fraturas, sendo associada à morbidade, mortalidade, alto custo de saúde e diminuição da qualidade de vida. Atinge homens e mulheres, mas nas mulheres o declínio substancial na massa óssea e mudanças na microarquitetura do osso são associados à deficiência de estrógeno. No osso adulto, há um equilíbrio entre a reabsorção óssea e neoformação, associados por interações bioquímicas complexas da atividade dos osteoblastos e osteoclastos. Fisiologicamente, o indivíduo acumula massa óssea até a faixa dos 30 anos, quando começa um decréscimo de 0,3% ao ano, mais acentuado em pessoas sedentárias. Na idade adulta, após a segunda década de vida, há equilíbrio entre deposição e absorção óssea. As mulheres apresentam maior risco para osteoporose que os homens, além de menor massa óssea (cerca de 10% menor). Entre os 35 e 40 anos têm uma acelerada perda de massa e nos 10 primeiros anos pós-menopausa esta pode chegar a 3% ao ano (BRAS *et al.*, 1982; LANE, 1998; JIANG; MATSUMOTO; FUJII, 2003; RAHNAMA, 2003; KIERSZENBAUM, 2004; HOSKING; GEUSENS; PRIZZOLI, 2005; LUIZE *et al.*, 2005).

A osteoporose pode ser categorizada como primária ou secundária. Primária é a deterioração da massa óssea associada a um decréscimo nos hormônios sexuais, envelhecimento, ou ambos. Na mulher, a deficiência de estrógenos pode acelerar o processo de osteoporose primária. A osteoporose secundária pode ocorrer devido a condições crônicas que contribuam para acelerar a perda óssea, incluindo excesso de tiroxina endógena ou exógena, doenças malignas, doenças gastrointestinais, renais ou ainda uso de medicamentos (DOWNEY; SIEGEL, 2006).

A osteoporose primária é a condição mais comum e inclui as osteoporoses involucional, pós-menopausa (tipo I), relativa à idade ou senil (tipo II) e a idiopática. A osteoporose tipo I parece ser causada por fatores intimamente relacionados ou exacerbados pela menopausa e verifica-se acelerada perda óssea e alterações do hormônio da paratireóide e de funções de regeneração óssea. Acomete mulheres entre 50 e 65 anos na proporção de 6:1, determinando perda óssea predominantemente trabecular. Na osteoporose primária tipo II a perda óssea é lenta e a perda óssea cortical e trabecular ocorrem na mesma proporção. Acomete homens e mulheres acima dos 75 anos na proporção 2:1. Doenças endocrinológicas, artrite reumatóide, síndrome de má absorção aparecem como causas da osteoporose secundária, além de agentes medicamentosos e condições ou doenças predisponentes, assim como imobilização ou desuso de um membro (BORBA; LAZARETTI-CASTRO, 1999).

### **3.2 Fatores de risco**

Conforme Gali (2001), Horner, Devlin e Harvey (2002), Downey e Siegel (2006), os riscos que influenciam a manifestação da osteoporose podem ser relativos à pessoa (individuais)

ou ao ambiente em que ela vive (ambientais). São considerados fatores de risco individuais a história de casos de osteoporose na família, sexo feminino, raça branca, presença de escoliose, indivíduos magros, tipo constitucional pequeno e aparecimento prematuro de cabelos brancos. Representam fatores ambientais o consumo de álcool e de cigarro (inibidores da multiplicação dos osteoblastos); cafeína (aumenta excreção de cálcio); inatividade, má nutrição, dieta rica em fibras, proteínas e sódio (diminuem a absorção de cálcio); amenorréia por exercícios; menopausa precoce e endocrinopatias. Baixas doses de cálcio ou vitamina D, abuso de álcool e alto consumo de cafeína são fatores nutricionais e estilo de vida sedentário, envelhecimento, fumo e baixo peso corporal são fatores ambientais. Contudo, a causa mais comum de osteoporose é o decréscimo do hormônio sexual estrógeno. Entre os fatores de risco estão também enfermidades não endocrinológicas, tais como hepatopatias, artrite reumatóide e mieloma, assim como o uso de glicocorticóides, citostáticos, anticonvulsivantes e heparina.

Os fatores de risco são utilizados como critérios para selecionar os pacientes para a realização de exames de densitometria óssea pela *National Osteoporosis Foundation* (NOF), que indica a densitometria óssea para mulheres de 65 anos ou mais e para as que estão em pós-menopausa e apresentem um ou mais dos fatores de risco para fratura, estabelecidos pela *Osteoporosis Society of Canada* (OSC) e *International Society for Clinical Densitometry* (ISCD). No Brasil, recomenda-se o “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Osteoporose” do Ministério da Saúde (PARISI JR; CHAHADE, 2007).

A idade e o peso foram os principais fatores associados à baixa massa óssea no estudo de Parisi Jr e Chahade (2007) em uma população de São José do Rio Pardo/SP.

### **3.3 Fisiopatologia**

O tecido ósseo é constituído por osteoblastos, osteócitos, células de revestimento e osteoclastos. Sua matriz contém componentes orgânicos e inorgânicos. Morfologicamente, é caracterizado como trabecular e cortical. Funcionalmente, o osso trabecular é mais associado com capacidades metabólicas do que o cortical, enquanto esse é associado à resistência (DOWNEY; SIEGEL, 2006). O osso trabecular é perdido mais rapidamente do que o cortical devido à remodelação mais rápida, maior número de células e maior superfície (GRYNPAS, 2002).

A remodelação óssea é um processo fisiológico constante, no qual o balanço entre a formação e a reabsorção óssea é regulado por complexos sistemas de fatores locais e sistêmicos, agindo nas células ósseas, como hormônios reguladores do cálcio, hormônios sexuais, fatores de crescimento e citosinas. O processo de reabsorção e formação mantém a homeostasia. Quando esta não é mantida, ocorre alteração na massa óssea que pode resultar em diferentes distúrbios, entre eles a osteoporose (MORITZ, 2001).

O processo de remodelação óssea ocorre nas unidades multicelulares básicas (BMU) ou unidades de remodelação óssea, sendo caracterizado pela interação das funções dos osteoclastos e osteoblastos (AMADEI *et al.*, 2006). O ciclo da remodelação óssea compreende as fases de ativação, reabsorção, reversão e formação, presentes durante toda a vida como um contínuo processo de destruição e renovação nas unidades de remodelação óssea (SZEJNFELD, 2000; ÅKESSON, 2003; AMADEI, 2006).

Esta divisão é baseada na maior atividade celular observada em cada fase. A ativação é o primeiro estágio do processo e envolve o recrutamento das células precursoras de osteoclastos que estão em repouso no sítio de remodelação. Os osteoclastos são recrutados, estimulados para diferenciação e guiados a uma área da superfície óssea a ser reabsorvida. Na fase de reabsorção os osteoclastos degradam a matriz óssea mineralizada e formam uma lacuna. A fase de reabsorção é seguida pela fase de reversão, transição entre destruição e reparo ósseo, quando a lacuna é limpa e preparada por células mononucleadas. Quando a fase de formação é iniciada os osteoblastos diferenciam-se nos sítios previamente reabsorvidos. A fase de formação envolve a produção de matriz e se inicia com a ativação dos pré-osteoblastos, que se diferenciam em osteoblastos. Estes, primeiramente depositam uma substância osteóide, a qual é mineralizada em cerca de três semanas (MORITZ, 2001; AMADEI, 2006).

Segundo Baxter, Fattore (1993) o fator que mais contribui para todos os tipos de osteoporose é a deficiência de cálcio na dieta. Aproximadamente 99% do peso de cálcio do corpo está armazenado nos ossos e o 1% remanescente é encontrado nas células e no fluido intersticial. Os níveis de cálcio são controlados pelos hormônios da paratireóide. Sempre que os níveis celulares diminuem, o cálcio é imediatamente requerido por meio da dieta ou, se a quantidade presente na dieta for insuficiente, o cálcio é mobilizado dos ossos. Se o cálcio ósseo é requerido durante um longo período de tempo acontece redução da densidade óssea. A deficiência de cálcio na dieta pode estar associada à perda de osso cortical, que aumenta com o avanço da idade.

Além do cálcio, a mineralização óssea requer concentrações de fosfato e vitamina D. O acúmulo de tecido osteóide substitui o osso normal e, como resultado dessa falta de mineralização, o osso torna-se fraco e suscetível a fraturas. A deficiência de vitamina D pode resultar de dieta deficiente, insuficiente exposição solar, desordens gastrointestinais, tais como síndromes de má absorção e prejuízo da síntese de vitamina D por patologias hepáticas ou renais. A carência da vitamina D é caracterizada por baixa absorção intestinal de cálcio e fósforo e por uma deficiência na mineralização óssea (MARQUES NETO, 2000).

Segundo Downey e Siegel (2006), o aumento da reabsorção óssea, associado com elevação do número de osteoclastos, é relacionado com a perda de estrógeno. Este aumento de osteoclastos é causado pelo aumento de citosinas que regulam a sua produção. Possivelmente, o estrógeno, direta ou indiretamente, regule a produção de citosina.

### **3.4 Dados sócio-econômicos/ epidemiologia**

A osteoporose é pouco sintomática, e às vezes só se manifesta por uma fratura. A fratura de fêmur é a mais temida complicação da osteoporose, pois resulta em grande morbidade (dor, deformidade e incapacidade física) e mortalidade, com enormes repercussões sócio-econômicas. Sua incidência tem aumentado em todo o mundo em função da maior sobrevivência e do envelhecimento da população mundial (WATANABE *et al.*, 2004).

No Brasil, com base nos dados do IBGE (2006), pode-se estimar que cerca de um milhão de mulheres possam ficar inválidas e pelo menos 200 mil irão morrer vítimas da osteoporose nos próximos anos se a doença não for combatida. A osteoporose aflige cerca de um terço das mulheres entre 60 e 70 anos de idade e dois terços daquelas com 80 anos ou mais. Em todo o mundo, aproximadamente 1,7 milhão de fraturas no quadril são atribuídas à osteoporose a cada ano. Estas estimativas colocam a osteoporose como uma das principais causas de morte na população feminina no mundo e no país.

Dados da *National Osteoporosis Foundation* (1999) mostram que, apesar de a osteoporose ser menos comum no homem do que na mulher, 20 a 30% dos casos de fratura de quadril em homens estão associados à perda de massa óssea e que um homem branco de 60 anos tem 25% de chance de apresentar fratura osteoporótica.

A osteoporose passa a ser vista como um problema de saúde pública e deve ser encarado de acordo com a sua multifatorialidade, tendo uma abordagem multiprofissional, pois médicos, dentistas, fisioterapeutas, nutricionistas, bioquímicos, farmacêuticos e profissionais de educação física podem oferecer grande contribuição para prevenção e tratamento dessa desordem óssea que é responsável por um gasto anual considerável no tratamento das fraturas (MOHAJERY; BROOKS, 1992; TOLAZZI, 2001).

No Brasil, a Portaria SAS/MS nº 470, de 23 de julho de 2002, estabelece o Protocolo Clínico e as Diretrizes Terapêuticas para Osteoporose. Essa Portaria visa à seleção de pacientes para o fornecimento de medicamentos para o tratamento da osteoporose. O principal critério de inclusão é a DMO igual ou inferior a -2,5 desvios-padrão do valor médio da massa óssea máxima para mulheres jovens normais, com ou sem fratura prévia. Portanto, para serem elegíveis ao tratamento, as pacientes necessariamente deverão realizar a densitometria óssea (PARISI JR; CHAHADE, 2007).

### **3.5 Osteoporose induzida por glicocorticóides**

Os glicocorticóides (GC) são empregados como agentes farmacológicos em diversas afecções devido a seus efeitos antiinflamatórios e imunossupressores, porém seu uso é acompanhado de efeitos colaterais sistêmicos importantes. A osteoporose é um dos efeitos

deletérios mais previsíveis dos GC e está associada a um alto índice de incapacitação por fraturas. Pode ocorrer em 30 a 50% dos pacientes que fazem uso crônico de GC. A perda óssea induzida por GC ocorre primeiramente no osso trabecular e principalmente em áreas como a coluna lombar. A administração oral de GC está associada a um aumento no risco de fraturas nas vértebras e no fêmur. O risco de fratura é dose-dependente, entretanto, mesmo baixas doses podem aumentar o risco. Os pacientes em uso de GC perdem mais osso trabecular do que cortical. Em consequência, as fraturas são mais frequentes na coluna que no quadril. A osteoporose induzida por GC tem sido reconhecida desde 1932, quando Cushing descreveu a desmineralização do osso relacionada com o hormônio adrenocorticotrófico em pacientes com tumor hipofisário. Na patogênese da osteoporose induzida por GC estão envolvidos vários efeitos sistêmicos e locais sobre o osso e sobre o metabolismo mineral. A patogênese da osteoporose induzida por GC é similar em homens e mulheres (BORBA; LAZARETTI-CASTRO, 1999; RAMALHO; LAZARETTI-CASTRO, 1999; CANALIS; GIUSTINA, 2001; MORITZ, 2001; GARTON, 2001; POLO, 2003; DOWNEY; SIEGEL, 2006; GREGÓRIO *et al.*, 2006; KANIS, 2007).

O uso de GC é a causa mais frequente de osteoporose secundária. Segundo Boling (2004) e Mazziotti *et al.* (2006), ocorre em duas fases: rápida nos primeiros seis meses, onde a DMO é reduzida, possivelmente por uma excessiva reabsorção do osso, talvez por remoção dos sais de cálcio da matriz óssea pelo paratormônio (PTH) e uma fase lenta, progressiva, onde a densidade mineral do osso diminui devido à deterioração na formação do osso e ativação dos osteoclastos pelo PTH.

A ocorrência de osteoporose induzida por GC tem aumentado muito com a introdução de GC sintéticos para tratamento de diversas doenças inflamatórias. Os GC causam profundos efeitos nas células ósseas: a inibição da formação do osso, pela diminuição do número e da função dos osteoblastos, e o aumento da reabsorção óssea, pela estimulação da osteoclastogênese. Contudo, o efeito dominante deve-se à sua ação direta sobre as células ósseas, principalmente quando se empregam altas doses do medicamento, causando perda de células ósseas pela inibição da diferenciação celular e aumento na apoptose dos osteoblastos maduros e osteócitos (CANALIS; DELANY, 2002; COOPER, 2004; CANALIS, 2005; GREGÓRIO *et al.*, 2006).

Das células ósseas, o osteoblasto é o mais afetado por GC, por efeito direto nos receptores osteoblásticos, resultando em um aumento na diferenciação das células precursoras de osteoblastos, reduzindo a proliferação e a síntese de osteoblastos maduros. As mudanças ocorridas na atividade dos osteoblastos são refletidas em mudanças histomorfométricas do osso, sendo observada diminuição no volume do osso e adelgaçamento das trabéculas. Nos osteoclastos, por não possuírem receptores para GC, o efeito é indireto (REID, 1997; DALLE CARBONARE *et al.*, 2001; POLO, 2003). Os efeitos indiretos no metabolismo ósseo se



caracterizam pela redução nos níveis de esteróides sexuais, diminuição da resistência e da massa muscular, bem como hiperparatireoidismo secundário, devido à diminuição na absorção do cálcio e ao aumento na sua excreção renal (COOPER, 2004). Diretrizes baseadas em evidências para prevenção e tratamento da osteoporose induzida por GC são sugeridas pelo *Bone and Tooth Society of Great Britain National Osteoporosis Society Royal College of Physicians*, (DEVOGELAER *et al.*, 2006). O padrão-ouro no tratamento farmacológico desta condição envolve o uso de bifosfonatos (MAZZIOTTI *et al.*, 2006).

### **3.6 Tratamento da osteoporose**

A finalidade do tratamento da osteoporose é manter a densidade mineral óssea e reduzir o risco de fraturas. Mudanças no estilo de vida e terapia medicamentosa podem prevenir ou tratar a osteoporose.

Medidas preventivas podem incluir adequada ingestão de cálcio e vitamina D na adolescência e início da idade adulta, necessária para formar o pico de massa óssea e mantê-lo adequadamente durante a vida, praticar exercícios físicos, não fumar e evitar o uso de medicações que possam contribuir para a perda de massa óssea. A ingestão de cálcio e vitamina D, utilizada para prevenir osteoporose, pode ter efeito benéfico na redução de perdas dentárias (JEFFCOAT *et al.*, 2000; KRALL *et al.*, 2002; HEANEY, 2003; HEANEY, 2006).

#### **3.6.1 Medicamentos**

Sistemicamente, a função das células ósseas é alterada principalmente pelos hormônios reguladores do metabolismo de cálcio: vitamina D, hormônios sexuais e tireoidianos - calcitonina e PTH. A terapia medicamentosa previne e trata a perda óssea contínua. O tratamento farmacológico aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA, 1994) consiste em:

- reposição hormonal - estrógenos aumentam a atividade osteoblástica e inibem a reabsorção óssea, pela indução de apoptose dos osteoclastos;
- calcitonina - hormônio produzido pela tireóide, inibe a reabsorção óssea;
- PTH - age indiretamente, mantendo o nível de cálcio extracelular;
- moduladores seletivos de receptores de estrógeno (SERMs) – têm ação semelhante à da terapia hormonal, reduzindo o risco de fraturas em mulheres pós-menopausa;
- bifosfonatos - diminuem a reabsorção óssea pela apoptose dos osteoclastos, mantém ou aumentam a massa óssea. Dos bifosfonatos, o alendronato sódico e o risedronato sódico são aprovados para prevenção e tratamento da osteoporose, sendo considerados como a melhor opção terapêutica;
- anticorpo monoclonal humano (IgG2) - inibe a reabsorção óssea pela ligação e neutralização de mediadores da diferenciação e da função dos osteoclastos.

Com o aumento da expectativa de vida, o tratamento da osteoporose se converte em um problema de saúde pública devido às implicações de fraturas, vertebrais ou não. A indicação medicamentosa deve levar em conta a relação custo/benefício e as contra-indicações, para assegurar a aceitação e o cumprimento do tratamento, considerando seu longo período de tempo (SCHONFELD, 2004).

#### 3.6.1.1 Bifosfonatos

Os bifosfonatos administrados por via oral são considerados efetivos tanto na prevenção quanto no tratamento da osteoporose induzida por GC, com capacidade de aumentar a massa óssea na coluna e no fêmur. O alendronato e o risedronato reduzem tanto a perda óssea como o risco de fraturas causadas pela terapia com GC. O risedronato é um potente inibidor dos osteoclastos, diminuindo a reabsorção e aumentando a densidade do osso no fêmur e na coluna, além de ser mais bem tolerado quando administrado por via oral, por apresentar menos efeitos colaterais, alta afinidade pelo tecido ósseo e alta potência anti-reabsorção (GARTON, 2001; MCCLUNG; GEUSENS, 2001; POLO, 2003; BOLING, 2004; PIAI *et al.*, 2005).

O tratamento prolongado com GC causa perda óssea mais rapidamente nos primeiros seis meses. As diretrizes do Colégio Americano de Reumatologia indicam o tratamento com bifosfonato em osteoporose induzida por GC para minimizar a perda óssea e o risco a fraturas. O risedronato é o mais indicado, pois aumenta a densidade óssea mineral e reduz significativamente a incidência de fraturas nas vértebras após um ano de tratamento (BOLING, 2004).

Reduzir o risco de fraturas não vertebrais é o objetivo crítico do tratamento da osteoporose, pois essas fraturas têm importante efeito na saúde e na qualidade de vida. O risco de fratura vertebral é reduzido em cerca de 36 a 48%, de acordo com estudo do tipo meta-análise que avaliou os efeitos do alendronato, risedronato, etidronato, raloxifeno e vitamina D. Somente o alendronato e o risedronato reduzem significativamente o risco de fratura não vertebral. O maior ganho de densidade mineral óssea (4,5% a 7,5%) foi encontrado para alendronato, risedronato e terapia hormonal (HOSKING; GEUSENS; PRIZZOLI, 2005).

Devogelaer e colaboradores (2006) realizaram uma revisão sistemática sobre o tratamento preventivo ou curativo da osteoporose induzida por GC, com diversas drogas farmacológicas, concluindo ser promissora a administração de bifosfonatos associados aos GC quando seu uso é imprescindível.

Os fatores de risco na osteoporose involucional, como idade e estado pós-menopausa, devem ser considerados para a prevenção e tratamento de pacientes em terapia com GC. Os bifosfonatos, especialmente o alendronato e risedronato, são os de primeira indicação. Estudos de meta-análise sugerem que a vitamina D ativa e nativa pode ajudar a manter a densidade mineral óssea das vértebras, contudo estudos clínicos randomizados mostram serem os

bifosfonatos superiores à vitamina D (GOURLAY; FRANCESCHINI; SHEYN, 2007; CURTIS; SAAG, 2007).

Após se unirem à superfície do osso, os bifosfonatos são liberados no meio ácido criado pelos osteoclastos, onde interferem na ação reabsortiva dos osteoclastos maduros e induzem a apoptose. O resultado é a redução da remodelação óssea. Os bifosfonatos podem também reduzir a profundidade da cavidade de reabsorção. Por inibir a atividade osteoclástica, os bifosfonatos mantêm ou aumentam a DMO e podem ajudar a preservar a estrutura do osso. Estudos recentes mostram que o efeito dos bifosfonatos nos osteoclastos podem ser mediados pelos osteoblastos, isto é, podem influenciar os osteoblastos a sintetizarem um inibidor dos osteoclastos (LAFITA, 2003).

#### 3.6.1.1.1 Osteonecrose dos Maxilares

Nos últimos anos, complicações associadas ao uso de bifosfonatos têm sido relatadas, principalmente na forma de ulcerações bucais e de osteonecrose dos maxilares (PONTE-FERNÁNDEZ; ESTEFANÍA-FRESCO; AGUIRRE-URIZAR, 2006).

A osteonecrose dos maxilares é caracterizada como conseqüência natural de vários fatores sistêmicos e locais que comprometem a irrigação do osso. Os fatores de risco para desenvolver osteonecrose incluem trauma, sexo feminino, idade avançada, regiões edêntulas, outros tratamentos (radioterapia, quimioterapia e uso de esteróides), anemia, procedimentos cirúrgicos odontológicos, uso de tabaco e álcool, infecções e terapia com bifosfonatos. Esta condição é reconhecida como uma séria complicação da terapia com bifosfonatos, mais freqüente na administração intravenosa, que se caracteriza por baixa absorção intestinal e alta seletividade para localização e deposição óssea. A teoria é baseada em evidências experimentais de que o pamidronato e o zoledronato inibem a neo-angiogênese capilar e o osso torna-se avascular. Os ossos maxilares têm maior suprimento sanguíneo do que outros ossos e rápido remodelamento associado à atividade diária de remodelação óssea em torno do ligamento periodontal. Os bifosfonatos concentram-se nos ossos maxilares e causam esta condição. A incidência exata não é conhecida, mas alguns estudos mostram estimativas de 1 em 10.000 casos (MARX *et al.*, 2005; GUTTA; LOUIS, 2007).

A osteonecrose induzida por bifosfonatos é encontrada nos ossos maxilares por ser esta região mais exposta ao meio externo. A mandíbula é mais afetada devido à sua vascularização terminal. Deve ser feita criteriosa avaliação do estado de saúde bucal antes de ser prescrito tratamento com bifosfonatos (MAGREMANNE *et al.*, 2006).

O aspecto clínico da osteonecrose pode simular abscesso dentário e osteomielite. Exames radiográficos podem mostrar imagens compatíveis com reabsorção e seqüestro ósseo. Os radiologistas devem estar atentos a essa situação (CARNEIRO *et al.*, 2006).

Estefanía-Fresco; Ponte-Fernández; Aguirre-Urizar (2006) analisaram as publicações na literatura indexada entre 2003 e 2005, verificando 246 casos de osteonecrose, afetando mais as mulheres na sexta década de vida. Os bifosfonatos mais frequentemente associados foram os nitrogenados (pamidronato e zoledronato). A localização foi maior na mandíbula, clinicamente caracterizada por exposição óssea e sintomatologia dolorosa. Os autores alertam para a necessidade de estabelecer medidas preventivas para osteonecrose dos maxilares em todos os pacientes tratados com bifosfonatos.

Pacientes com mieloma múltiplo e carcinoma metastático que recebem tratamento intravenoso com bifosfonato têm grande risco de desenvolver osteonecrose e representam 94% dos casos publicados. A mandíbula é mais afetada (2:1) e 60% dos casos são precedidos por procedimentos odontológicos (WOO; HELLSTEIN; KALMAR, 2006).

