



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Gina Delia Roque Torres

O efeito da nicotina e/ou bisfosfonatos no reparo  
ósseo alveolar em ratas ovariectomizadas  
irradiadas e não irradiadas

Piracicaba  
2016

Gina Delia Roque Torres

O efeito da nicotina e/ou bisfosfonatos no reparo  
ósseo alveolar em ratas ovariectomizadas  
irradiadas e não irradiadas

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Radiologia Odontológica, na Área de Radiologia Odontológica.

**Orientador:** Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo

Este exemplar corresponde à versão final da Tese que será defendida pela aluna Gina Delia Roque Torres e orientada pelo Prof. Dr. Frab Norberto Bóscolo.

Piracicaba

2016

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** CAPES, 33003033005P9

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

T636e Torres, Gina Delia Roque, 1987-  
O efeito da nicotina, bisfosfonatos, e irradiação no reparo ósseo alveolar em ratas ovariectomizadas / Gina Delia Roque Torres. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Frab Norberto Boscolo.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Ovariectomia. 2. Difosfonatos. 3. Nicotina. 4. Densidade óssea. 5. Microtomografia por raio-X. I. Boscolo, Frab Norberto, 1942-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** The effect of nicotine and / or bisphosphonates on alveolar bone repair in irradiated and non-irradiated ovariectomized rats

**Palavras-chave em inglês:**

Ovariectomy

Diphosphonates

Nicotine

Bone density

X-ray microtomography

**Área de concentração:** Radiologia Odontológica

**Titulação:** Doutora em Radiologia Odontológica

**Banca examinadora:**

Frab Norberto Boscolo [Orientador]

Flávio Ricardo Manzi

Amaro Ilídio Vespasiano Silva

Francisco Haiter Neto

Francisco Carlos Groppo

**Data de defesa:** 16-12-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Radiologia Odontológica



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Odontologia de Piracicaba**



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 16 de Dezembro de 2016, considerou a candidata GINA DELIA ROQUE TORRES aprovada.

PROF. DR. FRAB NORBERTO BOSCOLO

PROF. DR. FLÁVIO RICARDO MANZI

PROF. DR. AMARO ILÍDIO VESPASIANO SILVA

PROF. DR. FRANCISCO HAITER NETO

PROF. DR. FRANCISCO CARLOS GROPPPO

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a Deus, por ser essencial em minha vida, y a mis mayores tesoros, Toribio y Elsa, que me dieron fuerza y coraje en toda esta caminata, renunciando a muchas cosas y sueños para poder realizar los míos.

## AGRADECIMENTOS

### *Agradecimentos aos Professores*

*À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do seu diretor Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques, por ter me oferecido a oportunidade de conhecer e conviver com profissionais renomados em suas áreas.*

*Ao meu querido orientador Prof. Dr. **Frab Norberto Bóscolo**, obrigada por ter me ensinado a enxergar o outro lado da moeda, por me direcionar, por subsidiar minha coragem de querer sempre lutar pelo que mais quero, por dividir seu tempo, paciência e amizade. Sou uma pessoa privilegiada por ter um professor tão competente em todos os aspectos ao meu lado! Foi uma honra ter sido sua orientada! ...E mais ainda obrigada pelo carinho de paizinho que sempre me mostrou!*

*À minha querida mãezinha brasileira Prof<sup>a</sup>. Dra. **Solange Maria de Almeida**, que sempre foi muito mais que uma professora, é uma amiga, mãe e conselheira que me mostrou a importância de me questionar, duvidar, pensar e sonhar. Hoje cheguei aqui através do seu incentivo e confiança em mim. Obrigada!*

*Ao Prof. Dr. **Francisco Haiter Neto**, grande mestre, agradeço por tudo o que me ensinou e me proporcionou a aprender. Mesmo com tantos afazeres sempre esteve à disposição para tirar dúvidas, conversar sobre os trabalhos e me ajudar de forma exemplar quando precisava. Obrigada pelo carinho e atenção!*

*À Prof<sup>a</sup>. Dra. **Deborah Queiroz de Freitas**, pela sua dedicação e competência. Obrigada por estar à nossa disposição mesmo sempre muito ocupada!*

*Ao Prof. Dr. **Matheus Oliveira** pessoa que admiro pelo profissionalismo e competência, agradeço também pelos conselhos!*

*Ao Prof. Dr. **Francisco Carlos Groppo**, pela atenção, carinho e amizade! Obrigada pelos conselhos, ensinamentos e a delicadeza ao me receber em sua sala! Você não imagina como fico feliz em ter tido contato com o senhor na realização deste trabalho!*

*Aos professores membros da banca do exame de qualificação, Prof. Dr. **Alexander Tadeu Sverzut**, Profa. Dra. **Ana Claudia Rossi** e Profa. Dra. **Karla de Faria Vasconcelos** que contribuíram com suas sugestões para engrandecimento desse trabalho.*

*Aos professores membros da banca de defesa, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo, Prof. Dr. Flávio Manzi e Prof. Dr. Amaro Vespasiano Silva que prontamente aceitaram o convite e se dispuseram a participar desse momento.*

## *Agradecimentos Especiais*

*Diosito, gracias por el amor, por tu presencia constante en todos los momentos de esta caminata larga ya que tú me dabas el mejor conforto en las horas difíciles. Gracias por mostrarme el mejor camino a seguir, por nunca dejarme desistir, por estar siempre listo para oírme, por el fortalecimiento de mi fe en el amor y por la esperanza de días mejores!!!... sin tu amor Dios nada sería posible!*

*Papi, Mami, gracias por la dedicación, cariño, renuncia, esfuerzo e incentivo durante toda mi vida, pero principalmente en estos seis años que pase a más de tres mil km de Uds. No voy a negar que durante este tempo hubieron momentos en que me hacían mucha falta, pero sea cual fuese el obstáculo o lo que estaba pasando siempre me incentivaron a seguir y lucharon conmigo mismo no estando presentes físicamente puedo decir que sentí su corazón luchando conmigo... simplemente soy quien soy a expensa de sus sacrificios!!!... Los adoro!!!...*

*Kevin, hermano, amigo, confidente que Dios me dio de regalo, solo quienes te conocen saben el gran corazón que tienes, gracias por estar conmigo en todo momento, compartiendo y vibrando con cada una de mis victorias, no hay duda que soy una persona privilegiada al tenerte a mi lado en estos momentos e Yousi, hermana, mujer, amiga, madre... a pesar que no te digo quiero que sepas que te admiro por todo lo que enfrentaste en esta vida, gracias por creer en mí y buscarme cuando necesitabas de alguien para escucharte aunque no podía muchas veces darte el abrazo que necesitabas o ambas lo necesitábamos, cuenten conmigo siempre... Los amo a los dos!!!...*

*Papi Amancio, gracias por el inmenso amor y cariño que siempre me mostraste, nunca voy a olvidar cada recibimiento que tenía cuando llegaba a Huancayo, siempre con algún regalo para mí y reclamando tu café de siempre ... pero sin duda el mejor regalo que tuve es haberte tenido como abuelo...Eres nuestro ángel que ahora está junto con mi mama Delia!!! Siempre vivirán en mi mente y corazón!!!*

*Dudu* sé que eres el que mejor de los dos va recordarse de este momento pero algún día que lean esto solo quisiera que sepas que agradezco a Dios por permitir tenerlos aquí y *Facu*, a quien adoro por el temperamento fuerte que tienes. Mis queridos enanos con esta dedicatoria quiero demostrarles que todo podemos conseguir con trabajo y que siempre tengan en sus corazones la fuerza para luchar por sus propias convicciones!

A todos mis **parientes y amigos** que estuvieron conmigo en todo momento, siempre disponibles cuando mi tempo era limitado... que se acostumbraron con mis felicitaciones atrasadas, que aceptaron mis “no voy a poder estar con Uds”... gracias por la comprensión y cariño que siempre me dieron... especialmente a mi tía *Celia* y mi prima *Michelle* que hicieron un esfuerzo enorme por estar aquí conmigo en estos momentos, y *flaca* gracias por estar siempre al lado de mi mama y hermana!

*Magaly, Any, Denisse y Wendy*, mis *mukças* queridas, gracias por la amistad y cariño! Uds. son las Hermanas que escogí para permanecer para siempre en mi vida!

*Dona Mercedes*, minha vozinha brasileira, pessoa que estive comigo em momentos bons e ruins, obrigada pelo amor e dedicação, pela eterna preocupação, sem a senhora tudo teria sido bem mais difícil em casa!

À minha amiga –irmã 1 *Danieli*, obrigada por estar comigo em todos os momentos em Piracicaba e pelo mundo, porque a gente já passou essa barreira brasileira! O nosso “casamento” será para a vida toda!... nunca achei que ia conhecer minha alma gêmea aqui em Piracicaba, sem dúvida você é um dos melhores presentes que o Brasil me deu, não tenho palavras para te dizer toda a gratidão que tenho por você, você vai fazer muita falta nos meus dias ... não vou ter mais minha parceira para academia, crossfit, comidas, viagens, noites de vinho, saídas a escondidas da sociedade, cinema, compras, etc etc... acho que para tudo que fiz aqui você esteve presente, mas sei que não é mais que um até logo porque se a vida nos reuniu, a vida vai nos juntar de novo!!!

À minha amiga –irmã 2 *Dudinha* obrigada por me cativar com sua animação de cada dia, e me mostrar que não importa o tempo que você conheça alguém quando sua alma tem conexão com a outra pessoa simplesmente o carinho surge... obrigada por compartilhar um de seus mais grandes tesouros comigo, porque eu sei que família é tudo, você não sabe quanta saudade vou sentir da minha irmãzinha caçula... sentirei falta de tudo o compartilhado e vivido juntas... contigo aprendi



*que desta vida nada se leva o que importa é o que você faz pelos outros, só queria te agradecer por me dar tanto carinho saiba que o carinho é recíproco e que pode contar comigo sempre que precisar, continue com essa alegria de sempre...uhullllll!*

*Ao meu amigo - irmão 1 **Amaro** por ter me acolhido em Piracicaba. Tua hospitalidade e amizade foram fundamentais para que eu pudesse enfrentar essa jornada! A gente passou por momentos difíceis aqui e se não era porque nós tínhamos um ao outro acho que tudo tivesse sido muito difícil, não por nada sempre sai que eu sou teu clone ou anjo da guarda rs vou sentir falta de nossas conversas sobre tudo, todos e mais um pouco sempre com uma boa comida no meio e sem falta de nosso sorvete para fechar tudo o bom, ruim ou simplesmente o nada que aconteceu no nosso dia, sentirei saudade de nossos dias de Biotério só porque você estava por perto... Sem dúvida sou eternamente grata por tudo o que você fez por mim!!! Minha casa sempre será a sua, e pedirei a Papi Noel que nos dê o brinquedo que a gente nunca teve... PACIENCIA o nome rs*

*Ao meu amigo - irmão 2 **Yuri** por ter sido o carioca que me acolheu em Piracicaba. Na vida encontramos pessoas que sabem fazer de pequenos instantes grandes momentos, acho que essa é a melhor definição pra você! Continue sendo esse menino com um grande coração disposto a ajudar sempre que alguém precisar! Nunca esqueça que pode contar comigo sempre que precisar!*

*A pessoas que marcaram minha estadia aqui no Brasil... **Deborita** contigo aprendi que as coisas são mais simples do a gente enxerga, que vida é como uma montanha com subidas e decidas, depende da gente de como enfrenta cada desafio, guerreira que sempre vou admirar! **Karlinha de Farias**, mãezinha você não sabe quanto agradeço a Deus por colocar pessoas como você no meu caminho, aprendi tanto cada vez que falava com você, agradeço por toda a ternura e carinho que sempre me teve! **Priscila Peyneu**, amore a paixão pela vida levo como ensinamento seu, obrigada por compartilhar momentos tão agradáveis comigo, **Fran Fran** dedicação e amor no que faz me fez aquecer meus dias junto contigo, **Thiago Souza** companheiro com quem sempre posso contar, **Liana** seu bom humor fez meus dias divertidos rs, **Neiandro** fez meus dias mais leves durante todo este tempo de convívio e **Thiago Gamba** o foco que você tem no que faz é seu diferencial...Obrigada a todos pela amizade, ainda porque muitas vezes abriram mão de horas para me ajudar em qualquer coisa, pela parceria nos trabalhos, pelas viagens que compartilhamos... Só posso dizer: Obrigada!*

*Não posso deixar de agradecer a todos os amigos que estiveram comigo em Piracicaba. Vocês não imaginam o quanto fiquei feliz em suas companhias e o*

*quanto tornaram meus dias muito mais leves e divertidos! Que a nossa amizade não se limite aos muros da FOP! Amanda Candemil, Amanda Farias, Anne, Bernardo, Bia, Carlitos, Carol Valadares, Carol Cintra, Caroline Brito, Debora Moreira, Eliana, Fred, Gabi, Gustavo, Helena, Henrique, Hugo, Karla Rovaris, Laura, Larissa Lagos, Larissa Souza, Leo, Lulu, Mariana, Mariane, Mayra, Monikelly, Polyane, Priscila Lopez, Raquel, Rafaela, Roberto, Serginho, Tata e Victor.*

*Às minhas amigas e amigos estrangeiros da FOP, Dora, Erika, Gabriel, Manuel, Nati e Zulieth pela amizade e porque fazem de Piracicaba um lugar muito mais feliz e divertido!!!!*

*A minha amiga da espe Sara, gostaria de te parabenizar pela força, garra e por nos fazer acreditar que tudo é possível. Te levarei com muito amor em meu coração, você realmente fez diferença esses 3 anos juntas. Gratidão eterna!!*

*Aos meus amigos Fernando e Waldeck, meu respeito e gratidão por tudo o que fizeram por mim! Vocês são exemplos de dedicação e seriedade com a profissão! Se hoje sou apaixonada pela Clínica, devo isso a vocês!*

*À Líu, admiro sua eficiência e porque sem ela não sei o que vai ser desta Radiologia rs, Sara, Leny, Cidinha e aos demais funcionários da FOP, obrigada pelo bom dia, pela organização da Clínica... Através de vocês os sonhos se tornam possíveis!*

*Para todas as pessoas que colaboraram de alguma forma para a realização deste sonho, MUITO OBRIGADA!!!*

"Porque será que tenho a leve sensação que depois de algumas viagens, o corpo vai e volta rápido sem o meu coração, porque ele aos poucos vai chegando. Portanto, as vezes sinto que estou aqui, mas também um pouco lá, ali e há também outro tanto no meio do caminho. Talvez porque sou humana e aprendi a pertencer demais aos lugares e às pessoas "

*(Próprio)*

## RESUMO

Neste estudo teve-se como objetivo avaliar o efeito da nicotina e/ou bisfosfonatos no reparo ósseo alveolar em ratas ovariectomizadas irradiadas e não irradiadas. Foram utilizadas 60 ratas, com idade de 70 dias, divididas aleatoriamente em doze grupos experimentais: seis não irradiados e seis irradiados (controle de ambos grupos e com administração das substâncias: alendronato de sódio, ácido zoledrônico, nicotina, nicotina/alendronato de sódio, nicotina/ácido zoledrônico). Inicialmente, administrou-se durante 6 dias da semana a Nicotina nos grupos correspondentes, durante as últimas 15 semanas da pesquisa. Aos 90 dias de idade todas foram submetidas à ovariectomia. Cinco dias após este procedimento foram administrados nos grupos correspondentes, o alendronato de sódio e o ácido zoledrônico, durante as últimas 10 semanas da pesquisa. Cinquenta e seis dias após a ovariectomia realizou-se a exodontia do primeiro molar inferior do lado direito. Três dias após este procedimento, procedeu-se a irradiação da região de cabeça e pescoço com 15 Gy nos grupos que foram destinados à irradiação. Os animais foram submetidos a eutanásia aos 21 dias após a exodontia. O reparo ósseo alveolar foi analisado pela densidade radiográfica expressa em milímetros de alumínio. Para a avaliação da microarquitetura óssea foram utilizados parâmetros de avaliação tridimensional do osso trabecular pela microtomografia computadorizada. As análises utilizadas foram two-way ANOVA e Kruskal-Wallis. Em relação à densidade radiográfica os grupos nicotina e irradiado/nicotina apresentaram menor densidade, enquanto o alendronato de sódio e ácido zoledrônico, tiveram significativamente a densidade aumentada na presença da nicotina e da radiação X ( $p < 0,05$ ). Para a microarquitetura óssea, a nicotina e a radiação X afetaram a microarquitetura óssea em todos os parâmetros ( $p < 0,05$ ) mostrando efeitos deletérios. No grupo não irradiados/nicotina, com administração do ácido zoledrônico aumento os parâmetros volume ósseo, volume ósseo/volume tecidual, conectividade, densidade da conectividade; enquanto que com o alendronato de sódio aumentou o número de trabéculas; manteve estável o índice do modelo estrutural; aumentou a espessura trabecular; e diminuiu a separação das trabéculas e porosidade total ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo irradiado/nicotina. Nessas condições experimentais conclui-se que a radiação X e a nicotina apresentaram um efeito deletério sobre a densidade radiográfica e microarquitetura óssea; enquanto os bisfosfonatos mostraram um potencial significativo no reparo ósseo dos alvéolos, mesmo na presença nicotina e da radiação X.

**Palavras-chave:** Ovariectomia, Raios X, Bisfosfonatos, Nicotina, Osso, Densidade óssea, Microtomografia por Raio-X, Extração Dentária.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of nicotine and / or bisphosphonates on alveolar bone repair in irradiated and non-irradiated ovariectomized rats. We selected sixty rats, aged 70 days. The animals were randomly divided into twelve groups: control, six irradiated and six non-irradiated (control of both groups and with administration of sodium alendronate, zoledronic acid, nicotine, nicotine/sodium alendronate, nicotine/zoledronic acid and nicotine/zoledronic acid. Initially, was administrated for 6 times a week Nicotine in the corresponded groups, throughout the last 15 weeks of the research, and then, at 90 days of age all being subjected to ovariectomy. Five days after this procedure were administrated in the corresponded groups, sodium alendronate and zoledronic acid, during the last 10 weeks of the research. Fifty six days after ovariectomy was performed the extraction of the mandible right first molar in all groups. Three days later, proceeded to the irradiation of the head and neck with 15 Gy in the groups intended to irradiation. The animals were sacrificed 21 days after the dental extraction. Alveolar bone repair was examined by radiographic density expressed in millimeters of aluminum and bone microarchitecture analyzed by three-dimensional parameters for evaluation of bone trabecular by microcomputed tomography. The analyzes used were two-way ANOVA and Kruskal-Wallis test. Regarding the radiographic density the nicotine group and irradiated/nicotine were those that showed less density, as well as sodium alendronate and zoledronic acid significantly improved the density in the presence of nicotine and irradiation ( $p < 0.05$ ). As for the bone microarchitecture, nicotine and irradiation affect the bone microarchitecture in all parameters ( $p < 0.05$ ) showing deleterious effects. In the group non-irradiated/nicotine, with administration of zoledronic acid increasing parameters like bone volume, bone volume/tissue volume, connectivity and connectivity density; while with sodium alendronate increased trabecular number and both kept stable the structure model index, increased trabecular thickness and decreased trabecular separation and porosity ( $p < 0.05$ ). In these experimental conditions, it is concluded that radiation X and nicotine had a deleterious effect by the radiographic density and bone microarchitecture, and bisphosphonates have shown significant potential in the alveolar bone healing even when it were present the nicotine and radiation X.

**Palavras-chave:** Ovariectomy, X-Rays, Diphosphonates, Nicotine, Bone Tissue, Bone Density, X-Ray Microtomography, Tooth Extraction.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Delineamento do presente estudo. 59
- Figura 2.** Procedimento de gavagem para a administração de 1,0 mg /kg corpóreo de Nicotina (sal tartarato de nicotina -  $\geq 98\%$ ) durante 6 dias por semana durante toda a pesquisa. 60
- Figura 3.** Procedimento cirúrgico para a ovariectomia. A e B-tricotomia da região abdominal lateral; C-incisões cutâneas e musculares; D-exposição dos ovários; E-excisão dos ovários e gordura circundante; F-sutura da musculatura e pele bilateralmente em todos os animais. 61
- Figura 4.** Esquema dos grupos experimentais. 62
- Figura 5.** A-Procedimento de gavagem para a administração de 5,0 mg/kg corpóreo de Alendronato de Sódio, durante 3 dias na semana. B-administração por meio intravenoso de 0,1 mg/kg corpóreo de Ácido Zoledrônico como única dose. 64
- Figura 6.** Procedimento cirúrgico para a exodontia do primeiro molar. A- posicionamento na mesa inclinada e afastamento da mucosa e língua. B- presença do primeiro molar inferior do lado direito. C-procedimento cirúrgico propriamente da exodontia do primeiro molar. D-Sutura da região. 65
- Figura 7.** Procedimento de irradiação da região de cabeça e pescoço. A- posicionamento no acelerador linear dos animais; B-região de cabeça e pescoço incluída no campo de radiação C-Workstation do acelerador linear (Clinic 6/100®, Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, Estados Unidos). 66
- Figura 8.** Obtenção da peça para análise - Hemimandíbula do lado direito, observando-se a ausência do primeiro molar. A- Vista medial; B-Vista lateral. 67

- Figura 9.** Padronização dos parâmetros de aquisição das radiografias para a avaliação da densidade radiográfica. A-Esquema evidenciando o posicionamento dos receptores de imagem em relação ao tubo de raio X. B-Posicionamento da hemimandíbula, a escala de densidade e o número de para sua codificação. C-Imagem radiográfica gerada para a análise. 69
- Figura 10.** Análise da densidade radiográfica mediante o software ImageJ 1.6.0 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). A-Radiografia periapical no programa. B-Uso da ferramenta Oval selection para obter a densidade da região da raiz distal do primeiro molar. C e D-Utilização da ferramenta Rectangular selection para obter a densidade dos diferentes degraus de alumínio. 70
- Figura 11.** Aparelho SkyScan 1174 Compact Micro-CT (Kontich, Bélgica) utilizado para obtenção das imagens por micro-TC. 71
- Figura 12.** Posicionamento da peça anatômica no Aparelho SkyScan 1174 Compact Micro-CT. A-Hemimandíbula fixada no centro da base do dispositivo de acrílico cilíndrico, com a região da articulação temporomandibular para baixo, mostrando o alinhamento da peça anatômica com o longo eixo do dispositivo, mediante as linhas pretas longitudinais de referência. B—A peça anatômica colocada no interior do aparelho sobre o suporte correspondente. C-Pré-visualização da imagem para verificação e ajuste da centralização da peça anatômica. D-Secções utilizadas para a aquisição e análise do reparo ósseo. 72
- Figura 13.** Determinação da região que foi escaneada no aparelho SkyScan 1174 Compact Micro-CT. A-Pré-visualização da imagem para verificação e ajuste da centralização da peça anatômica. B-Imagem após as aplicações dos parâmetros de aquisição das imagens utilizados nesse estudo. 74
- Figura 14.** Reconstruções das imagens por micro-TC. A-Interface do programa NRecon® (Kontich, Bélgica). B-Ajuste dos parâmetros de 75

reconstrução: top e bottom. C-Verificação do Show profile da imagem. D-Ajuste dos parâmetros de reconstrução: ring artifacts reduction, smoothing e beam hardening correction.

**Figura 15.** Imagens da área de análise por micro-TC. A-Shadow projection da imagem reconstruída no programa CTAn® (Kontich, Bélgica). B-Região de interesse na top selection. C-Região de interesse na bottom selection. Observa-se que a ROI se encontra dentro do reparo ósseo na região da raiz distal do primeiro molar inferior. 76

**Figura 16.** Densidade óssea radiográfica em mmAl (Médias  $\pm$  D.P.) entre os grupos irradiados e não irradiados, considerando os diferentes tratamentos utilizados. 81

**Figura 17.** Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro Volume ósseo (BV). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min. 83

**Figura 18.** Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro Volume Ósseo/Volume Tecidual (BV/TV). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min. 84

**Figura 19.** Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro número de trabéculas (Tb.N). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min. 85

**Figura 20.** Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro espessura trabecular (Tb.Th). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min. 87

**Figura 21.** Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro separação das trabéculas (Tb.Sp). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min. 88



<b>Figura 22.</b> Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro porosidade total Po(tot). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min.	89
<b>Figura 23.</b> Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro índice do modelo estrutural (SMI). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min.	90
<b>Figura 24.</b> Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro média da interceptação do comprimento (MIL). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min.	92
<b>Figura 25.</b> Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro conectividade (Conn). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min.	93
<b>Figura 26.</b> Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro densidade da conectividade (Conn.Dn). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min.	94
<b>Figura 27.</b> Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro número euler (Eu.N). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min.	95

## LISTA DE TABELAS

<b>Quadro 1.</b> Diferentes grupos experimentais utilizados neste estudo	63
<b>Quadro 2.</b> Parâmetros de aquisição das imagens utilizadas neste estudo.	74
<b>Quadro 3.</b> Parâmetros de reconstrução no <i>software</i> Skyscan NRecon®	75
<b>Quadro 4.</b> Apresentação e descrição dos parâmetros selecionados para a análise da microarquitetura óssea trabecular na região de interesse avaliada neste estudo.	77

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
3 PROPOSIÇÃO	58
4 MATERIAL E MÉTODOS	59
5 RESULTADOS	80
6 DISCUSSÃO	96
7 CONCLUSÃO	106
REFERÊNCIAS	107
ANEXO 1	115

## 1 INTRODUÇÃO

O tabagismo está relacionado com a maior parte dos problemas de saúde, sendo a principal causa de morte evitável no mundo. A organização mundial de saúde (OMS) estima que 1/3 da população mundial adulta seja fumante, com maior prevalência do sexo masculino. Contudo, o número de mulheres fumantes vem crescendo nos últimos anos (Instituto Nacional do Câncer INCA/2016).

A fumaça proveniente do cigarro é composta por substâncias tóxicas, destacando-se a nicotina que é considerada uma droga psicoativa que causa dependência, aumentando a liberação de catecolaminas, que contraem os vasos sanguíneos, e aceleram a frequência cardíaca, podendo levar à hipertensão arterial. Além disso, a mesma pode causar a inibição da angiogênese, reepitelização e da osteogênese (Pinto et al. 2002, López-Moreno et al., 2004, Hapidin et al., 2011).

O tabagismo está relacionado com muitas doenças, dentre elas diferentes tipos de câncer, principalmente os de boca e de pulmão. Os agentes carcinogênicos do cigarro, que as pessoas respiram, ingerem ou que entram em contato por um período longo de tempo, estão relacionadas diretamente a ocorrência destas neoplasias. O risco de incidência de câncer na cabeça e pescoço de um fumante é seis vezes maior quando comparado com o risco de um não fumante (Baccaro et al. 2015).

O câncer de cabeça e pescoço é considerado um dos principais tipos de neoplasia maligna que ocorrem no Brasil e no mundo, em função de sua elevada incidência, prevalência e taxa de mortalidade. Tratamentos mutiladores podem se associar à disfonia, disfagia e desfigurações faciais relevantes, com perda funcional e repercussão no relacionamento social (Instituto Nacional do Câncer INCA/2016).

O tempo decorrido entre os primeiros sinais e sintomas, diagnóstico e tratamento interferem na evolução, prognóstico e qualidade de vida do paciente portador da doença. O tratamento da neoplasia de boca e orofaringe pode ser cirúrgico, radioterápico, quimioterápico ou combinações entre estes métodos. Quando uma lesão maligna é diagnosticada em sua fase inicial, o tratamento cirúrgico local será provavelmente suficiente para curar o paciente. Entretanto, se o diagnóstico não é feito no início, há uma maior probabilidade desta lesão produzir

metástases, necessitando de tratamento mais sofisticado, devendo-se incluir radioterapia e em alguns casos, quimioterapia (Shen et al. 2015).

A radioterapia utiliza os raios X de alta potência para destruir/controlar as células cancerígenas, que combinada com a cirurgia tem sido a principal modalidade de tratamento para as neoplasias. A radioterapia afeta os indivíduos de diferentes formas e é difícil prever os efeitos colaterais que podem ser causados, uma vez que a região de cabeça e pescoço é uma área complexa, composta por diversas estruturas que respondem de formas diferentes à radiação ionizante. As alterações radio induzidas na região de cabeça e pescoço podem ser divididas em precoce, afetando principalmente a mucosa e glândula salivar; e tardia, atingindo a dentição, periodonto, músculos e articulações (Tillner et al. 2014).

A radiação ionizante de baixa energia linear de transferência (raios gama, raios X) em altas doses cumulativas (>200 cGy) pode comprometer a vascularização do tecido ósseo (osteorradição necrose), levando à perda do osso cortical e trabecular (Delmas et al. 2002; Allen et al. 2011; Barba-Recreo et al. 2014; Bléry et al. 2015; Adler et al. 2016; Voss et al. 2016).

Os ossos são um importante componente que sustentam o corpo, servem de apoio aos músculos, protegem em alguns casos os órgãos internos, além de possuir relação com o metabolismo do cálcio. A medula óssea está relacionada com a formação das células do sangue, além de armazenar minerais, principalmente cálcio e fósforo. Os ossos podem apresentar diversas condições patológicas e estão suscetíveis a lesões. As mais comuns são os traumas físicos e as doenças degenerativas como escoliose, lordose, cifose, ou a perda de minerais, também conhecida como osteoporose (Adler et al. 2016).

A osteoporose é uma condição patológica óssea metabólica mais frequente, e tem sido considerada um grave problema de saúde pública, sendo uma das mais importantes doenças associadas ao envelhecimento. Afeta principalmente as mulheres pós-menopáusicas, resultando em uma perda de massa óssea e causando alterações na microarquitetura do osso, as quais podem levar a redução da resistência desse tecido (Ito et al. 2005, Baiomy et al. 2014).

As terapias para o tratamento da osteoporose atualmente disponíveis podem, na melhor das hipóteses, reduzir a incidência de fraturas mediante a

modificação do estilo de vida do indivíduo, mas não tratam definitivamente. Dentro destas modificações sugere-se a eliminação do tabagismo, realização de exercícios físicos regulares, uma dieta balanceada e terapia de reposição hormonal por meio de bifosfonatos, calcitonina sintética e suplementos para os hormônios da paratireóide (O'Connor et al. 2016).

Como tratamento para a osteoporose, os bisfosfonatos têm sido utilizados como agentes antiosteoclásticos. Esses compostos sintéticos são caracterizados por um grupo fósforo-carbono-fósforo, análogos de pirofosfato inorgânico. Os bisfosfonatos são utilizados na medicina, principalmente para inibir a reabsorção óssea em doenças como a osteoporose, doença de Paget e tumores ósseos. Estes compostos apresentam um efeito celular envolvendo tanto a apoptose quanto a destruição do citoesqueleto dos osteoclastos, induzindo uma diminuição da atividade osteoclástica (Eiken e Vestergaard 2016).

O alendronato de sódio (4-amino-1-hidroxiutilideno-1, 1- ácido bifosfônico, sódio tri-hidratado), é um potente bisfosfonato do grupo amino com via de administração oral, utilizado no tratamento de osteoporose e outros distúrbios esqueléticos (Aguirre et al. 2010). Em mulheres pós-menopausa com osteoporose, doses diárias de alendronato, por via oral, aumentam a densidade óssea mineral da coluna vertebral, quadril e demais ossos do corpo (Chavassieux et al., 1997; Bilezikian, 2009; Kim et al., 2011).

O ácido zoledrônico (1-hidroxi-1H-imidazol-1-il-phosphonoethyl monohidrato) molécula de ácido fosfônico, também pertence ao grupo dos bisfosfonatos. A diferença dos outros medicamentos de seu grupo, é que a via de administração é intravenosa e numa única dose, uma vez ao ano (Barba-Recreo et al. 2014; Rabelo et al., 2015; Adler et al. 2016).

O diagnóstico da osteoporose na odontologia pode ser realizado por meio de radiografias mediante índices radiomorfométricos, porém, na maioria das vezes só são visualizadas estas alterações, caso tenha havido uma perda de, no mínimo, 30% da massa óssea. Assim para que se tenha uma informação mais precoce do estado da estrutura óssea, deve-se lançar mão da Densitometria Óssea, que oferece informações mais precisas do estado de osteopenia, ou osteoporose já instalados (Griffith et al., 2010).

A microtomografia computadorizada (micro-TC) é uma modalidade de imagem que permite a análise tridimensional de amostras com um tamanho limitado, dependendo do aparelho utilizado e sem a necessidade de danificá-las, podendo ser utilizada em várias resoluções de acordo com a região de interesse. Por meio da micro-TC é possível se obter análises qualitativas/ quantitativas que determinam parâmetros como a densidade mineral óssea, a análise da microarquitetura do osso cortical e esponjoso, vascularização da região e a quantidade de hidroxiapatita por unidade de volume (Odgaard, 1997, Wu et al., 2015).

Em pesquisas sobre osteoporose pós-menopausa, a remoção dos ovários (ovarectomia) de ratas é um método bem estabelecido para simular tal condição, uma vez que a mesma induz a diminuição de estrogênio, conseqüentemente acaba aumentando a propensão de desenvolvimento de osteoporose (Salazar et al. 2011; Francisco et al. 2011; Yoon et al. 2012; Chen et al. 2013; Bauer et al. 2015; Mardas et al. 2016).

Considerando que mulheres fumantes no período de pós-menopausa podem apresentar osteopenia e posteriormente, osteoporose ainda, que essa mesma população poderia vir a desenvolver algum tipo de câncer na região de cabeça e pescoço decidiu-se realizar uma pesquisa em que foram levadas em consideração todos esses fatores associados com o uso de substâncias indicadas no tratamento de osteoporose, os bisfosfonatos, e um tipo de terapia para neoplasias, a irradiação X.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Tabagismo

O tabagismo integra o grupo dos transtornos mentais e comportamentais oriundos do uso de substância psicoativa, que causa dependência física, psicológica e comportamental, semelhante ao que ocorre com o uso de outras drogas como álcool, cocaína e heroína. O tabaco apresenta em sua composição muitas substâncias tóxicas conhecidas como potenciais irritantes, pois produzem irritação nos olhos, no nariz e na garganta, além de paralisia no epitélio ciliado dos brônquios. Desse modo, o tabagismo está associado a aproximadamente 50 doenças, muitas delas incapacitantes e fatais, como câncer, doenças cardiovasculares e respiratórias crônicas (INCA, 2013).

O aumento da expectativa de vida em todo o mundo resultou em uma maior prevalência de doenças crônicas não-transmissíveis. Baccaro et al. (2015) avaliaram a prevalência e fatores associados à ocorrência de câncer entre as mulheres brasileiras. A amostra foi composta de 622 mulheres com idade superior a 50 anos. A variável dependente foi a ocorrência de um tumor maligno em qualquer local e as independentes foram características sócio-demográficas, autopercepção de saúde, hábitos relacionados com a saúde e morbidades. A idade média das mulheres era de 64,1 anos e a prevalência de câncer foi de 6,8%. Os principais locais de ocorrência de tumores malignos foram a mama (31,9%), colo-retal (12,7%), pele (12,7%) e cabeça e pescoço (8,5%). No modelo estatístico final, o único fator associado ao câncer foi que elas fumavam mais de 15 cigarros/dia, seja no momento do estudo ou no passado. Os resultados aumentaram a compreensão da prevalência e fatores associados ao câncer, encorajando a população a manter um estilo de vida saudável e a ter uma atenção especial aos fatores de risco modificáveis, como o tabagismo.

Por outro lado, ainda não é claro se o cigarro pode levar a uma diminuição da densidade óssea, aumentando assim o risco de fratura de quadril em mulheres. Uma meta-análise realizada por Shen et al. (2015), que agruparam resultados de 10 estudos prospectivos, teve como objetivo a obtenção de uma estimativa mais precisa entre o tabagismo e o risco de fratura do quadril em mulheres. As estimativas de risco



foram calculadas usando tanto um modelo aleatório como de efeitos fixos. Heterogeneidade entre os artigos e os seus vieses também foram testados. Foi encontrado um risco significativamente aumentado nas atuais fumantes do sexo feminino. A associação foi significativa entre mulheres fumantes em altas doses (mais de 15 cigarros por dia), e não entre os de baixa doses (menos de 15 cigarros por dia). Os autores concluíram que o tabagismo está associado a um aumento do risco de fratura de quadril em mulheres. Dada a inconsistência entre os ajustes nas escolhas dos estudos, as associações entre tabagismo e risco de fratura de quadril em mulheres precisam de uma investigação mais aprofundada.

A dependência dos fumantes os deixa sujeitos a inalação de mais de 4.720 substâncias tóxicas, como: monóxido de carbono, amônia, cetonas, formaldeído, acetaldeído, acroleína, além de 43 substâncias cancerígenas, sendo as principais: arsênio, níquel, benzopireno, cádmio, chumbo, resíduos de agrotóxicos e substâncias radioativas, mas a real dependência ocorre pela presença da nicotina nos produtos à base de tabaco (INCA, 2016).

A nicotina presente no cigarro, ao ser inalada produz alterações no sistema nervoso central, modificando o estado emocional e comportamental dos indivíduos, da mesma forma como ocorre com a cocaína, heroína e álcool. Depois que a nicotina atinge o cérebro, entre 7 a 19 segundos, são liberadas várias substâncias (neurotransmissores) responsáveis por estimular a sensação de prazer. Com a inalação contínua da nicotina, o cérebro se adapta e passa a precisar de doses cada vez maiores para manter o mesmo nível de satisfação que tinha no início. Esse efeito é chamado de "tolerância à droga". Com o passar do tempo, o fumante passa a ter necessidade de consumir cada vez mais cigarros. Com a dependência, cresce também o risco de se contrair doenças crônicas não transmissíveis, que podem levar à invalidez e à morte (INCA, 2016).

### **2.1.1. Nicotina**

Pinto et al. (2002) avaliaram, mediante a análise histológica, a influência da nicotina no processo de reparo de alvéolos dentários em ratos. Foram utilizados oitenta animais, os quais foram divididos em 4 grupos: 2 controles e 2 tratados. Nos

dois grupos tratados, os animais receberam uma e duas doses diárias de solução de hemissulfato de nicotina, respectivamente. Nos dois grupos controles, os animais receberam solução salina estéril de acordo com o protocolo estabelecido para o grupo tratado. Todas as soluções foram aplicadas subcutaneamente, durante todo o período experimental até o dia do sacrifício (3, 7, 18 e 25 dias após a exodontia). A análise dos resultados mostrou que a nicotina atrasa o processo de reparo alveolar, especialmente na organização do tecido conjuntivo e osteogênese. A angiogênese foi consideravelmente prejudicada na área de ossificação assim como no tecido gengival. Dentro dos limites desse estudo, foi concluído que o atraso no processo de reparo alveolar foi diretamente relacionado à dosagem da droga injetada.

Machado et al. (2010) avaliaram os efeitos da nicotina e ovariectomia sobre o reparo ósseo alveolar após exodontia em ratos. Foi realizada a ovariectomia nas 80 ratas aos 120 dias de vida. Depois de 30 dias, todos os animais receberam 2 injeções diárias de solução salina ou de hemissulfato de nicotina por um período de 4 semanas. Após este período, a exodontia foi realizada e após 24 horas deste procedimento a administração da nicotina continuou até o momento da eutanásia nos dias 7 e 14, quando os alvéolos foram removidos para análises posteriores. Os dados confirmaram que a nicotina atrasa de forma significativa o processo de reparo alveolar após a exodontia, em aproximadamente 50%, e que a associação de nicotina com ovariectomia exacerba estes resultados. Concluíram que a nicotina potencializou o efeito da deficiência de estrogênio sobre o reparo ósseo induzido por ovariectomia.

A nicotina é um dos principais alcaloides do tabaco, que pode aumentar a formação de radicais livres, levando a osteoporose. Os efeitos da administração da nicotina sobre a histomorfometria óssea e biomarcadores foram estudados por Hapidin et al. 2011, em 28 ratos Sprague-Dawley. Os ratos com idades de 3 meses e pesando 250-300 g foram divididos em quatro grupos: controle (C), nicotina por 2 meses (N2), nicotina por 4 meses (N4), e cessação da nicotina (NC). O grupo NC teve administração da nicotina por dois meses e, nos próximos dois meses do estudo tiveram a cessação da nicotina. A análise histomorfométrica foi realizada por meio de um analisador de imagem. Kits de ELISA foram utilizados para medir a osteocalcina sérica (marcador da formação óssea) e piridinolina (PYD, marcador da reabsorção óssea), medidos no início, ao segundo e quarto mês. Todos os grupos mostraram uma diminuição significativa no volume do osso trabecular, superfície dos osteoclastos,

superfície duplamente rotulada da taxa de formação óssea, taxa de aposição mineral, taxa de formação óssea, assim como os níveis de osteocalcina, e houve um aumento na única superfície rotulada da taxa de formação óssea e os níveis de PYD quando comparado com o grupo C. Não houve diferença significativa em todos os parâmetros entre os grupos testados, exceto para a taxa de aposição mineral e taxa de formação óssea. Em conclusão, a administração de nicotina numa dose de 7 mg/kg durante 2 e 4 meses tem efeitos prejudiciais sobre o metabolismo ósseo. A administração de nicotina de 7 mg/kg por 2 meses é suficiente para produzir efeitos significativos sobre os parâmetros histomorfométricos e biomarcadores. Além disso, prolongar o tratamento por mais de 2 meses não mostrou diferença significativa. A cessação de nicotina por 2 meses não reverteu os efeitos

## **2.2 Radioterapia**

A radioterapia é um método capaz de destruir células tumorais, empregando feixe de radiações ionizantes. Uma dose pré-calculada de radiação é aplicada, em um determinado tempo, a um volume de tecido que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circunvizinhas, à custa das quais se fará a regeneração da área irradiada. A resposta dos tecidos às radiações depende de diversos fatores, tais como a sensibilidade do tumor à radiação, sua localização e oxigenação, assim como a qualidade e a quantidade da radiação, bem como o tempo total em que ela é administrada INCA (2013).

Apenas dados limitados estão disponíveis sobre os efeitos da radiação terapêutica no conteúdo mineral do osso em mulheres com menopausa tratadas para alguma condição patologia maligna. A incidência da osteopenia varia entre 8 e 23%, e os fatores que influenciam a atrofia óssea não estão claros em pacientes com câncer e tratados com altas doses de radioterapia local. Hopewell (2003) estudou as alterações no tecido dos pacientes, indicando um papel claro das alterações vasculares no desenvolvimento da osteopenia, embora haja alguma incerteza quanto aos efeitos de perda de osteoblastos. A circulação sanguínea reduzida no osso está claramente relacionada com a dose em estudos com animais experimentais e após

doses únicas de >20Gy alterações no conteúdo mineral ósseo foram encontradas. No entanto, este foi apenas em tempos tardios ( $\geq 30$  semanas).

Em 2006, Hamilton et al. apresentaram um estudo com dados de desenvolvimento de um modelo de roedores para perda de massa óssea induzida por radiação. A amostra foi constituída por quarenta e oito ratas, com nove semanas de vida expostos à radiação gama, prótons, carbono ou ferro, em doses de 2 Gy, representando tanto uma exposição fracionada de um tratamento clínico quanto uma exposição que ocorre em um voo espacial. Foi realizada a eutanásia dos animais aos 110 dias após a irradiação. A tíbia, a região proximal do fêmur e as diáfises foram analisadas por meio de micro-TC. Os resultados demonstraram mudanças profundas na arquitetura óssea trabecular. Perdas significativas na relação de volume ósseo trabecular foram observadas para todos os tipos de radiação: gama (-29%), prótons (-35%), carbono (-39%) e ferro (-34%). A densidade, a espessura, o espaçamento e o número de trabéculas também foram afetados. Os autores identificaram que houve uma perda significativa de osso trabecular nos ratos irradiados com todos os tipos de radiação (dose de 2Gy) com implicações tanto para pacientes de radioterapia, uma vez que a perda óssea num modelo animal foi demonstrada em doses baixas, quanto para os astronautas em missões espaciais, em que a radiação do espaço tem o potencial de exacerbar a perda óssea.

Chicarelli et al. (2007) avaliaram o processo de reparo ósseo em ratas ovariectomizadas submetidas ao procedimento de irradiação. Selecionaram uma amostra de cem ratas, a qual foi dividida aleatoriamente em quatro grupos experimentais: controle, ovariectomizadas, irradiado e ovariectomizadas/irradiado. Um defeito ósseo foi confeccionado nas tíbias de todos os animais. Três dias após a cirurgia, apenas os animais pertencentes aos grupos irradiado e ovariectomizado/irradiado receberam 8 Gy de radiação gama na região onde foi produzido o defeito ósseo. A eutanásia dos animais foi no tempo de 7, 14, 21 e 28 dias após a cirurgia. A partir de análises morfológica e estrutural, foi possível observar um atraso no processo de reparo ósseo nos animais do grupo ovariectomizado/irradiado, no qual houve uma marcante associação entre a deficiência de estrogênio e radiação ionizante, resultando na redução da produção de osso neoformado.

---

Kondo et al. (2009) determinaram se uma única dose de radiação aguda compromete a integridade estrutural do esqueleto pós-puberdade. Ratos machos, com 18 semanas de idade, foram expostos à radiação gama ( $^{137}\text{Cs}$ ) com doses de 1 Gy ou 2 Gy. O osso trabecular foi analisado por micro-TC nos tempos de 03 ou 10 dias após a irradiação, em controles basais (tecidos coletados da área irradiada) e em controles pareados por idade. A dose de 2 Gy de radiação gama causou uma diminuição de 20% na relação de volume ósseo trabecular da tíbia dentro de 3 três dias e uma redução de 43% no período de 10 dias, ao passo que 1 Gy de radiação gama causou uma redução de 28% após 10 dias. A redução da relação de volume ósseo trabecular ocorreu devido ao aumento do espaçamento e diminuição da espessura das trabéculas. A radiação também aumentou o índice de reabsorção óssea e diminuiu a relação de volume ósseo trabecular da vértebra lombar um mês após a irradiação, mostrando a persistência da perda de osso esponjoso, embora as propriedades mecânicas, analisadas por teste de compressão, não tenham sido afetadas. Os autores concluíram que uma única dose de radiação gama aumentou rapidamente o número de osteoclastos no tecido esponjoso comprometendo a microarquitetura desse tecido e a remodelação do esqueleto de ratos pós-púbere.

Muitos pacientes com metástases ósseas sintomáticas recebem radiação terapêutica, mesmo que esta seja conhecida por apresentar potenciais efeitos adversos no osso. Tendo em vista essa situação, Arrington et al. (2010) partiram da hipótese de que o uso concomitante de uma droga como os bisfosfonatos (ácido zoledrônico) ou uma combinação de ácido zoledrônico mais um agente anabólico (hormônio da paratireóide) levaria a melhorias na microarquitetura e propriedades mecânicas do osso irradiado. Células de câncer de mama humana foram injetadas na região distal do fêmur de 56 ratas, divididas em quatro grupos: sem tratamento (0 Gy), radiação administrada 4 semanas pós-injeção (20 Gy), radiação (20 Gy) e ácido zoledrônico, e radiação seguida de ácido zoledrônico e hormônio da paratireóide. Os membros esquerdos serviram como grupo controle. A perda óssea sobre o grupo de 12 semanas foi acompanhada por meio de radiografias seriadas e densitometria óssea. No final do estudo, imagens por micro-TC e testes mecânicos foram utilizados para quantificar a microarquitetura e a resistência ósseas. A radiação isoladamente não foi capaz de tratar o tumor induzido e diminuiu a densidade mineral óssea, o volume de osso trabecular e a resistência óssea. Os tratamentos com radiação+ ácido

zoledrônico ou radiação + ácido zoledrônico + hormônio da paratireóide foram eficazes na preservação da arquitetura óssea trabecular e da resistência óssea em níveis normais. O tratamento com o ácido zoledrônico reduziu o risco de fragilidade mecânica após a irradiação de lesão lítica no osso. Os autores concluíram que utilização suplementar de hormônio da paratireóide não resultou no maior aumento da resistência óssea, mas esteve associado com aumentos significativos na densidade mineral óssea e no volume de massa óssea, o que sugere ser vantajoso na melhoria da arquitetura óssea após o uso da radiação terapêutica.

Os objetivos de Willey et al. (2010) foram identificar se a radiação aumenta a reabsorção óssea, e se a perda óssea pode ser prevenida por meio da administração de risedronato. Cento e quinze ratas com 20 semanas de idade foram divididas nos seguintes grupos: não irradiadas e tratadas com placebo; irradiadas com 2 Gy de radiação X e tratadas com placebo, ou irradiadas com 2 Gy e tratadas com risedronato (30µg/kg a cada dois dias). Realizou-se a eutanásia dos animais 1, 2, e 3 semanas após a irradiação. A análise por micro-TC foi realizada em três locais: metáfise proximal da tíbia; metáfise distal do fêmur e corpo da quinta vértebra lombar. A histomorfometria dinâmica do osso cortical e trabecular foram realizadas. Segundo os autores, nas ratas irradiadas e tratadas com risedronato, a redução da relação entre o volume trabecular e o volume ósseo total em relação aos animais não irradiados foi observada em todos os três locais do esqueleto e tempos de sacrifício. Da mesma forma, a perda do número e conectividade trabecular induzida por radiação no grupo irradiado tratado com placebo foi observada em todos os locais do esqueleto durante o estudo. Os autores observaram que a perda óssea ocorreu principalmente durante a primeira semana após a irradiação e a formação de osso trabecular e cortical não sofreu redução até a segunda semana. Notaram ainda que não houve perda de volume ósseo no grupo irradiado tratado com risedronato. Na histologia observaram um maior número de osteoclastos na primeira semana no grupo irradiado tratado com placebo. Sobre os grupos tratados com risedronato afirmaram que esse bisfosfonato impediu o aumento no número de osteoclastos induzido pela radiação. Os autores concluíram que após a irradiação do corpo inteiro ocorreu uma rápida perda de osso trabecular e que o risedronato evita a perda óssea provavelmente induzida pela radiação.

Para pesquisa de câncer, estudos pré-clínicos *in vivo* utilizando pequenos animais tornaram-se indispensáveis para associar com as experiências com células *in vitro* e a aplicação clínica. No levantamento dessas pequenas experiências com animais, vários aspectos biológicos, técnicos e metodológicos têm que ser considerados. Neste trabalho Tillner et al. (2014) apresentaram uma revisão abrangente baseado em publicações relevantes das técnicas de irradiação utilizados para a investigação pré-clínica do câncer em ratos. Dispositivos clínicos de tratamento como a radioterapia para a aplicação da radioterapia externa e braquiterapia, bem como dispositivos dedicados a investigação da irradiação são viáveis para a irradiação de animais pequenos, dependendo do modelo animal e os objetivos experimentais. Neste trabalho, mostrou-se soluções adequadas para a transferência de tecnologia da radiação oncológica humana para investigações em animais pequenos.