Desde 2003, 865 casos de osteonecrose dos maxilares após o uso de bifosfonatos foram citados na literatura de língua inglesa, com preponderância dos associados ao uso parenteral. O envolvimento ósseo pode ser uni ou bilateral, com 63% a 68% dos casos afetando a mandíbula exclusivamente, 24 a 28% envolvendo a maxila exclusivamente e 4,2% comprometendo simultaneamente ambos maxilares (BROOKS *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação dos bifosfonatos ainda não é totalmente conhecido e continua a ser investigado. É recomendado aos cirurgiões-dentistas que sejam cuidadosos ao indicar tratamento, utilizem as informações da literatura médica e odontológica e informações do médico do paciente, além do julgamento profissional de acordo com as necessidades e preferências individuais dos pacientes. Estes devem ser informados dos riscos da terapia (ADA, 2006; RAJESH, 2007).

É importante que os profissionais da área da saúde, especialmente cirurgiões dentistas, estejam conscientes em relação aos pacientes em terapia com bifosfonatos antes de procederem a atos cirúrgicos e os pacientes devem ser informados dos riscos e ter a oportunidade de verificar suas necessidades de tratamento antes de iniciar a terapia. Todos os pacientes em uso de bifosfonatos devem ser mantidos sob estreita vigilância (GUTTA; LOUIS, 2007).

### **3.7 Métodos de diagnóstico**

Para diagnóstico, acompanhamento e avaliação da qualidade e da quantidade óssea em casos de osteoporose, osteopenia e mesmo em pacientes sem a doença, diversas opções são disponibilizadas, desde exames de urina e sangue até exames mais sofisticados que utilizam imagens dos ossos para avaliar a DMO com o objetivo de determinar o conteúdo mineral do tecido (SANTIAGO; VITRAL, 2006).

### 3.7.1 Marcadores bioquímicos

Marcadores bioquímicos de remodelação óssea são substâncias presentes no sangue ou na urina durante a reabsorção e a formação do osso. Marcadores de reabsorção são baseados na medida de fragmentos do colágeno tipo I liberados na circulação quando o osso é reabsorvido. Marcadores de formação medem a osteocalcina e a fosfatase alcalina específica, proteínas produzidas durante o processo de formação. O mais importante uso dos biomarcadores é monitorar a efetividade da terapia medicamentosa. Os marcadores bioquímicos da remodelação óssea usados na pesquisa clínica representam os produtos da formação e reabsorção óssea liberados na circulação. Mudanças quantitativas nos marcadores refletem o processo dinâmico do metabolismo ósseo (LANE, 2006).

### 3.7.2 Histomorfometria

Para diagnóstico e estudo das doenças metabólicas do osso, especialmente das trabéculas, é usada a histomorfometria ou histologia quantitativa, que consiste na contagem ou medida dos componentes celulares e na avaliação de alterações da microarquitetura óssea. É o único método que permite a medida da mineralização e o estudo da formação óssea, especialmente na osteoporose induzida por GC, caracterizada por adelgaçamento das trabéculas sem perfuração, que leva a uma redução no volume do osso, após altas doses, e a recuperação da massa óssea pelo tratamento com bifosfonato (HUANG *et al.*, 2004; ZECCHIN *et al.*, 2004; DALLE CARBONARE *et al.*, 2005).

O método histológico, considerado como padrão-ouro, tem a limitação de medir uma área específica do defeito ósseo. Os parâmetros da organização trabecular podem ser associados com a densidade mineral óssea e a microdensidade. A microrradiografia pode ser um método também utilizado com alta precisão para medir a distribuição mineral no osso, pois são obtidas radiografias de alta resolução em áreas inteiras do defeito, sendo capaz de avaliar qualitativamente o osso (MÜLLER *et al.*, 1998; IVASA *et al.*, 2000; SCHORTINGHUIS *et al.*, 2003, GORUSTOVICH *et al.*, 2003; SHIN; LIU; KING, 2005).

Com o método histomorfométrico obtém-se a densidade trabecular óssea, válida na detecção da osteoporose e no processo de restauração tecidual do osso provocadas por fármacos. Para análise microscópica da densidade trabecular óssea é obtida uma imagem amostral de osso trabecular. Um retículo é aplicado sobre a imagem, sendo uma área isolada para a mensuração. A análise da quantidade de matriz neoformada é realizada por planimetria - contagem de pontos que utiliza o retículo de pontos resultantes da intersecção entre linhas horizontais e verticais, superposto à imagem histológica. A quantidade de tecido ósseo neoformado, em porcentagem de área, é obtida pela razão entre número de pontos incidentes sobre a matriz óssea e número

total de pontos do retículo aplicado (PIAI *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2006).

### 3.7.3 Medidas de densidade mineral óssea

As diretrizes da Organização Mundial da Saúde para o diagnóstico da osteoporose são baseadas nas medidas de absorciometria de energia dupla de raios X (DXA) do fêmur e da coluna. A densitometria óssea é uma técnica não invasiva para medir a massa óssea e o risco de fratura. A DMO expressa a quantidade de tecido mineralizado na área escaneada em  $\text{g/cm}^2$  (SANTIAGO; VITRAL, 2006).

#### 3.7.3.1 Radiografia convencional

A radiografia convencional é de fácil execução e custo bastante acessível. É um exame subjetivo e menos sensível na avaliação da densidade do osso, pois requer perda mineral em torno de 30-40% para que seja visualmente detectada. O melhor uso da radiografia é no diagnóstico de fratura, para monitorar e avaliar doenças ósseas (LEWIECKI; BORGES, 2006).

#### 3.7.3.2 Absorciometria radiográfica

A absorciometria radiográfica (AR), também conhecida como fóton densitometria, é uma das primeiras técnicas de análise quantitativa da densidade mineral óssea. Usa uma fonte de raios X e uma escala de alumínio para calcular a densidade óssea. É usada em ossos periféricos, em sítios com pouco tecido mole. A partir de uma radiografia da mão, o filme processado e digitalizado é analisado para produzir o relatório de DMO (LEWIECKI; BORGES, 2006).

#### 3.7.3.3 Absorciometria por fóton simples

A densitometria óssea por emissão única/simples de fótons (SPA), introduzida em 1963, utiliza o iodo 125 como fonte e mede a massa óssea em sítios periféricos. Um fóton único de energia passa através do osso e do tecido mole, permitindo quantificar o volume total de mineral (IBÁÑEZ, 2003; LEWIECKI; BORGES, 2006).

#### 3.7.3.4 Absorciometria por fóton duplo

A densitometria por emissão dupla (DPA) usa um feixe de fótons que têm dois picos distintos de energia. Um pico de energia é mais absorvido pelos tecidos moles e o outro pelo osso. O componente do tecido ósseo pode ser matematicamente subtraído e a DMO determinada. A SPA e a DPA são técnicas não invasivas de quantificação da massa óssea que permitem identificar a diminuição da massa óssea, mas não identificam alterações na microarquitetura óssea (IBÁÑEZ, 2003; LEWIECKI; BORGES, 2006).

### 3.7.3.5 Absorciometria de energia simples de raios X

Com a incorporação de uma fonte de raios X substituindo os radionuclídeos, a técnica passou a ser denominada densitometria de emissão simples de raios X (SXA). É um método que expõe o paciente a baixas doses de radiação, sendo superior em termos de resolução espacial. Só permite medir sítios periféricos (NORDSTRÖM, 2004).

### 3.7.3.6 Absorciometria de energia dupla de raios X

A DXA mede a densidade mineral óssea em uma área ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ), utilizando radiação ionizante com feixe de dois diferentes níveis de energia. A diferença na atenuação do feixe passando através dos tecidos de diferentes composições provê uma medida quantitativa da densidade do osso. É uma das técnicas mais precisas na quantificação da massa óssea e permite analisar diferentes segmentos do corpo, assim como comparar os valores de DMO aos índices referenciais de normalidade, ajustados ao segmento avaliado e aos padrões antropométricos, permitindo informações do estado ósseo global, exceto em casos de osteoporose localizada. Os locais de medição mais estudados são a coluna lombar, o fêmur e o calcâneo (LEWIECKI; BORGES, 2006).

A técnica de DXA periférica analisa a DMO do radio distal e do calcâneo com alta precisão e baixa dose de radiação (LANE, 2006). É considerada a técnica padrão-ouro para a medida da massa óssea, em função da sua precisão, duração, segurança e custo (MEIRELES, 1999).

### 3.7.3.7 Ultrasonografia quantitativa

A ultrasonografia quantitativa (QUS) é baseada no conhecimento de que a velocidade do som e a atenuação das ondas sonoras são afetadas pela densidade, compressibilidade, viscosidade, elasticidade e estrutura do material atravessado. A ultrasonografia óssea utiliza ondas sonoras não só para quantificar a densidade óssea, como também para mensurar parâmetros de qualidade óssea relacionados à elasticidade e conectividade da microarquitetura óssea. Embora a ultrasonografia já tenha sido realizada em falange, patela ou tíbia, a topografia mais estudada corresponde ao osso calcâneo. A ultrasonografia óssea não faz diagnóstico de osteoporose, mas sim quantifica o risco de fraturas, principalmente em colo de fêmur de mulheres idosas (MEIRELES, 1999).

### 3.7.3.8 Tomografia computadorizada

A tomografia computadorizada avalia a densidade dos ossos, isolando a porção trabecular da cortical. Também permite avaliar as propriedades geométricas do osso, facilitando assim o cálculo das forças mecânicas. Como o osso trabecular apresenta maior remodelação que o cortical, este é considerado um exame mais sensível e claro que o DXA.

A tomografia computadorizada quantitativa (QCT) mede a densidade mineral óssea em  $\text{mg}/\text{cm}^3$  e é o método capaz de reconstruir um modelo volumétrico de distribuição da densidade do osso. Avalia a estrutura, o tamanho e as mudanças ocorridas no osso trabecular e cortical que ocorrem com o uso de medicamentos. A tomografia computadorizada quantitativa periférica (pQCT) mede a densidade do esqueleto apendicular (IBÁÑEZ, 2003; LEWIECKI; BORGES, 2006).

#### 3.7.3.9 Microtomografia computadorizada

A microtomografia computadorizada ( $\mu\text{CT}$ ) permite uma visão direta tridimensional das trabéculas, possibilitando medir seu número, conectividade, espessura e resistência à tração, produzindo imagens das trabéculas similares às imagens histomorfométricas (TURNER, 2001; LEWIECKI; BORGES, 2006). Utilizando programas adequados é possível realizar um modelo de elementos finitos para prever as propriedades biomecânicas do osso (IBÁÑEZ, 2003).

#### 3.7.3.10 Ressonância magnética

Imagens de ressonância magnética oferecem informação sobre a microarquitetura do osso. Já as imagens de ressonância magnética de alta resolução estão sendo investigadas para estudar o osso trabecular e suas propriedades mecânicas (TAKAHASHI *et al.*, 1999). Recentemente, constatou-se que podem fornecer informações a respeito da microarquitetura com mais detalhes que a densitometria, pois permitem a análise de incremento de subvolumes de  $1 \text{ cm}^3$  de osso com uma resolução espacial entre 50 e 100  $\mu\text{m}$  (NORDSTRÖM, 2004).

### 3.8 Osteoporose e odontologia

A possível relação entre perda óssea bucal e osteoporose foi inicialmente pesquisada em 1960 devido à importância da integridade óssea para o sucesso de inúmeros tratamentos odontológicos (TOLAZZI, 2001).

Kribbs, Smith e Chesnut (1983) demonstraram que a osteopenia em humanos tem manifestações bucais, visto que a altura da borda alveolar e sua densidade óssea, medidas em radiografias convencionais, têm uma relação significativa com a massa óssea total e local.

A massa óssea mandibular e a perda dentária foi investigada por Taguchi *et al.* (1995), relacionando a espessura da cortical mandibular na região do forame mental em radiografias panorâmicas com idade, sexo e número de dentes presentes dos pacientes. Não foi encontrada correlação significativa entre o número de dentes presentes em pacientes do sexo masculino, mas a diminuição da massa óssea mandibular foi positivamente correlacionada com perda dentária em mulheres na sétima década de vida.



Há um interesse crescente em pesquisar a interrelação entre osteoporose sistêmica e perda óssea bucal, perda dental e fatores de risco destas condições. A gravidade de perda óssea alveolar aumenta com a idade, em parte relacionada com condições sistêmicas, que também predis põem para a osteopenia/osteoporose. Também há evidências de que terapias que influenciam a DMO sistêmica, como reposição hormonal e bifosfonatos possam estar associados a menor perda dental e menor perda óssea alveolar. É possível a correlação entre perda óssea bucal e osteoporose (JEFFCOAT, 1998; BIRKENFELD *et al.*, 1999; von WOWERN, 2001; JEFCOAT, 2005).

Estudos com grupos específicos de idade são necessários para acessar o papel da osteoporose em várias condições bucais como perda óssea bucal, perda dental e doença periodontal. Entendendo a associação entre estas doenças e seus mecanismos, os cirurgiões-dentistas podem dispor de meios para prevenir, diagnosticar e avaliar o impacto da doença e seu tratamento no planejamento e na sua execução (KRALL *et al.*, 2001; WACTAWSKI-WENDE, 2001; MULLIGAN; SOBEL, 2005; KAYE, 2007).

Há muitos fatores comuns à doença periodontal avançada e osteoporose, mas, a perda de inserção periodontal, dentes e altura da crista alveolar, não estão bem elucidadas, pois os resultados podem ser confundidos por fatores como higiene oral deficiente, situação sócio-econômica, idade, condição pós-menopausa, terapia hormonal, tabagismo e raça (WACTAWSKI-WENDE, 2001; MATTSON; CERUTIS; PARRISH, 2002; DERVIS, 2005).

Os fatores sistêmicos que podem estar relacionados com perda óssea bucal incluem osteoporose, doenças renais, distúrbios hormonais, dieta e uso de diferentes medicamentos. Doença periodontal crônica, perda dentária precoce e o efeito de prótese mal adaptada no rebordo alveolar podem ser fatores locais associados com perda óssea mandibular (KNEZOVIĆ- ZLATARIĆ *et al.*, 2007)

Dieta deficiente em cálcio e vitamina D pode ser incluída nos fatores de risco comuns de osteoporose e doença periodontal e deficiência de estrógeno pode afetar o remodelamento ósseo da mesma forma que nos pacientes com periodontite, onde a quantidade de osso reabsorvido excede a de neoformação. Pacientes com baixa densidade mineral óssea, indicativa de osteoporose, têm alto risco de progressão da periodontite. No tratamento da osteoporose, a reposição hormonal e bifosfonatos pode também preservar a massa óssea periodontal. Estratégias para reduzir o risco de osteoporose podem também retardar a perda óssea alveolar (MATTSON; CERUTIS; PARRISH, 2002; REDDY, 2002; KAYE, 2007; INAGAKI *et al.*, 2007).

Os aspectos qualitativos e quantitativos da estrutura do osso mandibular são de grande importância na periodontia, endodontia, prótese, especialmente na implantodontia. É importante fazer uma indicação correta antes de indicar implantes e levar em conta os fatores sistêmicos e locais para acessar a qualidade e a quantidade óssea. O processo alveolar fornece estrutura para

suporte dos dentes e o declínio da massa óssea esquelética pode ser relacionada com o aumento de risco de perda óssea bucal e uma consequência negativa na estabilidade dentária. Os procedimentos para preservar o rebordo alveolar de atrofia devem ser considerados na reabilitação protética suportada por implantes osteointegrados (SANFILIPPO; BIANCHI, 2003; MULLIGAN; SOBEL, 2005; KNEZOVIC-ZLATARIC *et al.*, 2007).

As condições sistêmicas e hábitos influenciam o sucesso do implante dentário. A osteoporose pode ser uma contra-indicação relativa para a colocação de implantes dentários, mas a presença da doença não é definitiva para o insucesso do tratamento (HWANG; WANG, 2007). Para comparar osteoporose sistêmica e os parâmetros de qualidade do osso mandibular e avaliar a osteointegração em mulheres pós-menopausa que receberam implantes dentários, Amorim *et al.* (2007) utilizaram a classificação da cortical e osso trabecular em radiografias panorâmicas e a análise histomorfométrica por biópsia do osso mandibular, não encontrando diferença significativa associada à osteoporose.

Os bifosfonatos utilizados no tratamento da osteoporose podem induzir a complicações como osteonecrose, dificuldade em cicatrização pós-extração e a inibição no movimento ortodôntico (RINCHUSE *et al.*, 2007).

Portanto, a relação entre osteoporose sistêmica e saúde bucal é um complexo problema de grande interesse para os pesquisadores e clínicos. Estudos sugerem que achados em radiografias dentais e panorâmicas podem ser usados para detectar indivíduos com baixa massa óssea. As radiografias panorâmicas são freqüentes na prática odontológica, os resultados encontrados neste exame podem ajudar os dentistas a identificar pacientes com baixa massa óssea. Desta forma, o cirurgião dentista pode detectar pacientes com osteoporose utilizando informações obtidas em seu trabalho. A orientação sobre dieta, estilo de vida, podem fazer parte de múltiplos benefícios, tanto na saúde geral como bucal. Cirurgiões-dentistas têm importante papel na prevenção da osteoporose e nas implicações do tratamento desta. A finalidade do exame não é diagnosticar, mas identificar indivíduos com risco à osteoporose e encaminhá-los adequadamente (WACTAWSKI-WENDE, 2001; DERVIS, 2005; KAYE, 2007).

### 3.8.1 Exames radiográficos

As radiografias intrabucais e a panorâmica são amplamente utilizadas em Odontologia, sendo métodos radiográficos de baixo custo, facilidade de acesso e baixa dose de radiação. Utilizando ferramentas para medir a densidade óptica e análise morfológica destas radiografias, obtém-se resultados que possam sugerir aos dentistas informações para identificar indivíduos com baixa massa óssea (TAGUCHI *et al.*, 1995; LEE; WHITE, 2005; WHITE *et al.*, 2005; NACKAERTS *et al.*, 2006).

Estudos têm sugerido relação entre a osteoporose e alterações do trabeculado ósseo, visualizadas em radiografias dentárias (KASHIMA, 1995). A estrutura trabecular do osso

esponjoso é analisada principalmente em imagens radiográficas convencionais, as quais podem ser mensuradas quantitativamente mediante análise da malha da arquitetura óssea trabecular, tais como, análise de Fourier e dimensão fractal (KLEIN, 2005). Estas, associadas com informações clínicas estão relacionadas com fratura de quadril (WHITE *et al.*, 2005).

A análise quantitativa do padrão trabecular em radiografias dentais de mulheres pós-menopausa, pode ser usado para prever baixa densidade mineral óssea e identificar pacientes com osteoporose (GERAETS *et al.*, 2007, LICKS, 2007).

Law, Bollen e Chen (1996), avaliaram os sinais de osteoporose em radiografias dentárias por meio da comparação de quatro métodos de estimativa da densidade mineral óssea: dimensão fractal, microdensitometria, intensidade de *pixel* e análise da espessura da cortical mandibular em radiografias panorâmicas. As medidas de densidade óptica e intensidade de *pixel* utilizam penetrômetro de alumínio, adaptado aos filmes periapicais previamente à tomada radiográfica. Os autores concluíram que a intensidade de *pixel* pode ser usada como método de avaliação, suplementar em adição à história médica e avaliação clínica, para detectar a presença de osteoporose.

Além da análise morfológica, a avaliação da densidade radiográfica dos maxilares em radiografias periapicais e panorâmicas, associadas ao uso de penetrômetros de cobre e alumínio, tem sido amplamente pesquisada. A densidade radiográfica tem sido muito utilizada para comparar os ossos maxilares com os demais ossos do esqueleto em pacientes normais e com osteoporose (KRIBBS; SMITH; CHESNUT, 1983).

A interpretação de ganho ou perda óssea em radiografias clínicas é limitada por diversos fatores, incluindo falta de padronização geométrica, limitação de brilho e contraste, superposição de corticais e a falta de capacidade do olho humano detectar pequenas mudanças ósseas. A detecção de sutis mudanças na densidade do osso alveolar, indicadora da atividade de perdas ou ganhos teciduais do periodonto, teve sua visualização facilitada pela subtração de radiografias padronizadas, quando comparadas às interpretações subjetivas da radiografia convencional (JEFFCOAT; REDDY, 1983; TAVANO *et al.*, 1999).

Uma das maneiras de avaliar a possibilidade de que fatores presentes na radiografia panorâmica possam servir de indicativo de perda óssea mineral, para identificar um grupo de risco de perda óssea, é o uso de índices mensuráveis ou classificatórios, utilizados em radiografias panorâmicas. Muitos estudos mostram que a forma e espessura da cortical mandibular em radiografias panorâmicas estão correlacionadas com a densitometria óssea e podem ser usadas como ferramentas para detectar baixa DMO, não com a finalidade de diagnóstico, mas identificar o risco e encaminhar adequadamente, permitindo interceptar o progresso da doença, através de prevenção e tratamento (ARDAKANI; NIAFAR, 2004; BALCIKONYTE; BALCIUNIENE; ALEKNA, 2004; DERVIS, 2005).

Bras *et al.* (1982), sugeriram que a espessura da cortical no ângulo goníaco (IG) em radiografias panorâmicas pode ser usada como um parâmetro de avaliação para determinar perda óssea. Benson *et al.* (1991) sugere índice radiomorfológico baseado nas medidas da cortical óssea mandibular (IPM). Klemetti, Kolmakov, Kroger (1994), observando que indivíduos com osteoporose apresentam erosão no bordo inferior da mandíbula, sugeriram a classificação da cortical de acordo com as mudanças analisadas (ICM). Ledgerton *et al.* (1997) e Ledgerton *et al.* (1999) sugerem os índices mandibular (IM) e antegonial (IA) com potencial na identificação de osteopenia.

Arifin *et al.* (2006) desenvolveram um sistema de computador para medir a espessura da cortical mandibular em radiografias panorâmicas em mulheres pós-menopausa com suspeita de baixa DMO esquelética.

Taguchi *et al.* (2006) e Taguchi *et al.* (2007), comparando o índice cortical mandibular em radiografias panorâmicas com ferramenta de auto avaliação para osteoporose - *Osteoporosis Self-assessment Tool* (OST) - e com densitometria óssea, observaram que dentistas treinados foram capazes de identificar mulheres com baixa densidade mineral esquelética ou osteoporose. Karayianni *et al.* (2007) compararam questionários clínicos (índices de risco de osteoporose, OSIRIS) e radiografias dentárias, concluindo que esses métodos podem ser utilizados para identificar mulheres com risco de osteoporose.

Entretanto, a forma e a espessura da cortical mandibular, isoladas ou em combinação com fatores de risco clínicos não foram capazes de identificar mulheres pós-menopausa com osteoporose em alguns estudos (ISHII *et al.*, 2007; HORNER *et al.*, 2007; DEVLIN *et al.*, 2007).

### **3.9 Modelos animais no estudo de osteopenia/osteoporose**

Os fatores considerados para a escolha do modelo animal a ser utilizado em pesquisa são: homogeneidade genética, propriedades biológicas, custo e eficácia, facilidade de manipulação experimental, considerações ecológicas, implicações éticas e sociais. Devem reproduzir as doenças humanas na sua indução e progressão (BARLET *et al.*, 1994; AOKI *et al.*, 1996; EL MONTASER *et al.*, 1997).

Não existe modelo ideal a ser utilizado em estudos do osso, pois nenhum imita perfeitamente a osteoporose humana pelas diferenças na fisiologia reprodutiva, hormonal e características biomecânicas ósseas. A escolha do modelo depende do objetivo específico do estudo, porém estudos sobre alterações do metabolismo ósseo induzidas por diversos fatores, como deficiência hormonal, dieta deficiente em cálcio, administração de corticosteróides, além da osteoporose induzida, têm sido realizados, principalmente, em ratos Sprague-Dawley e Wistar (ARIAS; SZEJNFELD, 1997; AERSSSENS *et al.* 1998; THORNDIKE; TURNER 1998).

Para o estudo da osteoporose, nas mudanças histomorfométricas, com marcadores biológicos, densitometria e avaliação da fragilidade do osso, o rato é o modelo mais utilizado. Tem o menor custo de manutenção, facilidade nos cuidados diários, sua vida curta facilita o estudo do efeito da idade no osso, é conhecida a remodelação do osso e o efeito da dieta nesse processo. Os ratos constituem modelo animal que permite a indução de osteopenia por diferentes mecanismos, responde à ação de drogas utilizadas para o tratamento da osteoporose e propicia a pesquisa de técnicas diagnósticas não invasivas, para posterior estudo em humanos. Além disso, fornecem dados fundamentais e acurados semelhantes aos observados no esqueleto humano, são facilmente encontrados, manuseados e tratados. A desvantagem da utilização deste modelo é a ausência de menopausa natural (ARIAS; SZEJNFELD, 1997; AERSSSENS *et al.*, 1998; THORNDIKE; TURNER, 1998).