A radioterapia está sendo implementada mediante o uso de animais pequenos em programas de investigação pré-clínicos em todo o mundo. Butterworth et al. (2015) relataram sobre a situação e os desenvolvimentos da radioterapia no campo animal, sugerindo critérios para a concepção e execução de estudos eficazes que contenham esta poderosa tecnologia emergente, utilizado como ferramenta muito promissoras para o impacto translacional da radiação em oncologia.

Tratamento de carcinomas dos sistemas digestório e respiratório, muitas vezes requer radioterapia externa. No entanto, a radiação afeta todos os componentes do osso, com diferentes graus de sensibilidade, e pode produzir efeitos secundários graves, tais como osteoradionecrose mandibular (ORN). A vascularização intra-óssea parece diminuir após a irradiação, mas o seu impacto no volume ósseo total ainda é polêmico. Michel et al. (2015) compararam a vascularização intra-óssea, espessura do osso cortical e o volume do osso em ratos com osteoradionecrosis contra ratos não irradiados, mediante a micro-TC com um agente de contraste. O estudo foi realizado em 14 ratos Lewis 1A de 8 semanas de idade. Onze ratos foram submetidos a irradiação externa nos membros posteriores com uma única dose de 80 Gy. Três ratos não receberam irradiação e serviram como controle para análise estatística. Oito semanas após a radioterapia, todos os animais receberam uma injeção de sulfato de bário intracardíaco sob anestesia geral. Todas as amostras foram analisadas com uma resolução de 5.5  $\mu\text{m}$ . As imagens foram posteriormente processadas para criar reconstruções 3D e estudar a vascularização do osso, o volume ósseo, e espessura

da cortical. A espessura cortical diminuiu severamente após a irradiação. O osso trabecular e cortical foram destruídos após a irradiação, com amplas falhas ósseas. Finalmente, tanto o volume ósseo total ( $p = 0,0001$ ) e a espessura cortical ( $p = 0,0001$ ) foram reduzidos nas tíbias irradiadas comparando com o grupo controle de forma significativa. Este estudo revelou o impacto da radiação na vascularização intra-óssea e no osso cortical mediante a micro-TC.

### **2.3. Osteoporose**

Parfitt (1987) descreveu a osteoporose como sendo um desequilíbrio entre a ação dos osteoblastos, células responsáveis pela deposição óssea, e a ação dos osteoclastos, responsáveis pela destruição óssea, que acarreta uma maior reabsorção óssea em detrimento da deposição. Nesse contexto, os espaços medulares tornam-se maiores, devido à remoção completa de partes de suas paredes ósseas, e os espaços medulares que estão previamente separados por trabéculas ósseas coalescem. Esse processo inicia-se com perfuração focal do osso trabecular e progride para o alargamento das perfurações, criando assim fenestrações ósseas e cavitação subendosteal no interior do córtex. Dessa forma, esse desequilíbrio terá como consequências o aumento do espaço trabecular e o adelgaçamento da cortical óssea. Além disso, realizaram um estudo onde padronizaram a nomenclatura, símbolos e unidades referentes ao estudo da histomorfometria óssea, com a finalidade de facilitar a comunicação e entendimento de novos estudos e tecnologias, sendo esta padronização utilizada nas análises ósseas em micro-TC.

Finkelstein (1998) classificou a osteoporose em dois tipos: I e II. A osteoporose tipo I também denominada osteoporose pós-menopausa, caracterizada clinicamente por fraturas vertebrais. A osteoporose tipo II ou senil é aquela resultante do processo de envelhecimento normal do organismo, ocorrendo tanto em mulheres quanto em homens, estando associada a uma redução mais equilibrada da massa óssea cortical e trabecular, sendo comum a ocorrência de fraturas do quadril, pelve, punho, úmero proximal e corpos vertebrais.

A ovariectomia em ratas é amplamente utilizado em pesquisas de osteoporose, mas não existe um modelo padrão em todos os ossos. Francisco et al. (2011)



---

examinaram os efeitos individuais da idade, local esquelético afetado, e o tempo pós-ovariectomia, na densidade e conteúdo mineral, assim como a microarquitetura do osso. No entanto, as relações entre eles não estão ainda totalmente exploradas. Os ratos usados foram de 12 (n = 28), 24 (n = 28), e 44 (n = 31) semanas de idade. Em cada grupo de idade, cerca de metade foram submetidos a ovariectomia e outra metade passou por cirurgias *sham*. O conteúdo e densidade mineral, assim como a morfologia trabecular foi avaliada às 2, 5, 10, 15, 20, 25, e 30 semanas pós-cirurgia. Os locais examinados incluíram a tíbia proximal, coluna, fêmur distal e fêmur proximal. No geral, a tíbia proximal mostrou as diferenças mais precoces e maiores entre os grupos com e sem ovariectomia. O grupo de 24 semanas de idade, mostrou a melhor resposta osteoporótica. O grupo de 12 semanas de idade, mostrou efeitos do crescimento, enquanto que o grupo de 44 semanas de idade, mostrou os efeitos do envelhecimento; mas de um modo geral, entre os parâmetros examinados na deterioração microarquitetônicas foi detectada precocemente nas ratas ovariectomizadas com 12 semanas, em comparação com as de 24 e 44 semanas. A resposta de certos locais à ovariectomia também verificou-se que dependem da idade do rato utilizado. Estes resultados podem ajudar a explicar as discrepâncias relatadas na literatura, bem como combinações sinérgicas que pode significar condições avançadas.

Os métodos de diagnósticos relatados no trabalho de Adams et al. (2013) no manejo da osteoporose mostra que têm sido melhoradas pelo desenvolvimento de novos métodos de avaliação quantitativa do esqueleto e pela disponibilidade de um número cada vez maior de opções terapêuticas, respectivamente. Existem inúmeros métodos de imagem e todos têm vantagens e desvantagens. A absorção por dupla emissão de Raios X (DEXA) é o método mais amplamente disponíveis e comumente utilizada para o diagnóstico clínico da osteoporose. Para a avaliação quantitativa as tomografias computadorizadas (TC) permanecem predominantemente como uma ferramenta de pesquisa, mas tem vantagens sobre a DEXA já que permite a medição da densidade volumétrica, medidas separadas de densidade óssea cortical e trabecular, e avaliação da forma e tamanho do osso. Imagens com alta resolução, usando tanto TC e ressonância magnética (RM), foram introduzidas para medir a microestrutura do osso trabecular e cortical. Embora estes métodos fornecem

informações detalhadas sobre os efeitos da doença e terapias no osso, eles são tecnicamente desafiadores e não amplamente disponíveis.

Bauer et al. (2015) realizaram um modelo experimental em ratos para avaliação do metabolismo ósseo e de energia em fases precoces e tardias da osteoporose. Para a fase inicial, a hipótese dos autores foi de que a ovariectomia bilateral (OV) + dieta multideficiente (depleção de vitamina D, cálcio, vitamina K e fósforo) induziria o aumento da remodelação óssea, enquanto para a fase tardia seria caracterizada pelo aumento do catabolismo ósseo. Usou-se 41 ratas *Sprague Dawley* saudáveis com 10 semanas divididas aleatoriamente em grupos de *sham* e de tratamento, sacrificadas em 3, 12, e 14 meses depois do início do estudo. Nos resultados encontrou-se que houve uma diminuição na densidade mineral óssea de todo o corpo e no volume ósseo da vertebra (BV/TV) mediante a absorção por dupla emissão de Raios X e a micro-TC, a qual foi mais grave nos últimos estágios da doença, indicando o catabolismo ósseo. Concluindo que os marcadores do metabolismo ósseo e energia refletem no aumento da remodelação óssea algumas vezes associada à hiperinsulinemia inicial.

Como em outras condições patológicas, o diagnóstico da osteoporose é feito pela história clínica, exame físico e exames complementares. Já para o diagnóstico por imagens, utilizam-se as radiografias e a densitometria óssea. O exame radiográfico pode mostrar diminuição da densidade óssea, porém não dão quantificação da perda óssea. Em geral, a perda óssea ocorre gradualmente com o passar dos anos e para isso é usada a densitometria óssea, para determinar a extensão da perda e para verificar a eficácia da prevenção ou tratamento.

### **2.3.1. Densidade Radiográfica**

Nackaerts et al. (2006) desenvolveram o *software Osteop* com uma ferramenta de densitometria digital para o osso da mandíbula mediante a análise de radiografias intraorais. Para avaliar a precisão e exatidão desta ferramenta e determinar o limiar de detecção mínimo das mudanças mediante a densidade, foram selecionadas amostras ósseas decorrentes da região pré-molar de 47 mandíbulas humanas. Uma radiografia digital foi realizada em todas as amostras para mensurações que serviram como padrão ouro da densidade e permitiu a determinação da precisão. A absorção

de raios X de dupla energia (DEXA) foram realizadas em todas as amostras. Para todas as radiografias, a densidade equivalente em mmAl foi calculada utilizando o *software Osteop*. As amostras foram descalcificadas progressivamente, em intervalos de tempo padrão calculando a percentagem de descalcificação. Em cada etapa da descalcificação, radiografias foram realizadas e analisadas mediante a DEXA e densidade no volume pelo princípio de Arquimedes. A correlação entre as medições de densidade em mmAl e os resultados da DEXA foi de 0,9; já para as medidas de densidade em mmAl e as medidas da densidade no volume foi de 0,5. O *software* foi capaz de detectar a alteração na mineralização óssea de 6,6%. O presente método de análise de densitometria óssea radiográfica oferece potencialidades para avaliação clínica de densidade óssea e alterações mínimas de densidade óssea no osso maxilar.

Erdogan et al. (2009) avaliaram a relação entre os achados dentais e a osteoporose em mulheres na pós-menopausa. Cento e oito mulheres na pós-menopausa foram recrutados para o estudo. Todas as participantes foram submetidas a absorção de raios X de dupla energia (DEXA). Foram determinados o número de dentes remanescentes, perda de inserção clínica, profundidade de bolsas periodontais e de mobilidade de cada dente. A análise da densidade radiográfica foi realizada em radiografias periapicais digitais, utilizando a técnica de escala de alumínio. O aparecimento do córtex mandibular ínfero-posterior da região forame mental foi pontuada de acordo com a classificação de Klemetti. O número de dentes remanescentes, valores de perda de inserção, pontuações do Índice Klemetti e os escores da densidade radiográfica mostraram uma relação significativa com a densidade óssea do esqueleto. Concluindo que a perda do dente, um aumento do nível de inserção clínica, redução da densidade em radiografias periapicais digitais e uma aparência corroída do córtex mandibular inferior em radiografias panorâmicas estão associados com a baixa densidade mineral óssea do esqueleto

Técnicas precisas para medir a densidade mineral óssea (DMO) da maxila são úteis para o diagnóstico precoce de doenças sistêmicas. Lucisano et al. (2013) compararam a eficácia da absorção de raios X de dupla energia (DEXA) e densitometria radiográfica *in vivo* para medir a densidade mineral óssea após a administração sistêmica de alendronato de sódio. Treze ratos *Wistar* foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos, cinco no grupo controle, os quais

receberam água destilada, e oito no grupo alendronato de sódio, que receberam duas doses de alendronato de sódio quimicamente purificado (1 mg/kg), por uma semana. Após 8 semanas, os animais foram sacrificados, as tíbias foram removidas, e a DMO da metáfise da tíbia foi analisada radiograficamente e por DEXA. Ambas as técnicas revelaram que o grupo tratado com alendronato tinha um aumento significativo da DMO ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo de controlo ao final de 8 semanas de tratamento. Comparando-se os grupos com e sem terapia de alendronato, houve aumento de 14,9% e 29,6% na DMO, detectado pela radiografia e por DEXA, respectivamente. Em conclusão, os dois métodos foram capazes de detectar um aumento da DMO na tíbia após o tratamento com o alendronato.

Hirvasniemi et al. (2016) investigou a relação entre a densidade óssea e parâmetros da estrutura óssea entre imagens bidimensionais e tridimensionais, por meio de radiografias e a micro-TC *ex vivo* respectivamente. As tíbias do lado direito de 11 cadáveres humanos sem doença articular diagnosticada foram usadas realizando a aquisição da radiografia e a micro-TC. A densidade óssea e os parâmetros relacionados com a estrutura óssea foram calculados em quatro localizações diferentes; para as radiografias usaram o valor da escala de cinza equivalente ao alumínio, tendo em conta que os parâmetros de aquisição das imagens e algoritmos de pós-processamento pode afetar a avaliação da densidade óssea nestas imagens, mas para superar este problema, foram propostas calibrações dos valores de tons de cinza mediante o uso de uma escala de alumínio. No caso da análise por meio da micro-TC usaram os seguintes parâmetros BV/TV; Conn.Dn; Tb.Th; Tb.Sp; Tb.N e SMI. Concluindo que houve uma correlação significativa entre os parâmetros obtidos na radiografia quando comparado com a arquitetura tridimensional observadas na análise por micro-TC. Portanto a estimativa da densidade óssea a partir de imagens bidimensionais é considerada viável.

Osterhoff et al. (2016) mostraram a importância de conhecer a arquitetura trabecular e cortical no que diz respeito ao seu efeito sobre a resistência mecânica do osso. Para cada um desses fatores, as mudanças observadas na osteoporose e no envelhecimento devem ser descritas, pois os mesmos podem comprometer a resistência e, eventualmente, levar à fragilidade óssea. Desse modo, ressalta-se a importância de se conhecer a duração e localização anatômica para avaliação dos efeitos da deficiência do estrogênio na mineralização óssea trabecular e cortical, que

atualmente vem sendo avaliados pela microtomografia em estudos de experimentação animal. Além disso, estes autores citaram que o número de trabéculas, espessura trabecular e o grau de conectividade influenciam na resistência mecânica do osso. Os autores concluíram que a perda óssea na osteoporose precoce é principalmente trabecular, aumenta com a idade, e torna-se também endo e intracortical.

### **2.3.2. Microtomografia Computadorizada**

A microtomografia computadorizada tornou-se o " padrão de ouro " para avaliação da morfologia e microarquitetura óssea em animais pequenos ex vivo e in vivo. A microTC utiliza dados da atenuação dos raios X adquiridos em vários ângulos de visão para reconstruir uma representação tridimensional do espécime analisado sem destruí-lo. Existem inúmeras vantagens de se utilizar a microTC para a avaliação da morfologia do tecido ósseo, permitindo a medição direta da morfologia tridimensional deste tecido. Assim, as amostras podem ser posteriormente utilizadas para outros ensaios, tais como ensaios mecânicos ou histológicos. Além disso, esta tecnologia pode fornecer uma estimativa da mineralização do tecido ósseo por atenuação de raios X. Estes dados da densidade mineral óssea, juntamente com a morfologia de alta resolução do osso determinado a partir de dados da microTC, também pode ser usado para criar modelos para análise mediante elementos finitos, estimando o comportamento mecânico (Parfitt et al. 1987).

A osteoporose pós-menopausa é um distúrbio do excesso de fragilidade esquelética, devido em parte a alterações na microestrutura do osso. No entanto, o mecanismo e natureza das alterações microestruturais na menopausa necessitam de mais análises e uma descrição detalhada. Akhter et al. (2007) testaram a hipótese geral de que as variáveis que descrevem a microarquitetura óssea trabecular são afetadas por mudanças na situação hormonal das mulheres pouco antes, e logo após, a última menstruação, e que a densidade óssea volumétrica e estrutura trabecular diminuem significativamente. O estudo foi projetado para capturar verdadeiras mudanças trans-menopausa longitudinalmente na microarquitetura trabecular óssea dimensional. Realizaram-se biópsias ósseas transilíaca em mulheres saudáveis pré-

menopáusicas (idade N=46), repetindo o procedimento aos 12 meses após o último período menstrual. A arquitetura óssea foi quantificada em 38 amostras mediante a microtomografia computadorizada (micro-TC/40, Scanco). As biópsias ósseas foram digitalizadas a uma resolução de 30 micrones de tal modo que a região de interesse fosse semelhante a análises da histomorfometria bidimensional. Encontrando que houve boa correlação entre histomorfométrica bidimensional (2D) e medidas da micro-TC (3D). A maioria das variáveis que caracterizam a estrutura óssea em mulheres na pós-menopausa diminuíram significativamente (Fracção do volume ósseo BV/TV, número de trabéculas Tb.N e densidade do tecido). Além disso, tanto a separação das trabéculas (Tb.S) e o índice de modelo de estrutura (SMI) aumentaram nas mulheres na pós-menopausa, sugerindo transformação de osso trabecular. A conectividade da densidade trabecular (Conn.D) foi negativamente correlacionada com a frequência de ativação (Ac.f). Estes dados sugerem que as mensurações tridimensionais da micro-TC são comparáveis aos dados da histomorfometria padrão, e que a maior parte das medidas estruturais do osso são sensíveis a alterações pelo hormônio feminino através da menopausa.

A qualidade óssea é um índice de avaliação muitas vezes aplicado para interpretar observações clínicas feitas sobre a saúde óssea, baseada na densidade mineral óssea, micro e macro-arquitetura, e conteúdo mineral. Técnicas de inspeção convencionais não fornecem informações completas sobre a qualidade do osso trabecular. Sales et al. (2012) mostraram que microtomografia de raios X e a microfluorescência são técnicas com potencial para avaliação da qualidade óssea por produzirem imagens de alta resolução e caráter não-destrutivo. A avaliação do conteúdo mineral foi realizada por mapeamentos de concentração bidimensionais do cálcio, zinco e estrôncio. Os autores usaram 10 ratas com diferentes idades, e as vertebbras lombares foram usadas para a análise. Os resultados mostraram alterações significativas na morfologia óssea, no grupo mais velho mostraram uma diminuição na percentagem do volume do osso (BV / TV), o que significa um aumento da porosidade da matriz óssea. O parâmetro número de trabéculas (Tb.N) sofreu mudanças significativas, que podem refletir no incremento do espaçamento das trabéculas (Tb.Sp). Concluindo que houve uma mudança de acordo a idade do animal, este tipo de mudança também ocorre em seres humanos, e pode levar a um indivíduo a

desenvolver o que os médicos chamam de osteoporose de tipo II, também conhecida como osteoporose senil.

Yoon et al. (2012) verificaram se a ovariectomia em ratas é adequado como o modelo de osteoporose em animal mediante análise por microtomografia. Doze ratas *Sprague-Dawley* foram submetidos a uma operação simulada de ovariectomia (grupo *sham*) e o outro grupo a ovariectomia bilateral (grupo OV). Oito semanas após as operações, marcadores bioquímicos séricos de renovação óssea foram analisados; assim como os parâmetros histomorfométricos e propriedades da microarquitetura óssea na quarta vértebra lombar foram determinados pela micro-TC. Na análise na micro-TC da vértebra lombar, o grupo OV demonstrou redução significativa de 9,1% na fração do volume do osso trabecular (BV/TV) ( $p = 0,002$ ). Além disso, os ratos OV mostraram uma diminuição significativa na espessura trabecular (Tb.Th) ( $p=0,011$ ) e um aumento significativo na separação das trabéculas (Tb.Sp) ( $p=0,006$ ), quando comparado com o grupo *sham*. No entanto, o número de trabéculas (Tb.N) no grupo OV eram mais baixos do que no grupo *sham* ( $4,2 \pm 0,6$  no grupo simulado e  $3,8 \pm 0,5$  no grupo OV), que não foi significativamente diferente ( $p=0,351$ ). Os resultados mostraram que a remodelação óssea foi significativamente aumentada e a massa óssea foi diminuída significativamente após 8 semanas da ovariectomia. Assim, propõe-se que o modelo de ratas ovariectomizadas deve sim ser considerado reprodutível e fiel para indução de osteoporose.

Dai et al. 2014 investigaram as alterações de porosidade no osso alveolar maxilar em ratas ovariectomizadas. Trinta e duas ratas *Sprague-Dawley* de 6 semanas de idade foram divididas em dois grupos com e sem ovariectomia. Doze semanas após a cirurgia, a maxila de 16 ratas (8 de cada grupo) foram analisadas por micro-TC. O osso alveolar interradicular do primeiro molar superior foi reconstruído e analisado. As restantes 16 maxilas foram usadas para análise histoquímica, incluindo coloração com hematoxilina-eosina e coloração da enzima fosfatase ácido resistente ao tártarato. As imagens tridimensionais do osso alveolar irregular mostraram mudanças no osso trabecular no grupo ovariectomizado. O osso trabecular em ratas ovariectomizadas tinham uma microarquitetura com menor massa óssea e uma estrutura mais flexível das trabéculas já que se encontravam mais amplamente separadas. A densidade mineral óssea (DMO), fração de volume ósseo (BV/TV), e espessura trabecular (Tb.Th.) foram significativamente menores no grupo

ovariectomizado do que aqueles no grupo simulado ( $p < 0,05$ ). A separação trabecular (Tb.Sp.) aumentou significativamente nas ratas ovariectomizadas em comparação com o outro grupo ( $p < 0,05$ ). Histomorfometricamente, o osso alveolar também revelou alterações no osso trabecular nas ratas ovariectomizadas. A área óssea diminuiu significativamente no grupo ovariectomizado ( $p < 0,01$ ). Houve também, mais osteoclastos presentes no osso trabecular destas ratas ( $p < 0,05$ ). Concluiu-se que a ovariectomia induz a osteoporose no osso trabecular em ratas, e pode estar relacionada ao aumento do número de osteoclastos e à presença de microarquitetura com menor massa óssea, assim como uma estrutura mais flexível.

Os bisfosfonatos são eficazes para o tratamento da osteoporose apesar dos recentes relatos de preocupações de segurança: como a fratura atípica do fêmur. Jha et al. 2015, conduziram uma análise ecológica de relatórios relevantes da mídia, sobre o uso de bifosfonatos orais, e os resultados de fratura nos Estados Unidos. Tendências dos relatos da mídia e o interesse público dos bisfosfonatos foram quantificados utilizando dados do Google Trends. Os dados do Medical Expenditure Panel Survey (MEPS) e do National Inpatient Sample (NIS) foram utilizados para estimar as tendências no uso de bifosfonatos orais nos pacientes com idades entre 55 anos a mais e hospitalizados por fraturas intertrocantéricas e subtrocantéricas. Estas tendências na prevalência do uso de bifosfonatos orais e a taxa de incidência das fraturas intertrocantéricas e subtrocantéricas de acordo com a idade dos pacientes foram examinados, de 1996 a 2012. Uma série de picos na pesquisa na internet da atividade do alendronato (Fosamax) ocorreram entre 2006 e 2010 imediatamente após relatos da mídia com relação as preocupações de segurança. A utilização de bifosfonatos orais diminuiu mais de 50% entre 2008 e 2012 ( $p < 0,001$ ) depois do aumento crescente da utilização por mais de uma década. O declínio foi mais comum em pacientes com níveis de educação mais baixos. As fraturas intertrocantéricas do quadril declinaram desde 1996 a 2006 ( $p < 0,001$ ) e continuaram declinando desde o 2008 a 2012 ( $p < 0,05$ ). As fraturas subtrocantérica e diafisárias apresentaram um aumento constante e significativo a partir do 2002 até o 2011 ( $p < 0,05$ ). No entanto, a incidência diminuiu de um pico de 30,5 por 100.000 em 2011 para 26,7 por 100.000 em 2012. A ideia e subsequentemente o declínio na utilização de bifosfonatos orais desde 2006 coincidiu com reportes sobre as preocupações de segurança dos bisfosfonatos, apesar de que os relatórios da US Food and Drug



Administration (FDA) e a American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) não recomendam quaisquer restrições do uso dos bisfosfonatos.

O foco do trabalho de O'Connor (2016) foi sobre o tratamento farmacológico da osteoporose em mulheres pós-menopáusicas. Tratamento que deve ser considerado como já mencionado mediante a densitometria óssea, história de fratura, osteopenia ou uma pontuação maior ou igual a 3% no quadril e 20% em outros locais do FRAX (*Fracture Risk Assessment Tool*). Em alguns casos se possível determinar quais pacientes estão em maior risco para ocorrência de osteorradionecrose da mandíbula ou fratura femoral atípica, e assim escolher alguma droga anti-reabsorção de uma forma mais personalizada.

Dentro dos desafios gerados pela ocorrência de osteoporose estão os eventos cardíacos (por exemplo, enfarte do miocárdio) e ósseos (por exemplo, fraturas) que vão direcionar o tratamento da doença a longo prazo. Adler (2016) afirmou que os eventos cardíacos são muito menos prováveis de acontecer no paciente do que o evento ósseo, o qual deve ser seguido por avaliação e tratamento da condição. Pelo fato de que efeitos colaterais incomuns aconteçam, como osteonecrose da mandíbula e fraturas de fêmur que levam aos pacientes tomar medicações para osteoporose, particularmente agentes anti-reabsorção. Não existe nenhum procedimento padrão para o manejo da osteoporose e prevenção de fratura. A terapia atual diminui o risco de fratura por cerca de metade. A maioria dos clínicos estão mais confortável nos primeiros 5 anos de tratamento com Bisfosfonatos, já que é o período estabelecido sem causar nenhum dano.

## 2.4 Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos são análogos estáveis de pirofosfato caracterizados por uma ligação Fósforo-Carbono-Fósforo (P-C-P). Uma variedade de bisfosfonatos é sintetizada, sendo que a potência desse agente depende do comprimento e da estrutura da cadeia lateral. Os bisfosfonatos têm uma forte afinidade pela apatita óssea, tanto *in vitro* como *in vivo*, a qual serve como base para a sua utilização clínica. Esses agentes são inibidores potentes da reabsorção óssea e apresentam como

mecanismo de ação a redução do recrutamento e da atividade dos osteoclastos e aumento do apoptose dessas células (Kanis et al., 2013).