O FDA *Guidelines for Preclinical and Clinical Evaluation of Agents Used in the Treatment or Prevention of Postmenopausal Osteoporosis* (1994) recomenda ratas ovariectomizadas e outros modelos animais não-roedores para demonstrar a eficácia de agentes na prevenção e tratamento da osteoporose (THOMPSON *et al.*, 1995).

Modelos animais utilizando ratos têm sido largamente empregados em pesquisas em odontologia, pois o tecido ósseo mandibular e as estruturas periodontais de ratos, especialmente na região de molares, assemelham-se às do homem (KLAUSEN *et al.*, 1989). Contudo, procedimentos radiográficos que visam obter medidas utilizadas em animais de maior porte e no homem, apresentam-se dificultados, senão impossíveis, devido pequeno tamanho desses animais (GAEGAUF-ZOLLINGER; BURCKHARDT; GUGGENHEIM, 1982).

Em decorrência de dificuldades na obtenção de radiografias *in vivo*, o estudo radiográfico da reabsorção óssea nesses modelos experimentais é realizado a partir de uma radiografia do material de necrópsia, permitindo apenas estudos transversais, limitando avaliações longitudinais, envolvendo também aparatologia complexa (SEGAWA, 1990).

A primeira dificuldade encontrada é a necessidade de um dispositivo que assegure a reprodutibilidade das tomadas radiográficas de um mesmo animal, imobilizando ratos vivos durante a tomada radiográfica. Nishimura *et al.* (1987), indicaram a possibilidade da utilização de um dispositivo cefalométrico para realizar radiografias reprodutíveis de cabeça e mandíbula de ratos vivos, em estudos longitudinais da reabsorção da crista residual pós-extração, e estabelecer um sistema relativamente fácil, rápido e de custo acessível. Raymond; Cimasoni (1997) desenvolveram um dispositivo para imobilizar ratos, utilizando um aparelho de mamografia de 31 kV e 32 mA.

Ainda, para que sejam registradas com detalhes estruturas anatômicas, é necessário que se utilize equipamento radiográfico com baixa potência, variando de 20 a 50 kVp (GAEGAUF-ZOLLINGER; BURCKHARDT; GUGGENHEIM, 1982; SEGAWA, 1990; BRESIN; KILIARDIS; STRID, 1999).

Serota, Jeffcoat e Kaplan (1981) desenvolveram uma técnica intrabucal para radiografar molares de ratos vivos, utilizando filme periapical recortado. As radiografias foram obtidas com 65 kV, 10 mA, 0,2 s de exposição e distância focal de 20 cm. As imagens obtidas por esta técnica, sem sobreposição com o lado oposto, permitiram observar as estruturas dentárias e o estudo longitudinal *in vivo* no mesmo animal.

Petrikowski e Overton (1996) compararam mudanças de conteúdo mineral em mandíbulas de ratos lactentes com dieta pobre em cálcio, utilizando radiografias obtidas em aparelho de raios X de 40 kV, 50 mA, tempo de exposição de 0,2 s, distância foco-filme de 53,2 cm e filmes de mamografia.

Morya, Ito e Murai (1998), em estudo para investigar a relação entre a osteoporose e a perda óssea alveolar, utilizaram o método radiográfico para calcular a densidade óssea mineral utilizando 20 kVp, 4 mA, distância foco-filme de 53 cm e tempo de exposição de 120 s e uma escala de alumínio como referência. Foram radiografadas mandíbulas e fêmures, as imagens digitalizadas, transferidas ao computador e analisadas no programa Photoshop.

Vários modelos de mensuração de massa e DMO vêm sendo propostos, assim com meios de se avaliar a quantidade e a qualidade do tecido ósseo. Para determinar a relação entre a DMO e os achados radiográficos, podem-se destacar a microdensitometria, a subtração digital, as tomografias linear e computadorizada. A análise da textura óssea em filmes radiográficos, tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética é um método promissor para verificar alteração da arquitetura do trabeculado ósseo (LEROUXEL *et al.*, 2004). Apesar de eficazes, são técnicas mais onerosas e menos disponíveis que as radiografias convencionais, como mostram vários estudos (BRAS *et al.*, 1982; BENSON; PRIHODA; GLASS, 1991; KLEMETTI; VAINIO; LASSILA, 1994; TAGUCHI *et al.*, 1996; KLEMETTI; KOLMAKOW, 1997; HORNER; DEVLIN; HARVEY, 2002; WATANABE *et al.*, 2004; TAGUCHI *et al.*, 2004).

Outros métodos para a obtenção de imagens nos estudos mais recentes, incluem a absorciometria por raios X ou densitometria óssea (SAKAKURA *et al.*, 2001; JIANG; MATSUMOTO; FUJII, 2003; MARDAS *et al.*, 2003; KURODA *et al.*, 2003; HIDAKA *et al.*, 2003; ELSUBEIHI; HEERSCHER, 2004) e microtomografia computadorizada, que produz imagens das trabéculas similares às imagens histomorfométricas (TURNER, 2001; NAKANO *et al.*, 2003; YANG; PHAM; CRABBE, 2003; TANAKA *et al.*, 2003; KURODA *et al.*, 2003).

Contudo, a utilização desses métodos implica em instalações especiais para uso em animais e alto custo operacional, determinando que estudos em ratos realizados em nosso meio (SEMENOFF SEGUNDO, 2003; GAIO *et al.*, 2004) deixem de realizar a avaliação radiográfica para a obtenção de medidas longitudinais e avaliação da densidade óssea.

Poucos são os estudos publicados na literatura que relatam tentativas de padronização geométrica na obtenção de radiografias da mandíbula de roedores vivos. Estudos longitudinais

necessitam radiografias repetidas ao longo do tempo. Os procedimentos para obter duas radiografias da mesma área em diferentes intervalos de tempo requerem estabilização do filme e da fonte de raios X por meio de um dispositivo especial, assim como a técnica radiográfica e o processamento dos filmes devem ser padronizados para obter uma imagem de melhor qualidade.

As variações geométricas e de densidade no filme radiográfico resultantes das condições de exposição e de processamento devem ser minimizadas para que se possa obter uma análise quantitativa de mudanças ósseas longitudinais em tecidos mineralizados. O uso de dispositivos para correção geométrica aumenta significativamente a segurança das medidas e permite padronização para estudos longitudinais (SOUTHARD *et al.* 1999).

Uma possível alternativa para quantificar essas alterações poderia ser a técnica de subtração radiográfica, usada desde 1980 em Odontologia. Além de permitir padronizar e reproduzir radiografias, esta facilita a acurada detecção de mudanças na mineralização na ordem de 1 a 5% e a possibilidade de medir quantitativamente *in vivo* a perda óssea que ocorre entre os exames radiográficos. Um programa é usado para obter a imagem subtraída e medir perda ou ganho. As áreas de perda óssea são mostradas em cinza escuro - com valores de densidade óptica menores que 128 - e as de ganho mostram-se claras - com valores de densidade óptica maiores que 128 (JEFFCOAT; REDDY, 1993; SOUTHARD; SOUTHARD, 1994; TAVANO *et al.*, 1999). Southard e Southard (1994) utilizaram esta técnica para examinar mudanças no osso de cães, nos quais foi simulada a osteoporose, comparando imagens obtidas com filmes de sensibilidade D e aparelhos de raios X de 30 e 50 kV. Os melhores resultados foram obtidos com 30 kV, pois foi possível detectar menor perda óssea (7,5%) do que com 50 kV (19%). Não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram mudanças na densidade no osso mandibular de ratos por subtração radiográfica digital.

Medidas da densidade óssea mineral e análise histomorfométrica pela microrradiografia de contato foram utilizadas por Iwasa *et al.* (2000) para verificar o efeito de ingestão de dieta rica em sal no osso mandibular de ratos. Pela dificuldade de distinguir a diferença entre a região trabecular e cortical no osso mandibular, a área foi medida como volume de osso entre o incisivo e a raiz do molar. Gorustovich *et al.*, (2003) utilizaram estudo histomorfométrico, usando sistema de análise de imagem assistida por computador para determinar a densidade do tecido ósseo e remodelação óssea no osso interradicular da raiz mesial do primeiro molar de ratos. A densidade do tecido ósseo reflete a proporção volumétrica de tecido mole ou porosidade.

Petrikowski e Overton (1996), compararam as mudanças radiográficas ocorridas na espessura da cortical mandibular de ratas com dieta pobre em cálcio, com as ocorridas em fêmur e coluna, concluindo que as mudanças na cortical mandibular existem, mas são menores do que as de fêmur e coluna.

Morya, Ito e Murai (1998), para investigar a relação entre a osteoporose e a perda óssea alveolar em ratas ovariectomizadas com dieta pobre em cálcio, utilizaram o método radiográfico convencional e o programa Photoshop para medir a densidade óssea mineral de mandíbula, maxila, fêmur e tíbia de ratas, investigando a relação entre osteoporose e perda óssea alveolar, concluindo que a densidade mineral óssea diminui no esqueleto e osso alveolar. Matani, Okamoto, Chihara (1998) desenvolveram uma técnica para avaliação da densidade trabecular usando análise de multiresolução em processamento de imagens de secção de vértebras de colunas de ratas normais e com osteoporose, indicando que técnicas de processamento de imagens podem ser úteis em diagnosticar osteoporose precocemente.

Para análise de mudanças ocorridas no osso mandibular e fêmur de ratas, Iwasa *et al.* (2000) utilizaram método histomorfométrico, medindo a área total em volume de na região distal do terceiro molar, pela dificuldade de distinguir entre a região cortical e trabecular no osso mandibular, excluindo o efeito dos dentes na densidade óssea mandibular. Para o fêmur, foi medida a densidade mineral óssea da cortical e trabecular.

Para verificar se a deficiência de estrógenos afeta a densidade mineral do osso mandibular em ratas ovariectomizadas, utilizando técnicas de densitometria óssea e tomografia computadorizada periférica quantitativa, Kuroda *et al.* (2003) compararam a perda mineral na mandíbula e no fêmur destes animais. Os resultados mostraram que a perda de densidade mineral na mandíbula de ratas ovariectomizadas é pequena, detectável na tomografia computadorizada, mas não pela análise densitométrica.

Jiang *et al.* (2003) utilizaram tomografia computadorizada periférica quantitativa para avaliar a relação entre osteoporose e perda óssea na mandíbula de ratas com dieta com baixa ingestão de cálcio e ovariectomizadas, demonstrando que houve diminuição da densidade mineral óssea cortical e trabecular e as mudanças ocorreram entre o primeiro e segundo molar. Como a estrutura interna da mandíbula é complexa, a região de interesse foi marcada eliminando os dentes molar e incisivo.

Comparando o método histológico, considerado como padrão-ouro, com a microrradiografia quantitativa, usada para medir a distribuição mineral em lesões no osso por ter alta resolução, Schortinghuis *et al.* (2003), concluíram que esta técnica tem a capacidade de avaliar qualitativamente o osso, mas não quantitativamente. A densidade do osso reduz significativamente após ovariectomia, observado em imagens digitalizadas e comprovado por análise histomorfométrica (ZECCHIN *et al.*, 2004).

O volume do osso trabecular na mandíbula é menor que o cortical, fator que pode dificultar a detecção de sua perda em indivíduos com osteoporose sistêmica. Para avaliar o efeito terapêutico de vários agentes na mudança do osso trabecular da mandíbula, foi utilizada tomografia computadorizada periférica quantitativa e medida a densidade e o conteúdo mineral ósseo em ratas ovariectomizadas (JIANG *et al.*, 2004).



Takahashi *et al.* (2004), avaliaram o efeito de bifosfonato em ratos com osteopenia induzida por acetato de Metilprednisolona (1 mg/kg de peso via subcutânea, 3 vezes por semana, durante 12 semanas), medindo a DMO por densitometria óssea nas vértebras lombares e concluíram que este pode ser efetivo no tratamento, acompanhando a terapia com corticosteróide.

Anbinder *et al.* (2007) empregaram radiografias digitais de mandíbulas de ratas para calcular a densidade radiográfica em tons de cinza da área do osso alveolar, sob o primeiro molar inferior, em ratas com deficiência estrogênica e tratadas com bifosfonato e sinvastatina. Concluíram que a densidade óssea diminuiu com a ovariectomia e o tratamento com bifosfonato foi eficiente.

Poucos estudos mostram as mudanças de microestrutura e tecidos mineralizados do osso neoformado em fraturas osteoporóticas. Yingjie *et al.* 2007, pesquisaram a cicatrização óssea em fraturas osteoporóticas em ratas ovariectomizadas, comparando os métodos de tomografia periférica quantitativa, microtomografia computadorizada, histológico e testes biomecânicos.



**4 ARTIGO 1**

FONTANELLA, V.; MAHL, C. R. W.; TRAVESSAS, J.; PADILHA, D. M. P. Evaluation of an Apparatus for Standardized Radiographs of the Rat Mandible. *Reports from the 15th International Congress of Dentomaxillofacial Radiology*. Medimond : Bologna, p. 11-14, 2005.

## **Evaluation of an Apparatus for Standardized Radiographs of the Rat Mandible**

**V.R.C. Fontanella, C.R.W. Mahl,  
J.A. Travessas and D.M.P. Padilha**

*Graduate Program in Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
Porto Alegre, Brazil*

### **Summary**

Five heads of rats were radiographed three times by the same operator to test a positioning device. Radiographic images were digitized under standardized conditions. The first image (G1) was used as obtained. In the second (G2) and third images (G3), 3% and 5% bone losses were digitally simulated. The ImageLab software was used for subtraction of G1x G2 and G1x G3. The mean optical density for control area and 3% bone loss area were  $131.52 \pm 3.26$  and  $128.90 \pm 2.55$ ; and for control area and 5% bone loss,  $131.56 \pm 3.38$  and  $128.13 \pm 3.18$ . The results of Wilcoxon test ( $p=0.043$ ) showed that the test areas had significantly lower density than control areas for both bone loss intensities. The positioning apparatus can standardize radiographs so that subtle bone loss can be detected in subtraction images.

### **Introduction**

Animal models using rats have been largely used in dental researches that focus on bone tissue. Radiographic procedures to obtain measurements in larger animals or human beings are complicated and at times impossible due to the small size of this animal (1).

Because of the difficulty in obtaining in vivo radiographs, the radiographic investigation of bone resorption in these experimental models is conducted using radiographs of material obtained from necropsies, which only allows for cross-sectional studies and limits longitudinal

investigation (2). The first difficulty faced is the need of a device that ensures reproducibility of radiographs taken from the same animal (3)

Few studies in the literature report on results of geometrical standardization of radiographs of the mandible of live rodents (1-5). The evidence that these radiographic procedures are difficult or do not yield satisfactory results is the use of other procedures to obtain images in more recent studies, such as X-ray absorptiometry (6) and X-ray microtomography (7), which require special facilities to be used with animals and have high operational costs.

Therefore, the purpose of this study is to investigate whether radiographs of rat heads kept in formalin using a positioning apparatus are reproducible to detect subtle changes in bone density by means of digital subtraction.

## **Methods**

The rat was laid down in the supine position on a base of the positioning apparatus, and its head was positioned and fixed by five metal clamps: interdental space between lower central incisors, interincisal space of the upper central incisors (occluded), frontal region, and right and left auditory canals. Midsagittal plane of the head was parallel to the film packet (no. 2, periapical) and the X-ray tube, which was adapted to a support so that the vertical angle was  $-30^\circ$  and focal distance was 60 cm.

Film processing was standardized using the time-temperature method, and digitized images were also standardized using a scanner equipped with a transparency reader.

Images from Group 1 (first radiograph of each head) were used as obtained, whereas in Groups 2 and 3 (second and third radiographs) bone losses of 3% and 5%, respectively, were digitally simulated in a determined area of the body of the mandible. For these procedures, the Adobe Photoshop 6.0 software was used (tool = spray; weight = 30 pixels, color = black; opacity = 3% and 5%).

The ImageLab software (UTHSCSA, USA) was used for image subtraction according to the following combinations: Group 1 x Group 2 and Group 1 x Group 3. Mean optical density and standard deviation values were calculated for two control areas and the test area in which bone loss was simulated. The Wilcoxon nonparametric test was used to calculate whether there were differences that showed bone loss in the test areas, and whether the method is reproducible (control areas).

## **Results**

Table 1 shows optical density values in test and control areas according to intensity of simulated bone loss. The optical density values for

Cape Town, South Africa, May 28 - June 2, 2005

13

Table 1 Comparison of optical density values in the test and control areas according to intensity of simulated bone loss.

Rat	Bone loss			
	3%		5%	
	Control area	Test area	Control area	Test area
1	126.62	125.36	126.30	123.54
2	131.04	128.97	131.27	127.77
3	130.90	127.55	131.22	127.34
4	134.44	131.39	134.96	131.99
5	134.60	131.25	134.07	130.03
Mean	131.52	128.90	131.56	128.13
Standard deviation	3.26	2.55	3.38	3.18
p	0.043		0.043	

the control areas were  $131.52 \pm 3.26$  and  $131.56 \pm 3.38$ . The results of the Wilcoxon test ( $p=0.043$ ) showed that values in the test areas ( $128.90 \pm 2.55$  and  $128.13 \pm 3.18$  for 3% and 5% bone loss, respectively) were significantly lower than values of the control areas.

## Discussion

The radiographs showed only the apical third of molars and the base of the mandible because of overlapping with the body of the mandible on the opposite side. The vertical angle would have to be increased to show the alveolar crest, but this would lead to greater image distortion.

Radiographic image subtraction is a method that can detect minimal changes in mineral content of tissues (8), and is an alternative method to detecting volume as well as height loss.

Digital subtraction of images obtained using the apparatus described in this study detected digitally simulated 3% and 5% bone losses. However, it is necessary that this apparatus be tested in live rats under anesthesia and that results be compared with the histological criterion standard.

## Conclusion

The positioning apparatus evaluated in this study standardizes radiographs so that subtle bone loss can be detected in subtraction images.

## References

1. GAEGAUF-ZOLLINGER R et al. Radiographic measurements of alveolar bone loss in the rat. *Archs Oral Biol*, 27:651-8, 1982.
2. SEGAWA H. Fundamental study of alveolar bone measurements in the hamster using an apparatus for intraoral radiography. *Ou Daigaku Shigakushi*, 17(2):77-94, 1990.

3. RAYMOND F, CIMASONI G. Radiographic measurements of alveolar bone loss in the living rat. *J Periodontol*, 68:141-4, 1997.
4. SEROTA KS, JEFFCOAT MK, KAPLAN ML. Intraoral radiography of molar teeth in rats. *Labo Animal Science*, 31:507-9, 1981.
5. NISHIMURA I, DAMIANI PJ, ATWOOD DA. Resorption of residual ridges in rats. *J Dent Res*, 66:1753-7, 1987.
6. KURODA S et al. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral Dis*, 9(1):24-8, 2003.
7. TANAKA M et al. Long-term changes in trabecular structure of aged rat alveolar bone after ovariectomy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 95(4):495-502, 2003.
8. Christgau M et al. Quantitative digital subtraction radiography for the determination of small changes in bone thickness. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85: 462-72, 1998.





**5 ARTIGO 2**

MAHL, C. R.; FONTANELLA, V. Optimal parameters for lateral oblique radiographs of rat mandibles. *Dentomaxillofacial Radiology*. Aceito para publicação.

**ABSTRACT**

**Objective:** To establish optimal exposure parameters for lateral oblique radiographs of rat mandibles using an intraoral X-ray machine.

**Methods:** A positioning apparatus, previously tested for its reproducibility, was used to obtain radiographs of four heads of formaldehyde-preserved Wistar rats. Radiographs were exposed at 50 kV and 8 mA using four size-2 films (Insight, Ektaspeed Plus, Ultraspeed and D-Speed), two focal distances (30 and 60 cm) and seven exposure times (0.6, 0.7, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 s). The radiographs were evaluated by 2 examiners and scored for image quality: 1, very poor; 2, poor; 3, fair; 4, good; 5, excellent. The evaluations were repeated at 30 days.

**Results:** Intraobserver reproducibility was substantial ( $\kappa = 0.798$  and  $0.667$ ). Also, the two examiners showed substantial agreement ( $\kappa = 0,726$ ). There was a significant difference ( $\alpha = 1\%$ ) between the scores for the films under study. At a 30-cm distance, E-speed films had mean scores of 4 and 5 at 0.8 and 1-s exposure times, and D-speed films, at 1.5, 2 and 2.5-s exposure times. At a 60-cm distance, the best results were found for E-speed films at 2.0 and 2.5-s exposure times.

**Conclusion:** The films under study did not show any significant difference in quality of rat mandible images as long as exposure times were adequate to their sensitivity and focal distance.

**Key Words:** Radiography; Rats, Wistar; mandible; X-ray film.

## INTRODUCTION

The use of animal models is fundamental to establish the scientific bases of the research process. Of several animal models, rats are more often used also because they are low cost, easy to manage animals.<sup>1</sup> However, the radiographic procedures usually adopted to obtain linear measures of larger animals and human beings are complicated in rats because of their small size.<sup>2</sup> Moreover, low-power X-ray machines have to be used to record detailed images of anatomic structures, such as the cementoenamel junction.<sup>3-6</sup> Also, a positioning device has to be used to ensure reproducibility of radiographic exposures in the same animal.<sup>5</sup> However, few studies in the literature<sup>3,5</sup> report attempts to establish geometric standardization of the process of obtaining radiographs of the mandible of live rats.

Because of the difficulties posed by *in vivo* radiographs, experimental bone resorption studies are often conducted with radiographs of necropsy material, which can be used for cross-sectional studies but limits longitudinal evaluations.<sup>2,3</sup>

Fontanella et al.<sup>7</sup> developed and tested a positioning apparatus for oblique lateral radiographs of the mandible using 5 formaldehyde-preserved heads of rats and dental films. The tested apparatus ensured standardization for the detection of subtle bone losses using digital subtraction of images. However, it is still unclear which radiographic parameters provide the best results. Therefore, the purpose of this study was to establish the optimal parameters of exposure time, focal distance and type of film for radiographs of rat mandibles using an intraoral X-ray machine.

## MATERIALS AND METHODS

The positioning apparatus tested by Fontanella et al.<sup>7</sup> was used to obtain the radiographs. Each rat head was positioned and fixed by three metal clamps placed in the interincisal space of upper central incisors (occluded), and right and left auditory canals. The midsagittal plane of the head was parallel to the film packet and the X-ray tube was adapted to a support so that the vertical angle was  $-30$  degrees (Figure 1).



**Figure 1.** Rat head positioned in apparatus.

Four heads of formaldehyde-preserved Wistar rats were used. Radiographs were exposed at 50 kVp and 8 mA (Spectro II, Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brazil) using 4 types of film (Eastman Kodak Co, Rochester, USA), two of which were D-speed films (Ultraspeed and D-Speed) and two E-speed films (Insight and Ektaspeed Plus), at 7 different exposure times (0.6, 0.7, 0.8, 1, 1.5, 2 and 2.5 s), two different focal distances (30 and 60 cm) and vertical angle of  $-30$  degrees. The combination of these parameters resulted in 56 radiographs of each head, which totaled 224 radiographs. The films were processed using the time-temperature method and fresh processing solutions (Eastman Kodak Co, Rochester, USA).

An X-ray film viewer was used to analyze radiographs randomly in a darkened room. Two examiners, both experienced oral radiologists, used a magnifying glass and classified image quality according to a five-point scale: 1, very poor; 2, poor; 3, fair; 4, good; and 5, excellent.

The evaluations were repeated at 30 days and intra- and interobserver reproducibility was calculated using kappa agreement. The Kruskal-Wallis test was used to analyze the scores assigned by examiners and to determine the optimal combination of exposure parameters.

## RESULTS

The analysis of reproducibility showed substantial<sup>8</sup> intraobserver agreement ( $\kappa = 0.798$  and  $0.667$ ). Also interobserver agreement was substantial ( $\kappa = 0.726$ ). Median scores assigned twice to each image by the 2 examiners were used for the analysis of parameter combinations (Tables 1 and 2).

A significant difference in scores was found in the comparison between the films under study (nonparametric Kruskal-Wallis test). At a 30-cm distance (Table 1), Ultraspeed and D-Speed scores were different from Insight and Ektaspeed Plus scores, except for the 1.5-s exposure time. The images obtained with D-speed films were significantly worse at shorter times and significantly better at 2.0 and 2.5-s exposure times than the images obtained with E-speed films. At a 60-cm distance (Table 2), film speed did not show statistically different results up to 1-s exposure time. At other exposure times, the use of E-speed films resulted in statistically better images than those obtained with D-speed films.