Segundo Delmas (2002), o objetivo do tratamento da osteoporose pós-menopausa é a redução da frequência de fraturas vertebrais e não vertebrais (especialmente no quadril), que são responsáveis pela morbidade associada à doença. O autor realizou uma revisão de literatura sobre o tratamento da osteoporose pós-menopausa, e os resultados dos estudos revisados mostraram que o alendronato de sódio, o raloxifeno, o risedronato, o fragmento 1-34 do hormônio da paratireóide e a calcitonina nasal, reduziram significativamente o risco de fraturas vertebrais. Além disso, uma grande redução de fraturas não vertebrais foi mostrada para o alendronato, o risedronato, e o fragmento 1-34 do hormônio da paratireóide. Cálcio e vitamina D não foram suficientes para tratar indivíduos com osteoporose, mas se mostraram úteis, especialmente em mulheres idosas. A terapia com reposição hormonal apresentou importância significativa na prevenção da osteoporose em mulheres no início da menopausa. Ainda segundo o autor, a escolha do tratamento depende da idade, da presença ou ausência de fraturas, especialmente prevalentes na coluna vertebral, e do grau de densidade mineral óssea medida na coluna vertebral e no quadril. As intervenções não farmacológicas incluem ingestão de cálcio e dieta adequada, programas de exercícios físicos, redução de outros fatores de risco para fraturas osteoporóticas e redução do risco de quedas em idosos.

Os efeitos dos bisfosfonatos sobre o esqueleto estão sendo estudados por uma ampla gama de disciplinas, incluindo endocrinologia, ortopedia, oncologia, e odontologia. O aparecimento da osteonecrose nos maxilares como um efeito colateral raro, tem estimulado o interesse em compreender como esta classe de drogas afeta a cavidade oral. Allen (2011) realizou uma revisão sobre os trabalhos recentes que descrevem como os Bisfosfonatos afetam a remodelação óssea, as propriedades dos tecidos e o reparo ósseo na cavidade oral. Procedimentos orais invasivos, como a exodontia ou colocação de implantes dentários representam algumas das cirurgias mais comuns realizadas a cada ano. Porém na literatura não está totalmente claro, se estas cirurgias são mais comuns em pacientes com câncer tratados com Bisfosfonatos do que em pacientes com câncer não tratados com Bisfosfonatos. Na sequência de uma cirurgia, como a exodontia, o alvéolo sofre uma série bem definida de etapas de cicatrização. Estes incluem formação inicial coágulo, substituição de coágulo por

tecido de granulação, formação de tecido conjuntivo e tecido pre-ósseo, preenchendo o alvéolo com tecido ósseo trabecular, e finalmente remodelação do alvéolo para produzir osso lamelar. Um número de estudos com animais começou a investigar os efeitos dos Bisfosfonatos sobre a cicatrização na cavidade oral. A cicatrização precoce pós-extração (entre 5-10 dias) é afetada, quando comparados roedores tratados com Bisfosfonatos, os quais apresentaram menos de metade da quantidade de osso no interior do alvéolo em comparação com os grupos controles. Além disso, quanto maior o tempo de cicatrização pós-extração (entre 14-70 dias), as diferenças entre os grupos controles e os animais tratados com Bisfosfonatos quase não existem, sugerindo que os efeitos são transitórios no que diz respeito à produção de osso dentro da etapa de cicatrização. Em animais não tratados, a maior parte do osso trabecular dentro do alvéolo foi cicatrizando começando na região apical consolidando-se em osso cortical. Assim também sobressalta que na avaliação da cicatrização nos estudos com roedores não existe detalhe de como o volume ósseo está distribuído dentro da cavidade.

Os bisfosfonatos continuam sendo o tratamento de escolha para osteoporose pós-menopausa. Mas também, são também usados no tratamento da osteoporose no sexo masculino e na osteoporose induzida por glucocorticoides e em metástases ósseas. Dentre os Bisfosfonatos orais, o alendronato de sódio é recomendado como terapia de primeira escolha por proporcionar benefícios já conhecidos e apresentar baixo custo.

#### **2.4.1 Alendronato de sódio e o tecido ósseo**

Os efeitos do tratamento com alendronato por via oral sobre a qualidade óssea e remodelamento ósseo foram avaliados em mulheres com osteoporose pós-menopausa por Chavassieux et al. (1997). Para isso, biópsias ósseas transilíacas foram obtidas de 231 mulheres nos tempos de 24 meses (n=11) e 36 meses (n=120) a partir do início do tratamento com alendronato (doses entre 05 e 20 mg/dia ou placebo). Sessenta e quatro biópsias de tecido ósseo trabecular foram realizadas no tempo de 24 meses (31 a partir do grupo placebo e 33 do grupo tratado com alendronato) e 95 biópsias no tempo de 36 meses (40 a partir do grupo placebo e 55

de pacientes tratados com alendronato). As amostras de tecido ósseo esponjoso foram analisadas por histomorfometria. Nos tempos de 24 e 36 meses, a espessura, o volume e a superfície osteóide (matriz orgânica do tecido ósseo) apresentaram-se significativamente diminuídos. Os autores detectaram um aumento significativo na espessura da cortical óssea acompanhada por uma redução na profundidade da erosão em biópsias obtidas no tempo de 24 meses. Os autores afirmaram que, os resultados confirmaram que a mineralização foi normal, e que a remodelação do osso trabecular mostrou-se significativamente reduzida em indivíduos que receberam, por longo tempo, doses de alendronato. Sugeriram que o aumento observado na densidade mineral óssea pode resultar tanto de uma redução do espaço trabecular, devido a uma diminuição da frequência de ativação da remodelação óssea, quanto de uma possível tendência para um equilíbrio positivo desse processo de remodelação.

Os bisfosfonatos são utilizados clinicamente para o tratamento de anormalidades metabólicas do osso, porque são inibidores potentes da reabsorção óssea. Hikita et al. (2009) estudaram os efeitos dos bisfosfonatos sobre o reparo alveolar em ratos que foram tratados com bisfosfonatos antes da exodontia. Sessenta ratos *Wistar* foram divididos em dois grupos experimentais grupo bisfosfonato e controle. Em ambos os grupos, o segundo molar direito superior foi extraído sob anestesia geral. Os ratos do grupo bisfosfonatos foram injetados com 50 µl (1,0 mg/kg) de alendronato diretamente no osso alveolar vestibular a cada 4 dias durante 14 dias, começando 2 dias antes da exodontia. Os ratos do grupo controle foram injetados com solução salina fisiológica em vez de alendronato. Para que no final a eutanásia seja realizada aos 3, 7, 10 ou 14 dias após a exodontia, para que assim os maxilares sejam recolhidos. A morfometria óssea realizada com imagens do micro-TC e o cálculo dos parâmetros da reabsorção óssea, baseada em cortes histológicos, mostraram que a nova formação óssea no alvéolo foi atrasada no grupo tratado com bisfosfonato em relação ao grupo controle, durante os primeiros 7 dias após a exodontia, mas aos 10 e 14 dias houve um aumento do volume do tecido, volume ósseo e fracção do volume ósseo nos grupos tratados com bisfosfonatos. Concluindo que um aumento subsequente na formação de novo osso mostrou que a reabsorção óssea em ratos com bisfosfonato acabou sendo inibida.

A exodontia tem sido identificada como um importante fator de risco para a osteonecrose induzida por bisfosfonatos na mandíbula. Nesse contexto, Aguirre et al.

(2010) determinaram os efeitos do alendronato sobre o reparo ósseo dos alvéolos e no osso alveolar interdental pós exodontia em 70 ratos *Sprague–Dawley*. Os animais foram injetados por via subcutânea com o veículo ou alendronato por 3-4 semanas antes da exodontia do primeiro molar inferior, estes tratamentos foram continuados após a exodontia por períodos de 10, 21, 35 e 70 dias. Observou-se que o alendronato diminuiu a formação do osso novo, a área dos vasos sanguíneos, perímetro do alvéolo aos 10 dias pós-exodontia, mas não em dias posteriores. Além disso, os ratos tratados com alendronato aumentaram o volume ósseo alveolar interdental e altura em apenas 10 dias após exodontia. Também, houve um aumento de 2,5 vezes na porcentagem de osteocitos no osso alveolar do grupo com tratamento de alendronato em apenas 10 dias após a exodontia. Concluiu-se que o alendronato diminuiu transitoriamente a formação e vascularização no alvéolo e atrasou a remoção de osso alveolar interdental após a exodontia em ratos.

Jee et al. (2010) utilizaram a micro tomografia computadorizada (micro-TC) *in vivo* para examinar o efeito inibidor do alendronato na cicatrização de alvéolos em ratas ovariectomizadas. Vinte ratas *Sprague-Dawley*, com 5 semanas de idade, foram distribuídas aleatoriamente em três grupos: grupos operados de forma simulada, as ovariectomizadas (OV) e tratada com solução salina (0,1 mL/100 g/d) e as tratadas com alendronato (1 mg/kg/d). Os primeiros molares superiores esquerdos das ratas foram extraídos após uma semana da ovariectomia. O micro-TC *in vivo* (resolução espacial de 50x50 µm) da mandíbula foi realizado no início e em intervalos de 2 semanas durante 6 semanas. A densidade radiográfica e dimensões de osso foram analisados. Assim como os padrões de cicatrização do alvéolo foram avaliadas em cada grupo. Observou-se que as densidades radiográficas do alvéolo dos grupos tratados com placebo e alendronato aumentaram significativamente durante as primeiras 4 semanas após a exodontia ( $p < 0,05$ ). Na segunda semana, a densidade radiológica do grupo tratado com placebo aumentou, mas o aumento foi significativamente menor quando comparado com os outros grupos na quarta semana ( $p < 0,05$ ). O osso formado nos alvéolos foi identificado em todos os grupos entre a segunda e sexta semana após a exodontia. Houve uma perda significativa da altura do rebordo alveolar na segunda semana pós-exodontia em comparação com os dados iniciais, e na quarta semana em comparação com a segunda semana ( $p < 0,05$ ), exceto no grupo alendronato. Concluindo que observou-se osso recém formado

longitudinalmente nos alvéolos em todos os grupos entre a 2 a 6 semana após a exodontia. Além disso, o alendronato parece promover a cicatrização de alvéolos em ratas com deficiência de estrogênios e ajuda a na perda de osso alveolar adjacente aos locais da exodontia.

Campbell et al. (2011) examinaram o efeito do hormônio da paratireóide associado ou não ao alendronato, na microarquitetura óssea, na mineralização e na resistência óssea em ratas ovariectomizadas. Ratas *Wistar* entre 7 e 9 meses de idade foram distribuídas em cinco grupos: (1) *sham* + veículo, (2) ovariectomizado + veículo, (3) ovariectomizado + hormônio da paratireóide, (4) ovariectomizado + alendronato e (5) ovariectomizado + hormônio da paratireóide e alendronato. A micro-TC da tíbia direita foi realizada *in vivo*, nas semanas 0, 6, 8, 10, 12 e 14, sendo que as medições da microarquitetura óssea e estimativa de parâmetros mecânicos (análise de elementos finitos) foram feitas a partir das imagens. Ao final do estudo, a micro-TC da tíbia e da quarta vértebra lombar foi realizada após o sacrifício dos animais para determinar o grau de distribuição espacial da mineralização óssea. A análise dos resultados mostrou que o alendronato preservou a microarquitetura após a ovariectomia e aumentou a espessura cortical (9%,  $p > 0,05$ ) e trabecular (5%,  $p > 0,05$ ). O tratamento combinado resultou em melhorias mais acentuadas da microarquitetura óssea do que o tratamento somente com o hormônio da paratireóide, enquanto que a manutenção do estado de mineralização foi observada com o tratamento com o hormônio da paratireóide.

O efeito do alendronato na formação óssea não é tão claro como o seu efeito sobre a reabsorção. Tanoue et al. (2015) determinaram o efeito do alendronato a curto prazo sobre a formação e reparo ósseo após exodontia. Realizou-se a exodontia do primeiro molar direito da maxila. O alendronato e o hormônio da paratireóide, ou solução salina (controle de veículo) foram administrados. A eutanásia foi aos 3, 5, 7, 10, e 21 dias após as exodontias. O reparo ósseo foi determinado histomorfometricamente. Os neutrófilos, vasos linfáticos e sanguíneos foram quantificados para avaliar a cicatrização do tecido mole. A expressão do gene nas feridas foi avaliada no RNA. Além disso, o sistema de transplante ósseo foi utilizado para verificar os achados da análise da cicatrização após exodontia. A fosfatase alcalina (ALP) foi visualizado nos ossos na avaliação da atividade dos osteoblastos. O alendronato não exibiu nenhum efeito negativo sobre a formação óssea. Nas tíbias

o alendronato aumentou a massa óssea significativamente mais do que o hormônio da paratiróide. Encontrou-se que o preenchimento ósseo das cavidades pós exodontia, do grupo tratado com alendronato foi equivalente ao do controle. Os genes associados com a sinalização de proteína morfogenética do osso, tais como *bmp2*, *nog*, e *dlx5*, foram ativados no reparo ósseo dos animais tratados com alendronato. A formação óssea foi significativamente maior no grupo alendronato do que no hormônio da paratiróide. A agregação de neutrófilos e supressão da limfangiogenesis foram evidentes no tecido mole aos 21 dias após a extração, embora a cicatrização dos alvéolos foram sem complicações. Além disso, concluíram que o tratamento com alendronato a curto prazo aumentou a formação óssea, já que não houve alteração nos alvéolos.

Sabendo que alendronato de sódio e risendronato são a terapia de primeira escolha no tratamento da osteoporose pós-menopausa. Eiken & Vestergaard (2016) descreveram alternativas potenciais para substituir o alendronato por outras terapias para a osteoporose. Uma busca sistemática de *PubMed* foi conduzida para encontrar artigos que avaliam os efeitos das mudanças terapêuticas em fraturas, densidade mineral óssea (DMO), ou de marcadores de remodelação óssea. Os resultados de 11 estudos que avaliaram prospectivamente tratamento com alendronato e risendronato em mulheres com osteoporose pós-menopausa. Existem muitos trabalhos que fazem a transição do alendronato para o ácido zoledrônico e os efeitos terapêuticos se mantem em mais de 12 meses. Outras alternativas dadas foram de mudar para o ranelato de estrôncio, denosumab ou teriparatide, já que observou-se um aumento na DMO. Por outro lado, os autores concluem que são necessários mais estudos de longo prazo.

Como já se sabe, atualmente os bisfosfonatos são a primeira escolha de tratamento para a osteoporose e também são usados como tratamento paliativo das metástases ósseas. Do ponto de vista clínico, o ácido zoledrônico é atraente por um número de razões como não só diminuir osteólise relacionado com o tumor, a dor óssea e risco de fratura, mas também mostra uma atividade anticancerígena direta e indireta. Ele também tem a capacidade de atuar como um radiosensibilizador contra células tumorais, além de mostrar o potencial para diminuir a dor óssea devido à lise. (Curtis et al. 2016)

### 2.4.2 Ácido Zoledrônico e o tecido ósseo

Os Bisfosfonatos são conhecidos por aumentar a força dos ossos e, portanto, a resistência à fratura e por diminuir a reabsorção óssea osteoclástica. Estas propriedades podem permitir que os bisfosfonatos também aumentem a resistência para a reparação de fraturas. O ácido zoledrônico é um bisfosfonato potente com uma elevada ação na mineralização do osso. Amanat et al. (2007) examinaram a aplicação de uma única dose de ácido zoledrônico no reparo de fratura endocondral. Os ratos foram divididos em cinco grupos de tratamento (n=25 por grupo): controle de solução salina, o ácido zoledrônico local (0,01 mg/kg), e três grupos de ácido zoledrônico via intravenosa (0,1 mg/kg) com diferentes tempos de administração: no momento da fratura, uma semana depois fratura, e 2 semanas após a fratura. Os ratos foram sacrificados 6 semanas após a cirurgia. As análises incluíram radiografia, HR-pQCT, micro-TC, testes biomecânicos, contagem de cintilação, autorradiografia e histologia. Encontraram que a dose única via intravenosa de ácido zoledrônico aumentou significativamente o volume e a concentração mineral nos calos, assim como a força mecânica. O tratamento peri-operatório aumentou em 30% a resistência mecânica em comparação com os controles ( $p < 0,05$ ). A administração da dose sistêmica em uma ou duas semanas após a fratura aumentou a resistência mecânica em comparação com o grupo controle de 44% e 50%, respectivamente ( $p < 0,05$ ). Não houve diferenças significativas nos parâmetros mecânicos quando comparado com a injeção local na dose estudada. A radiográfica indicou que o ácido zoledrônico se liga significativamente ao osso no momento da administração. A quantificação do AZ indicou que a administração retardada aumentou significativamente a eficiência de absorção no calo. A análise histológica e por micro-TC sugeriram que a administração de ácido zoledrônico nos calos mostrou uma estrutura interna distinta constituída por uma intrincada rede de osso trabecular. Concluiu-se que o tempo de uma única dose sistêmica de ácido zoledrônico desempenha um papel importante na modulação das propriedades nos calos; e que a administração atrasada da dose única produz um calo maior e mais forte.

Zhang et al. 2012 compararam o efeito do ácido zoledrônico no tratamento e prevenção da osteoporose com um grupo placebo. Foram selecionados estudos aleatórios controlados do uso do ácido zoledrônico no tratamento da osteoporose, baseados nos dados do *PubMed* até abril de 2012. Um total de 9 ensaios foram



incluídos nesta meta-análise. Estes estudos mostraram que o ácido zoledrônico pode aumentar a densidade mineral do osso em 2,98 vezes em comparação com o placebo, e reduzir a taxa de fraturas nos pacientes em 32%. Os resultados devem-se a que intervenção do ácido zoledrônico teve eventos adversos menos graves do que os controles, o *odds ratio* foi de 0,81 (0,76-0,87). A intervenção por um período mais longo, aproximadamente 12 meses de intervenção, poderia gerar um efeito melhor na prevenção da osteoporose e da fratura. Esta meta-análise mostrou que o ácido zoledrônico é eficaz na prevenção da osteoporose, e pode aumentar a densidade mineral óssea e reduzir o risco de fratura

A terapia de radiação para sarcomas de tecidos moles e doenças metastáticas pode afetar adversamente osso, levando a fraturas por fragilidade. A administração de bisfosfonatos tem sido usada como meio de minimizar esses efeitos adversos. Utilizando um modelo murino de irradiação focal dos membros posteriores, Keenawinna et al. (2013) examinaram o potencial do ácido zoledrônico em minimizar os efeitos deletérios da radioterapia localizada no osso. Os animais receberam uma única exposição unilateral dos membros posteriores de 20 Gy. 4 dias antes da irradiação, e em 1, 2 e 3 semanas após a irradiação, os animais foram tratados com ácido zoledrônico ou injeções de solução salina usada como veículo. A área da densidade mineral óssea foi avaliada em 4 dias, e 2, 4 e 12 semanas pós-irradiação por absorção de raios X de dupla energia. A avaliação por micro-TC e testes de compressão axial foram usados para quantificar alterações nas propriedades morfológicas e mecânicas dos fêmures em 4 e 12 semanas pós-irradiação. A radiação teve efeitos diferenciais sobre o osso cortical e trabecular, aumentando o conteúdo mineral ósseo no osso cortical (BMC), o volume cortical ósseo (BV) e separação das trabéculas (Tb.Sp), enquanto diminuiu o número das trabéculas (Tb.N) em 12 semanas após a radioterapia localizada. A administração do ácido zoledrônico no membro posterior aumentou a área da densidade mineral óssea na presença e ausência de radioterapia, aumentou também o conteúdo mineral ósseo no osso cortical, o volume ósseo, o volume ósseo no osso trabecular (BV / TV), o número trabecular (Tb.N), assim como a espessura trabecular (Tb.Th) e diminuição da separação trabecular (Tb.Sp) em relação ao fêmur do grupo controle e irradiado. Apesar destas melhorias na morfologia com o ácido zoledrônico, não foi observada

---

nenhuma vantagem biomecânica. São necessários mais trabalhos para definir o papel dos bisfosfonatos na prevenção de fraturas pós-irradiação.

Barba-Recreo et al. (2014), executaram um modelo experimental reprodutível que se relacionasse diretamente com a administração crônica de bisfosfonatos e o desenvolvimento da osteonecrose com ou sem exodontia, e sem outro medicamento envolvido. 20 ratos *Wistar* foram divididos em 4 grupos (n=5/grupo). Os animais receberam injeções, ao longo de 9 semanas, com ácido zoledrônico (0,1 mg/kg). Nos grupos 1 e 2 três vezes por semana, intraperitonealmente, e no grupo 3 uma vez por semana por via intravenosa. Um grupo controle (Grupo 4) recebeu injeções intraperitoneal de solução salina três vezes por semana. Após 8 semanas de tratamento, 3 molares da maxila do lado direito foram extraídos nos grupos 1, 3 e 4 e todos os ratos foram sacrificados uma semana mais tarde. Os maxilares foram analisados mediante histologia quanto à presença de focos de osteonecrose, número de osteoclastos, vascularização, estado de reabsorção óssea e a presença de abscessos. O exame radiográfico foi realizado com uma radiografia simples de cada hemi-cabeça. Verificou-se que com a exodontia e maior dose de ácido zoledrônico tiveram a maior incidência de osteonecrose (80%), ausência de reabsorção óssea (100%) e menor número de osteoclastos. Os grupos tratados com ácido zoledrônico mostraram graus variáveis de osteoesclerose e desorganização trabecular nas radiografias. Mostrando assim, um novo modelo animal de osteonecrose após a administração de ácido zoledrônico e exodontias dentárias, conseguindo mudanças similares ou superiores a estudos anteriores, mas neste caso dando destaque para a exodontia como um importante fator desencadeante.

Greenspan et al. (2015) determinaram a eficácia e segurança do ácido zoledrônico em mulheres idosas. O estudo foi realizado durante 2 anos, com participação de 181 mulheres, de 65 anos, tratadas com uma dose de 5 mg de ácido zoledrônico ou placebo por via intra-venosa e suplemento diário de cálcio e vitamina D. Para a avaliação realizou-se a avaliação da densidade mineral óssea (DMO) no quadril e coluna em 12 e 24 meses. Obtiveram que as mudanças da DMO foram maiores no grupo de tratamento ( $p < 0,01$ ). Concluindo que mulheres com osteoporose melhoram a DMO com uma dose de ácido zoledrônico em 2 anos.

Mardas et al. (2016) avaliaram a formação óssea nos defeitos na calota craniana sob a aplicação do politetrafluoretileno denso e membranas microporosas para regeneração óssea guiada (GBR) em ratas saudáveis, osteoporóticas e osteoporóticas tratadas com ácido zoledrônico. Quarenta e oito ratas *Wistar* de 6 meses de idade foram usadas. A osteoporose foi induzida pela ovariectomia (OV) e dieta deficiente em cálcio em 32 ratos. Dezesesseis ratas OV foram tratadas com uma dose única de ácido zoledrônico, enquanto 16 ratas OV não receberam nenhum tratamento. Os restantes 16 foram *sham*-operadas e utilizados como controles saudáveis. Os defeitos ósseos criados foram avaliados histologicamente nos períodos de 30 e 60 dias. A neoformação óssea foi avaliada por análise histológica qualitativa e quantitativa. Os resultados mostraram que o tratamento com ácido zoledrônico e o uso da membrana ( $p=0,000$ ) aumentou significativamente a neoformação óssea, enquanto a presença da osteoporose reduziu a formação de osso novo. Concluindo que o tratamento com ácido zoledrônico pode melhorar a formação de novo osso em ratos com osteoporose.

A osteonecrose relacionada ao uso de bisfosfonatos ocorre em 1% dos pacientes com osteoporose tratados com tais medicamentos. Ovelhas são um modelo animal de grande porte estabelecido para investigar alterações esqueléticas osteoporóticas. Voss et al. (2016) analisaram o reparo ósseo após a exodontia do dente em ovinos ovariectomizados sob dieta pobre em cálcio e terapia de glicocorticoides ao receber ácido zoledrônico. Para isso, 8 ovelhas foram aleatoriamente divididas em dois grupos. A dexametasona foi administrado semanalmente durante 16 semanas. O ácido zoledrônico 75  $\mu\text{g}/\text{kg}$  foi então dada cada três semanas por 16 semanas em quatro ovelhas. Este estudo foi avaliado por médio da histologia e micro-TC. No caso da micro-TC se considerou uma avaliação baseada em scores, mas não na arquitetura óssea. Baseada nestas avaliações mostraram que houve cicatrização de feridas sem intercorrências após a extração do dente em ovinos sem tratamento do ácido zoledrônico, enquanto os animais com tratamento desenvolveram osteonecrose. Como a administração de bisfosfonatos é um tratamento padrão para a osteoporose induzida por glucocorticóides, este modelo pode ser usado para novas pesquisas na patogênese e gestão de eventos adversos relacionados com os mesmos.