The images with the greatest scores indicated the optimal combination of film type and exposure time for each of the distances used. At a 30-cm distance, E-speed films had mean scores of 4 and 5 at 0.8 and 1-s exposure times, and D-speed films, at 1.5, 2 and 2.5-s exposure times. At a 60-cm distance, the best results (mean scores: 4.5 and 4.8) were found for E-speed films at 2.0 and 2.5-s exposure times.

**Table 1.** Results of Kruskal-Wallis test: comparisons between films and exposure times at 30-cm focal distance

<i>Film</i>	<i>N</i>	<i>Mean score</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Mean rank</i>	<i>P</i>
<i>0.6 s time</i>					
D-speed	4	1.3	0.5	5.1 <sup>A</sup>	0.024
Ultraspeed	4	1.3	0.5	5.1 <sup>A</sup>	
Insight	4	2.8	1.0	12.4 <sup>B</sup>	
Ektaspeed Plus	4	2.5	1.0	11.4 <sup>B</sup>	
<i>0.7 s time</i>					
D-speed	4	1.3	0.5	3.9 <sup>A</sup>	0.012
Ultraspeed	4	1.8	1.0	5.9 <sup>A</sup>	
Insight	4	3.5	1.0	12.2 <sup>B</sup>	
Ektaspeed Plus	4	3.3	0.5	12.0 <sup>B</sup>	
<i>0.8 s time</i>					
D-speed	4	2.0	0.0	4.50 <sup>A</sup>	0.005
Ultraspeed	4	2.0	0.8	4.50 <sup>A</sup>	
Insight	4	4.5	0.6	13.50 <sup>B</sup>	
Ektaspeed Plus	4	4.0	0.0	11.50 <sup>B</sup>	
<i>1.0 s time</i>					
D-speed	4	3.0	0.0	4.00 <sup>A</sup>	0.005
Ultraspeed	4	3.3	0.5	5.25 <sup>A</sup>	
Insight	4	4.5	0.6	11.25 <sup>B</sup>	
Ektaspeed Plus	4	5.0	0.0	13.50 <sup>B</sup>	
<i>1.5 s time</i>					
D-speed	4	4.3	0.5	9.0	0.193
Ultraspeed	4	4.8	0.5	12.0	
Insight	4	4.0	0.8	7.7	
Ektaspeed Plus	4	3.5	1.0	5.2	
<i>2.0 s time</i>					
D-speed	4	4.3	1.0	11.50 <sup>A</sup>	0.005
Ultraspeed	4	5.0	0.0	13.50 <sup>A</sup>	
Insight	4	1.3	0.5	4.50 <sup>B</sup>	
Ektaspeed Plus	4	1.3	0.5	4.50 <sup>B</sup>	
<i>2.5 s time</i>					
D-speed	4	4.0	1.4	12.25 <sup>A</sup>	0.004
Ultraspeed	4	4.5	0.6	12.75 <sup>A</sup>	
Insight	4	1.0	0.0	4.50 <sup>B</sup>	
Ektaspeed Plus	4	1.0	0.0	4.50 <sup>B</sup>	

Mean Ranks followed by different letters differ significantly ( $P < 0.05$ ).

**Table 2.** Results of Kruskal-Wallis test: comparisons between films and exposure times at 60-cm focal distance

<i>Film</i>	<i>N</i>	<i>Mean score</i>	<i>Standard deviation</i>	<i>Mean rank</i>	<i>P</i>
<i>0.6 s time</i>					
D-speed	4	1.0	0.0	7.50	0.542
Ultraspeed	4	1.0	0.0	7.50	
Insight	4	1.3	0.5	9.50	
Ektaspeed Plus	4	1.3	0.5	9.50	
<i>0.7 s time</i>					
D-speed	4	1.0	0.0	7.50	0.542
Ultraspeed	4	1.0	0.0	7.50	
Insight	4	1.3	0.5	9.50	
Ektaspeed Plus	4	1.3	0.5	9.50	
<i>0.8 s time</i>					
D-speed	4	1.0	0.0	7.50	0.543
Ultraspeed	4	1.0	0.0	7.50	
Insight	4	1.5	1.0	9.63	
Ektaspeed Plus	4	1.3	0.5	9.38	
<i>1.0 s time</i>					
D-speed	4	1.0	0.0	5.0	0.542
Ultraspeed	4	1.3	0.5	6.7	
Insight	4	2.3	1.9	9.5	
Ektaspeed Plus	4	2.3	0.5	12.7	
<i>1.5 s time</i>					
D-speed	4	1.5	0.6	4.2 <sup>A</sup>	0.012
Ultraspeed	4	1.8	0.5	5.4 <sup>A</sup>	
Insight	4	3.0	0.8	11.1 <sup>B</sup>	
Ektaspeed Plus	4	3.5	0.6	13.2 <sup>B</sup>	
<i>2.0 s time</i>					
D-speed	4	2.3	0.5	3.5 <sup>A</sup>	0.006
Ultraspeed	4	2.8	0.5	5.5 <sup>A</sup>	
Insight	4	4.3	0.5	12.0 <sup>B</sup>	
Ektaspeed Plus	4	4.5	0.6	13.0 <sup>B</sup>	
<i>2.5 s time</i>					
D-speed	4	2.8	1.0	5.1 <sup>A</sup>	0.024
Ultraspeed	4	2.8	1.0	5.1 <sup>A</sup>	
Insight	4	5.0	0.0	12.4 <sup>B</sup>	
Ektaspeed Plus	4	4.8	0.5	11.4 <sup>B</sup>	

Mean Ranks followed by different letters differ significantly (P<0.05).



## DISCUSSION

Radiographic studies help in the early detection of bone tissue changes in animal models. When radiographic procedures are standardized, variations in mineral content can be detected using digital subtraction radiography.<sup>9</sup>

The standardization of radiographic exposures in animal models has been investigated, but procedures still require high-cost equipment and are time-consuming.<sup>3</sup> Radiographic studies with rats have used mammography films,<sup>5</sup> dental radiography films,<sup>10-12</sup> intraoral<sup>4</sup> or occlusal,<sup>12,13</sup> and low kilovoltage X-ray sources.<sup>14-16</sup> These studies do not seem to have reached satisfactory results – as they were not employed in more recent studies - and other methods to obtain images, such as X-ray absorptiometry, bone densitometry<sup>17-21</sup> and micro X-ray computed tomography<sup>22-25</sup> have been investigated. However, these methods require special installations for their use with animals and have a high operational cost. Therefore, several studies with rats do not perform radiographic evaluations to obtain longitudinal measures and assess bone density.

The term “radiographic image quality” describes the subjective analysis of images, directly affected by density, contrast and sharpness or by the level of detail observed in the images of target structures.<sup>26</sup> The lack of standardization in these parameters further restricts the interpretation of bone gain or loss.<sup>27</sup>

In the present study, D-speed and E-speed radiographic films are not significantly different, not even in terms of diagnostic efficacy in human patients,<sup>28</sup> as long as exposure times are adjusted.<sup>29-30</sup>

The results of this study revealed that at a 30-cm distance and short exposure times, D-speed film images are worse than images obtained with E-speed films but significantly better than images obtained at longer exposure times (2.0 and 2.5 s). Images are similar at 1.5-s exposure time. At a 60-cm distance, E-speed films had the greatest scores at 2.0 and 2.5-s exposure times.

In conclusion, this study found no significant difference in the quality of the image of rat mandibles among the four films when exposure times were adjusted to the film and focal

distance. The best quality images were obtained using 30-cm distance, Ektaspeed Plus film with 1.0s exposure time, and Ultraspeed film with 2.0s exposure time.

## REFERENCES

1. El Montaser MA, Devlin H, Sloan P, Dickinson MR. Pattern of healing of calvarial bone in the rat following application of the Er:YAG laser. *Lasers Surg Med* 1997;**21**:255–261.
2. Gaio EJ, Fernandes MI, Oppermann RV, Rados PV, Rösing CK. Análise comparativa da altura óssea histométrica e morfométrica na periodontite induzida em ratos. *Braz Oral Res* 2004;**18**:65.
3. Gaegauf-Zollinger R, Burckhardt JJ, Guggenheim B. Radiographic measurements of alveolar bone loss in the rat. *Arch Oral Biol* 1982;**27**:651–658.
4. Segawa H. Fundamental study of alveolar bone measurements in the hamster using an apparatus for intraoral radiography. *Ou Daigaku Shigakushi* 1990;**17**:77–94.
5. Reymond F, Cimasoni G. Radiographic measurements of alveolar bone loss in the living rat. *J Periodontol* 1997;**68**:141–144.
6. Bresin A, Kiliaridis S, Strid KG. Effect of masticatory function on the internal bone structure in the mandible of the growing rat. *Eur J Oral Sci* 1999;**107**:35–44.
7. Fontanella VR, Mahl CRW, Padilha DMP, Travessas JA. Evaluation of an apparatus for standardized radiographs of rat mandible. *Proceedings of the 15<sup>th</sup> International Congress of Dentomaxillofacial Radiology*; 2005, Cape Town, South Africa, Medimond: Bologna; 2005.
8. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;**33**:159-174.
9. Southard KA, Southard TE. Detection of simulated osteoporosis in dog alveolar bone with the use of digital subtraction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;**77**:412–418.
10. Serota KS, Jeffcoat MK, Kaplan ML. Intraoral radiography of molar teeth in rats. *Lab Anim Sci* 1981;**31**:507–509.

11. Nishimura I, Damiani PJ, Atwood DA. Resorption of residual ridges (RRR) in rats. *J Dent Res* 1987;**66**:1753–1757.
12. Bodner L, Kaffe I, Littner MM, Cohen J. Extraction site healing in rats. A radiologic densitometric study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;**75**:367–372.
13. Junqueira JC, Mancini MN, Carvalho YR, Anbinder AL, Balducci I, Rocha RF. Effects of simvastatin on bone regeneration in the mandibles of ovariectomized rats and on blood cholesterol levels. *J Oral Sci* 2002;**44**:117–124.
14. Maki K, Nishioka T, Shioiri E, Takahashi T, Kimura M. Effects of dietary consistency on the mandible of rats at the growth stage: computed X-ray densitometric and cephalometric analysis. *Angle Orthod* 2002;**72**:468–475.
15. Petrikowski CG, Overton TR. Quantitative radiographic changes in the mandible, femur and vertebra in lactating rats fed a low-calcium diet. *Dentomaxillofac Radiol* 1996;**25**:136–145.
16. Moriya Y, Ito K, Murai S. Effects of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. *J Oral Sci* 1998;**40**:171–175.
17. Sakakura Y, Shide N, Tsuruga E, Irie K, Yajima T. Effects of running exercise on the mandible and tibia of ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* 2001;**19**:159–167.
18. Hidaka S, Okamoto Y, Miyazaki K, Uesugi T. Evaluation of a soybean product fujiflavone P40 as an antiosteoporotic agent in rats. *Phytother Res* 2003;**17**:112–119.
19. Jiang G, Matsumoto H, Fujii A. Mandible bone loss in osteoporosis rats. *J Bone Miner Metab* 2003;**21**:388–395.
20. Mardas N, Kostopoulos L, Stavropoulos A, Karring T. Osteogenesis by guided tissue regeneration and demineralized bone matrix. *J Clin Periodontol* 2003;**30**:176–183.
21. Elsubeihi ES, Heersche JN. Quantitative assessment of post-extraction healing and alveolar ridge remodelling of the mandible in female rats. *Arch Oral Biol* 2004;**49**:401–412.
22. Kuroda S, Mukohyama H, Kondo H, Aoki K, Ohya K, Ohyama T, Kasugai S. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral Dis* 2003;**9**:24–28.

23. Nakano H, Watahiki J, Kubota M, Maki K, Shibasaki Y, Hatcher D, Miller AJ. Micro X-ray computed tomography analysis for the evaluation of asymmetrical condylar growth in the rat. *Orthod Craniofac Res* 2003;**6**:168–172.
24. Tanaka M, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H, Ejiri S. Long-term changes in trabecular structure of aged rat alveolar bone after ovariectomy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;**95**:495–502.
25. Yang J, Pham SM, Crabbe DL. Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture. *Dentomaxillofac Radiol* 2003;**32**:247–251.
26. Whaites E. *Essentials of dental radiography and radiology*, 3rd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002.
27. Jeffcoat MK, Reddy MS. Digital subtraction radiography for longitudinal assessment of peri-implant bone change: method and validation. *Adv Dent Res* 1993;**7**:196–201.
28. Ardakani FE, Davari A, Goodarzipour D, Goodarzipour K, Fallahzadeh H. Evaluation of the diagnostic advantage of intraoral D and E film for detecting interproximal caries. *J Contemp Dent Pract* 2004;**5**:58–70.
29. Price C. Sensitometric evaluation of a new F-speed dental radiographic film. *Dentomaxillofac Radiol* 2001;**30**:29–34.
30. Syriopoulos K, Velders XL, Sanderink GCH, van der Stelt PF. Sensitometric and clinical evaluation of a new F-speed dental X-ray film. *Dentomaxillofac Radiol* 2001;**30**:40–44.



**6 ARTIGO 3**

MAHL, C. R.; FONTANELLA, V. Evaluation by digital subtraction radiography of induced changes in the bone density of the female rat mandible. *Dentomaxillofacial Radiology*. Submetido para publicação.

**ABSTRACT**

**Objective:** To verify whether changes in bone mass induced by glucocorticoid and biphosphonate can be detected by digital subtraction radiography of lateral X rays in female rat mandibles.

**Methods:** Thirty-six *Rattus Norvegicus* (Wistar) females were randomly allocated to: group 1: control ( $n=12$ ), group 2: induced osteopenia ( $n=12$ ) and group 3: induced osteopenia + risedronate ( $n=12$ ). Group 1 received subcutaneous saline solution (2 ml/kg) injections for 12 weeks. Group 2 received 1 mg/kg methylprednisolone acetate in suspension, diluted in saline solution, for 12 weeks. Group 3 received the same treatment as group 2 plus 3mg/kg risedronate sodium for a further 12 weeks. A radiograph of the left mandible was taken on day zero and after 12 weeks. A third radiograph was taken in group 3 after risedronate treatment. Digital subtraction of the radiographs was used to compare the intensity of pixels in the control area and the test area. The animals were killed and the same area assessed by subtraction was histologically evaluated.

**Results:** ANOVA revealed statistically significant histological differences between the three groups. Tukey's multiple comparisons test showed that group 2 had the smallest mean proportion of bone trabeculae per field, and group 3 the largest ( $F=37.56; p<0.01$ ). Radiographic subtraction revealed a higher mean proportion of bone trabeculae in groups 1 and 3 vs. group 2. In group 3, glucocorticoid caused a significant loss in radiographic density, and risedronate restored that loss (Friedman's non-parametric test).

**Conclusion:** Subtraction radiography was able to detect changes in bone mass induced by glucocorticoid and biphosphonate.

**Keywords:** Biphosphonates; Glucocorticoids; Subtraction technique; Osteoporosis

## INTRODUCTION

Loss of bone mass is prevalent among elderly populations and frequently results in fractures, impacting negatively on this population's quality of life, with enormous social economic repercussions. Its incidence has increased worldwide as a result of the global population's increased longevity.<sup>1</sup> A possible relationship between mandibular bone loss and osteoporosis was originally investigated due to the importance of bone integrity to the success of dental treatment, and it was demonstrated that osteopenia in humans has oral manifestations.<sup>2</sup>

Experimental studies of osteoporosis frequently use rodents, due to the fact that they are of low cost and easy to handle, in addition to fitting with current bioethical precepts.<sup>3</sup> Glucocorticoids, used for prolonged periods, are the pharmacological agents most frequently linked with inducing osteoporosis, since they reduce osteoblast activity without a compensating reduction in bone reabsorption.<sup>4</sup> In contrast, biphosphonates are pyrophosphates that inhibit osteoclast production or activity and are considered effective both for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis, with the capacity to increase bone mass of the vertebrae and femur.<sup>5</sup> The most recent animal studies have primarily assessed quantity and quality of bone tissues by means of bone densitometry and micro-computed tomography.<sup>5-10</sup> While these methods are effective, they are less readily available than conventional radiography. Furthermore, their use in experimental research with animal models requires special installations and involves high operational costs.

If mandibular bone loss is related to systemic loss, the possibility of carrying out longitudinal studies with animals in which these changes are quantified by means of radiographic subtraction techniques may open new horizons in osteoporosis research. Therefore, the objective of this study was to investigate whether glucocorticoid and biphosphonate-induced changes in bone mass can be detected by means of subtraction radiography of lateral X rays of female rat mandibles.



## MATERIALS AND METHODS

### *Study Design and Sample*

The present randomized, controlled animal experiment was approved by the Research Ethics Committee at the School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Thirty-six females of the species *Rattus Norvegicus*, Wistar line, at 13 weeks old were allocated at random to one of three groups, identified by colors on their tails and kept in an environment with a controlled temperature of  $23 \pm 3$  °C, relative air humidity of  $55 \pm 15\%$  and a light-dark cycle of 12-12 h. They were fed with a standard laboratory diet (Labina, Purine, Canoas, RS, Brazil), containing 1.3% calcium, plus water *ad libitum*.

### *Experimental Groups*

The three groups were as follows: group 1: control ( $n=12$ ), group 2: induced osteopenia ( $n=12$ ) and group 3: induced osteopenia + risedronate ( $n=12$ ). All three groups were treated for 12 weeks; group 1 was given subcutaneous saline solution (2 ml/kg) injections three times a week. Group 2 was given methylprednisolone acetate (1 mg/kg, Depo-Medrol, Pfizer, Puurs, Belgium) in suspension, diluted in saline solution. Group 3 (induced osteopenia + risedronate) was given additional treatment with risedronate sodium (3mg/kg, Actonel OSG, Norwich Pharmaceuticals, North Norwich, U.S.A.) diluted in distilled water at a volume of 5 ml/kg for 12 weeks, six times per week, administered orally with a gavage syringe and needle for rats IC 810 (Insight Equipamentos Científicos Ltda., Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) All animals were weighed at the start and end of the experiment.

### *Radiographs*

A radiograph was taken of the left mandible of each animal on day zero and after the initial 12 weeks of treatment. A third radiograph was taken of each of the animals in group 3 after the 12 additional weeks of treatment with risedronate.

Radiographs were taken with animals secured in a positioning device developed by the authors,<sup>11</sup> in which the rat, under intraperitoneal anesthesia (Sodium thiopental, Thiopentax, 40 mg/kg, Cristália, São Paulo, São Paulo, Brazil), was held in ventral decubitus on a supporting

base with its head positioned and fixed to the cephalostat at three points: the interdental space between the lower and upper central incisors (in occlusion), and the left and right auditory canals. The medial sagittal plane of the head was parallel to the film support and the X ray machine's cylinder was fitted to the positioning device's locator in such a way as to obtain a vertical angle of  $-30^\circ$  and a focal distance of 30 cm (Figure 1).

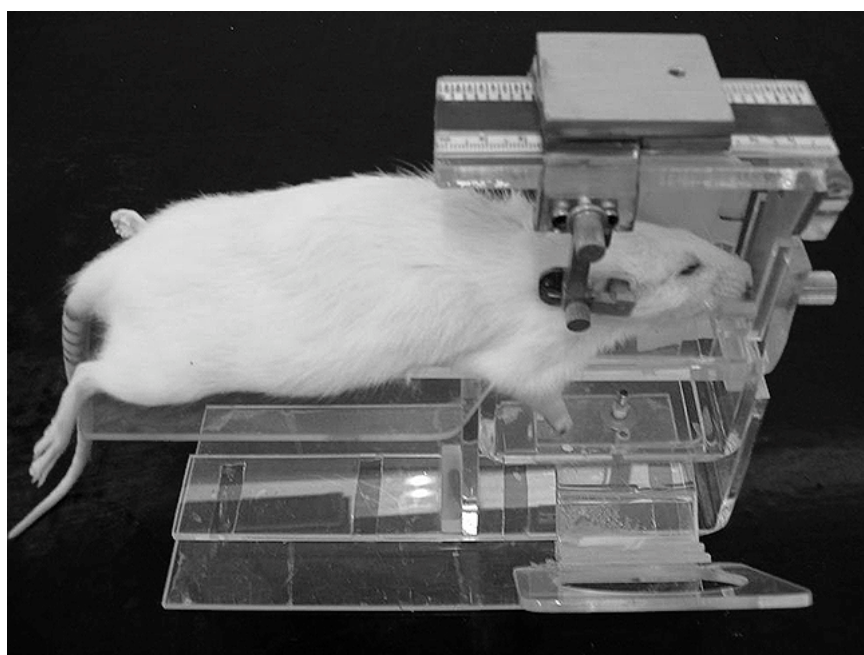


Figure 1. Animal in positioning device for radiograph.

According to previously-established criteria,<sup>12</sup> the X ray unit operated at 8 mA at 50 kVp (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil), with a #2 periapical film, sensitivity E (Ektaspeed Plus, Eastman Kodak Co, Rochester, USA) and exposure time of 1.0 s.

Films were processed using new solutions, in a standardized manner, by the temperature-time method, and images were also digitized in a standardized manner, using a scanner with a transparency adapter (Epson Perfection 2450, Long Beach, CA, U.S.A.), at full size, with automatic brightness and contrast adjustment, at a resolution of 300 dpi, in 8 bit mode, and then saved in JPEG format.

### *Radiographic Subtraction*

Prior to subtraction, due to the animals' growth, it was necessary to perform geometric adjustment of the images, using the program Regeemy (Image Registration and Mosaicking – version 0.2.43, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, SP, Brazil). The two images to be corrected were displayed side by side, with the first image being the most recent.

Next, corresponding points were marked on both images. Six pairs of reference points were used, demarcating the dimensions of the mandible. Only the first image was resized, based on the points marked, in such a way as to achieve a similar size to the second to allow for correct superimposition of the pair of images for subtraction.

Radiographic subtraction was carried using the program Adobe Photoshop CS (version 8.0, Adobe Systems Inc., San Jose, CA, United States). The initial image was pasted over the final image as a new layer, and had its grayscale inverted and its opacity adjusted to 50%. Using the histogram function of the same software, mean and standard deviations were obtained for two areas of each subtracted image; one of the mandible – the same region that would later be assessed histologically: below the second molar apex - and another control area, both 1020 pixels (Figure 2). This analysis was performed by a calibrated observer who was blind to which group each image belonged.

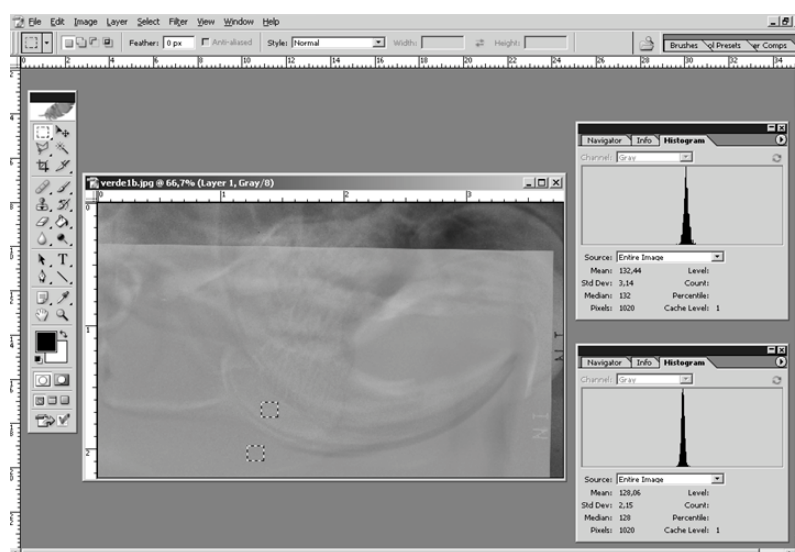


Figure 2. Subtraction image during production of the histogram of selected areas.

In the control and corticoid groups just one subtraction was performed for each animal (initial vs. final radiographs). In the risedronate group three subtractions per animal were performed: initial vs. end of corticoid, end of corticoid vs. end of risedronate and initial vs. end of risedronate radiographs.

#### *Euthanizing procedure*

The animals were euthanized under intraperitoneal anesthesia with Sodium thiopental (Thiopentax, 40 mg/kg, Cristália, São Paulo, São Paulo, Brazil), with those in groups 1 and 2 killed after 12 weeks and those in group 3 after 24 weeks' treatment. Once euthanized, the left hemi-mandible was dissected in order to obtain the same area of interest that had been demarcated on the radiographs. The anatomic samples obtained were stored individually in plastic, identified pots, containing 20 ml neutral buffered formalin solution at 10% (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

#### *Preparation and histological assessment of specimens*

The samples were decalcified in a 1:1 solution of formic acid at 50% (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) and sodium citrate at 20% (Synth Lab, São Paulo, SP, Brazil) at the Oral Pathology Laboratory at the UFRGS Dental School. They were kept submersed in the solution, which was renewed daily, throughout the period of decalcification. The decalcification time was controlled by attempting to transfix the specimen with a histological needle.