Li et al. (2016) investigaram o papel da doença periodontal progressiva na indução de osteonecrose relacionada com os bisfosfonatos usando o modelo de rata ovariectomizada. Trinta ratas Sprague-Dawley de 12 semanas de idade foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos. Todos os animais foram submetidos a ovariectomia bilateral. Seis semanas após a cirurgia, o ácido zoledrônico 66 µg/kg ou o veículo foi administrado por via intraperitoneal durante 12 semanas. No mesmo dia da injeção, uma ligadura foi colocada subgingivalmente ao redor do primeiro molar inferior para induzir a periodontite. A eutanásia realizou-se 12 semanas após a injeção. As mandíbulas inteiras foram colhidas para a avaliação por micro-TC e exames histológicos. No caso da análise por a micro-TC avaliou-se os seguintes parâmetros para a microestrutura trabecular: a densidade mineral óssea (DMO), volume ósseo / volume de tecido (BV / TV), espessura trabecular (Tb.Th), número trabecular (Tb.N) e separação trabecular (Tb. Sp), mostrando que a colocação de ligadura causou perda óssea alveolar significativa tanto no grupo ácido zoledrônico e controle. Considerando que no grupo ácido zoledrônico, a perda óssea foi atenuada em comparação com o grupo de controle ( $p < 0,01$ ); assim como observou-se que a densidade mineral óssea no grupo ácido zoledrônico foi significativamente mais elevada do que no grupo controle, concluíram que o ácido zoledrônico inibe a reabsorção óssea alveolar em doença periodontal progressiva, o que pode beneficiar o controle da periodontite.

Hsieh (2016) afirmou que um regime de dosagem favorável de ácido zoledrônico tem o potencial de melhorar a saúde óssea dos pacientes, e assim obter resultados clínicos. O autor realizou uma análise retrospectiva para examinar os efeitos antiosteoporóticos de uma infusão uma vez por ano de 5 mg de ácido zoledrônico em pacientes de Taiwan com osteoporose por até 48 meses. Concluindo que o tratamento com ácido zoledrônico melhora a saúde óssea, aumentando a densidade mineral óssea e reduzindo a remodelação óssea, mesmo em pacientes com alto risco de fraturas. Assim também, foi associado a um perfil de segurança aceitável, sem eventos adversos relacionados com a droga.

Estudos clínicos usando a radioterapia estereotáxica para o tratamento local do osteossarcoma canino mostraram que nos seres humanos atingiram o tempo de sobrevivência médio semelhantes a amputação e quimioterapia adjuvante. Apesar disso, ainda há um alto risco de fratura patológica após o tratamento de radiação. O

ácido zoledrônico (AZ) e o hormônio da paratireoide (HP) são candidatos terapêuticos para a redução deste risco de fratura pós-irradiação. Devido a mecanismos diferentes, existe a hipótese de que o tratamento combinado com AZ e HP melhora significativamente a cicatrização óssea mais do que o uso de ZA ou HP por separado. Curtis et al. (2016), usaram um modelo do osteossarcoma canino em 40 ratos atímicos, nos quais foram avaliados a cicatrização óssea após doses clinicamente relevantes da radioterapia (12 Gy x 3 frações, total 36 Gy), quanto ao AZ, o mesmo foi injetado por via subcutânea uma vez por semana (12,5 µg/kg) começando no dia 13 (sendo a dose total AZ de 100 µg/kg). Neste estudo observaram-se aumentos significativos no volume de osso e aumento do momento de inércia em 8 semanas após a radioterapia no grupo de tratamento combinado (AZ/HP), em comparação com o tratamento de radioterapia sozinha. No caso da avaliação por micro-TC foram usados os seguintes parâmetros de avaliação para o osso trabecular: volume ósseo/volume tecidual, densidade mineral óssea, número de trabéculas, espessura das trabéculas e separação trabecular. O momento de inércia polar também foi quantificado ao longo de toda a região de interesse como uma medida substituta da força óssea. A análise revelou evidência de mineralização ativa ao final de estudo, bem como destruição das células tumorais em todos os grupos de tratamento, a análise por micro-TC mostrou um aumento geral do volume ósseo no tratamento de AZ sozinho. Este trabalho fornece uma evidência para a indicação do uso do AZ e HP, incluindo nos casos de alterações ósseas após radioterapia devido a osteossarcoma.

#### **2.4.3. Comparação da ação do Alendronato de sódio e do Ácido zoledrônico no tecido ósseo**

A administração da dose de 5 mg ácido zoledrônico (AZ), uma vez por ano, pode aumentar a densidade mineral óssea (DMO) e reduzir a taxa de fraturas em mulheres na pós-menopausa. Gasser et al. (2008) determinaram a duração dos efeitos protetores de uma dose única de AZ em ratas ovariectomizada, assim como a comparação com o uso do alendronato de sódio, além dos efeitos sobre a remodelação óssea e propriedades mecânicas. Os animais foram divididos em 8 grupos onde receberam doses únicas, intravenosas, de AZ 0,8; 4; 20; 100 ou 500 µg/kg, ou alendronato de 200 µg/kg, ou solução salina isotônica 4 dias antes da

ovariectomia bilateral. A massa e densidade do osso esponjoso e cortical foram medidos, em intervalos de 4 semanas, durante 32 semanas. A arquitetura óssea por meio de micro-TC (Volume do osso trabecular, espessura, número e separação trabecular, e conectividade da densidade), a dinâmica da formação óssea e a força biomecânica em testes de compressão também foram avaliados em 32 semanas. Observaram que existe uma associação significativamente entre a perda de densidade mineral óssea e a ovariectomia atenuada por 32 semanas mediante o uso de AZ > 4 µg/kg para a DMO total, AZ > 20 µg/kg para o osso cortical e DMO, e AZ > 4 µg/kg para osso trabecular, tudo quando comparado com o grupo controle. O alendronato de 200 µg/kg foi equivalente a administração do AZ 20 µg/kg. A diminuição dos parâmetros da arquitetura trabecular foram dose-dependente no caso do AZ. Os parâmetros de formação óssea não foram significativamente afetados pela AZ 20 µg/kg, mas foram significativamente reduzidas pelo AZ 100-500 µg/kg. O AZ produziu melhorias relacionadas com a dose nos parâmetros de resistência óssea após ovariectomia. Em conclusão, neste modelo animal de osteopenia na pós-menopausa, uma única dose de 100 µg/kg de AZ equivalente à dose humana de 5 mg suprime a reabsorção óssea, protege contra a perda de osso cortical e trabecular, e evita a deterioração dos parâmetros mecânicos. Comparando com o alendronato, o AZ apresenta uma potência de 10-vezes mais elevada na prevenção da perda óssea. Estes dados suportam a utilização de um regime de dosagem intravenosa de AZ anual para o tratamento da osteoporose.

Em um estudo realizado por Bilezikian (2009) foram avaliados resultados de ensaios clínicos com o objetivo de demonstrar a eficácia de quatro bisfosfonatos no tratamento da osteoporose. Os fármacos utilizados nos ensaios foram: alendronato, ácido zoledrônico, ibandronato e risedronato. Para a avaliação da eficácia do alendronato foram feitos dois ensaios clínicos, denominados FIT-1 e FIT-2. Todos os indivíduos receberam cálcio e vitamina D durante os estudos. No grupo FIT-1 a amostra foi composta de 2.027 mulheres na pós-menopausa (entre 54 e 80 anos de idade) que apresentavam no mínimo uma fratura vertebral. Essa amostra foi dividida em dois grupos duplo-cegos, randomizados, sendo um tratado com 5 mg/dia de alendronato e o outro placebo. Após três anos de tratamento, houve uma redução do risco de fratura para o grupo tratado em 51% em relação ao grupo placebo. O grupo FIT-2 teve uma amostra constituída por 4.432 mulheres na pós-menopausa, com

idade média de 68 anos, que apresentavam baixa densidade óssea mineral ( $\leq 0,68$  g /  $\text{cm}^3$ ). A amostra foi dividida da mesma forma do grupo FIT-1, e o grupo tratado recebeu 10 mg/dia de alendronato. Após quatro anos e três meses seguindo o tratamento, o risco de fratura do grupo tratado foi 44% menor em relação ao grupo placebo. Para a avaliação da eficácia do ácido zoledrônico todos os indivíduos receberam cálcio e vitamina D durante o estudo. A amostra foi composta por 7,765 mulheres na pós-menopausa (entre 65 e 89 anos de idade). Essa amostra foi tratada com 15 mg de ácido zoledrônico e o outro placebo com administração cada 12 meses durante 3 anos. Após três anos de tratamento, houve uma redução do risco de fratura para o grupo tratado em 70% em relação ao grupo placebo. Os autores concluíram que todos os quatro bisfosfonatos reduzem o risco relativo de novas fraturas vertebrais em mulheres na pós-menopausa com osteoporose, quando comparados ao placebo. O alendronato, o risedronato e o ácido zoledrônico reduzem o risco relativo de novas fraturas não vertebrais e fraturas do quadril. Além disso, o uso do alendronato durante até dez anos e do risedronato até sete anos têm mostrado que a eficácia desses bisfosfonatos é mantida durante o tratamento em longo prazo, e com respeito ao ácido zoledrônico, a disponibilidade de uma terapia intravenosa, uma vez por ano, 5 mg de ácido zoledrônico, pode render novas melhorias nos resultados na população crescente de pacientes com osteoporose.

Chen et al. (2013) comparou os efeitos do alendronato (AS), o ranelato de estrôncio (RE) e do ácido zoledrônico (AZ) na osseointegração osso-implante em ratas ovariectomizadas. Sessenta ratas *Sprague-Dawley* foram incluídas neste estudo. Delas, 48 foram ovariectomizadas (OV) e distribuídos em quatro grupos: OV (OV + Veh), ALN (OV + AS), SR (OV + RE), e ZOL (OV + AZ). E outras 12 ratas foram *sham*-operadas como um grupo de controle (*sham*). Quatro semanas após a ovariectomia, os implantes de titânio foram inseridos nas tíbias bilateralmente em todas as ratas. Em seguida, as ratas dos grupos de AS, RE e AZ receberam sistemicamente o alendronato (7 mg/kg/semana, por via oral), ranelato de estrôncio (500 mg/kg/dia, por via oral), ou uma única injeção de ácido zoledrônico (0,1 mg/kg, iv), respectivamente. Doze semanas após a implantação, todos os ratos foram sacrificados para obter o fêmur e a tíbia. O exame histológico e testes biomecânicos foram utilizados para avaliar a osseointegração osso-implante em todos os grupos. Encontraram que, para o exame histológico e testes biomecânicos mostram que AZ,

AS e RE melhoraram a osseointegração osso-implante; o AS e RE tem efeitos semelhantes, enquanto AZ aumenta a osseointegração osso-implante quando comparado com o AS e RE. Concluíram que a administração sistêmica de AZ, AS e RE melhora a osseointegração osso-implante quando comparado com OV; além de que o AZ, que foi dada em uma única dose, teve efeitos mais positivos do que o AS ou RE.

Baiomy et al. (2014) avaliaram os efeitos do alendronato e do ácido zoledrônico administrados localmente sobre a taxa de osteogênese em cães submetidos à distração mandibular. Após a corticotomia mandibular, os segmentos ósseos foram mantidos em posição neutra por distração durante sete dias. Em seguida, a distração foi iniciada a uma taxa de 0,5 mm, duas vezes por dia durante dez dias para obter uma distração total de 10 mm, seguida por um período de consolidação. Os animais foram divididos em três grupos de acordo com a droga injetada: solução salina, correspondente ao grupo controle; e ácido zoledrônico e alendronato, correspondentes aos grupos experimentais. Os cães foram sacrificados nos tempos de 02, 06 e 10 semanas após a distração. As amostras foram coletadas para exames radiográficos, avaliação da densidade mineral óssea e avaliação histológica. Nas radiografias e resultados histológicos os autores observaram que a formação do osso e a maturação dos grupos experimentais foram mais rápidas quando comparadas com o grupo controle, concluindo que a administração local do ácido zoledrônico e do alendronato demonstrou ser eficaz na redução do período de consolidação óssea. Por outro lado, o ácido zoledrônico se mostrou mais eficaz do que o alendronato já que encurtou o período de consolidação óssea.

Zhou et al. (2016) realizaram um meta-análise onde compararam a eficácia de diferentes bisfosfonatos na prevenção de fraturas na osteoporose primária. Foram incluídos 36 ensaios randomizados comparando qualquer bisfosfonato com outros bisfosfonatos ou placebo. Nos estudos encontraram diferença significativa entre bisfosfonatos para fratura vertebral e fratura não vertebral. Quando comparado com grupos controles, o alendronato, clodronato, ibandronato, minodronate, pamidronato, risedronato e ácido zoledrônico preveniu significativamente a fratura vertebral. O ácido zoledrônico foi o que mais reduziu o risco de fratura vertebral, em comparação com o alendronato, clodronato, etidronato, ibandronato, risedronato, e tiludronato (0,65 (0,46, 0,91), 0,53 (0,33, 0,86), 0,45 (0,27, 0,74), 0,52 (0,36, 0,75), 0,59 (0,42, 0,83), e



0,31 (0,21, 0,48), respectivamente). Comparado o etidronato e o clodronato com o ácido zoledrônico, este último preveniu significativamente fratura não vertebral. O ácido zoledrônico preveniu significativamente qualquer fratura quando comparado com o alendronato. Os rankings mostraram que o ácido zoledrônico ficou em primeiro lugar na prevenção de fratura vertebral, do quadril e qualquer outra fratura, e o pamidronato ficou em primeiro lugar na prevenção da fratura não vertebral e no punho. Nas análises de sensibilidade, o ácido zoledrônico ficou em primeiro lugar na prevenção de fraturas não vertebrais e o alendronato ficou em primeiro lugar na prevenção de fratura do quadril e no punho. Concluindo que o ácido zoledrônico foi o mais eficaz na prevenção de fraturas vertebrais, não vertebrais e em qualquer outra fratura, e alendronato ou ácido zoledrônico parecia ser os mais eficazes na prevenção da fratura do quadril. Mas a incerteza ainda permanece e futuros estudos são necessários para avaliar com precisão a eficácia comparativa dos bisfosfonatos.

### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo neste trabalho foi avaliar o efeito da nicotina, bisfosfonatos, e irradiação no reparo ósseo alveolar em ratas ovariectomizadas.

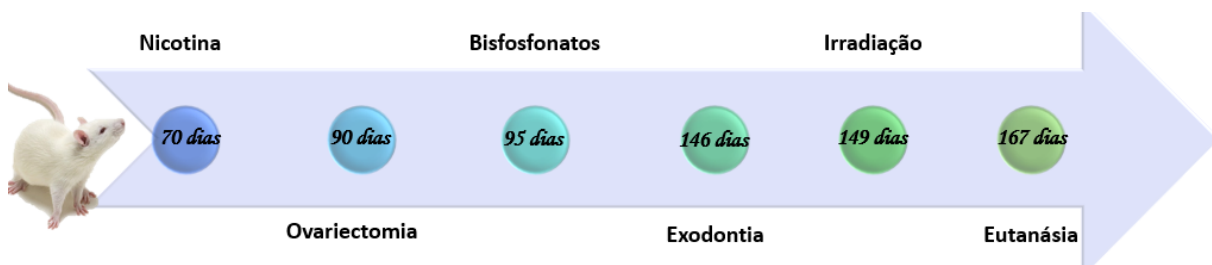
- Avaliar a densidade óssea radiográfica, nestas condições do reparo ósseo alveolar.
- Avaliar a microarquitetura óssea, nestas condições do reparo ósseo alveolar.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto dessa pesquisa foi aprovado pela Comissão de ética para uso de animais da Universidade Estadual de Campinas, sob protocolo de número 3344-1. (Anexo 1)

Para a realização deste estudo foram utilizadas 60 ratas (*Rattus norvegicus*, *Albinus*, *Wistar*), com 70 dias de idade e peso variando entre 250g – 300 g, procedentes do Biotério Central da UNICAMP. Durante toda a pesquisa, os animais foram mantidos em gaiolas de policarbonato, em local com temperatura e umidade controladas e com ciclo alternado de doze horas claro-escuro. A alimentação dos animais constou de ração balanceada padrão e água *ad libitum*. Sendo delineada da seguinte forma: (Figura 1)

**Figura 1.** Delineamento do presente estudo



### 4.1. Administração de Nicotina

Aos 70 dias, nos animais pertencentes aos grupos NI, NI/AS, NI/AZ, IRR/NI, IRR/NI/AS, IRR/NI/AZ, foi iniciada a administração de 1,0 mg/Kg por peso corpóreo de Nicotina (sal tartarato de nicotina - ≥98%) dissolvido em solução salina normal ajustada com um pH de 7.2 – 7.4 (Sigma-Aldrich, EEUU) seis vezes por semana, durante toda a pesquisa. Dose que foi utilizada para simular um fumante moderado-severo (Lamota et al. 2008). A administração foi realizada por via enteral, utilizando-se uma agulha de gavagem (Insight Equipamentos Ribeirão Preto – SP, Brasil) conectada a uma seringa de 1,0 ml, permitindo que as soluções fossem depositadas

diretamente no estômago dos animais (Figura 2). Os animais dos grupos OV, AS, AZ, IRR, IRR/AS e IRR/AZ, receberam uma gavagem *sham* com solução salina.

**Figura 2.** Procedimento de gavagem para a administração de 1,0 mg /kg corpóreo de Nicotina (sal tartarato de nicotina -  $\geq 98\%$ ) durante 6 dias por semana durante toda a pesquisa.

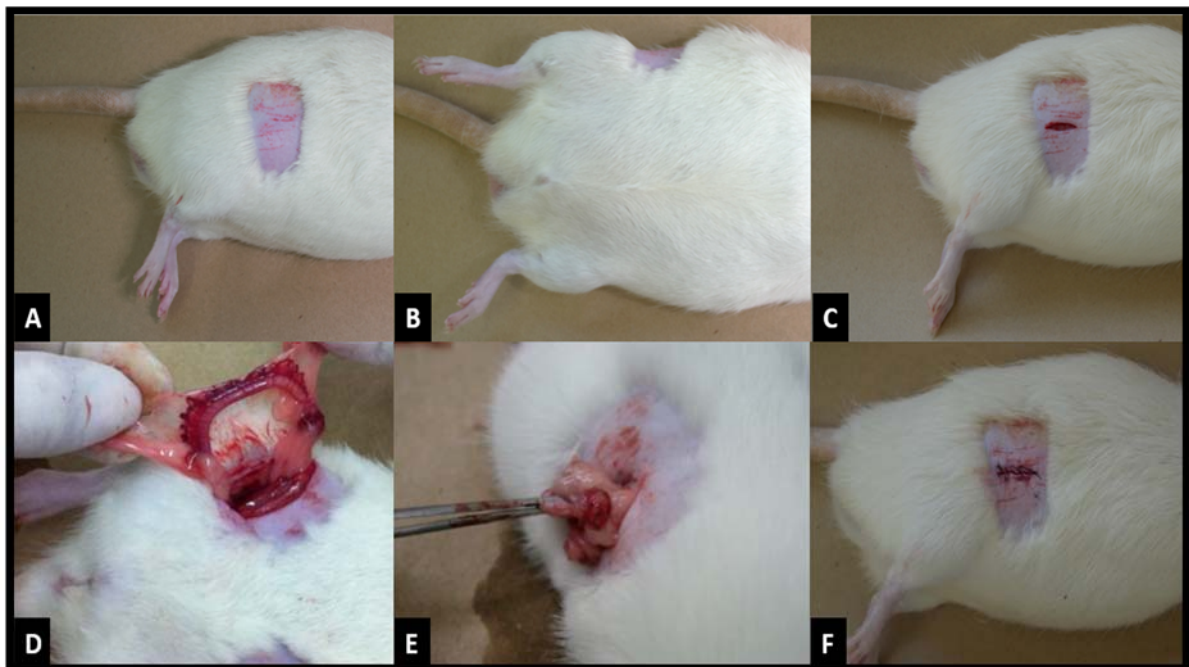


#### 4.2. Ovariectomia

Todos os animais aos 90 dias foram pesados e, em seguida, anestesiados via intramuscular com 0,1 mg/kg de solução de Cloridrato de Ketamina (Dopalen® Agribands do Brasil Ltda., Paulínea, SP, Brasil) e 0,05 mg/kg de solução de Cloridrato de Xylasina (Rompum®, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil). Para o preparo do campo cirúrgico realizou-se a tricotomia da região abdominal bilateral. Após a antissepsia local com álcool iodado, foram realizadas incisões cutâneas e musculares bilaterais em sentido longitudinal, na região da última costela e próxima ao nível do rim, sendo o tecido muscular divulsionado para a exposição dos ovários. Procedeu-se a hemostasia por meio da ligação da parte superior do tubo uterino com o auxílio de fio de sutura 3.0 (Ethicon, Johnson do Brasil S.A., São José dos Campos, SP, Brasil) e

posteriormente a excisão do ovário e gordura circundante. A musculatura e a pele foram então suturadas com fio Mononylon 4.0 (Ethicon, Johnson do Brasil S.A., São José dos Campos, SP, Brasil) (Figura 3), e em seguida os animais receberam 1 mg/kg de antibiótico por via intramuscular (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Laboratório FORT DODGE Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil).

**Figura 3.** Procedimento cirúrgico para a ovariectomia. A e B-tricotomia da região abdominal lateral; C-incisões cutâneas e musculares; D-exposição dos ovários; E-excisão dos ovários e gordura circundante; F-sutura da musculatura e pele bilateralmente em todos os animais.



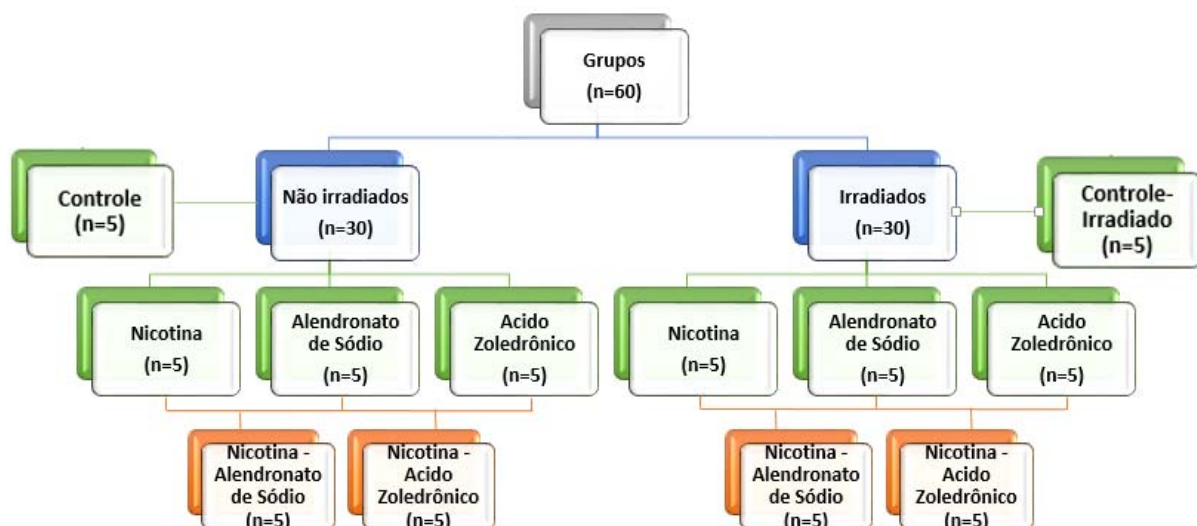
### 4.3. Grupos Experimentais

Todos os animais após a ovariectomia foram divididos, aleatoriamente, em doze grupos experimentais, contendo cinco animais cada, conforme descrito a seguir e, sucintamente, apresentado na Figura 4 e Quadro 1.

- Grupo Controle (C): animais que não foram submetidos à irradiação nem à administração das substâncias testadas.
- Grupo Alendronato de Sódio (AS): animais que tiveram administração do Alendronato de Sódio.

- Grupo Ácido Zoledrônico (AZ): animais que tiveram administração do Ácido Zoledrônico.
- Grupo Nicotina (NI): animais que tiveram administração de nicotina.
- Grupo Nicotina/Alendronato de Sódio (NI/AS): animais que tiveram administração de nicotina e do Alendronato de Sódio.
- Grupo Nicotina/Ácido Zoledrônico (NI/AZ): animais que tiveram administração de nicotina e do Ácido Zoledrônico.
- Grupo Controle/Irradiado (IRR): animais que foram submetidos a irradiação.
- Grupo Irradiado/Alendronato de Sódio (IRR/AS): animais que foram submetidos a irradiação e administração do Alendronato de Sódio.
- Grupo Irradiado/Ácido Zoledrônico (IRR/AZ): animais que foram submetidos a irradiação e administração do Ácido Zoledrônico.
- Grupo Irradiado/Nicotina (IRR/NI): animais que foram submetidos a irradiação e administração de nicotina.
- Grupo Irradiado/Nicotina/Alendronato de Sódio (IRR/NI/AS): animais que foram submetidos a irradiação e administração de nicotina e do Alendronato de Sódio.
- Grupo Irradiado/Nicotina/Ácido Zoledrônico (IRR/NI/AZ): animais que foram submetidos a irradiação e administração de nicotina e do Ácido Zoledrônico.