The decalcified specimens were cut with a scalpel along the mesial crowns of the second molars and the distal of the third molars and the pieces processed for embedding in paraffin. Semi-serial sections were cut perpendicular to the buccal and lingual cortices with a 4 $\mu$ m thickness at 1 mm intervals, starting at the mesial extreme of the piece, using a Leica RM 2155 rotary microtome (Leica Microsystems, Nussloch, Germany). The sections were mounted on histological slides.

The slides were then stained using Hematoxylin and Eosin (Harris Hematoxylin and Yellow Eosin at 3%, Newprov, Pinhais, PR, Brazil) for viewing under a transmitted light microscope. The central area of each histological section was selected and captured using an

optical microscope (Zeiss, Jena, Germany), at a magnification of 4x, coupled to a digital camera (Nikon Coolpix, Ayuthaia, Thailand) with a resolution of 300 dpi.

The images of the slides were imported into Adobe Photoshop CS (version 8.0, Adobe Systems Inc., San Jose, CA, United States) and then a central area was selected – comprising a square with sides of 568 pixels – situated between the buccal and lingual cortices of the mandible, and between the root apices of the molar and the mandibular canal. This area was cropped and used to quantify the trabecular area, using tools available in the same program.

The “Extract” filter was then used to select just those pixels representing trabecular bone, by discarding the image of medullar spaces. This procedure fills the unselected area of the image with uniform white color. Next, just the colored part of the image was selected and, once more using the histogram function, the area (in pixels) of bone trabeculae was obtained (Figure 3).

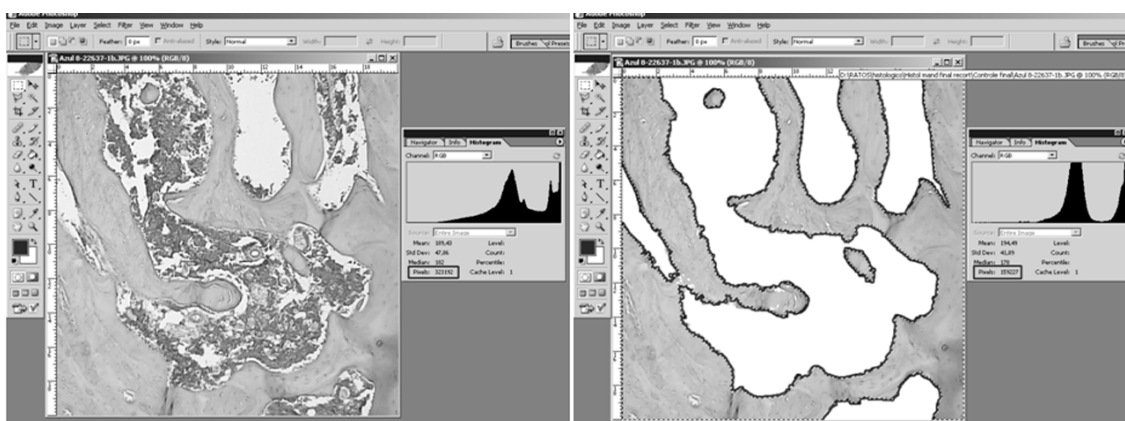


Figure 3. Cropped image and with trabecular bone selected to obtain area in pixels.

From this point it was then possible to calculate the ratio between the total area of the image and the trabecular area. Slides were assessed in batches, with a maximum of ten images processed per day and, after a minimum interval of 7 days, a second assessment was made.

#### *Statistical analysis*

Student’s *t* test for comparing the means of paired samples was used to test the degree of agreement between the first and second measurement of trabecular bone area.

Analysis of variance, supplemented by Tukey's multiple comparison test, was applied at a 5% significance level to test differences between study groups in terms of weight, optical density of subtraction images and the ratio of trabecular bone to medullar space. Since the comparisons within group 3 were of paired data, Friedman's non-parametric test was applied to them. Data processing and analysis was performed using the statistical software SPSS version 10.0.

## RESULTS

Analysis of variance did not identify significant differences between the groups in terms of weight at the start of the experiment, however, the same analysis supplemented by Tukey's multiple comparisons test demonstrated that group 3 (risedronate) exhibited greater mean weight at the end of the experiment than groups 1 (control) and 2 (corticoid) ( $F=3.88;p=0.03$ ).

Table 1 lists the data used for error assessment of the histological method proposed as gold standard. It is observed that the first assessment did not significantly differ from the second (Student's *t* test for paired samples,  $\alpha=1\%$ ).

**Table 1.** Comparison between first and second histological assessments

Assessment	<i>n</i>	Mean	Standard deviation	Mean difference*	<i>t</i>	<i>p</i>
1 <sup>a</sup>	36	70.32	14.71	0.57	1.09	0.28
2 <sup>a</sup>	36	69.74	16.09			

\* Mean difference between assessments.

In response to this result, the mean of both assessments was used for comparisons between groups. In this comparison (Table 2), ANOVA identified statistically significant differences between all three groups. Tukey's multiple comparisons test demonstrated that

group 2 (Corticoid) exhibited the lowest mean proportion of bone trabeculae per field, followed by group 1 (Control) and last, with the highest mean, group 3 (Risedronate) ( $F=37.56$ ;  $p<0.01$ ).

**Table 2.** Percentage of trabecular bone per field in three treatment groups

Group	<i>n</i>	Mean*	Standard deviation	95% CI **	<i>F</i>	<i>p</i>
1	12	72.00 <sup>A</sup>	5.95	[68.22 to 75.78]	34.03	<0.01
2	12	53.94 <sup>B</sup>	12.53	[45.98 to 61.90]		
3	12	84.14 <sup>C</sup>	7.20	[79.56 to 88.72]		

\*Means followed by the same letter do not differ. \*\*95% confidence interval for mean.

Once the difference had been confirmed histologically, the results of radiographic subtraction were also compared (Table 3). This analysis is based on the variation in pixel intensity in the control area less than that of the test area. In this case, negative figures indicate lost radiographic density, while positive numbers indicate gain. The ANOVA results show that there are significant differences between groups and Tukey's multiple comparisons test indicates that groups 1 (Control) and 3 (Risedronate) do not differ and have higher means than group 2 (Corticoid).

**Table 3.** Comparison of radiographic subtraction data between groups

Group	<i>n</i>	Mean*	Standard deviation	95% CI**	<i>F</i>	<i>p</i>
1	12	0.34 <sup>A</sup>	0.72	[-0.12 to 0.80]	143.65	<0.01
2	12	-4.28 <sup>B</sup>	1.02	[-4.93 a -3.63]		
3	12	0.52 <sup>A</sup>	0.55	[0.17 to 0.87]		

\*Means followed by the same letter do not differ. \*\*95% confidence interval for mean.

The group 3 (Risedronate) radiographic subtraction results for the different stages of the study were then compared (Table 4). Friedman's non-parametric test indicates significant

differences between them. In this group, administration of the glucocorticoid resulted in significant loss of radiographic density and the risedronate restored it.

**Table 4.** Comparison of risedronate intra-group data

Measure*	<i>n</i>	Mean	Standard deviation	Mean Rank**	<i>p</i>
I vs. C	12	-4.76	0.73	1.00 <sup>A</sup>	<0.01
I vs. R	12	0.52	0.55	2.00 <sup>B</sup>	
C vs. R	12	5.81	1.22	3.00 <sup>C</sup>	

\* I: initial; C: after administration of corticoid and R: after administration of risedronate.

\*\*Mean Ranks followed by the same letter do not differ.

## DISCUSSION

Osteoporosis and osteopenia are characterized by loss of bone mass and the animal model that has been most widely used to study them is the rat, because loss of bone mass can be induced by a variety of mechanisms, it responds to the action of the drugs used to treat osteoporosis and is appropriate for research into non-invasive diagnostic techniques for later evaluation in humans.<sup>13</sup> Furthermore, it provides fundamental data similar to those observed in the human skeleton.<sup>14</sup>

Notwithstanding, radiographic procedures designed to obtain measurements used with a large animals and humans, are problematic, if not impossible, due to the small size of rats.<sup>15</sup> The first difficulty encountered is the need for a device which ensures the reproducibility of radiographic views of the same animal, immobilizing live rats during the X ray.<sup>16</sup> For this purpose, prior to this study the authors developed a positioning device for taking lateral X rays of rodent mandibles, which proved to result in reproducible images.<sup>11</sup>

Still on the subject of problems with X raying rats, in order that these record anatomic structural details, it is necessary to use low power X ray equipment, ranging from 20 to 50



kVp.<sup>15,16</sup> We have previously evaluated the ideal exposure conditions for the technique being employed,<sup>12</sup> finding that excellent quality images could be obtained using E-speed film, a focal distance of 30 cm and exposure time of 1 s, with an X ray unit operating at 8 mA at 50 kVp, which is the configuration that was used in this study.

The administration of high doses of glucocorticoids for prolonged periods is associated with loss of bone mass, which is more evident and occurs faster in trabecular bone than in cortical bone, due to more rapid turnover, a larger number of cells and a greater surface area.<sup>17-21</sup> The glucocorticoid dosing used in this study has previously been employed by Takahashi et al.,<sup>5</sup> to induce osteopenia in female rats. Bone mass was reduced on average by 6% in relation to controls, verified by bone densitometry of the second lumbar vertebra. The lower trabecular volume observed in group 2 (corticoid) in this study has also been observed in other studies.<sup>20,22</sup>

Biphosphonates are the treatment of choice for glucocorticoid-induced osteoporosis and are considered the gold standard of pharmacological treatment.<sup>5,18,20</sup> Administered orally, they are considered effective both for prevention and for treatment, since they reduce bone loss and increase by 4.5% to 75% the bone mineral density of vertebrae and femur.<sup>1</sup> Of the biphosphonates, it is risedronate sodium that has the most powerful action, offers the best tolerance when given orally and has least side effects, in addition to having a strong affinity for bone tissue and a strong anti-resorption potential, with a dose-dependent effect.<sup>5,23-26</sup>

In this study treatment with biphosphonate was capable of restoring the lost bone mass caused by administration of the glucocorticoid, raising the trabecular bone/medullar spaces ratio to levels slightly above those of the control group, which has also been observed in other studies.<sup>5,20</sup>

Diagnosis and study of metabolic diseases of bone, especially of its trabecular portion, involves histomorphometry or quantitative histology, which consists of counting or measuring the cellular components and changes in bone microarchitecture. The method permits mineralization to be measured and bone formation to be studied which, in the case of glucocorticoid-induced osteoporosis, is characterized by thinning of trabeculae, which leads to a reduction in bone volume, after high doses, and to recovery of bone mass after treatment with

biphosphonate.<sup>27,28</sup> Trabecular organization parameters may be associated with bone mineral density. When performing microscopic analysis of trabecular density, it is usual to superimpose a counting grid on the image in order to measure trabecular and medullar areas. Counting the number of points intersecting the histological image of the area of interest allows it to be quantified for later calculation of proportions.<sup>29,30</sup> In this study, measuring the area of trabeculae in each field with the aid of an image analysis program proved to be simple and reproducible, demonstrating that this method can serve as a model for histomorphometric studies.

Many different methods have been employed to measure bone mineral density when diagnosing osteoporosis: quantitative computed tomography, peripheral quantitative computed tomography and microtomography,<sup>7,8,10,31-35</sup> but it is dual-emission X ray absorptiometry (DEXA) that is used as the gold standard in studies of bone mineral density.<sup>36</sup>

Conventional radiographic methods have little precision and merely provide evidence of accentuated changes in bone density.<sup>37,38</sup> Detection of subtle changes in the density of mineralized tissues has been facilitated by subtraction radiography, when compared with a subjective interpretation of a pair of radiographs,<sup>39,40</sup> however, no studies were found in the literature that have evaluated bone alterations related to osteoporosis using this method.

With this method, geometric variations and variations in density of the radiographic film resulting from exposure and processing conditions must be minimized to make it possible to obtain a quantitative analysis of longitudinal bone alterations in mineralized tissues.<sup>41</sup>

In this study, even though the X rays had been standardized, discrepancies were observed in the size of images, attributed to growth of the animals. In order to overcome this situation, the first image was adjusted to the second, using an open access program, available at <http://regima.dpi.inpe.br>, that had originally been designed to align satellite image and has already been tested with X ray images.<sup>42</sup>

A study that compared five software programs' efficacy for radiographic subtraction considered that Adobe Photoshop generated subtraction images of the lowest quality.<sup>43</sup> However, bearing in mind that the program does not have a command called subtraction and

that the authors did not describe the steps they took to perform subtraction, we believe, based on analysis of the image published, that they merely applied transparency to the upper layer of the image without inverting its grayscale. In this study the subtraction images generated were considered completely satisfactory.

In conclusion, administration of methylprednisolone was capable of inducing osteoporosis in the mandibles of female rats and the lost bone mass was restored by administration of risedronate sodium. These changes were detected by means of subtraction radiography.

## REFERENCES

1. Hosking DJ, Geusens P, Prizzoli R. Osteoporosis therapy: an example of putting evidence-based medicine into clinical practice. *Q J Med* 2005; **98**: 403-413.
2. Birkenfeld L, Yemini M, Kase NG, Birkenfeld A. Menopause-related oral alveolar bone resorption: a review of relatively unexplored consequences of estrogen deficiency. *Menopause* 1999; **6**: 129-133.
3. Turner A S. Animal models of osteoporosis – necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 2001; **22**: 66-81.
4. Devogelaer JP, Goemaere S, Boonen S, Body JJ, Kaufman JM, Reginster JY, et al. Evidence-based guidelines for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: a consensus document of the Belgian Bone Club. *Osteoporos Int* 2006; **17**: 8-19.
5. Takahashi K, Fukushima S, Nozaki K, Kokubo S, Teramura K, Miyata, K. Effect of incadronate on corticosteroid-induced osteopenia in rats. *Yakugaku Zasshi* 2004; **124**: 627-630.
6. Sakakura Y, Shide N, Tsuruga E, Irie K, Yajima T. Effects of running exercise on the mandible and tibia of ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab* 2001; **19**: 159-167.
7. Jiang G, Matsumoto H, Fujii A. Mandible bone loss in osteoporosis rats. *J Bone Miner Metab* 2003; **21**: 388-395.

8. Kuroda S, Mukohyama H, Kondo H, Aoki K, Ohya K, Ohyama T, et al. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral Dis* 2003; **9**: 24-28.
9. Hidaka S, Okamoto Y, Miyazaki K, Uesugi T. Evaluation of a soybean product fujiflavone p40 as an antiosteoporotic agent in rats. *Phytother Res* 2003; **17**; 112-119.
10. Yang J, Pham SM, Crabbe DL. Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture. *Dentomaxillofac Radiol* 2003; **32**: 247-251.
11. Fontanella V, Mahl CRW, Travessas J, Padilha DMP. Evaluation of an apparatus for standardized radiographs of the rat mandible. In: *Reports from the 15th International Congress of Dentomaxillofacial Radiology*. Medimond: Bologna, 2005, pp 11-14.
12. Mahl CRW, Fontanella V. *Optimal parameters for lateral oblique radiographs of rat mandibles*. *Dentomaxillofac Radiol* (in press).
13. Thorndike EA, Turner AS. In search of an animal model for postmenopausal diseases. *Front Biosci* 1998; **3**: c17-c26.
14. Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J. Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology* 1998; **139**: 663-670.
15. Gaegauf-Zollinger R, Burckhardt JJ, Guggenheim B. Radiographic measurements of alveolar bone loss in the rat. *Arch Oral Biol* 1982; **27**: 651-658.
16. Raymond F, Cimasoni G. Radiographic measurements of alveolar bone loss in the living rat. *J Periodontol* 1997; **68**:141-144.
17. Canalis E, Giustina A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: summary of a workshop. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; **86**: 5681-5685.
18. Boling EP. Secondary osteoporosis: underlying disease and the risk for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Clin Ther* 2004; **26**: 1-14.
19. Cooper MS. Sensitivity of bone to glucocorticoids. *Clinical Science* 2004; **107**: 111-123.

20. Iwamoto J, Seki T, Takeda T, Sato Y, Yamada H, Shen C-L, et al. Preventive effects of risedronate and calcitriol on cancellous osteopenia in rats treated with high-dose glucocorticoid. *Exp Anim* 2006; **55**: 349-355.
21. Mazziotti G, Angeli A, Bilezikian JP, Canalis E, Giustina A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *Trends Endocrinol Metab* 2006; **17**: 144-149.
22. Kimura E, Nishioka T, Hasegawa K, Maki K. Effects of bisphosphonate on the mandible of rats in the growing phase with steroid-induced osteoporosis  
*Oral Dis* (OnlineEarly Articles) 2007. doi:10.1111/j.1601-0825.2006.01331.x
23. Garton M J. Treatment of osteoporosis with biphosphonates. *CPD Rheumatol* 2001; **2**: 64-70.
24. McClung M, Geusens P. Review of risedronate in the treatment of osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother* 2001; **2**: 2011-2025.
25. Iwaniec UT, Samnegård E, Cullen DM, Kimmel DB. Maintenance of cancellous bone in ovariectomized, human parathyroid hormone [hPTH(1-84)]-treated rats by estrogen, risedronate, or reduced hPTH. *Bone* 2001; **29**: 352-360.
26. Jutea S, Orbai P, Ghervan C, Duncea I, Gozariu L. Glucocorticoids increase inflammation-mediated osteopenia in the rat. *Acta Endocrinol (Bucharest)* 2006; **2**: 11-18.
27. Huang TS, Yang RS, Tsai TW, Liu SH. Growth hormone cannot enhance the recovery of dexamethasone-induced osteopenia after withdrawal in young female Wistar rats. *Tohoku J Exp Med* 2004; **204**:257-266.
28. Dalle Carbonare L, Bertoldo F, Valenti MT, Zenari S, Zanatta M, Sella S, et al. Histomorphometric analysis of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Micron* 2005; **36**: 645-652.
29. Piai CR, Carvalho VAP, Werkman C, Anbinder AL, Rocha RF. Efeitos do risedronato na reparação óssea de ratos machos e fêmeas com osteopenia. *Cienc Odontol Bras* 2005; **8**: 77-82.
30. Pinto AS, Oliveira TT, Del Carlo RJ, Nagem TJ, Fonseca CC, Moraes GHK, et al. Efeitos de tratamento combinado de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona na

- osteoporose induzida com dexametasona em ratas. *Rev Bras Cienc Farmaceuticas/Braz J Pharm Sci* 2006; **42**: 99-107.
31. Petrikowski CG, Overton TR. Quantitative radiographic changes in the mandible, femur and vertebra in lactating rats fed a low-calcium diet. *Dentomaxillofac Radiol* 1996; **25**: 136-145.
32. Glatt M. The bisphosphonate zoledronate prevents vertebral bone loss in mature estrogen-deficient rats as assessed by micro-computed tomography. *Eur Cell Mat* 2001; **10**: 18-26.
33. Rahnama M. Experimental investigations on bone density of the mandible and spine in ovariectomized rats. *Bull Vet Inst Pulawy* 2003; **47**: 225-230.
34. Kamitani Y, Maki K, Tofani I, Nishikawa Y, Tsukamoto K, Kimura M. Effects of grape seed proanthocyanidins extract on mandibles in developing rats. *Oral Dis* 2004; **10**: 27-31.
35. Cho MH, Chun IK, Lee SC, Cho MH, Lee SY. Trabecular thickness measurement in cancellous bones: postmortem rat studies with the zoom-in micro-tomography technique. *Physiol Meas* 2005; **26**: 667-676.
36. World Health Organization. *Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: report of a WHO Study Group*. Geneva: World Health Organization, 1994.
37. Moriya Y, Ito K, Murai S. Effects of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. *J Oral Sci* 1998; **40**: 171-175.
38. Maki K, Nishida I, Kimura M. The effects of oral ipriflavone on the rat mandible during growth. *Eur J Orthod* 2005; **27**: 27-31.
39. Bittar-Cortez JA, Passeri LA, Boscolo FN, Haiter-Neto F. Comparison of hard tissue density changes around implants assessed in digitized conventional radiographs and subtraction images. *Clin Oral Implants Res* 2006; **17**: 560-564.
40. Sakakura CE, Marcantonio E Jr, Wenzel A, Scaf G. Influence of cyclosporin A on quality of bone around integrated dental implants: a radiographic study in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2007; **18**: 34-39.

41. Southard TE, Wunderle DM, Southard KA, Jakobsen JR. Geometric and densitometric standardization of intraoral radiography through use of a modified XCP system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; **87**: 253-257.
42. Dotto GN. *Registro de radiografias periapicais para a técnica de subtração* [doctoral dissertation]. São José dos Campos, Brazil: Universidade Estadual Paulista Tese de Doutorado, Faculdade de Odontologia, 2005.
43. Güneri P, Goğü S, Tuğsel Z, Ozturk A, Gungor C, Boyacıoğlu H. Clinical efficacy of a new software developed for dental digital subtraction radiography. *Dentomaxillofac Radiol* 2006; **35**: 417-421.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

---



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A possível relação entre perda óssea dos maxilares e a osteoporose tem sido estudada desde 1960, devido à importância da integridade óssea para o sucesso de inúmeros tratamentos odontológicos. Vários métodos para verificar alteração da arquitetura do trabeculado ósseo em modelos animais vêm sendo propostos no sentido de buscar uma correspondência entre estes fatores, podendo-se destacar a microdensitometria e a microtomografia.

Contudo, a utilização desses métodos, apesar de eficazes, implica em instalações especiais para uso em animais e alto custo operacional, permitindo apenas estudos de corte, determinando que muitos estudos em ratos realizados em nosso meio não obtenham medidas longitudinais e avaliação da densidade óssea.

Mudanças radiográficas encontradas na morfologia da mandíbula em radiografias convencionais poderiam ser sinais indicativos de osteoporose, visto que este seria um método de fácil acesso e baixo custo. Mas poucos são os estudos publicados na literatura que relatam tentativas de padronização geométrica na obtenção de radiografias da mandíbula de roedores vivos.

Para a reprodutibilidade das tomadas radiográficas de um mesmo animal há necessidade de padronização geométrica na obtenção de radiografias, por meio de dispositivos que facilitem esta tomada radiográfica em roedores vivos e permita a padronização para estudos longitudinais. Contudo, os dispositivos posicionadores mencionados nos estudos apresentados não são de fácil acesso para aquisição.

As variações geométricas e de densidade no filme radiográfico resultantes das condições de exposição e de processamento devem ser minimizadas para que se possa obter uma análise quantitativa de mudanças ósseas longitudinais em tecidos mineralizados.

Pequenas mudanças na densidade do osso alveolar tiveram sua visualização facilitada pela subtração digital de radiografias padronizadas, quando comparadas às interpretações subjetivas da radiografia convencional. Quantificar essas alterações pela técnica de subtração radiográfica poderia trazer novas perspectivas na pesquisa relacionada à osteoporose.

Com esta finalidade foi realizado o presente estudo, em três etapas. O dispositivo posicionador foi inicialmente testado e ajustado, em estudo *in vitro*. Em uma segunda etapa, foram determinados os fatores ideais de exposição. Finalmente, o estudo foi repetido em ratos vivos, induzindo perda óssea, recuperando-a e então verificando se estas modificações podem ser detectadas por meio da subtração radiográfica digital de radiografias laterais da mandíbula de ratas.

Destes três estudos pode-se concluir que:

- O dispositivo posicionador foi capaz de padronizar as tomadas radiográficas possibilitando detectar pequena perda óssea na imagem de subtração;
- Imagens de excelente qualidade foram obtidas com 50 kV e 8 mA, e filmes periapicais de sensibilidade D ou E, desde que o tempo de exposição seja adequado aos demais fatores; e
- A administração de metilprednisolona foi capaz de induzir osteoporose em mandíbulas de ratas, a massa óssea foi recuperada pela administração de risedronato sódico e estas alterações foram detectadas por meio da subtração radiográfica digital.

Desta forma, disponibiliza-se à comunidade científica uma metodologia para avaliar a densidade óptica da mandíbula de ratas, empregando a técnica de subtração digital, que pode ser utilizada em estudos longitudinais com ratos vivos.



## 8 BIBLIOGRAFIA

- ADA Council on Scientific Affairs. Dental Management of Patients Receiving Oral Bisphosphonate Therapy. Expert panel recommendations. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 137, n. 8, p. 1144-1150, Aug. 2006.
- AERSSSENS, J. *et al.* Interspecies Differences in Bone Composition, Density, and Quality: Potential Implications for In Vivo Bone Research. **Endocrinology**, Springfield, v. 139, n. 2, p. 663-670, Feb. 1998.
- ÅKESSON, K. New Approaches to Pharmacological Treatment of Osteoporosis. **Bull. World Health Organ.**, Geneva, v. 81, n. 9, p. 657-664, 2003.
- AMADEI, S. U. et al A Influência da Deficiência Estrogênica no Processo de Remodelação e Reparação Óssea. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1, p. 5-12, fev. 2006.
- AMORIM, M. A. et al. Comparative Study of Axial and Femoral Bone Mineral Density and Parameters of Mandibular Bone Quality in Patients Receiving Dental Implants. **Osteoporos. Int.**, London, v. 18, n. 5, p. 703-709, May 2007.
- ANBINDER, A. L. et al. The Influence of Ovariectomy, Simvastatin and Sodium Alendronate on Alveolar Bone in Rats. **Braz. Oral Res.**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 247-252, 2007.
- AOKI, A. et al. The Effects of Mis-radiation of the Er:YAG Laser on Soft and Bone Tissues. In: Congress of the International Society for lasers in dentistry, 5, 1996, Jerusalem. **Proceedings...** Jerusalem, 1996. p. 27-32.
- ARDAKANI, F. E.; NIAFAR, N. Evaluation of Changes in the Mandibular Angular Cortex Using Panoramic Images. **J. Contemp. Dent. Pract.**, Cincinnati, v. 5, n. 3, p. 1-15, Aug. 2004.
- ARIAS, M. V. B.; SZEJNFELD, V. L. Modelos Animais de Osteoporose. **Rev. Bras. Reumatol.**, Campinas, v. 37, n. 6, p. 335-338, nov./dez. 1997.
- ARIFIN, A. Z. et al. Computer-aided System for Measuring the Mandibular Cortical Width on Dental Panoramic Radiographs in Identifying Postmenopausal Women with Low Bone Mineral Density. **Osteoporos. Int.**, London, v. 17, n. 5, p. 753-759, March 2006.
- BALCIKONYTE, E.; BALCIUNIENE, I.; ALEKNA, V. Panoramic Radiographs in Assessment of the Bone Mineral Density. **Stomatologija**, Kaunas, v. 6, n. 1, p. 17-19, 2004.
- BARLET, J. P. et al.. Modèles Animaux d' Ostéoporose Post-ménopausique. **Reprod. Nutr. Dev.**, Paris, v. 34, n. 3, p. 221-236, 1994.
- BAXTER, J. C.; FATTORE, L. Osteoporosis and Osseointegration of Implants. **J. Prosthodont.**, Copenhagen, v. 2, n. 2, p. 120-125, June 1993.
- BENSON, B. W.; PRIHODA, T. J.; GLASS, B. J. Variations in Adult Cortical Bone Mass as Measured by a Panoramic Index. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 71, n. 3, p. 349-356, March 1991.
- BIRKENFELD, L. et al. Menopause-related Oral Alveolar Bone Resorption: a Review of Relatively Unexplored Consequences of Estrogen Deficiency. **Menopause**, New York, v. 6, n. 2, p. 129-133, Summer 1999.
- BOLING, E. P. Secondary Osteoporosis: Underlying Disease and the Risk for Glucocorticoid-induced Osteoporosis. **Clin. Ther.**, Princeton, v. 26, n. 1, p.1-14, Jan. 2004.
- BORBA, V. Z. C.; LAZARETTI-CASTRO, M. Osteoporose Induzida por Glicocorticóide. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 43, n. 6, p. 452-456, dez. 1999.
- BRAS, J. et al. Radiographic Interpretation of the Mandibular Angular Cortex: A diagnostic Tool in Metabolic Bone Loss. Part I: Normal State. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 53, n. 5, p. 541-545, May 1982.

- BRESIN, A.; KILIARIDIS, S.; STRID, K. G. Effect of Masticatory Function on the Internal Bone Structure in the Mandible of the Growing Rat. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v. 107, n. 1, p. 35-44, Feb 1999.
- BROOKS J. K. et al. Osteonecrosis of the Jaws Associated with use of Risedronate: Report of 2 new Cases. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 103, n. 6, p. 780-786, June 2007.
- CANALIS, E. Mechanisms of Glucocorticoid Action in Bone. **Curr. Osteoporos. Rep.**, Philadelphia, v. 3, n. 3, p. 98-102, Sep 2005.
- CANALIS, E.; DELANY, A. M. Mechanisms of Glucocorticoid Action in Bone. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 966, p. 73-81, June 2002.
- CANALIS, E.; GIUSTINA, A. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Summary of a Workshop. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Springfield, v. 86, n. 12, p. 5681-5685, Dec 2001.
- DALLE CARBONARE, L. et al. Comparison of Trabecular Bone Microarchitecture and Remodeling in Glucocorticoid-induced and Postmenopausal Osteoporosis. **J. Bone Miner. Res.**, Washington, v. 16, n. 1, p. 97-103, Jan 2001.
- DALLE CARBONARE, L. et al. Histomorphometric Analysis of Glucocorticoid-induced Osteoporosis. **Micron**, Oxford, v. 36, n. 7-8, p. 645-652, Sept 2005.
- CARNEIRO, E. et al. Bisphosphonate-Associated Mandibular Osteonecrosis. **Am. J. Neuroradiol.**, Baltimore, v. 27, n. 5, p.1096-1097, May 2006.
- CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE. Diagnosis, Prophylaxis and Treatment of Osteoporosis. **Am. J. Med.**, New York, v. 94, n. 6, p. 646-650, June 1993.
- COOPER, M. S. Sensitivity of Bone to Glucocorticoids. **Clin. Sci.**, London, v. 107, n. 2, p. 111-123, Aug 2004.
- CURTIS, J. R.; SAAG, K. G. Prevention and Treatment of Glucocorticoid-induced Osteoporosis. **Curr. Osteoporos. Rep.**, Philadelphia, v. 5, n. 1, p. 14-21, Mar 2007.
- DEVLIN, H. et al. Diagnosing Osteoporosis by Using Dental Panoramic Radiographs: The OSTEODENT Project. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, Apr 2007 doi:10.1016/j.tripleo.2006.12.027
- DEVOGELAER, J-P. et al. Evidence-based Guidelines for the Prevention and Treatment of Glucocorticoid-induced Osteoporosis: a Consensus Document of the Belgian Bone Club. **Osteoporos. Int.**, London, v. 17, n. 1, p. 8-19, Jan 2006.
- DERVIS, E. Oral Implications of Osteoporosis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St Louis, v. 100, n. 3, p. 349-356, Sep. 2005.
- DOWNEY, P. A.; SIEGEL, M. I. Bone Biology and the Clinical Implications for Osteoporosis. Physical Therapy. **Phys. Ther.**, Albany, v. 86, n. 1, p. 77-91, Jan 2006.
- EL MONTASER, M. A. et al. Pattern of Healing of Calvarial Bone in the Rat Following Application of the Erbium-YAG Laser. **Lasers Surg. Med.**, New York, v. 21, n. 3, p. 255-261, 1997.
- ELSUBEIHI, E. S.; HEERSCHKE, J. N. Quantitative Assessment of Post-Extraction Healing and Alveolar Ridge Remodelling of the Mandible in Female Rats. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 49, n. 5, p. 401-412, May 2004.
- ESTEFANÍA-FRESCO, R.; PONTE-FERNÁNDEZ, N.; AGUIRRE-URIZAR, J. M. Bisphosphonates and Oral Pathology II. Osteonecrosis of the Jaws: Review of the Literature Before 2005. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, Valencia, v. 11, n. 6, p. E456-461, Nov 2006.

FDA. **Guidelines for Preclinical and Clinical Evaluation of Agents Used in the Treatment or Prevention of Postmenopausal Osteoporosis.** 1994. Disponível em: <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/osteo.pdf> Acesso em: 23/05/2007

GAEGAUF-ZOLLINGER, R.; BURCKHARDT, J. J.; GUGGENHEIM, B. Radiographic Measurements of Alveolar Bone Loss in the Rat. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 27, n. 8, p. 651-658, 1982.

GAIO, E. J. et al. Análise Comparativa da Altura Óssea Histométrica e Morfométrica na Periodontite Induzida em Ratos. **Braz. Oral Res.**, v. 18 Suppl, p. 65, 2004.

GALI, J. C. Osteoporose. **Acta Ortop. Bras.**, São Paulo, v. 9, n. 2, p. 53-62, abr./jun. 2001.

GARTON, M. J. Treatment of Osteoporosis with Bisphosphonates. **C. P. D. Rheumatol.**, v. 2, p. 64-70, 2001.

GERAETS, W. G. et al. Prediction of Bone Mineral Density with Dental Radiography. **Bone**, Elmsford, v. 40, n. 5, p. 1217-1221, May 2007.

GORUSTOVICH, A. A. et al. Mandibular Bone Remodeling Under a Choline-Deficient Diet: a Histomorphometric Study in Rats. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 74, n. 6, p. 831-837, June 2003.

GOURLAY, M.; FRANCESCHINI, N.; SHEYN, Y. Prevention and Treatment Strategies for Glucocorticoid-induced Osteoporotic Fractures. **Clin. Rheumatol.**, Brussels, v. 26, n. 2, p. 144-153, Feb 2007.

GREGÓRIO, L. H et al. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, São Paulo, v. 50, n. 4, p. 793-801, Aug. 2006.

GRYNPAS, M. D. The concept of Bone Quality in Osteoporosis. In: ZARB, G. et al. **Ageing, Osteoporosis and Dental Implants.** London: Quintessence Books: 2002. p. 25-34.

GUTTA, R.; LOUIS, P. J. Bisphosphonates and Osteonecrosis of the jaws: Science and Rationale. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 104, n.2, p. 186-193, Aug 2007.

HEANEY, R. P. Advances in Therapy for Osteoporosis. **Clin. Med. Res.**, New York, v. 1, n. 2, p. 93-99, Apr 2003.

HEANEY, R. P. Calcium Intake and Disease Prevention. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 4, p. 685-693, Aug 2006.

HIDAKA, S. et al. Evaluation of a Soybean Product Fujiflavone P40 as an Antiosteoporotic Agent in Rats. **Phytother. Res.**, London, v. 17, n. 2, p. 112-119, Feb 2003..

HOSKING, D. J.; GEUSENS, P.; PRIZZOLI, R. Osteoporosis Therapy: an Example of Putting Evidence-based Medicine into Clinical Practice. **Q. J. M.**, Oxford, v. 98, p. 403-413, 2005.

HORNER, K.; DEVLIN, H.; HARVEY, L. Detecting Patients with Low Bone Mass. **J. Dent.**, Alexandria, v. 30, n. 4, p. 71-75, May 2002.

HORNER, K. et al. The Mandibular Cortex on Radiographs as a Tool for Osteoporosis Risk Assessment: the OSTEODENT Project. **J. Clin. Densitom.**, Totowa, v. 10, n. 2, p. 138-146, Apr-Jun 2007.

HUANG, T-S. et al. Growth Hormone Cannot Enhance the Recovery of Dexamethasone-induced Osteopenia after Withdrawal in Young Female Wistar Rats. **Tohoku J. Exp. Med.**, Sendai, v. 204, n. 4, p. 257-266, dec 2004.

HWANG, D.; WANG, H. L. Medical Contraindications to Implant Therapy: Part II: Relative Contraindications. **Implant. Dent.**, Baltimore, v. 16, n. 1, p. 13-23, Mar 2007.

IBGE. Pesquisa Nacional Por Amostra de Domicílios. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad98/saude/metodologia.shtm> Acesso em: 16 nov. 2006

- IBÁÑEZ, R. Técnicas de Medida de Densidad de Masa Ósea. **An. Sist. Sanit. Navar.**, Pamplona, v. 26, Supl. 3, p. 19-27 2003.
- INAGAKI, K. et al. Oral Osteoporosis: a Review and its Dental Implications. **Clin. Calcium.**, Osaka, v. 17, n. 2, p. 157-163, Feb 2007.
- ISHII, K. et al. Diagnostic Efficacy of Alveolar Bone Loss of the Mandible for Identifying Postmenopausal Women with Femoral Osteoporosis. **Dentomaxillofac. Radiol.**, Tokyo, v. 36, n. 1, p. 28-33, Jan 2007.
- IWASA, Y. et al. The Effect of High Salt Intake on the Mandibular Bone Loss in Dahl-Iwai Salt-Sensitive Rat. **J. Med. Dent. Sci.**, v. 47, n. 3, p. 187-195, Sep 2000.
- JEFFCOAT, M. K. Osteoporosis: a Possible Modifying Factor in Oral Bone Loss. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v. 3, n. 1, p. 312-321, July 1998.
- JEFFCOAT, M. K. The Association between Osteoporosis and Oral Bone Loss. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 76, n. 11 Suppl, p. 2125-2132, Nov 2005.
- JEFFCOAT, M. K. et al. Post-menopausal Bone Loss and its Relationship to Oral Bone Loss. **Periodontol.** 2000, v. 23, p. 94-102, June 2000
- JEFFCOAT, M. K.; REDDY, M. S. Digital Subtraction Radiography for Longitudinal Assessment of Peri-implant Bone Change: Method and Validation. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v. 7, n. 2, p. 196-201, Aug 1993.
- JIANG, G.; MATSUMOTO, H.; FUJII, A. Mandible Bone Loss in Osteoporosis Rats. **J. Bone Miner. Metab.**, Tokyo, v. 21, n. 6, p. 388-395, 2003.
- JIANG, G. et al. Prevention of Trabecular Bone Loss in the Mandible of Ovariectomized Rats. **J. Oral Sci.**, Tokyo, v. 46, n. 2, p. 75-85, June 2004.
- KANIS, J. A. et al. Glucocorticoid-induced Osteoporosis: a Systematic Review and Cost-utility Analysis. **Health Technol. Assess.**, Winchester, v. 11, n. 7, p. 1-231, Mar 2007.
- KARAYIANNI, K. et al. Accuracy in Osteoporosis Diagnosis of a Combination of Mandibular Cortical width Measurement on Dental Panoramic Radiographs and a Clinical Risk Index (OSIRIS): the OSTEODENT project. **Bone**, Elmsford, v. 40, n. 1, p. 223-229, Jan 2007.
- KASHIMA, I. Computed Radiography with Photostimulable Phosphor in Oral and Maxillofacial Radiology. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St Louis, v. 80, n. 5, p. 577-598, Nov. 1995.
- KAYE, E. K. Bone Health and Oral Health. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 138, n. 5, p. 616-619, May 2007.
- KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular – Uma Introdução a Patologia**. Rio de Janeiro : Elsevier, 2004, 654 p.
- KLAUSEN, B., EVANS, R.T., SFINTESCU, C. Two Complementary Methods of Assessing Periodontal Bone Level in Rats. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 97, n. 6, p. 494-499, Dec. 1989.
- KLEIN, C. G. **Avaliação da Arquitetura Óssea Trabecular por meio de Processamento de Imagem Digital em Radiografias Panorâmicas**. Dissertação (Mestrado em Ciências - área de Concentração: Engenharia Biomédica) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2005. 87 f.
- KLEMETTI, E.; VAINIO, P.; LASSILA, V. Mineral Density in the Mandibles of Partially and Totally Edentate Postmenopausal Women. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 102, n. 1, p. 64-67, Feb 1994.

- KLEMETTI, E.; KOLMAKOW, S. Morphology of the Mandibular Cortex on Panoramic Radiographs as an Indicator of Bone Quality. **Dentomaxillofac. Radiol.**, Tokyo, 1997; 26: 22-25.
- KNEZOVIC-ZLATARIĆ, D. et al. Assessment Tools in Early Detection of Osteoporosis in Dentistry. **Arh Hig Rada Toksikol.**, Zagreb, v. 58, n. 1, p. 33-39, Mar 2007.
- KRALL, E. A. et al. Calcium and Vitamin D Supplements Reduce Tooth Loss in the Elderly. **Am. J. Med.**, New York, v. 111, n. 6, p. 452-456, Oct 2001.
- KRIBS, P. J.; SMITH, D.; CHESNUT, C. H. Oral Findings in Osteoporosis. Part II: Relationship between Residual Ridge and Alveolar Bone Resorption and Generalized Skeletal Osteopenia. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 50, n. 5, p. 719-724, Nov. 1983.
- KURODA, S. et al. Bone Mineral Density of the Mandible in Ovariectomized Rats: Analysis Using Dual Energy X-ray Absorptiometry and Peripheral Quantitative Computed Tomography. **Oral. Dis.**, Copenhagen, v. 9, n. 1, p. 24-28, Jan 2003.
- LANE, J. M. Diagnosis and Management of Orthopaedic Problems Commonly Found in Women: Osteoporosis. In: American Academy of orthopaedic Surgeons 65TH Annual Meeting, 1998, New Orleans. **Proceedings...**, Chicago: AAOS Press, 1998.
- LANE, N. E. Epidemiology, Etiology, and Diagnosis of Osteoporosis. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v. 194, n. 2 Suppl, p. S3-11, Feb. 2006
- LAW, A. N.; BOLLEN, A. M.; CHEN, S. K. Detecting Osteoporosis Using Dental Radiographs: a Comparison of Four Methods. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 127, n. 12, p. 1734-1742, Dec 1996.
- LEE, B. D.; WHITE, S. C. Age and Trabecular Features of Alveolar Bone Associated with Osteoporosis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St Louis, v. 100, n. 1, p. 92-98, Jul 2005.
- LEDGERTON, D. et al. Panoramic Mandibular Index as a Radiomorphometric Tool: an Assessment of Precision. **Dentomaxillofac. Radiol.**, Tokyo, v. 26, n. 2, p. 95-100, Mar 1997.
- LEDGERTON, D. et al. Radiomorphometric Indices of the Mandible in a British Female Population. **Dentomaxillofac. Radiol.**, Tokyo, v. 28, n. 3, p. 173-181, May 1999.
- LEROUXEL, E. et al. Mandibular Bone Loss an Animal Model of Male Osteoporosis (orchidectomized rat): a Radiographic and Densitometric Study. **Osteoporos. Int.**, London, v. 15, n. 10, p. 814-819, Oct 2004.
- LEWIECKI, E. M.; BORGES, J. L. C. Bone Density Testing in Clinical Practice. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, Rio de Janeiro, v. 50, n. 4, p. 586-595, Aug 2006.
- LICKS, R. **Radiografia Periapical como Ferramenta de Predição para Baixa Massa Óssea.** Dissertação (Mestrado em Odontologia - área de concentração em Clínica Odontológica/ Radiologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. 64f.
- LUIZE, D. S. et al. A influência da Osteoporose na Implantodontia. **Arq. Odontol.**, Belo Horizonte, v. 41, n. 2, p. 139-154, abr./jun. 2005.
- MAGREMANNE, M. et al. Bisphosphonates and Maxillo-mandibular Osteo(chemo)necrosis. **Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.**, Paris, v. 107, n. 6, p. 423-428, Dec 2006.
- MARDAS, N. et al. Osteogenesis by Guided Tissue Regeneration and Demineralized Bone Matrix. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 30, n. 3, p. 176-183, Mar 2003.
- MARQUES NETO, J. F. Vitamina D e metabólitos ativos. In: SZEJNFELD, V.L. **Osteoporose Diagnóstico e Tratamento.** São Paulo: Sarvier, 2000. p.321-336.



- MARX, R. E. et al. Bisphosphonate-Induced Exposed Bone (Osteonecrosis/Osteopetrosis) of the Jaws: Risk Factors, Recognition, Prevention, and Treatment. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 63, n. 11, p. 567-1575, Nov 2005.
- MATANI, A.; OKAMOTO, T.; CHIHARA, A. Evaluation of a Trabecular Structure using a Multiresolution Analysis. **Proceedings of the 20<sup>th</sup> Annual International Conference of the IEEE**, v. 20, n. 2, p. 632-633, 1998.
- MATTSON, J. S.; CERUTIS, D. R.; PARRISH, L. C. Osteoporosis: a Review and its Dental Implications. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, Lawrenceville, v. 23, n. 11, p. 1001-1008, Nov 2002.
- MAZZIOTTI, G. et al. Glucocorticoid-induced Osteoporosis: an Update. **Trends Endocrinol. Metab.**, New York, v. 17, n. 4, p. 144-149, May/June 2006.
- MCCLUNG, M.; GEUSENS, P. Review of Risedronate in the Treatment of Osteoporosis. **Expert Opin. Pharmacother.**, London, v. 2, n. 12, p. 2011-2025, Dec 2001.
- MEIRELLES, E. S. Diagnóstico por Imagem na Osteoporose. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 423-427, dez. 1999.
- MENDOZA, M. T. H. Clasificación de la Osteoporosis. Factores de Riesgo. Clínica y Diagnóstico Diferencial. **An. Sist. Sanit. Navar.**, Pamplona, v. 26, Supl. 3, p. 29-52, 2003.
- MOHAJERY, M.; BROOKS, S. L. Oral Radiographs in the Detection of early Signs of Osteoporosis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St Louis, v. 73, n. 1, p. 112-7, Jan. 1992.
- MORITZ, E. S. **Relação da Osteoporose com a Perda Dentária e o Impacto do Perfil Dentário na Qualidade de Vida**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção - área de Concentração Ergonomia) - Programa de Pós-graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001. 148 f.
- MORIYA, Y.; ITO, K.; MURAI, S. Effects of Experimental Osteoporosis on Alveolar Bone Loss in Rats. **J. Oral Sci.**, Tokyo, v. 40, n. 4, p. 171-175, Dec 1998.
- MÜLLER, R. et al. Morphometric Analysis of Human Bone Biopsies: a Quantitative Structural Comparison of Histological Sections and Micro-computed Tomography. **Bone**, Elmsford, v. 23, n. 1, p. 59-66, July 1998.
- MULLIGAN, R.; SOBEL, S. Osteoporosis: Diagnostic Testing, Interpretation, and Correlations with Oral Health--Implications for Dentistry. **Dent. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 49, n. 2, p. 463-484, Apr 2005.
- NACKAERTS, O. et al. Accuracy and Precision of a Densitometric Tool for Jaw Bone. **Dentomaxillofac. Radiol.**, Tokyo, v. 35, n. 4, p. 244-248, July 2006.
- NAKANO, H. et al. Micro X-Ray Computed Tomography Analysis for the Evaluation of Asymmetrical Condylar Growth in the Rat. **Orthod. Craniofac. Res.**, Oxford, v. 6, Suppl 1, p.168-172, 2003.
- NISHIMURA, I.; DAMIANI, P. J.; ATWOOD, D. A. Resorption of Residual Ridges in Rats. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 66, n. 12, p. 1753-1757, Dec 1987.
- NORDSTRÖM, A. **Bone Mass and Physical Activity**. PhD Thesis (Geriatric Medicine) - Umea University, 2004. 50 p.
- PARISI JR, P. D.; CHAHADE, W. H. Fatores de Risco Associados à Osteoporose em uma População de Mulheres Brasileiras Residentes em São José do Rio Pardo, Estado de São Paulo. **Rev. Bras. Reumatol.**, Campinas, v. 47, n. 1, p. 16-24, jan./fev. 2007.
- PETRIKOWSKI, C. G.; OVERTON, T. R. Quantitative Radiographic Changes in the Mandible, Femur and Vertebra in Lactating Rats Fed a Low-Calcium Diet. **Dentomaxillofac. Radiol.**, Tokyo, v. 25, n. 3, p.136-145, June 1996.