**Figura 4.** Esquema dos grupos experimentais



**Quadro 1.** Diferentes grupos experimentais utilizados neste estudo

<b>Grupos</b>	<b>Dose de radiação <math>\gamma</math></b>	<b>Tratamento</b>	<b>Duração</b>
<b>Controle (C)</b>	--	Ovariectomia	
<b>Alendronato de Sódio (AS)</b>	--	5,0 mg/Kg corpóreo de Alendronato de Sódio	3 vezes por semana
<b>Ácido Zoledrônico (AZ)</b>	--	0,1 mg/Kg corpóreo de Ácido Zoledrônico	Dose única
<b>Nicotina (NI)</b>	--	1,0 mg/Kg corpóreo de Nicotina (sal tartarato de nicotina - $\geq 98\%$ )	6 vezes por semana
<b>NI/ AS</b>	--	1,0 mg/Kg e 5,0 mg/kg corpóreo de Nicotina e Alendronato de Sódio	Idem quando separado
<b>NI/ AZ</b>	--	1,0 mg/Kg e 0,1 mg/kg corpóreo de Nicotina e Ácido Zoledrônico	Idem quando separado
<b>Irradiado (IRR)</b>	15 Gy	Ovariectomia	
<b>IRR/ AS</b>	15 Gy	5,0 mg/Kg corpóreo de Alendronato de Sódio	3 vezes por semana
<b>IRR/ AZ</b>	15 Gy	0,1 mg/Kg corpóreo de Ácido Zoledrônico	Dose única
<b>IRR/ NI</b>	15 Gy	1,0 mg/Kg corpóreo de Nicotina (sal tartarato de nicotina - $\geq 98\%$ )	6 vezes por semana
<b>IRR/ NI/ AS</b>	15 Gy	1,0 mg/Kg e 5,0 mg/kg corpóreo de Nicotina e Alendronato de Sódio	Idem quando separado
<b>IRR/ NI/ AZ</b>	15 Gy	0,1 mg/Kg e 1,0 mg/kg corpóreo de Nicotina e Ácido Zoledrônico	Idem quando separado

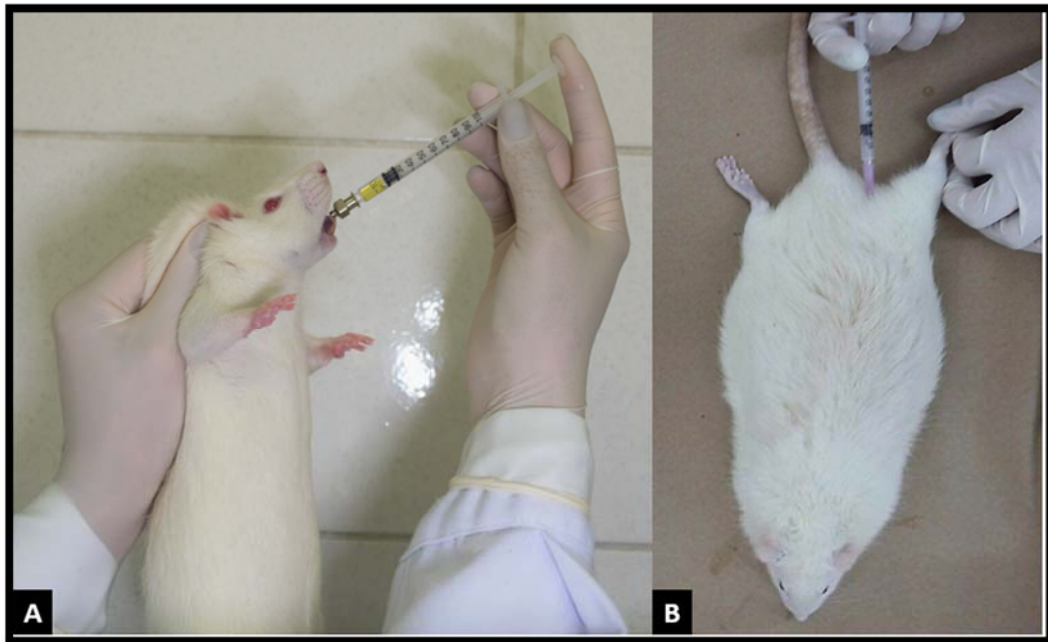
#### **4.4. Administração dos bifosfonatos**

No quinto dia após a ovariectomia (Chicarelli et al., 2007), a administração dos bifosfonatos (alendronato de sódio e ácido zoledrônico) foi iniciada. Antes da administração do alendronato de sódio, a alimentação (ração e água) foi suspensa por uma hora, a fim de simular o jejum recomendado antes da ingestão do medicamento. Nos animais pertencentes aos grupos AS, NI/AS, IRR/AS, IRR/NI/AS foram administrados 5,0 mg/Kg de xarope de alendronato de sódio manipulado. A administração foi realizada via enteral, utilizando-se uma agulha de gavagem,

assegurando-se que as soluções fossem depositadas diretamente no estômago dos animais (Figura 5A). Os animais dos grupos C, AZ, NI, NI/AZ, IRR, IRR/AZ, IRR/NI e IRR/NI/AZ receberam uma gavagem *sham*.

Neste mesmo período, foi administrado, por meio intravenoso, na cauda do animal, a dose única de 0,1 mg/Kg de Ácido Zoledrônico (Zometa® Novartis Pharma Stein AG, Stein, Suíça) nos grupos AZ, NI/AZ, IRR/AZ, IRR/NI/AZ (Figura 5B). Os animais dos grupos C, AS, NI, NI/AS, IRR, IRR/AS, IRR/NI, e IRR/NI/AS receberam uma injeção *sham*.

**Figura 5.** A-Procedimento de gavagem para a administração de 5,0 mg/kg corpóreo de Alendronato de Sódio, durante 3 dias na semana. B-administração por meio intravenoso de 0,1 mg/kg corpóreo de Ácido Zoledrônico como única dose.



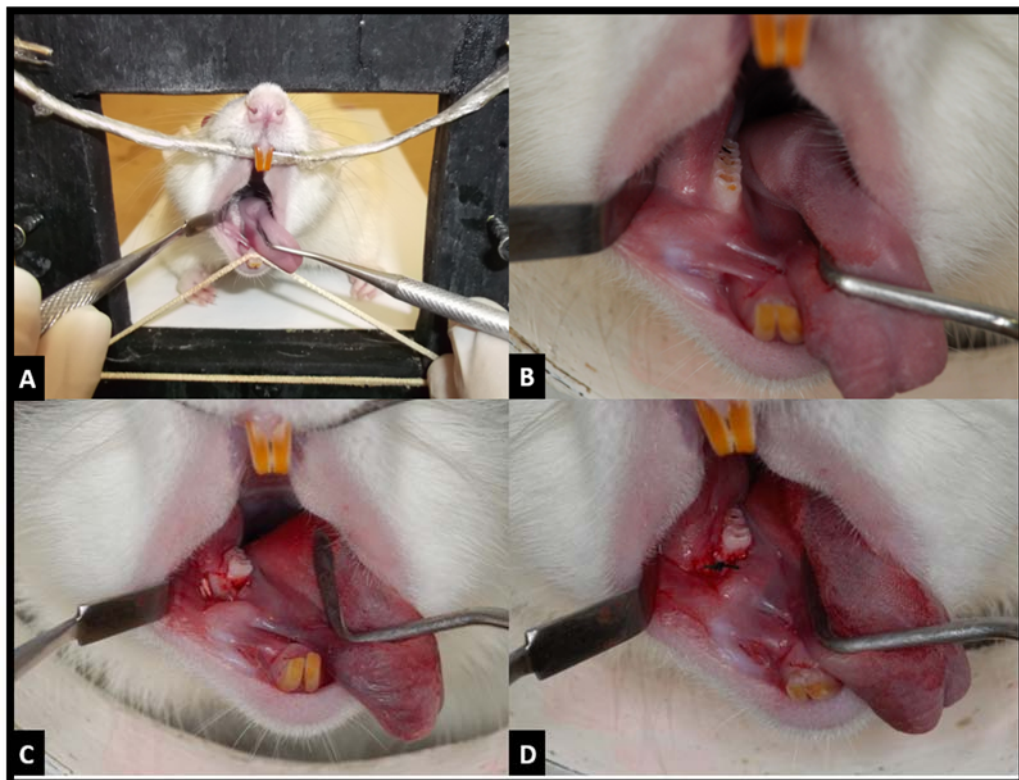
#### 4.5 Exodontia do primeiro molar inferior

Após 56 dias da ovariectomia, tempo no qual as ratas mostram uma deterioração microarquitetônica precoce (Yoon et al. 2012). Assim, todos os animais foram pesados e anestesiados via intramuscular, com 0,1 ml/kg de solução de Cloridrato de Ketamina (Dopalen® AgribRANDS do Brasil Ltda., Paulínea, SP, Brasil) e 0,05 ml/kg de solução de Cloridrato de Xylasina (Rompum®, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil).



Depois de anestesiados, os animais foram colocados sobre uma mesa inclinada descrita por Zecchin et al. (2007), e procedeu-se a exodontia do primeiro molar inferior do lado direito. Dois elásticos de borracha foram usados para manter a boca aberta. A seguir, realizou-se a sindesmotomia com um instrumento Hollemback 3ss (Duflex®, S.S. White, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), separando a gengiva ao redor do primeiro molar inferior. O Hollemback foi posicionado entre o primeiro e segundo molar, assim como entre a raiz mesial e distal do primeiro molar inferior permitindo a luxação e avulsão do dente. O alvéolo foi suturado de forma atraumática com agulha com fio de nylon (fio Mononylon 4.0, Ethicon, Johnson do Brasil S.A., São José dos Campos, SP, Brasil). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais contendo água *ad libitum* até a recuperação completa da anestesia (em torno de 20 a 24 horas). Durante os dois primeiros dias após a exodontia do molar, os animais foram alimentados regularmente com alimentos pastosos para evitar trauma pós-cirúrgico (Figura 6)

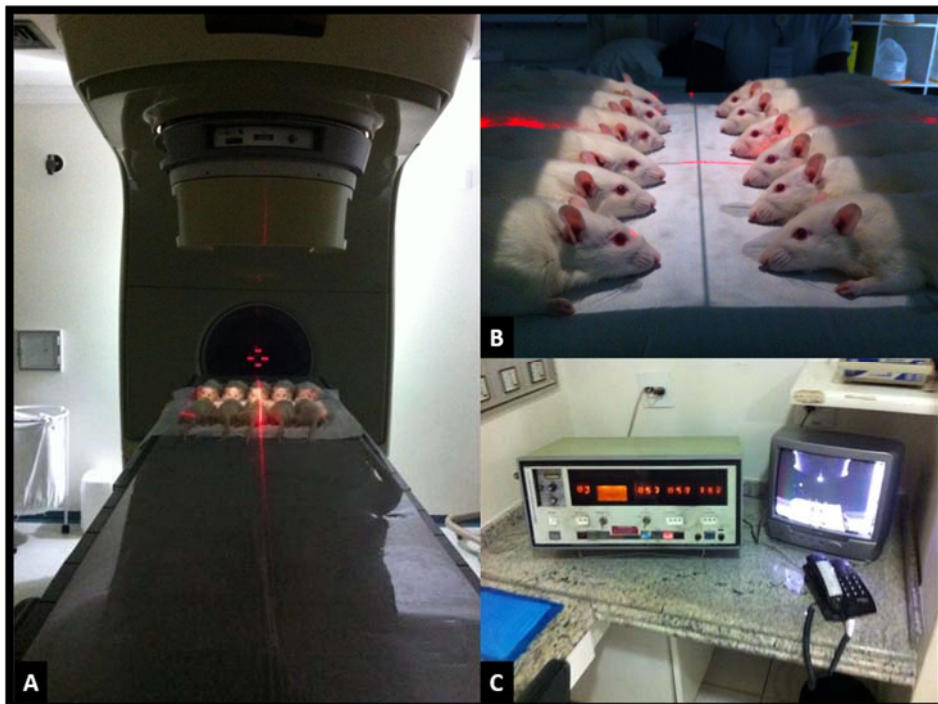
**Figura 6.** Procedimento cirúrgico para a exodontia do primeiro molar. A-posicionamento na mesa inclinada e afastamento da mucosa e língua. B-presença do primeiro molar inferior do lado direito. C-procedimento cirúrgico propriamente da exodontia do primeiro molar. D-Sutura da região.



#### 4.6. Procedimento de Irradiação

No terceiro dia após a exodontia (Chicarelli et al. 2007), os animais dos grupos IRR, IRR/AS, IRR/AZ, IRR/NI, IRR/NI/AS e IRR/NI/AZ foram pesados e anestesiados via intramuscular, com 0,1 ml/kg de peso corpóreo de solução de Cloridrato de Ketamina (Dopalen® AgribRANDS do Brasil Ltda., Paulínea, SP, Brasil) e 0,05ml/kg de peso corpóreo de solução de Cloridrato de Xylasina (Rompum®, Bayer S.A., São Paulo, SP, Brasil). Depois de anestesiados, os animais foram colocados sobre a maca e posicionados de modo que apenas a região de cabeça e pescoço ficasse incluída no campo de irradiação. Isso foi obtido mediante a colimação do campo. À seguir, foi realizada a exposição à radiação X utilizando-se um acelerador linear (Clinic 6/100®, Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, Estados Unidos), com distância focal de 100 cm e campo de colimação de 15x30 cm. Foi aplicada a dose única de 15 Gy de radiação X (Figura 7). Tal dose é suficientemente danosa às células do osso, dessa forma, escolhida no presente estudo, visando provocar deliberadamente dano nas estruturas, bem como compreender os efeitos exercidos pelos fármacos utilizados (Willey et al. 2010).

**Figura 7.** Procedimento de irradiação da região de cabeça e pescoço. A-posicionamento no acelerador linear dos animais; B-região de cabeça e pescoço incluída no campo de radiação C-Workstation do acelerador linear (Clinic 6/100®, Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, Estados Unidos).



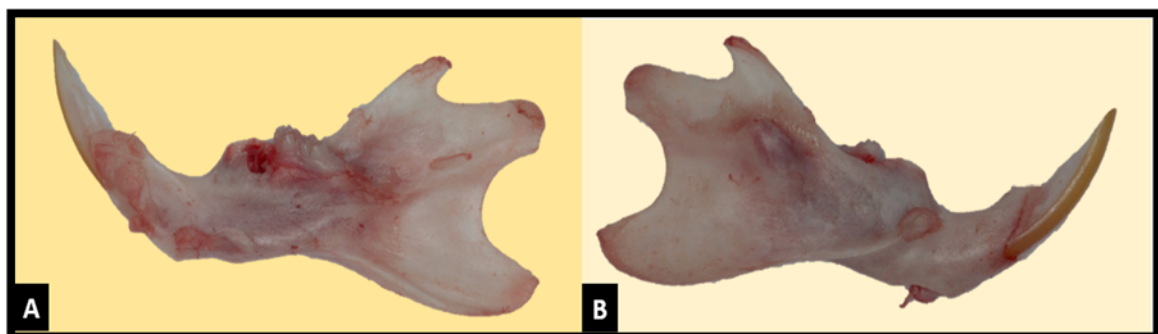
#### 4.7 Avaliação do efeito da ovariectomia

A fim de comprovar o efeito da ovariectomia todos os animais foram submetidos ao exame macroscópico dos cornos uterinos. Assim, antes dos animais serem submetidos à eutanásia, após a anestesia, foi realizada uma incisão abdominal, em cada animal, para localização dos respectivos cornos uterinos. Na presença de hormônio, eles se apresentariam róseos, volumosos e totalmente preenchidos por fluido; enquanto na deficiência do mesmo, ou seja, nos animais ovariectomizados, apresentaram-se finos, atróficos e anêmicos (Francisco et al. 2011).

#### 4.8 Obtenção e Preparo das peças

Após 21 dias da realização da exodontia do primeiro molar, período onde o osso se encontra em processo de maturação óssea segundo Jee et al. 2010, foi realizada a eutanásia dos animais. Para este procedimento, os animais foram novamente pesados e anestesiados, segundo o protocolo previamente descrito. Em seguida, foram submetidos à eutanásia por prolongamento anestésico para que a mandíbula de cada animal fosse removida por incisão nas articulações temporomandibulares e separação dos tecidos moles ao redor, com utilização de uma lâmina de bisturi nº 15, sendo posteriormente separadas, obtendo-se assim a hemimandíbula do lado direito, que foi dissecada e fixada em formol tamponado a 10% por, no mínimo, 72 h (Figura 8). Após a obtenção das peças, duas análises foram utilizadas para a avaliação do processo de reparo ósseo na mandíbula.

**Figura 8.** Obtenção da peça para análise - Hemimandíbula do lado direito, observando-se a ausência do primeiro molar. A- Vista medial; B-Vista lateral.



A densidade óssea radiográfica (DeRx) e a microtomografia computadorizada (micro-TC) foram utilizadas para analisar a área do reparo ósseo e quantificar as alterações na microarquitetura óssea trabecular, respectivamente.

#### **4.9. Análises da densidade óssea radiográfica (DeRx)**

As peças anatômicas foram submetidas à avaliação de DeRx, medidas na região alveolar da raiz distal de todas as mandíbulas, expressas em milímetros de alumínio (mmAl).

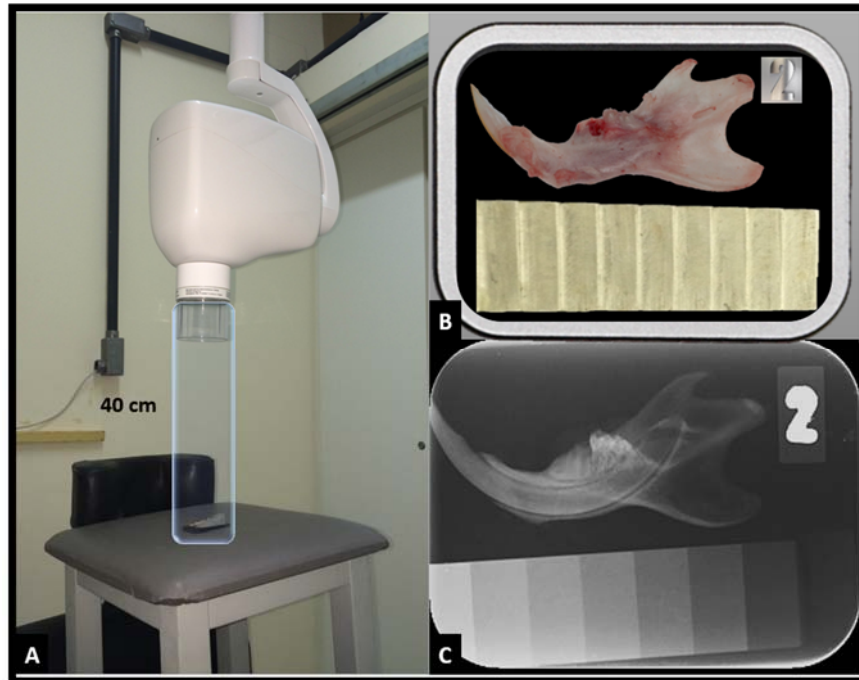
##### **4.9.1. Padronização dos parâmetros de aquisição das imagens**

As radiografias periapicais foram obtidas utilizando-se o aparelho de raios X intrabucal (GE-100, General Electric, Milwaukee, USA) mediante a técnica do paralelismo com uma distância foco-placa de fósforo de 40 cm. As imagens foram adquiridas no receptor de imagem tipo placa de fosforo fotoestimável (Digora, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland) usando os parâmetros de exposição de 50 kVp, 10 mA, 12 pulsos (Figura 9A).

Para correlacionar a densidade radiográfica da região alveolar da raiz distal do primeiro molar do reparo ósseo da mandíbula com o alumínio usou-se a escala de densidade de alumínio com 9 degraus, com 99% de pureza (6063 liga de alumínio, ABNT).

A mandíbula foi posicionada com o lado vestibular em contato com o receptor de imagem, e escala de densidade de alumínio foi posicionado do lado do rebordo da mandíbula, junto com um número para sua respectiva identificação. A placa de fósforo foi digitalizada no *scanner* (Digora, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland), para que assim a imagem fosse observada no monitor (Figura 9B e C).

**Figura 9.** Padronização dos parâmetros de aquisição das radiografias para a avaliação da densidade radiográfica. A-Esquema evidenciando o posicionamento dos receptores de imagem em relação ao tubo de raio X. B-Posicionamento da hemimandíbula, a escala de densidade e o número de para sua codificação. C-Imagem radiográfica gerada para a análise.

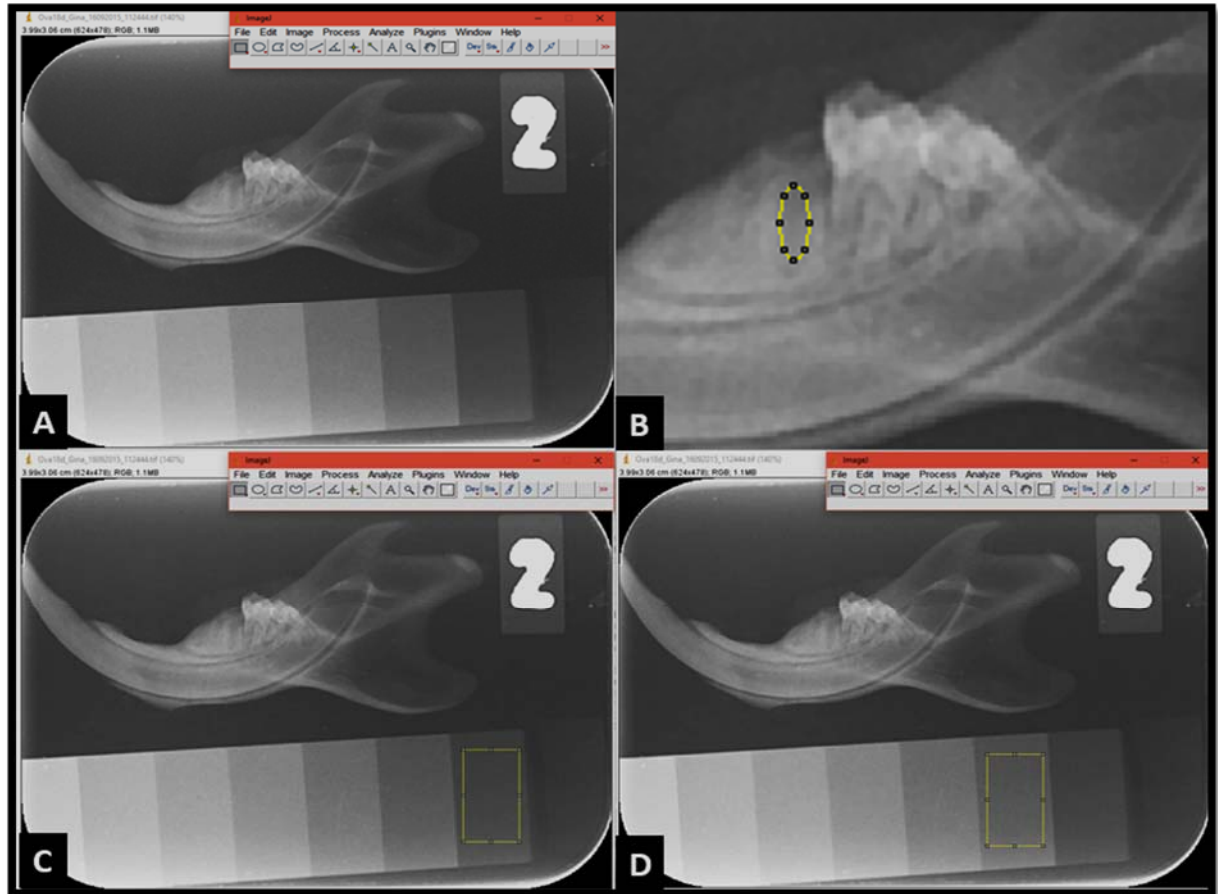


#### 4.9.2. Análise da densidade radiográfica

Para a avaliação da densidade radiográfica foi utilizado o *software* Image Processing and Analysis in Java - Image J *software* 1.6.0 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), usando-se a ferramenta *Oval selection* para obter a densidade do reparo ósseo da região alveolar da raiz distal do primeiro molar. Foram realizadas três leituras dos valores da mesma região (Figura 10 A e B).

Para se obter as densidades dos degraus de alumínio usou-se a ferramenta *Rectangular selection*, escolhendo-se os três valores mais próximos da média obtida da densidade da região do reparo ósseo que foram do valor mais próximo, um valor acima e abaixo. No programa Microsoft Excel 2013 v15.0 (Microsoft Office 2013) construiu-se um gráfico de dispersão, de onde obteve-se uma curva de calibração. A partir desta equação calculou-se a equivalência dos valores de cinza em mmAl da região do reparo ósseo. É relevante destacar que foi feito um gráfico para cada imagem, porque a radiopacidade dos degraus varia entre as imagens (Figura 10 C e D).

**Figura 10.** Análise da densidade radiográfica mediante o *software* ImageJ 1.6.0 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). A-Radiografia periapical no programa. B-Use da ferramenta *Oval selection* para obter a densidade da região da raiz distal do primeiro molar. C e D-Utilização da ferramenta *Rectangular selection* para obter a densidade dos diferentes degraus de alumínio.



#### 4.9.3. Análise dos dados

O teste de Bartlett mostrou que houve homocedasticidade ( $p=0,58$ ) e o de Kolmogorov & Smirnov mostrou que houve normalidade ( $p>0,1$ ). Os valores da radiopacidade expressados em  $\text{mmAl}$  foram analisados pelo teste two-way ANOVA (Tukey).

#### 4.10. Análise por micro-TC do reparo ósseo

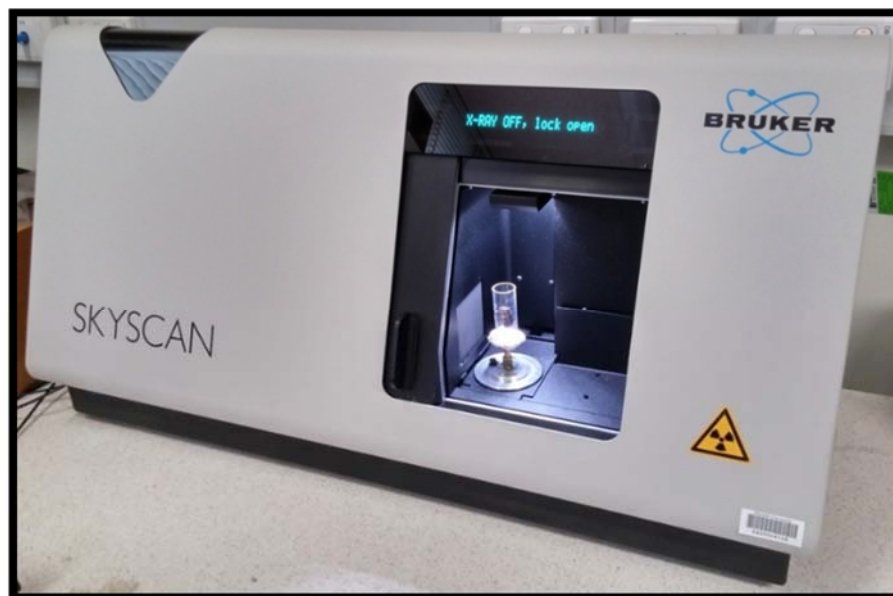
Para a descrição da análise por microtomografia computadorizada, foi adotada a nomenclatura recomendada pelo Comitê de Nomenclatura de Histomorfometria da

Sociedade Americana de Osso e Pesquisa Mineral e pelo Journal of Bone and Mineral Research (Parfit et al., 1987).