- PIAI, C. R. et al. Efeitos do Risedronato na Reparação Óssea de Ratos Machos e Fêmeas com Osteopenia. **Ciênc Odontol Bras.**, São José dos Campos, v. 8, n. 3, p. 77-82, jul./set. 2005.
- PINTO, A. S. et al. Efeitos de Tratamento Combinado de Alendronato de Sódio, Atorvastatina Cálcica e Ipriflavona na Osteoporose Induzida com Dexametasona em Ratas. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 99-107, jan./mar. 2006.
- PINTO, A. S. et al. Efeitos de Alendronato de Sódio, Atorvastatina Cálcica e Ipriflavona sobre a Osteoporose Induzida com Dexametasona em ratas. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, Araraquara, v. 26, p. 63-70, 2005.
- POLO, R. G. Osteoporosis Inducida por Glucocorticoides. **An. Sist. Sanit. Navar.**, Pamplona, v. 26, p. 63-80, 2003.
- PONTE-FERNÁNDEZ, N.; ESTEFANIA-FRESCO, R.; AGUIRRE-URIZAR, J. M. Bisphosphonates and Oral Pathology I. General and Preventive Aspects. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, Valencia, v. 11, n. 5, pE396-400, Aug 2006.
- RAHNAMA, M. Experimental Investigations on Bone Density of the Mandible and Spine in Ovariectomized Rats. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**, v. 47, p. 225-230, 2003.
- RAJESH, P. Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaws: Science and Rationale. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 104, n. 2, p. 186-193, Aug 2007.
- RAMALHO, A. C.; LAZARETTI-CASTRO, M. Fisiopatologia da Osteoporose Involutiva. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 409-414, dez. 1999.
- REDDY, M. S. Oral Osteoporosis: is there an Association between Periodontitis and Osteoporosis? **Compend. Contin. Educ. Dent.**, Lawrenceville, v. 23, n. 10 Suppl, p. 21-28, Oct 2002.
- REID, I. R. Glucocorticoid Osteoporosis – Mechanisms and Management. **Eur. J. Endocrinol.**, Oslo, v. 137, n. 3, p. 209–217, Sept 1997.
- RAYMOND, F.; CIMASONI, G. Radiographic Measurement of Alveolar Bone Loss in the Living Rat. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 68, n. 2, p. 141-144, Feb 1997.
- RINCHUSE, D. J. et al. Orthodontic Treatment of Patients Using Bisphosphonates: a Report of 2 Cases. **Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.**, St. Louis, v. 131, n. 3, p. 321-326, Mar 2007.
- SAKAKURA, Y. et al. Effects of Running Exercise on the Mandible and Tibia of Ovariectomized Rats. **J. Bone Miner. Metab.**, Tokyo, v. 19, n. 3, p. 159-167, 2001.
- SANTIAGO, R. C.; VITRAL, R. W. F. Métodos de Avaliação da Densidade Mineral Óssea e seu Emprego na Odontologia. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Integr.**, João Pessoa, v. 6, n. 3, p. 289-294, set./dez. 2006.
- SANFILIPPO, F.; BIANCHI, A. E. Osteoporosis: the Effect on Maxillary Bone Resorption and Therapeutic Possibilities by Means of Implant Prostheses-a Literature Review and Clinical Considerations. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, Chicago, v. 23, n. 5, p. 447-457, Oct 2003.
- SCHONFELD, M. I. Tratamiento no Hormonal de la Osteoporosis Posmenopáusica (parte II). **Rev. Arg. Osteol.**, Buenos Aires, v. 3, n. 1, p. 9-16, ene. 2004.
- SCHORTINGHUIS, J. et al. Microradiography to Evaluate Bone Growth into a Rat Mandibular Defect. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 48, n. 2, p.155-160, Feb 2003.
- SEGAWA, H. Fundamental Study of Alveolar Bone Measurements in the Hamster Using an Apparatus for Intraoral Radiography. **Ou. Daigaku Shigakushi**, Koryiama, v. 17, n. 2, p. 77-94, Jul 1990.

SEMENOFF SEGUNDO, A. **O Papel do Estresse Crônico na Etiopatogenia da Periodontite em Ratos**. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Curso de Odontologia, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2003. 98 f.

SEROTA, K. S.; JEFFCOAT, M. K.; KAPLAN, M. L. Intraoral Radiography of Molar Teeth in Rats. **Lab. Anim. Sci.**, Joliet, v. 31, n. 5, p. 507-509, Oct 1981.

SHIN, J. Y.; LIU, Z. J.; KING, G. J. Trabecular Organization in Mandibular Osteodistraction in Growing and Maturing Rats. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 63, n. 1, p. 77-86, Jan 2005.

SOUTHARD, K. A.; SOUTHARD, T. E. Detection of Simulated Osteoporosis in Dog Alveolar Bone with the Use of Digital Subtraction. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St Louis, v. 77, n. 4, p. 412-418, Apr 1994.

SOUTHARD, T. E. et al. Geometric and Densitometric Standardization of Intraoral Radiography through use of a Modified XCP System. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St Louis, v. 87, n. 2, p. 253-257, Feb. 1999.

SZEJNFELD, V. L. Remodelação Óssea. In: \_\_\_\_\_. **Osteoporose Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: Sarvier, 2000. p. 20-29.

TAGUCHI, A. et al. Tooth Loss and Mandibular Osteopenia. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St Louis, v. 79, n. 1, p. 127-132, Jan 1995.

TAGUCHI, A. 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.**, Tokyo, v. 25, n. 5, p. 263-267, Nov 1996.

TAGUCHI, A. et al. Validation of Dental Panoramic Radiography Measures for Identifying Postmenopausal Women with Spinal Osteoporosis. **Am. J. Roentgenol.**, Springfield, v. 183, n. 6, p. 1755-1760, Dec 2004 .

TAGUCHI, A. et al. Use of Dental Panoramic Radiographs in Identifying Younger Postmenopausal Women with Osteoporosis. **Osteoporos. Int.**, London, v. 17, n. 3, p. 387-394, 2006.

TAGUCHI, A. et al. Identification of Post-menopausal Women at Risk of Osteoporosis by Trained General Dental Practitioners using Panoramic Radiographs. **Dentomaxillofac. Radiol.**, Tokyo, v. 36, n. 3, p. 149-154, Mar 2007.

TAKAHASHI, K. et al. Effect of Incadronate on Corticosteroid-induced Osteopenia in Rats. **Yakugaku. Zasshi.**, v. 124, n. 9, p. 627-630, Sept 2004.

TANAKA, M. et al. Long-term Changes in Trabecular Structure of Aged Rat Alveolar Bone after Ovariectomy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St Louis, v. 95, n. 4, p. 495-502, Apr 2003.

TAVANO, O. et al. Estudo da Densidade Radiográfica Digital do Tecido Ósseo Face ao Implante do Polímero de Mamona em Coelhos. **Rev. FOB**, Bauru, v. 7, n. 3/4, p. 53-58, jul./dez. 1999..

THOMPSON, D. D. FDA Guidelines and Animal Models for Osteoporosis. **Bone**, Elmsford, v. 17, n. 4 Suppl, p. 125S-133S, Oct 1995.

THORNDIKE, E. A.; TURNER, A. S. In Search of an Animal Model for Postmenopausal Diseases. **Front. Biosci.**, v. 3, p. c17-26, Apr 1998.

TOLAZZI, A.L. **Osteoporose Relacionada com a Odontologia**. Dissertação (Mestrado em Odontologia/Diagnóstico Bucal) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001. 166 f.

TURNER, A. S. Animal Models of Osteoporosis – Necessity and Limitations. **Eur. Cell Mater.**, Gasgow, v. 1. p. 66-81, June 2001.

VON WOWER, N. General and Oral Aspects of Osteoporosis: a Review. **Clin. Oral Investig.**, Berlin, v. 5, n. 2, p. 71-82, Jun 2001.

WACTAWSKI-WENDE, J. Periodontal Diseases and Osteoporosis: Association and Mechanisms. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v. 6, n. 1, p. 197-208, Dec 2001.

WATANABE, P. C. A. et al. Inter-relação de dois Indicadores de Qualidade para Pesquisa de Osteoporose em Radiografias Panorâmicas de Mulheres Brasileiras. **R.B.E**, Curitiba, v. 1, n. 3, p. 120-126, 2004.

WHITE, S. et al. Clinical and Panoramic Predictors of Femur Bone Mineral Density. **Osteoporos. Int.**, London, v. 16, n. 3, p. 339-346, Mar 2005.

WOO S-B.; HELLSTEIN, J. W.; KALMAR, J. R. Narrative [Corrected] Review: Bisphosphonates and Osteonecrosis of the Jaws. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 144, n. 10, p. 753-761, May 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Assessment of Fracture Risk and its Application to Screening for Postmenopausal Osteoporosis: Report of a WHO Study Group**. Geneva: World Health Organization, 1994, 129p.

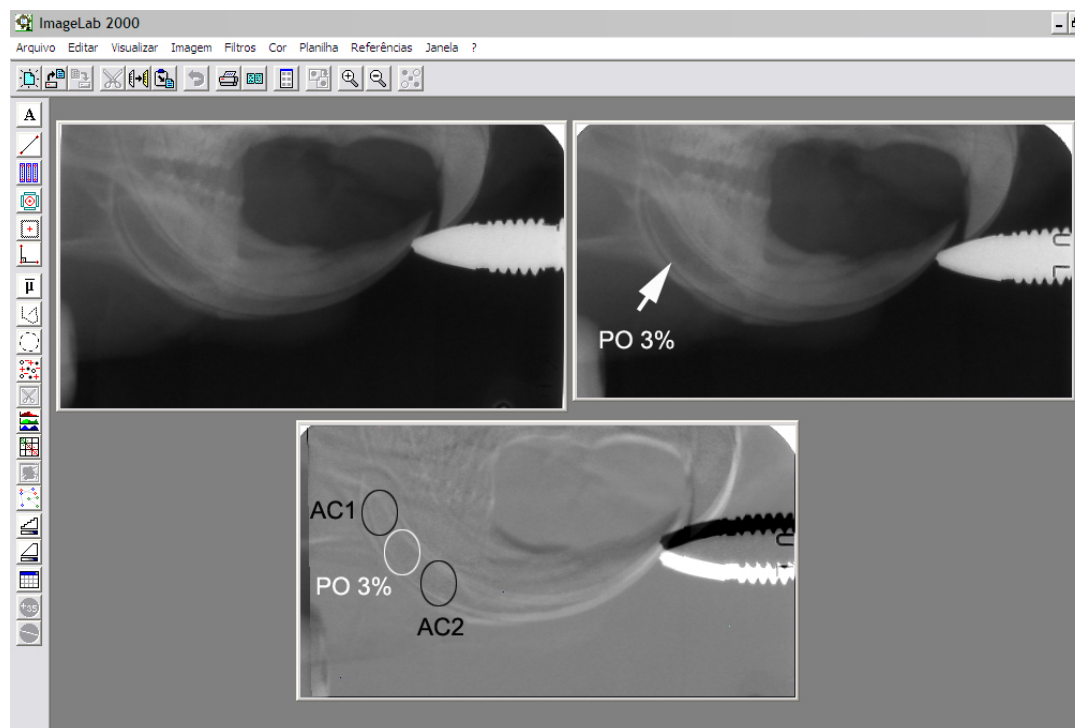
ZECCHIN, K. G. et al. Conventional X-ray Densitometry Detects Osteopenia in Ovariectomized Young Rats. Short communications. **Braz. J. Oral Sci.**, Piracicaba, v. 3, n. 8, p. 425-427, jan./mar. 2004.

YANG, J.; PHAM, S. M.; CRABBE, D. L. Effects of Oestrogen Deficiency on Rat Mandibular and Tibial Microarchitecture. **Dentomaxillofac. Radiol.**, Tokyo, v. 32, n. 4, p. 247-251, July 2003.

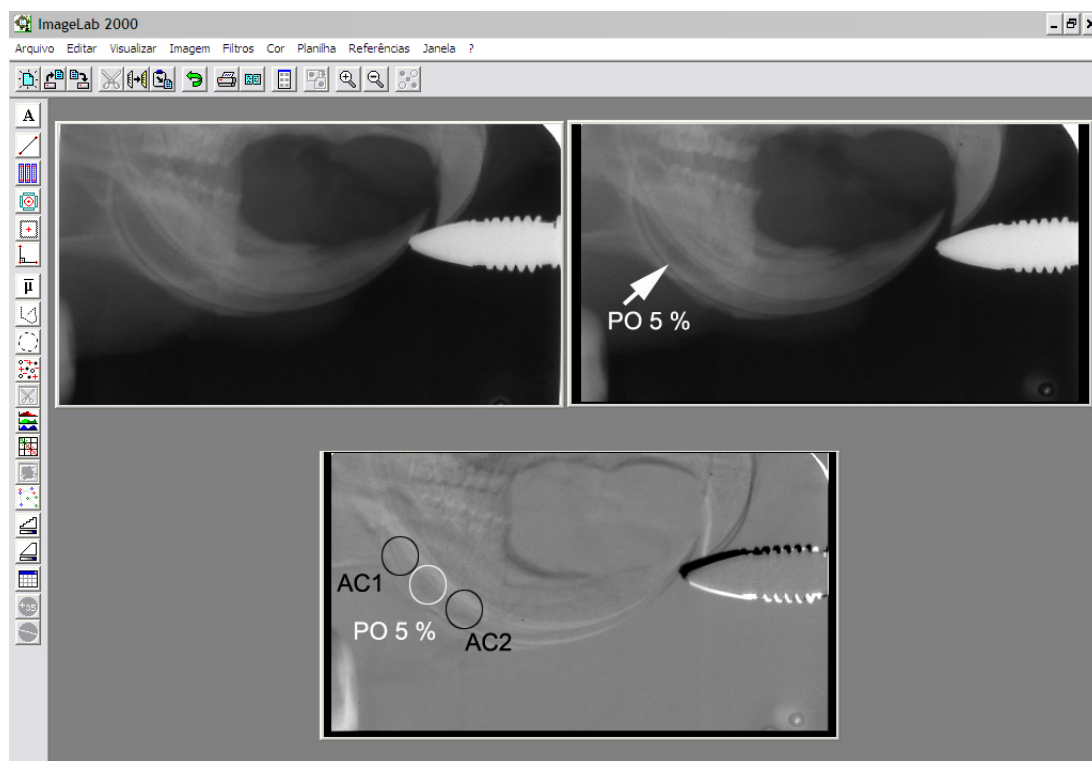
YINGJIE, H. et al. Changes of Microstructure and Mineralized Tissue in the Middle and Late Phase of Osteoporotic Fracture Healing in Rats. **Bone**, Elmsford, doi:10.1016/j.bone.2007.06.006.



## APÊNDICE 1: IMAGENS DO ARTIGO 1

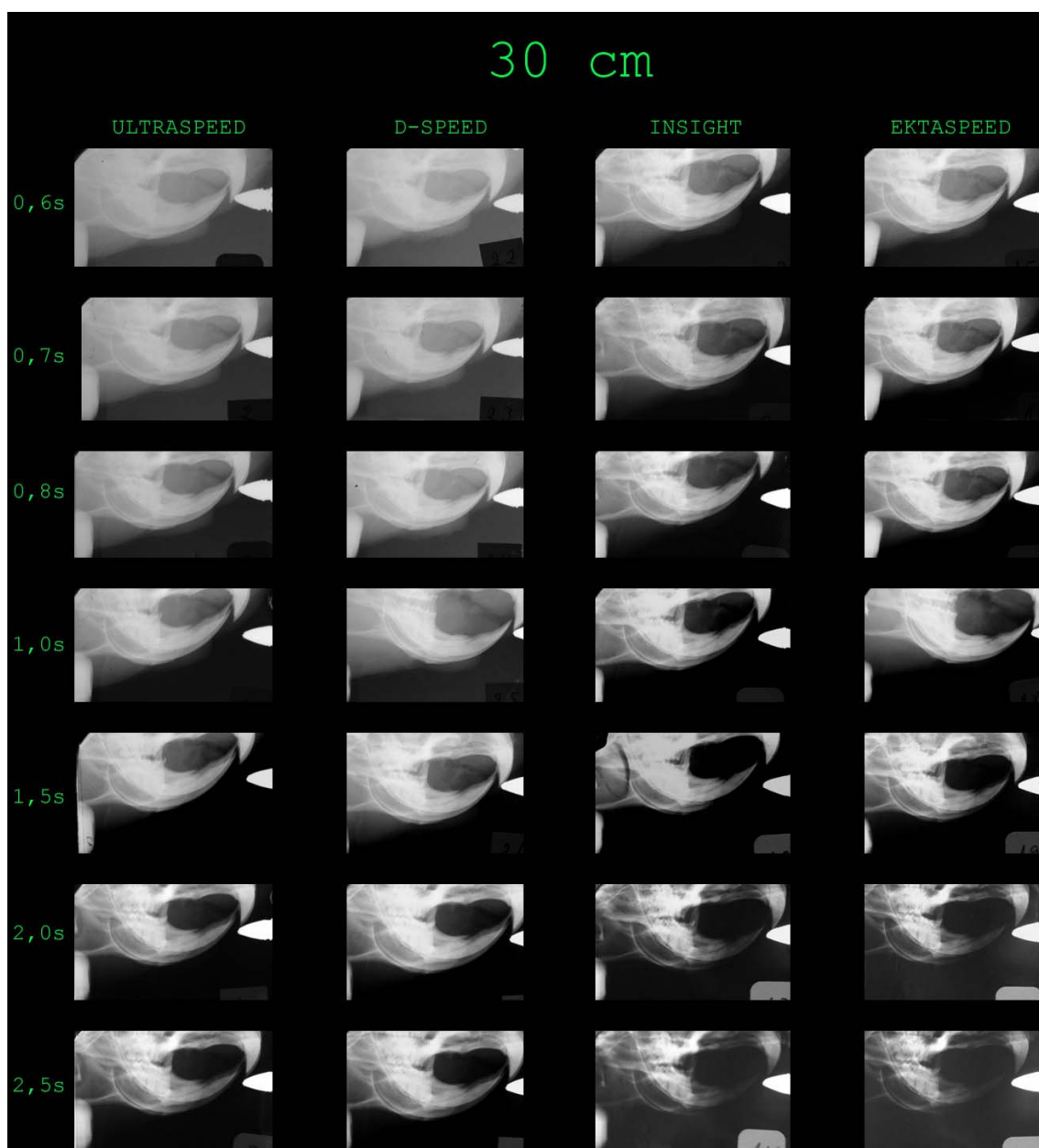


Par de radiografias e resultado da subtração em que foi simulada a perda óssea (PO) em 3%. AC: área controle

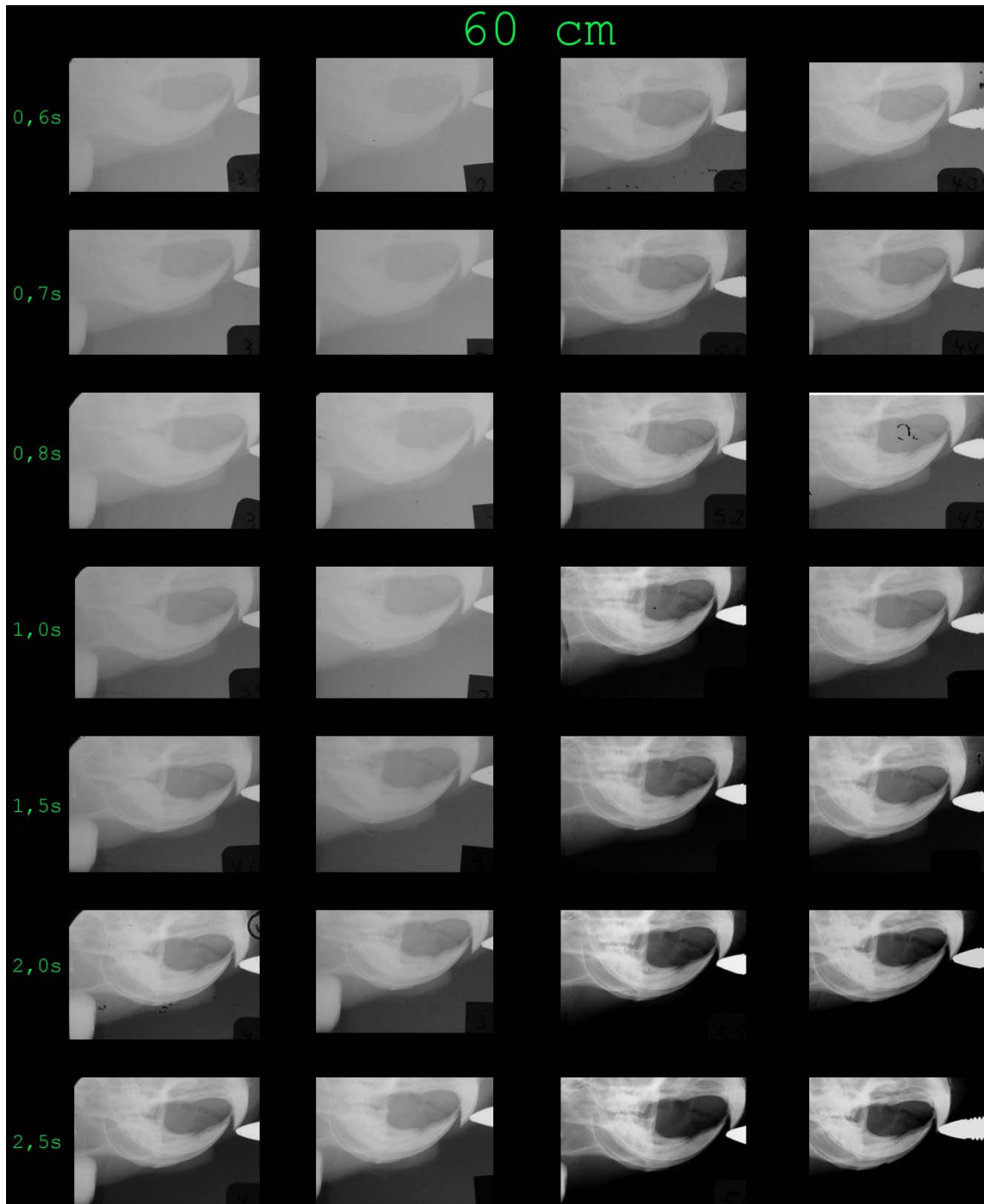


Par de radiografias e resultado da subtração em que foi simulada a perda óssea (PO) em 5%. AC: área controle

## APÊNDICE 2: IMAGENS DO ARTIGO 2



Radiografias de um dos ratos da amostra obtidas com diferentes filmes e tempos de exposição, na distância focal de 30 cm.



Radiografias de um dos ratos da amostra obtidas com diferentes filmes e tempos de exposição, na distância focal de 60 cm.



### APÊNDICE 3: DETALHAMENTO DA METODOLOGIA DO ARTIGO 3

#### *A - Subtração digital de imagens*

Devido ao tempo transcorrido entre as tomadas radiográficas, observou-se diferença no tamanho entre as imagens, pois houve crescimento dos animais. Desta forma, não foi possível sobrepor adequadamente as imagens na subtração (Figura 1).

Foi, então, necessário realizar o alinhamento geométrico das imagens, utilizando-se o programa Regeemy (Image Registration and Mosaicking – versão 0.2.43, Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, SP). As duas imagens a serem corrigidas foram exibidas lado a lado, sendo a imagem 1 sempre a do animal quando mais jovem e a 2 quando menos jovem (Figura 2).

A seguir foram marcados pontos correspondentes em ambas as imagens. Foram utilizados seis pares de pontos de referência, demarcando as dimensões da mandíbula (Figura 3). Somente a primeira imagem foi redimensionada, com base na marcação de pontos, de maneira a assemelhar-se em tamanho com a segunda e permitir a correta sobreposição do par de imagens na subtração.

Para a subtração de imagens foi utilizado o programa Adobe Photoshop CS (versão 8.0, Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EUA). O par de imagens a ser subtraído foi exibido no monitor. A imagem inicial foi colada sobre a final como uma camada, a qual foi submetida ao filtro de inversão e teve seus atributos de opacidade ajustados para 50% (Figura 4).

Por meio da função histograma do mesmo *software*, de cada imagem subtraída foram obtidos os valores médios e de desvio-padrão em duas áreas, uma sobre a mandíbula - na mesma região onde se realizou a avaliação histológica - e de uma área controle, ambas com área de 1020 *pixels* (Figura 5).

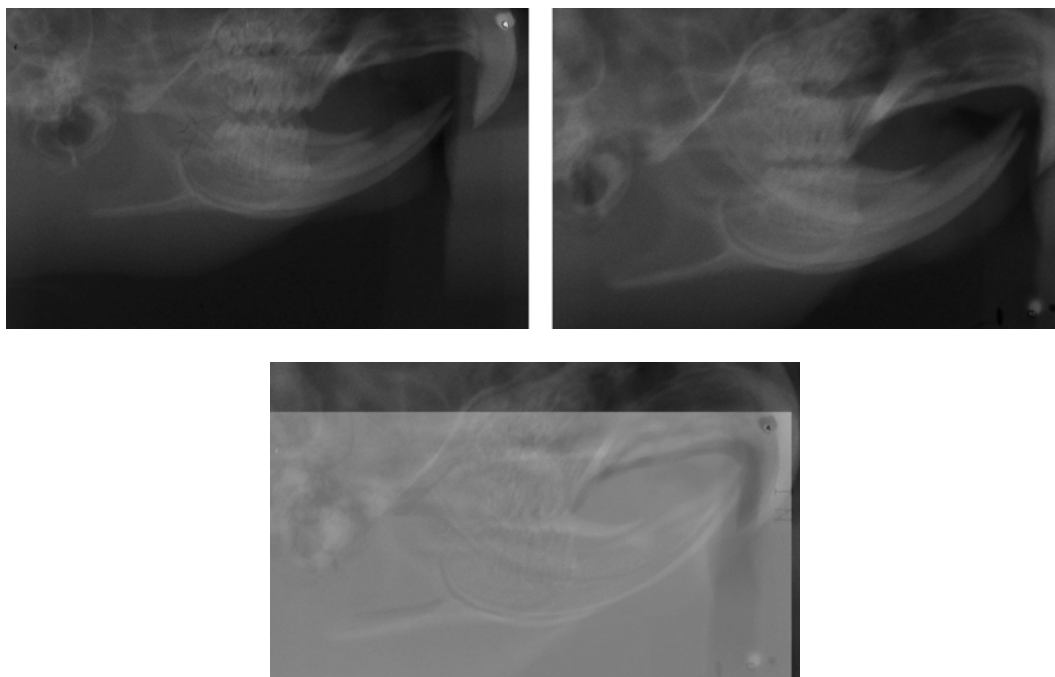


Figura 1 – Radiografias inicial e final de um dos animais do grupo controle e a respectiva subtração, onde se observa discrepância de tamanho entre as imagens.

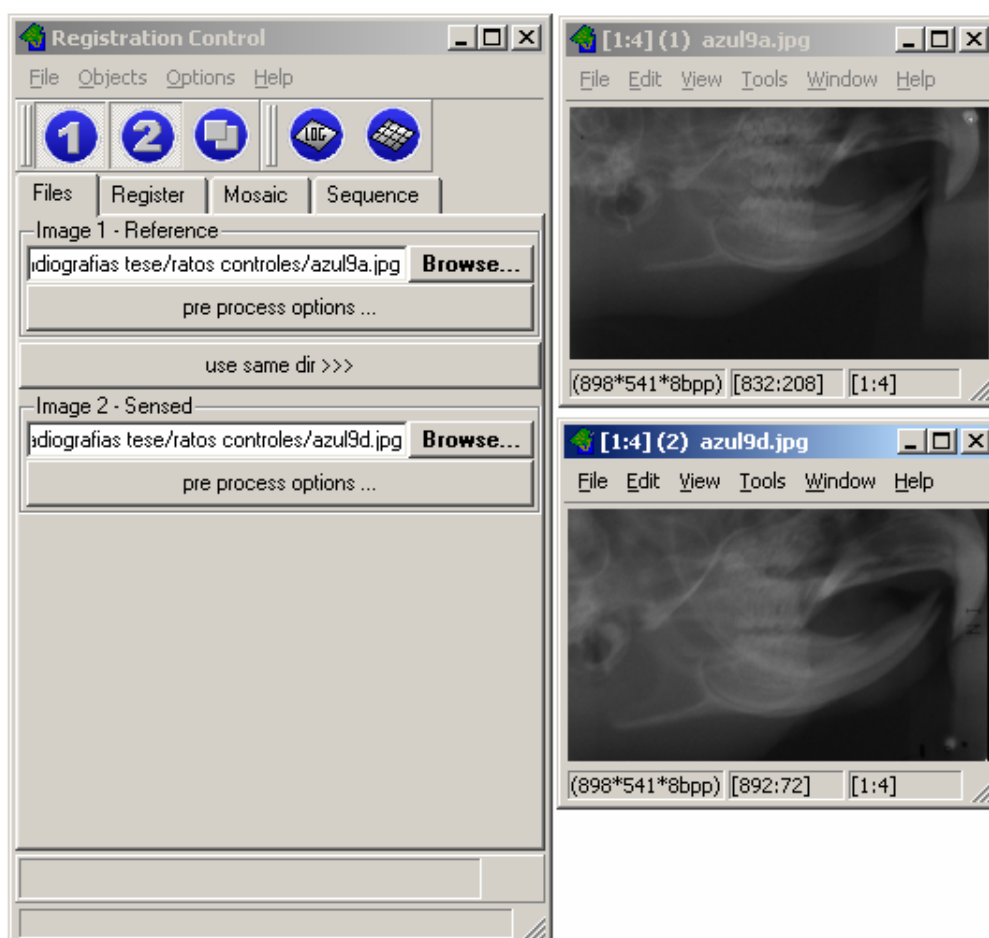


Figura 2 – Radiografias inicial e final de um dos animais do grupo controle sendo preparadas para o ajuste geométrico entre as imagens.

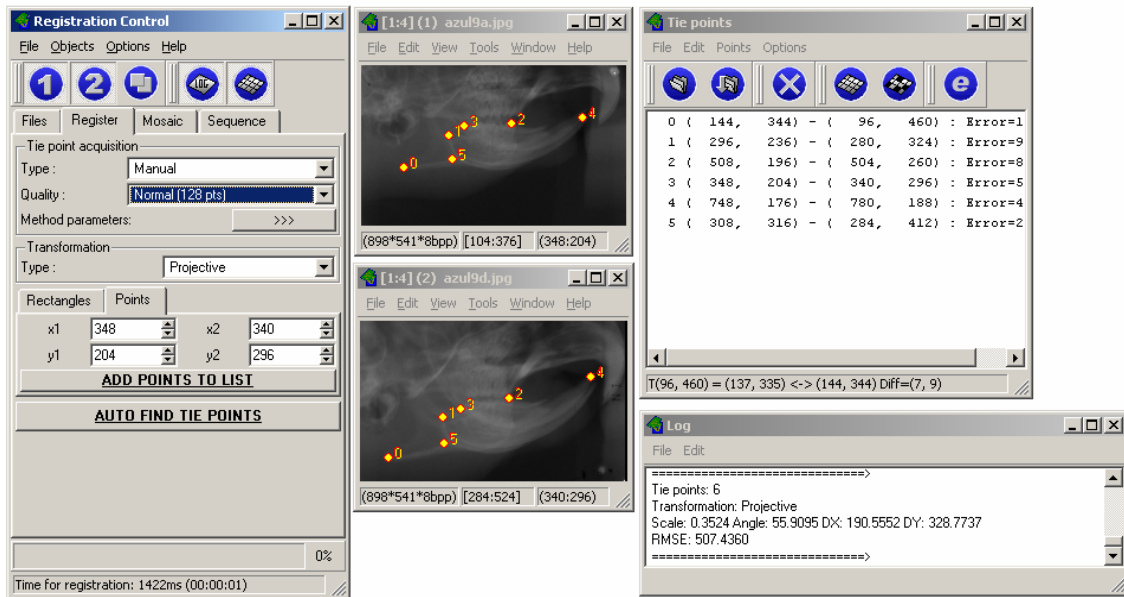


Figura 3 – Marcação de seis pares de pontos correspondentes nas radiografias inicial e final de um dos animais do grupo controle, para posterior ajuste geométrico entre as imagens.

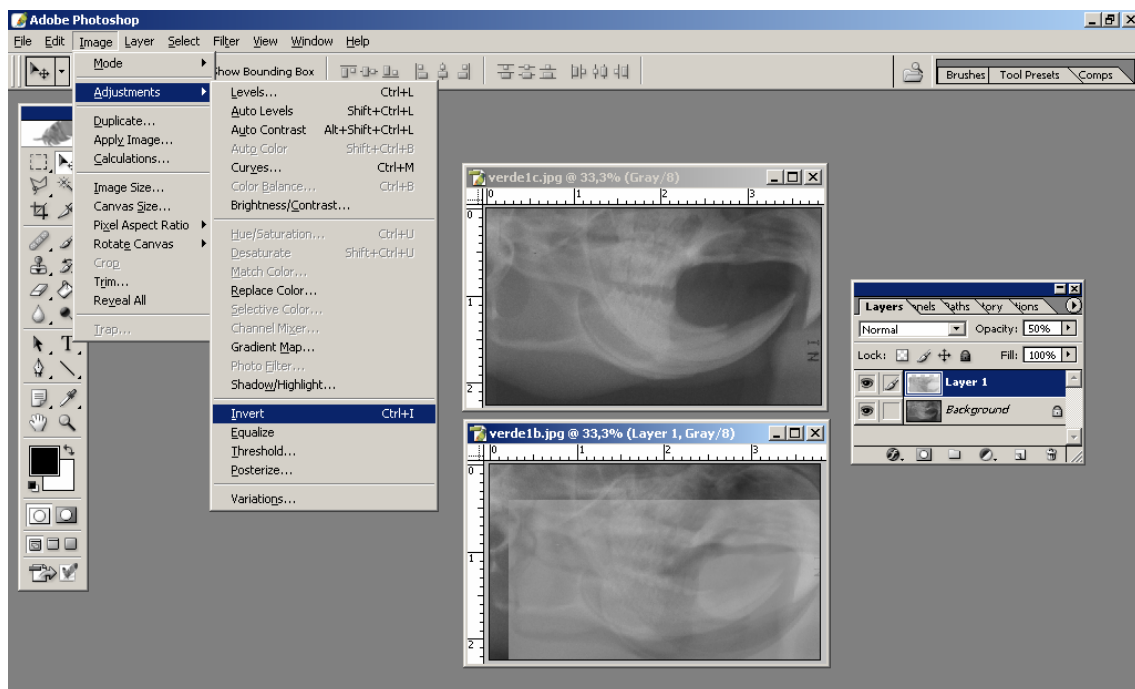


Figura 4 – Sobreposição da imagem inicial sobre a final na forma de camada com opacidade de 50% e com a escala de cinza invertida.

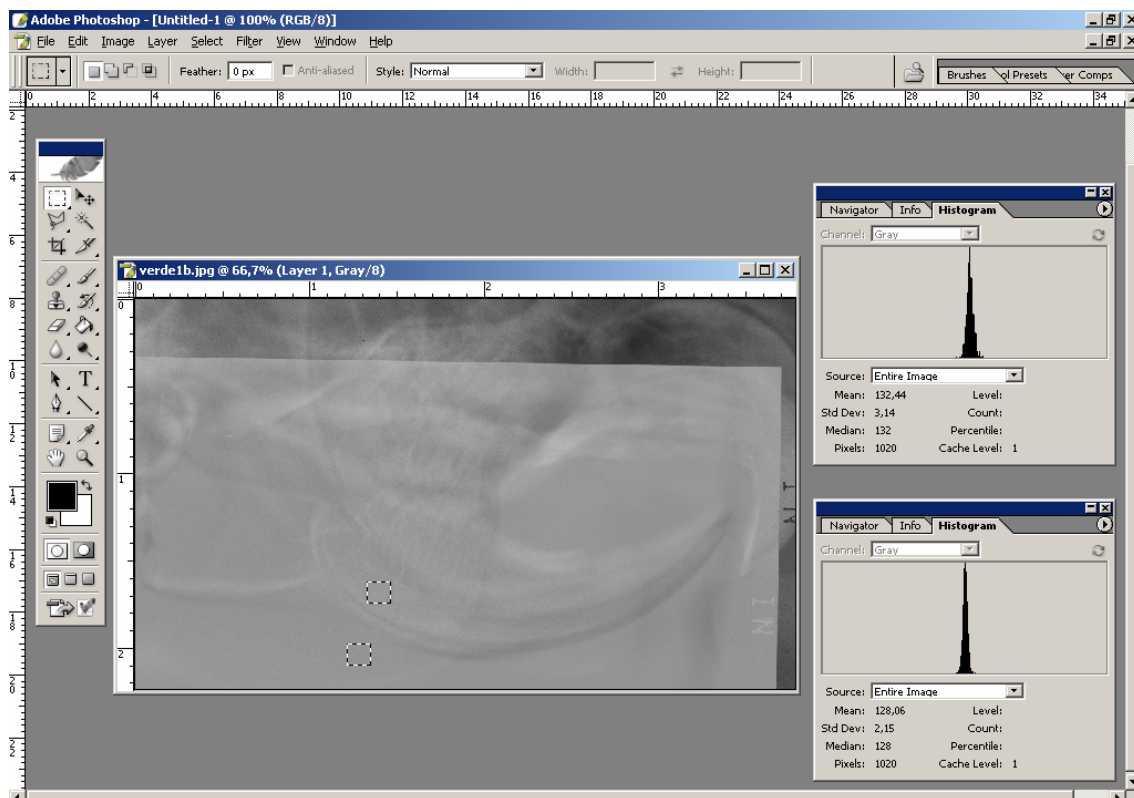


Figura 5 – Imagem de subtração durante a obtenção do histograma das áreas selecionadas.

### B - Quantificação da área trabecular

As imagens das lâminas foram importadas para o programa Adobe Photoshop CS (versão 8.0, Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EUA) e então selecionada uma área central – constituída por um quadrado com lado de 568 *pixels* – situada entre as corticais vestibular e lingual da mandíbula, assim como entre os ápices do molar e o canal mandibular (Figura 6).

Esta área recortada foi utilizada para a quantificação da área trabecular, por meio de recursos do mesmo programa (Figura 7).

O filtro “extrair” foi a ferramenta empregada para selecionar e manter na imagem apenas os *pixels* representando o osso trabecular, removendo a imagem dos espaços medulares. Este procedimento preenche a imagem não selecionada homogeneamente com a cor branca (Figura 8).

A seguir apenas a porção colorida da imagem foi selecionada e, novamente por meio da função histograma, obtida a área (em *pixels*) das trabéculas ósseas (Figura 9). Procedeu-se, então, o cálculo de proporção entre a área total da imagem e a área trabecular.

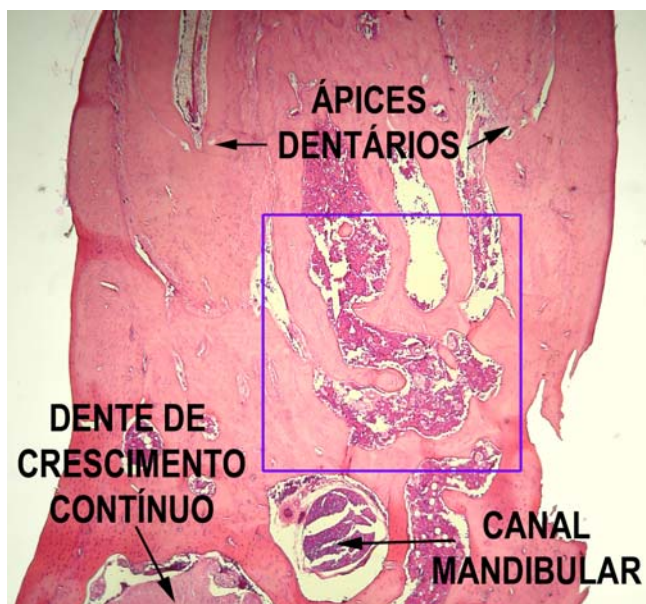


Figura 6 – Área para recorte da imagem histológica (quadrado em azul) e estruturas anatómicas de referência (setas).

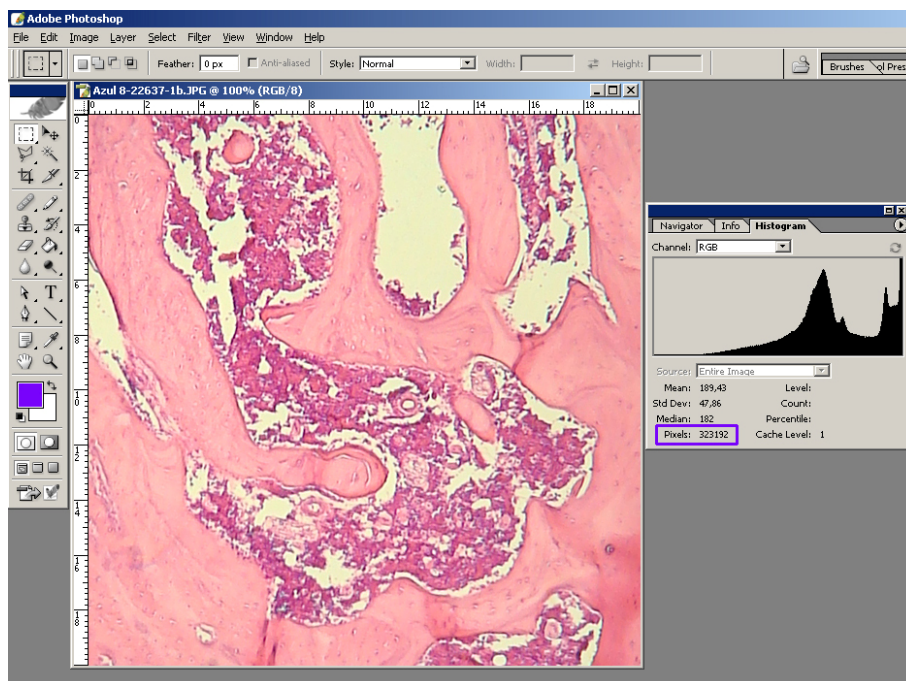


Figura 7 – Obtenção, por meio da ferramenta histograma, da área total da imagem recortada, expressa em *pixels*.

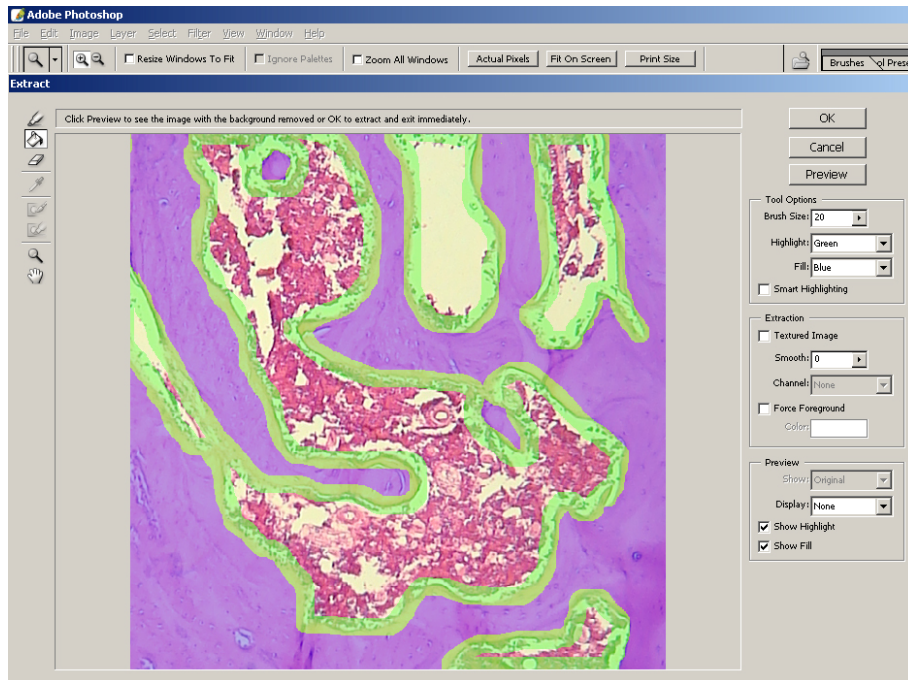


Figura 8 – Imagem durante o procedimento de extração. *Pixels* correspondentes às trabéculas ósseas sombreados em azul e *pixels* a remover da imagem contornados em verde. O programa determina a exata posição a ser utilizada no recorte dentro da faixa verde, em função do contraste.

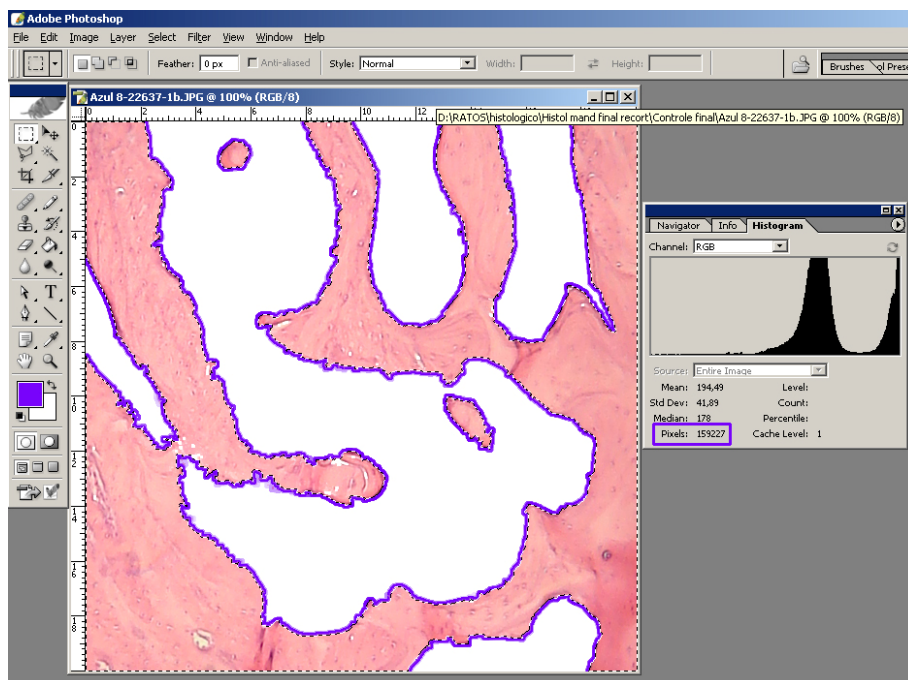


Figura 9 – Imagem representando a área trabecular selecionada (contorno azul) e histograma com o número de *pixels* que a mesma representa.



## ANEXO 1



Universidade Federal do Rio Grande do



Faculdade de Odontologia

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

## RESOLUÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa e a Comissão de Pesquisas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisaram o Projeto:

Número: 42/06

**TÍTULO: AVALIAÇÃO POR SUBTRAÇÃO DIGITAL DAS ALTERAÇÕES INDUZIDAS POR METILPREDNISOLONA E INCADRONATO NA DENSIDADE ÓSSEA DA MANDÍBULA DE RATAS**

**Investigador(es) principal(ais): Professora Vânia R. C. Fontanella e C.D. Célia R. W. Mahl**

O Projeto foi aprovado na reunião do dia 15/08/06, Ata nº 08/06 do Comitê de Ética em Pesquisa e da Comissão de Pesquisas, da UFRGS, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com as normas de utilização de animais em projetos de pesquisa, conforme a Resolução 04/97, da Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde GPPG/HCPA.

Porto Alegre, 18 de setembro de 2006.

Profa. Marisa Maltz  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Profa. Heloísa Emilia Dias da Silveira  
Coordenadora da Comissão de Pesquisas



## ANEXO 2

**Vania Fontanella**

---

**De:** Sharon Brooks [slbrooks@umich.edu]  
**Enviado em:** quarta-feira, 29 de agosto de 2007 14:04  
**Para:** Vania Fontanella  
**Assunto:** DMFR manuscript 186-06

**Sinalizador de acompanhamento:**

Acompanhar

**Status do sinalizador:**

Vermelho

Dear Dr. Fontanella

I am pleased to inform you that we are accepting your revised manuscript 'Optimal parameters for lateral oblique radiographs of rat mandibles' for publication in Dentomaxillofacial Radiology.

I have forwarded the manuscript to the publisher. You will receive page proofs for your review when they are ready. Due to the number of already accepted papers in the publication queue, this will take a few months.

Thank you for submitting this manuscript to Dentomaxillofacial Radiology.

Sharon Brooks  
Editor, DMFR

\*\*\*\*\*

Sharon L. Brooks, DDS, MS  
Diplomate, American Board of Oral and Maxillofacial Radiology Editor,  
Dentomaxillofacial Radiology University of Michigan School of Dentistry Department of  
Periodontics and Oral Medicine Ann Arbor, MI 48109-1078 USA  
Tel: +1 734-764-1595 Fax +1-734-764-2469  
slbrooks@umich.edu

## ANEXO 3

**Vania Fontanella**

---

**De:** em.dmfr.0.56ed2.6fd47d5c@editorialmanager.com em nome de DMFR Office  
[slbrooks@umich.edu]  
**Enviado em:** sexta-feira, 7 de setembro de 2007 15:40  
**Para:** vaniafontanella@terra.com.br  
**Assunto:** A manuscript number has been assigned to "EVALUATION BY DIGITAL  
SUBTRACTIONRADIOGRAPHY OF INDUCED CHANGES IN THE BONE DENSITY  
OF THE FEMALE RATMANDIBLE"

**Sinalizador de acompanhamento:**

Acompanhar  
**Status do sinalizador:** Vermelho

Dear Vania,

Your submission entitled "EVALUATION BY DIGITAL SUBTRACTION RADIOGRAPHY OF INDUCED CHANGES IN THE BONE DENSITY OF THE FEMALE RAT MANDIBLE" has been assigned the following manuscript number: DMFR-D-07-00116.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an Author at <http://dmfr.edmgr.com/>

Thank you for submitting your work to DMFR.

Kind regards,  
Sharon L. Brooks