#### 4.10.1. Aquisição das imagens por micro-TC

As imagens foram adquiridas por meio do aparelho SkyScan 1174 Compact Micro-CT (Kontich, Bélgica) (Figura 11).

**Figura 11.** Aparelho SkyScan 1174 Compact Micro-CT (Kontich, Bélgica) utilizado para obtenção das imagens por micro-TC.



A aquisição das imagens foi realizada seguindo as seguintes etapas:

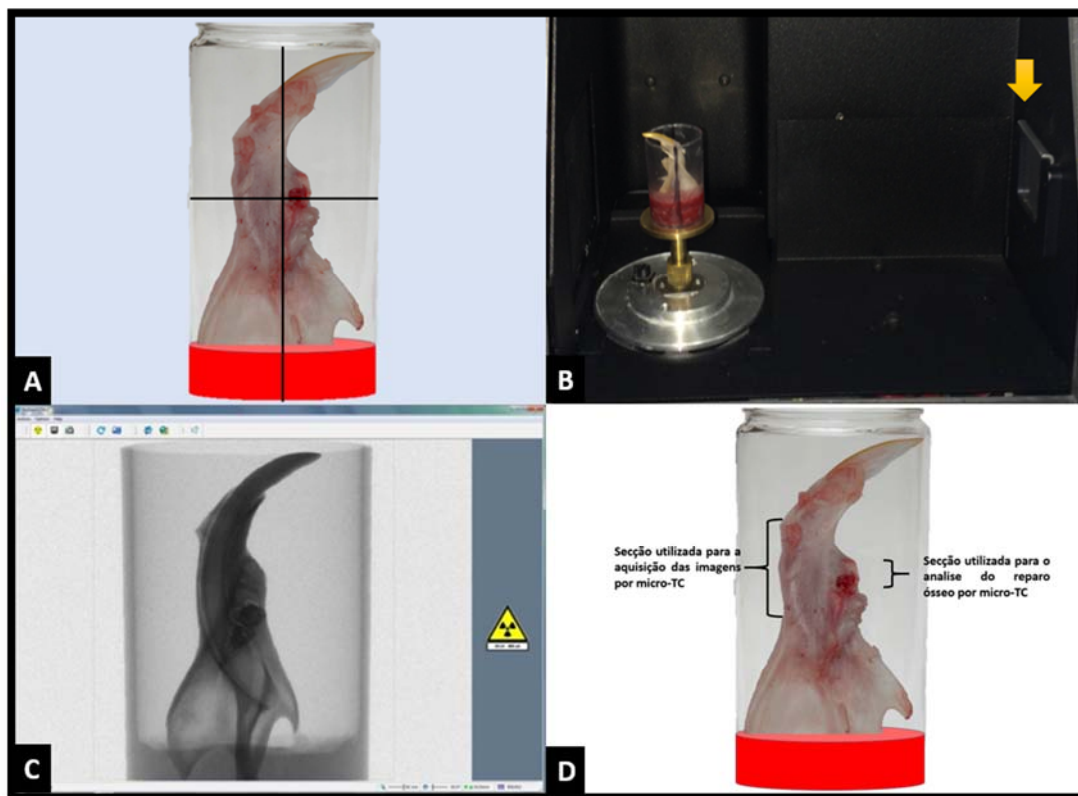
- Preparo e posicionamento da peça anatômica;
- Padronização dos parâmetros de aquisição das imagens;

#### Preparo e posicionamento da peça anatômica

Para a análise por micro-TC, cada hemimandíbula foi posicionada verticalmente num dispositivo cilíndrico de acrílico. Na base desse dispositivo foi colocada cera utilidade (Lysanda Produtos Odontológicos, São Paulo, SP, Brasil), sendo cada hemimandíbula fixada no centro da base, com a região da articulação

temporomandibular para baixo. O dispositivo continha água para evitar a desidratação da peça anatômica durante o escaneamento. A fim de padronizar o alinhamento da peça anatômica com o longo eixo do dispositivo, foram desenhadas linhas pretas longitudinais de referência. O dispositivo foi, então, colocado no interior do micro-TC sobre o suporte correspondente, sendo em seguida, obtida uma pré-visualização da imagem para verificação e ajuste da centralização da peça anatômica (Figura 12).

**Figura 12.** Posicionamento da peça anatômica no Aparelho SkyScan 1174 Compact Micro-CT. A- Hemimandíbula fixada no centro da base do dispositivo de acrílico cilíndrico, com a região da articulação temporomandibular para baixo, mostrando o alinhamento da peça anatômica com o longo eixo do dispositivo, mediante as linhas pretas longitudinais de referência. B- A peça anatômica colocada no interior do aparelho sobre o suporte correspondente. C- Pré-visualização da imagem para verificação e ajuste da centralização da peça anatômica. D- Secções utilizadas para a aquisição e análise do reparo ósseo.



### Padronização dos parâmetros de aquisição das imagens

Os sistemas de micro-TC geralmente operam na faixa de 20 a 110 KVp (Ritman, 2004) e os fótons de Raios X, como em outros sistemas que utilizam radiação



ionizante, quando atravessam o objeto podem causar absorção ou espalhamento, dependendo da energia dos fótons. Para a análise de pequenos objetos aconselha-se o uso de baixa energia, caso contrário, ruídos tornam-se elevados, o que pode prejudicar análises quantitativas (Bouxsein et al, 2010). Considerando o tamanho das peças, nesse estudo o escâner foi operado a 50 kVp.

O número de fótons de cada projeção durante um escaneamento depende da corrente no tubo de Raios X ( $\mu\text{A}$ ), do tempo de integração de cada projeção (ms) e do número de vezes que cada projeção é repetida (frame averaging). Três capturas de imagem foram obtidas a cada rotação de  $0,45^\circ$ , com um tempo de integração de 82 ms. Cada peça anatômica foi escaneada com um giro total de  $180^\circ$ , obtendo-se assim um total de 366 projeções. A intensidade da corrente no tubo de Raios X foi de 795  $\mu\text{A.s}$ .

Na maioria dos sistemas de micro-TC, a energia do feixe de Raios X incidente é equivalente à energia do feixe de Raios X que atravessa a peça anatômica. Quando a proporção entre os fótons com maior energia e os fótons com menor energia varia, aumentando a quantidade de fótons com maior energia, ocorre um aumento da energia média do feixe, tornando-o mais penetrante. Esse comportamento é conhecido como endurecimento do feixe. Neste estudo foi aplicado um algoritmo de correção de endurecimento do feixe fornecido pelo *software SkyScan 1174* em todos os escaneamentos; e um filtro de alumínio de 0,5 mm de espessura foi colocado na saída dos feixes de Raios X, a fim de filtrar os fótons de baixa energia (Figura 12B, seta amarela).

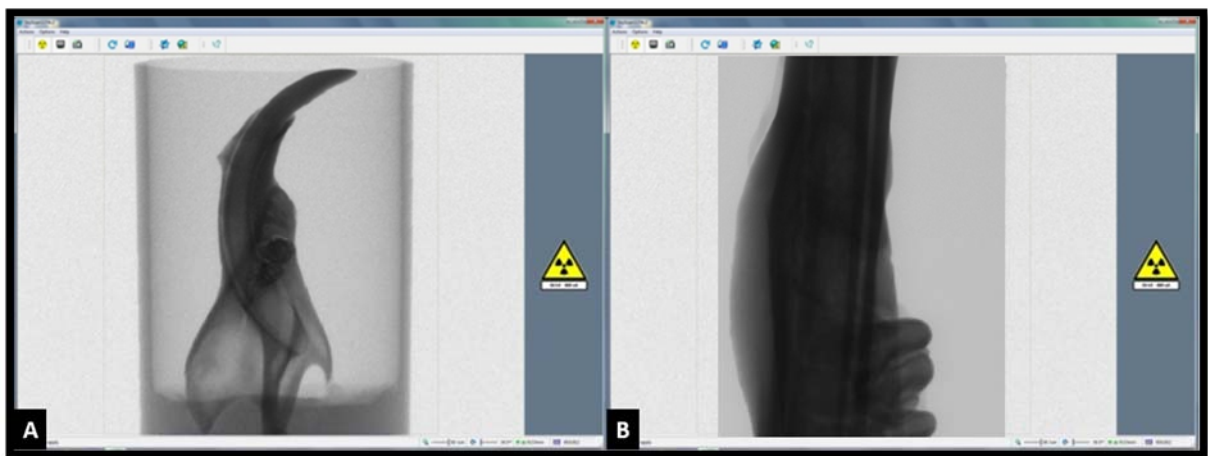
A resolução da imagem em micro-TC varia de acordo com o tamanho do *voxel* estabelecido. O *voxel* nesse caso é descrito como isotrópico, ou seja, apresenta as três dimensões iguais. Para se estabelecer o tamanho desse *voxel*, é preciso determinar qual o tamanho da menor estrutura que será analisada. Nesse estudo foi utilizada uma resolução isotrópica de  $6,08 \mu\text{m}^3$ , estabelecida com base na literatura como o tamanho de *voxel* para a avaliação do osso trabecular nos ratos (Bouxsein et al. 2010) (Figura 13).

Os parâmetros de aquisição das imagens estabelecidos neste estudo estão dispostos de forma resumida no Quadro2.

**Quadro 2.** Parâmetros de aquisição das imagens utilizadas neste estudo.

Variável	Valor estabelecido
Potência do tubo de Raios X	50 kVp
Intensidade dos Raios X na corrente do tubo	795 $\mu$ A.s
Espessura do filtro de alumínio	0,5 mm
Tamanho do <i>voxel</i>	6,08 $\mu$ m <sup>3</sup>
Número de <i>frames</i>	3
Tempo de integração	82 ms
Número de projeções	366

**Figura 13.** Determinação da região que foi escaneada no aparelho SkyScan 1174 Compact Micro-CT. A-Pré-visualização da imagem para verificação e ajuste da centralização da peça anatômica. B-Imagem após as aplicações dos parâmetros de aquisição das imagens utilizados nesse estudo.

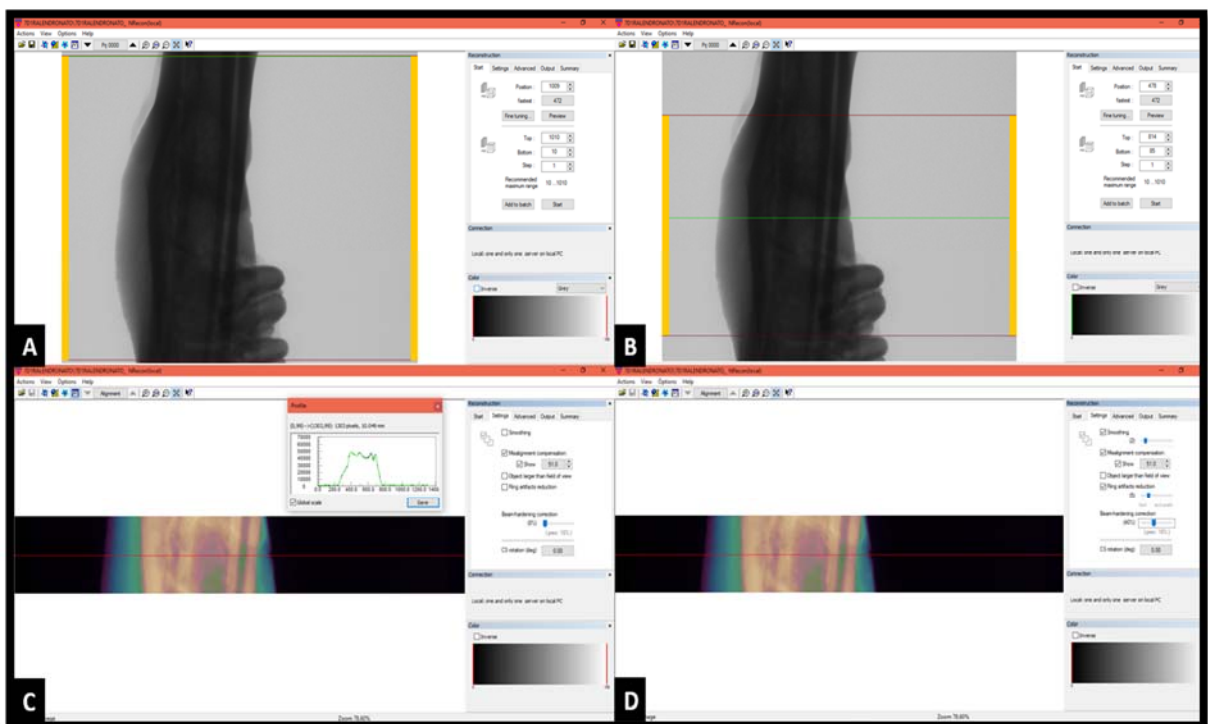


#### 4.10.2. Reconstruções das imagens por micro-TC

Antes de serem analisadas, as imagens foram submetidas a um processo de reconstrução por meio do *software* SkyScan NRecon® (Kontich, Bélgica). Durante esse processo, foram demarcados os limites superior (*top*) e inferior (*bottom*) para a reconstrução. Após essa demarcação foram usadas as ferramentas de correção de artefatos em anéis (*ring artifacts reduction*), suavização dos ruídos (*smoothing*) e correção de artefatos gerados pelo efeito de endurecimento do feixe de Raios X (*beam*

*hardening correction*) das imagens a serem reconstruídas, correções estas que foram aplicadas individualmente em cada peça anatômica, de acordo com os parâmetros relacionados, conforme o Quadro 3. Realizadas as correções, as imagens foram reconstruídas (Figura 14).

**Figura 14.** Reconstruções das imagens por micro-TC. A-Interface do programa NRecon® (Kontich, Bélgica). B-Ajuste dos parâmetros de reconstrução: *top* e *bottom*. C-Verificação do *Show profile* da imagem. D-Ajuste dos parâmetros de reconstrução: *ring artifacts reduction*, *smoothing* e *beam hardening correction*.



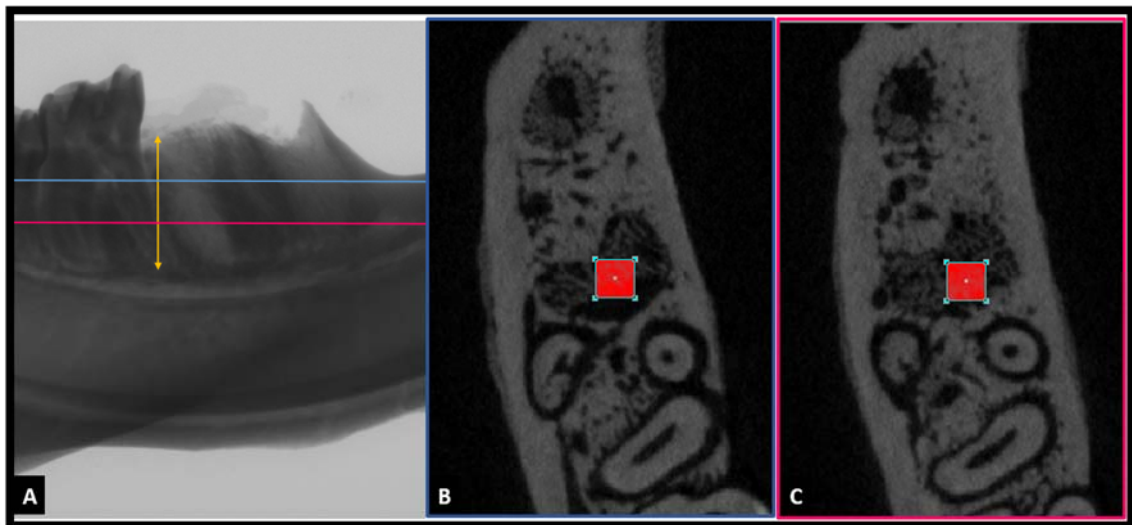
**Quadro 3.** Parâmetros de reconstrução no *software* Skyscan NRecon®

Parâmetro	Valor Definido
Correção de artefatos em anéis	5
Suavização dos ruídos	2
Correção de artefatos gerados pelo efeito de endurecimento do feixe de raios X	40%

#### 4.10.3. Análises das imagens por micro-TC

A análise das imagens foi realizada por meio do *software* Skyscan CTAn (Analyser<sup>®</sup>, Kontich, Bélgica). Para a análise do reparo ósseo foi escolhida a região alveolar da raiz distal por ser anatomicamente uma raiz mais reta, quando comparada à mesial. A região de interesse (*Region of interest* - ROI) foi determinado por um quadrado com dimensão de 1x1x1 mm para todas as imagens que foi selecionado para padronizar a avaliação, sendo posicionado no terço médio da região do reparo ósseo, garantindo que o mesmo se encontrasse sempre dentro da região do reparo ósseo na varredura das imagens axiais (Figura 15).

**Figura 15.** Imagens da área de análise por micro-TC. A-*Shadow projection* da imagem reconstruída no programa CTAn<sup>®</sup> (Kontich, Bélgica). B-Região de interesse na *top selection*. C-Região de interesse na *bottom selection*. Observa-se que a ROI se encontra dentro do reparo ósseo na região da raiz distal do primeiro molar inferior.

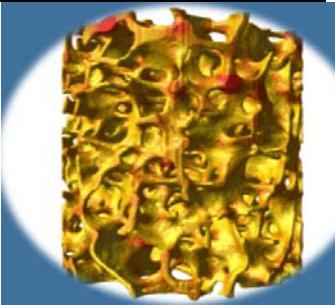
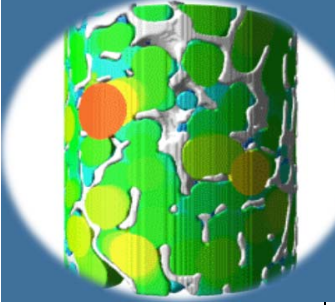
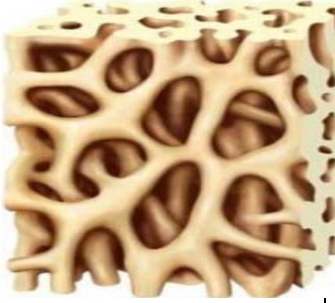


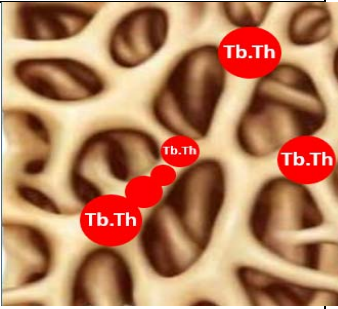
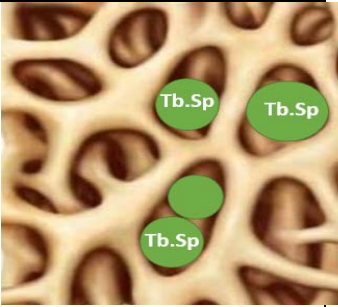
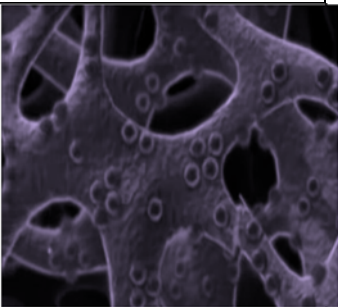
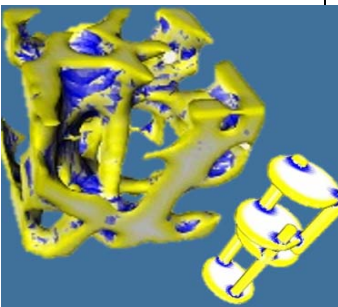
Após se estabelecer a secção da imagem a ser analisada, que foi definida com o auxílio da ferramenta *square region of interest* do *software* Skyscan CTAn, foi gerado um volume de interesse (VOI) a partir da ROI (Figura 15 B, C).

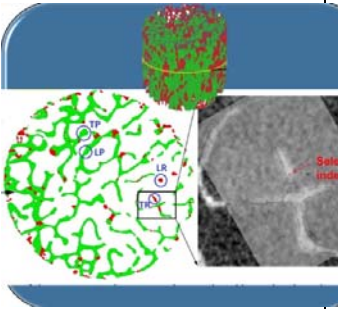

Sobre o VOI adquirido foi realizado a binarização de toda a região e a partir desse passo, todas as imagens ganharam tons binários pretos e brancos. As imagens binarizadas foram submetidas ao processo de limiarização (*thresholding*), em que foi padronizada a faixa de valores de tons de cinza do volume que seriam analisados (40

mínimo – 170 máximo). Uma lista de tarefas (*task list*) personalizada para este estudo foi aplicada e as imagens volumétricas foram analisadas pelo *software* CTAn, quando foram selecionados parâmetros para estudo da microarquitetura do osso esponjoso na região de interesse de acordo com Buxsein et al. (2010). Os parâmetros selecionados para a análise da microarquitetura óssea trabecular estão descritos no quadro 4.

**Quadro 4.** Apresentação e descrição dos parâmetros selecionados para a análise da microarquitetura óssea trabecular na região de interesse avaliada neste estudo.

Abreviação	Variável	Descrição	Unidade padrão	Representação gráfica
BV	Volume ósseo	Volume ósseo segmentado	mm <sup>3</sup>	
BV/TV	Fracção do volume ósseo	Proporção entre o volume ósseo segmentado e o volume total	%	
Tb.N	Número de trabéculas	Medida da média do número de trabéculas por unidade de comprimento	1/mm	

Tb.Th	Espessura das trabéculas	Medida da espessura trabecular, analisada utilizando o método direto 3D	mm	
Tb.Sp	Separação das trabéculas	Distância média entre as trabéculas (medula óssea), analisada utilizando o método direto 3D	mm	
Po (tot)	Porosidade total	Espaços (poros) entre as trabéculas do osso	%	
SMI	Índice do modelo estrutural	Indicador da predominância de bastonetes ou placas no osso trabecular. Uma estrutura apenas com placas ou bastonetes terá valores de SMI 0 e 3, respectivamente.		

MIL	Media da Interceptação do Comprimento	Medida da anisotropia estrutural, é a contagem das interseções entre as placas e bastonetes do osso trabecular.	a	
Conn	Conectividade	Número máximo de ramificações que podem ser cortadas sem separar as trabéculas		
Conn.Dn	Densidade da conectividade	Medida do grau de conectividade das trabéculas normalizada pelo volume total.	1/mm <sup>3</sup>	
Eu.N	Número Euler	Número indicador de conectividade de uma estrutura 3D.		

Ao final do processo de análise, o *software* forneceu listas com todos os valores dos parâmetros supracitados para cada peça anatômica analisada (Quadro 4).

#### 4.10.4. Análises dos dados

Após análise exploratória dos dados, foi realizada a análise dos dados pelo teste de Kruskal-Wallis (Dunn)..

---

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Parâmetros da densidade óssea radiográfica na região do reparo ósseo alveolar

Houve homocedasticidade (teste de Bartlett,  $p=0,58$ ) e distribuição normal (Kolmogorov & Smirnov,  $p>0,1$ ) para os dados de densidade radiográfica, a qual mostrou, de maneira geral, diferenças estatisticamente significantes entre os grupos irradiados e não irradiados, na região de reparo ósseo (two-way ANOVA,  $p<0.05$ ).

Ao se analisar os resultados da densidade óssea radiográfica na Figura 17, observa-se que houve diferença estatisticamente significativa ( $p\leq 0,01$ ) entre os diferentes tratamentos administrados nos grupos não irradiados. O grupo nicotina/ácido zoledrônico apresentou o maior valor de DeRx quando comparado aos demais grupos, seguido pelo grupo nicotina/alendronato de sódio. O grupo nicotina foi o grupo que apresentou o menor valor de DeRx de todos os grupos não irradiados.

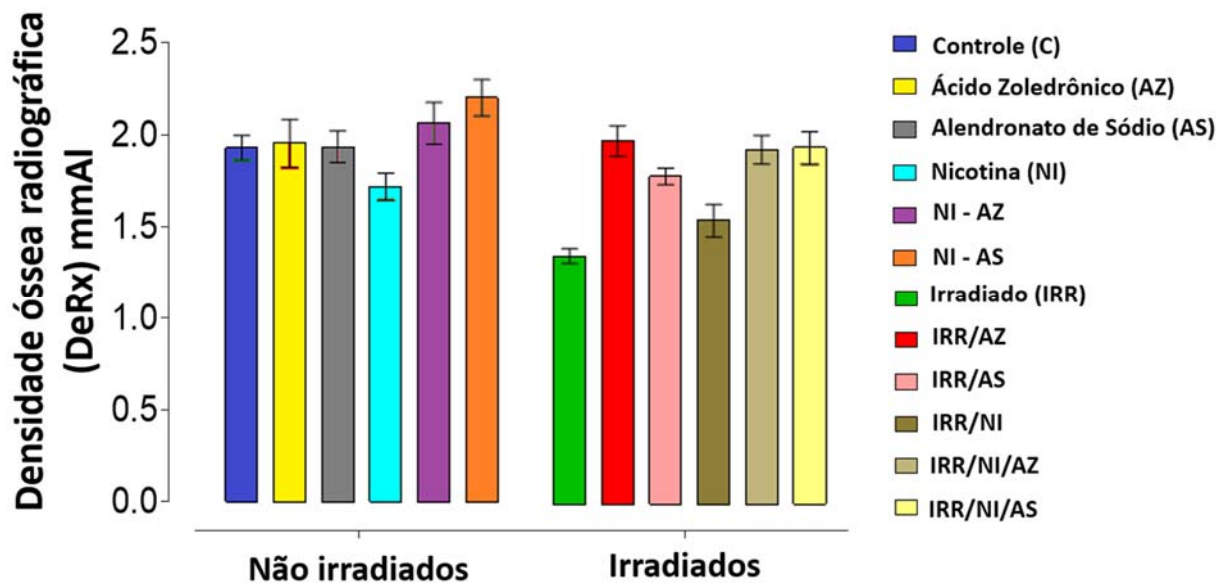
No caso de comparação entre os grupos irradiados, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p\leq 0,01$ ) apenas no grupo irradiado que apresentou uma densidade radiográfica (DeRx) menor quando comparado com os demais grupos. Assim como, o grupo irradiado/nicotina mostrou um menor valor de DeRx em relação aos grupos irradiado/ácido zoledrônico, irradiado/alendronato de sódio e entre os grupos irradiados com administração combinada da nicotina com os dois bifosfonatos (Figura 17).

Ao se comparar os grupos irradiados e não irradiados, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p\leq 0,01$ ) entre o grupo irradiado e irradiado/nicotina, que tiveram os menores valores de DeRx quando comparado aos demais grupos não irradiados. Também foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo irradiado/ácido zoledrônico, que apresentou o maior valor de DeRx, em relação ao grupo nicotina. Além disso, o grupo irradiado/nicotina/ácido zoledrônico teve menor DeRx quando comparado com o grupo nicotina/alendronato de sódio. Observa-se ainda que os grupos; ácido zoledrônico, alendronato de sódio, nicotina/ácido zoledrônico e nicotina/alendronato



de sódio apresentaram maiores valores de DeRx quando comparado ao grupo irradiado/alendronato de sódio (Figura 17).

**Figura 16** – Densidade óssea radiográfica em mmAl (Médias  $\pm$  D.P.) entre os grupos irradiados e não irradiados, considerando os diferentes tratamentos utilizados.



---

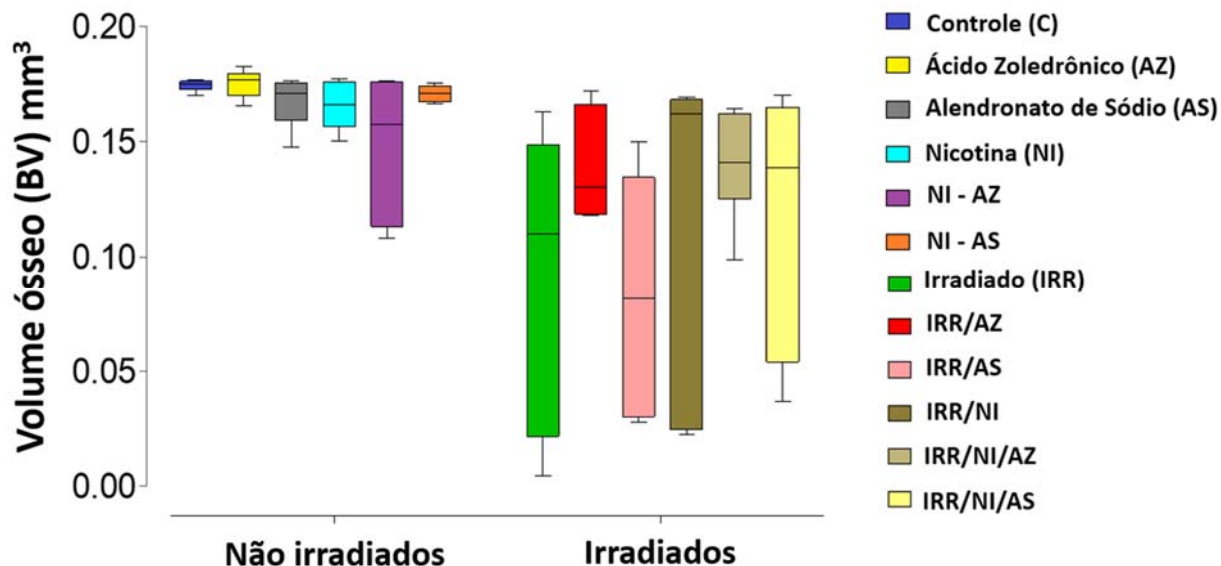
## 5.2 Parâmetros morfométricos da microarquitetura na região do reparo ósseo alveolar

A avaliação da microarquitetura óssea na região do reparo ósseo alveolar baseou-se na análise dos seguintes parâmetros:

- 5.2.1. Volume ósseo, BV
- 5.2.2. Volume Ósseo/Volume Tecidual, BV/TV
- 5.2.3. Número de trabéculas, Tb.N
- 5.2.4. Espessura trabecular, Tb.Th
- 5.2.5. Separação das trabéculas, Tb.Sp
- 5.2.6. Porosidade total, Po(tot)
- 5.2.7. Índice do modelo estrutural, SMI
- 5.2.8. Media da Interceptação do Comprimento, MIL
- 5.2.9. Conectividade, Conn;
- 5.2.10. Densidade da conectividade, Conn.Dn.
- 5.2.11. Número euler, Eu.N

Ao ser avaliado o volume ósseo na figura 18, não se observou diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado os grupos não irradiados e irradiados separadamente. Entretanto, quando comparado os grupos não irradiados com os grupos irradiados, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) nos animais dos grupos controle e ácido zoledrônico que apresentaram um volume ósseo maior em relação a todos os grupos irradiados. Além disso, os grupos alendronato de sódio, nicotina e nicotina/alendronato de sódio mostraram-se também com maior volume quando comparado com o volume ósseo do grupo irradiado e irradiado/alendronato de sódio.

**Figura 17** – Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro Volume ósseo (BV). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min.

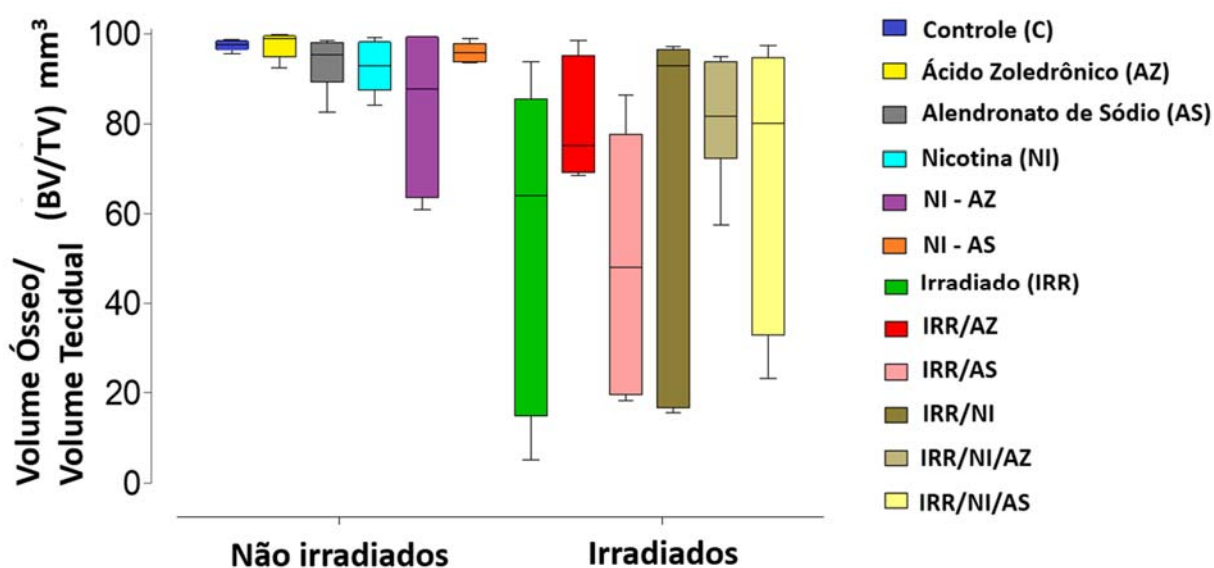


Em relação a análise do volume ósseo/volume tecidual na figura 19, quando foi analisado a relação entre os grupos não irradiados, nenhuma diferença estatisticamente significante foi observada ( $p \geq 0,05$ ).

No entanto, observou-se diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ) quando se comparou o tratamento nos grupos irradiados. O grupo irradiado apresentou um volume ósseo/volume tecidual menor em relação aos grupos irradiado/ácido zoledrônico, irradiado/nicotina e irradiado/nicotina/alendronato de sódio. Assim como, o grupo irradiado/alendronato de sódio apresentou-se com um volume menor quando comparado com o grupo irradiado/nicotina. Já o grupo irradiado/ácido zoledrônico apresentou um volume maior quando comparado com o grupo irradiado/alendronato de sódio, e menor em relação ao grupo irradiado/nicotina/ácido zoledrônico. Esta mesma combinação irradiado/nicotina/ácido zoledrônico; teve uma distribuição simétrica e volume menor em relação ao grupo irradiado/nicotina e maior em relação ao grupo irradiado/nicotina/alendronato de sódio (Figura 19).

Ao comparar os grupos irradiados e não irradiados, observou-se que todos os grupos irradiados que apresentaram diferença estatística tiveram um menor volume e uma distribuição assimétrica quando comparados aos não irradiados. Os grupos que tiveram diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) foram o grupo irradiado e irradiado/nicotina/ácido zoledrônico em relação aos grupos ácido zoledrônico e nicotina/alendronato de sódio. Assim como, quando se comparou o grupo irradiado/ácido zoledrônico em relação aos grupos controle, alendronato de sódio e nicotina/ácido zoledrônico. Já o grupo irradiado/nicotina teve uma distribuição assimétrica em comparação com os grupos controle, alendronato de sódio e nicotina/ácido zoledrônico (Figura 19).

**Figura 18** – Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro Volume Ósseo/Volume Tecidual (BV/TV). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min.

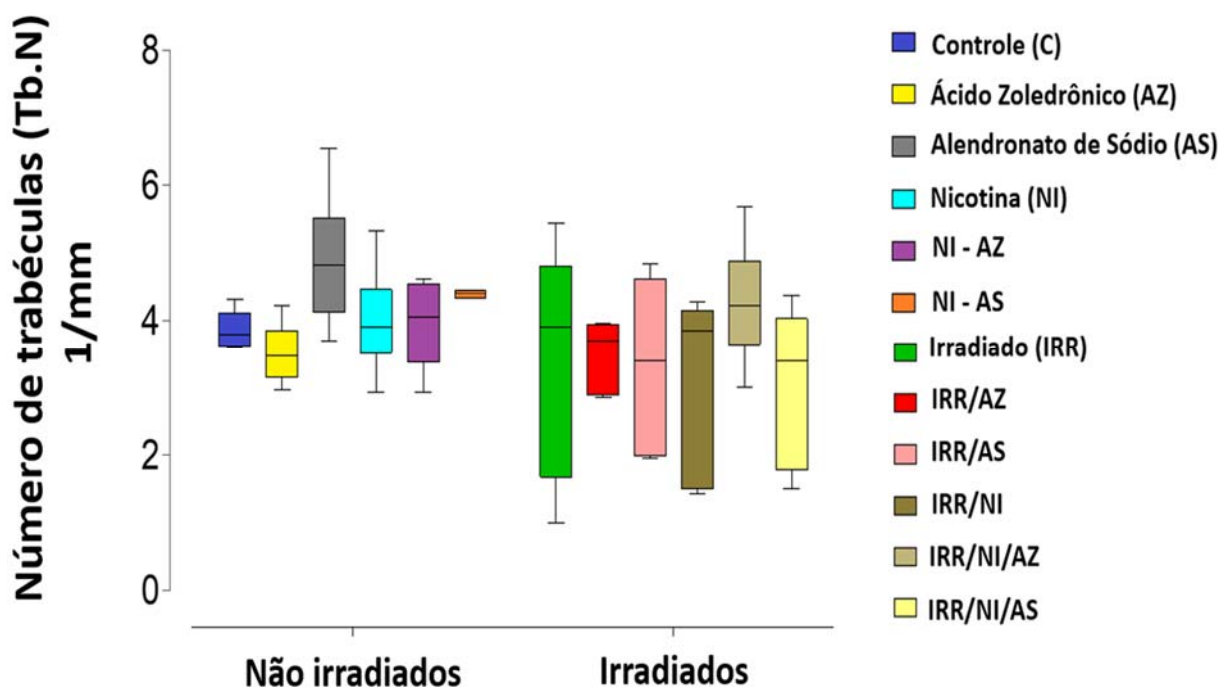


Na avaliação do parâmetro número de trabéculas na figura 22, nos grupos não irradiados observou-se diferença estaticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ). O grupo controle teve menor número de trabéculas quando comparado com o grupo nicotina/alendronato de sódio. Este, por sua vez quando comparado também apresentou um maior número de trabéculas em relação ao grupo nicotina/ ácido zoledrônico.

Não observou-se diferença estaticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) comparando os diferentes tratamentos no grupo irradiado, com exceção do grupo irradiado/nicotina/alendronato de sódio que teve um número menor de trabéculas em relação a todos os outros, exceto com o grupo irradiado (Figura 22).

Finalmente, quando se comparou os grupos não irradiados e irradiados, verificou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) para o grupo nicotina/alendronato de sódio, que teve maior número de trabéculas em relação a todos os outros grupos, com exceção dos grupos irradiado e irradiado/nicotina/alendronato de sódio. Assim, quando se comparou o grupo irradiado/nicotina/alendronato de sódio, mostrou menor número de trabéculas em relação aos grupos nicotina/ácido zoledrônico e controle (Figura 22).

**Figura 19** – Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro número de trabéculas (Tb.N). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min.

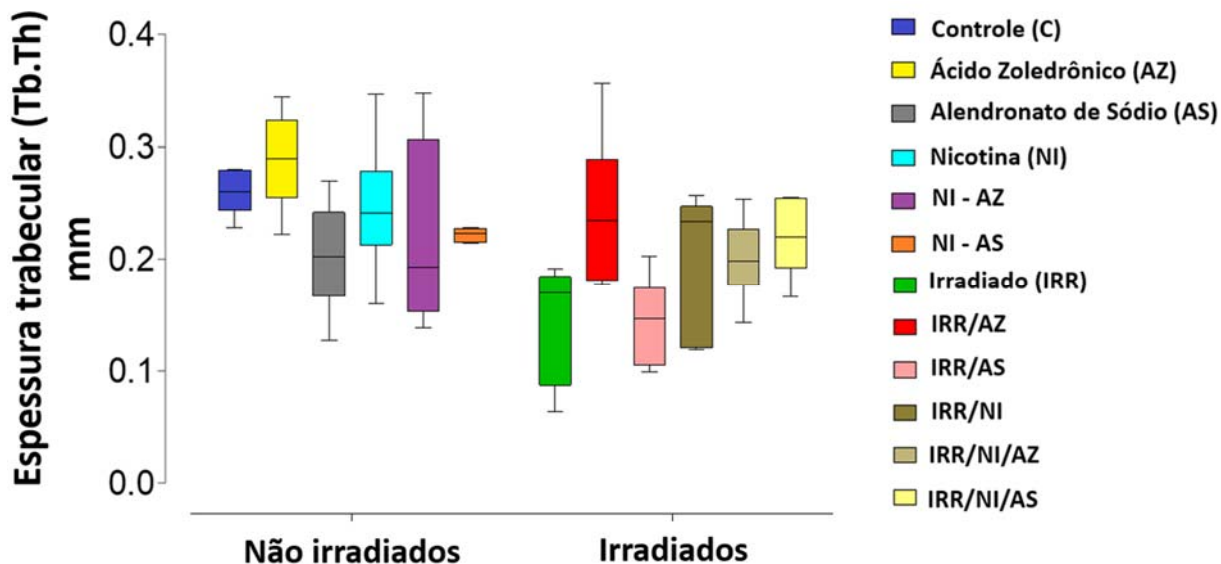


Em relação ao parâmetro espessura trabecular na figura 23, nos grupos não irradiados, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada ( $p \geq 0,05$ ).

Entre os grupos irradiados observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) da seguinte maneira: o grupo irradiado mostrou-se com menor espessura trabecular quando comparado os grupos com administração de irradiado/ácido zoledrônico e irradiado/nicotina; assim como uma maior espessura quando comparado com o grupo irradiado/alendronato de sódio. Já o grupo irradiado/ácido zoledrônico e irradiado/nicotina apresentaram uma maior espessura trabecular quando comparado com os grupos irradiados de nicotina com a combinação dos bifosfonatos, mas estes se encontravam distribuídos mais simetricamente. No grupo irradiado/alendronato de sódio observou-se espessura trabecular menor quando comparado com o grupo irradiado/nicotina/ácido zoledrônico (Figura 23).

Quando se comparou os grupos irradiados e não irradiados observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ). O grupo irradiado teve uma espessura trabecular menor que o grupo ácido zoledrônico, assim como quando se comparou o grupo irradiado/nicotina/ácido zoledrônico com os grupos nicotina/alendronato de sódio e ácido zoledrônico. Já quando se comparou o grupo irradiado/nicotina observou-se uma maior espessura em relação aos grupos alendronato de sódio e a combinação da nicotina com os bisfosfonatos, e menor espessura quando comparado com os grupos controle e nicotina. Por outro lado, o grupo irradiado/ácido zoledrônico teve uma maior espessura quando comparado com o grupo alendronato de sódio (Figura 23).

**Figura 20** – Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro espessura trabecular (Tb.Th). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min.

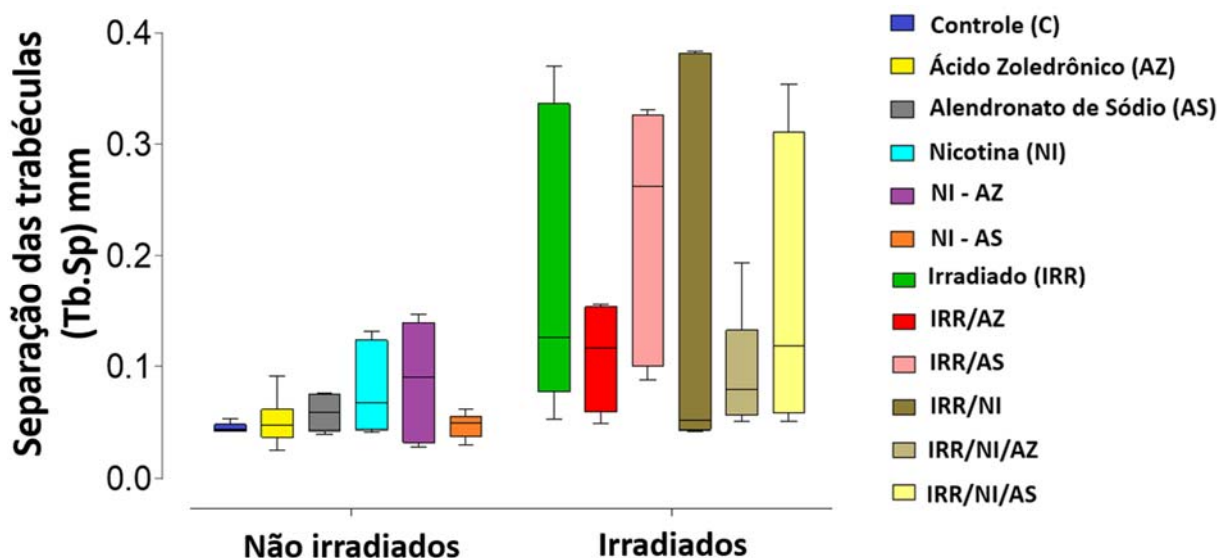


Nenhuma diferença estatisticamente significativa ( $p \geq 0,05$ ) foi observada entre os grupos não irradiados para o parâmetro separação das trabéculas na figura 24, com exceção dos grupos que foram tratados com a combinação da nicotina e ambos bifosfonatos, onde o grupo nicotina/ácido zoledrônico teve maior separação trabecular.

Quando foi comparado os grupos irradiados nos diversos tratamentos encontrou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ). Para o grupo irradiado a separação das trabéculas foi maior quando comparado com os grupos irradiado/ácido zoledrônico, irradiado/nicotina e irradiado/nicotina/alendronato de sódio; assim como do grupo irradiado/ácido zoledrônico teve uma separação de trabéculas maior em relação aos grupos irradiado/nicotina/ácido zoledrônico e menor com respeito ao grupo irradiado/alendronato de sódio. O grupo irradiado/nicotina mostrou uma separação trabecular menor quando comparado com o grupo irradiado/alendronato de sódio e irradiado/nicotina/ácido zoledrônico. Por último, os grupos com administração de nicotina e bisfosfonatos também apresentaram diferença significativa entre eles, onde o grupo com maior separação de trabéculas foi o irradiado/nicotina/alendronato de sódio (Figura 24).

Quando se comparou o grupo não irradiado e irradiado, verificou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) nos seguintes grupos. O grupo irradiado, irradiado/alendronato de sódio e irradiado/nicotina/ácido zoledrônico apresentaram maior separação de trabéculas, em relação ao grupo nicotina/alendronato de sódio. Além disso, para o grupo nicotina/ácido zoledrônico e alendronato de sódio tiveram uma menor separação trabecular que o grupo irradiado/ácido zoledrônico. Já entre o grupo irradiado/nicotina/ácido zoledrônico observou-se uma separação maior quando comparado com os grupos ácido zoledrônico (Figura 24).

**Figura 21** – Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro separação das trabéculas (Tb.Sp). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min.



Ao ser analisado a figura 25 para a porosidade total, nenhuma diferença estatisticamente significativa ( $p \geq 0,05$ ) foi observada entre os grupos não irradiados.

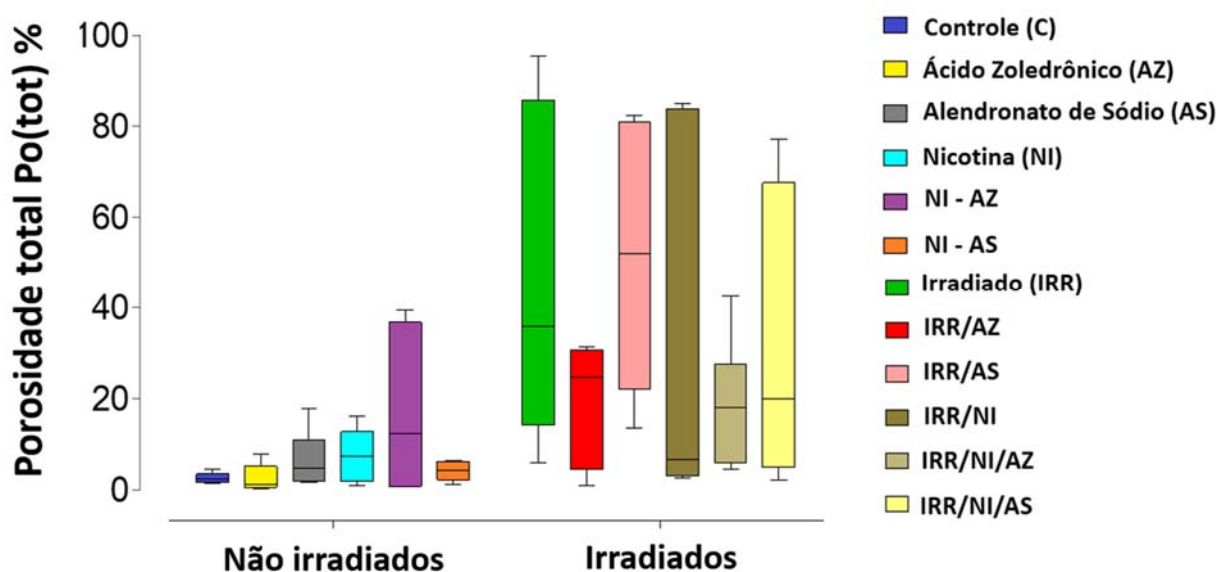
Já entre os grupos irradiados, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre o grupo irradiado que teve maior porosidade em relação com os grupos irradiado/ácido zoledrônico, irradiado/nicotina e irradiado/nicotina/alendronato de sódio. Também entre o grupo irradiado/ácido zoledrônico observou-se menor porosidade com respeito ao grupo irradiado/alendronato de sódio e maior porosidade com respeito ao grupo



irradiado/nicotina/ácido zoledrônico. Além disso, o grupo irradiado/nicotina apresentou menor porosidade quando comparado com os grupos irradiado/alendronato de sódio e com o grupo irradiado/nicotina/ácido zoledrônico. Já quando comparado os grupos irradiados com nicotina e combinação dos bifosfonatos, o grupo irradiado/nicotina/alendronato de sódio mostrou maior porosidade, mas com uma distribuição assimétrica (Figura 25).

Também observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado os grupos não irradiado e irradiados. Para o grupo irradiado e irradiado/nicotina/ácido zoledrônico encontrou-se uma porosidade maior em relação aos grupos ácido zoledrônico e nicotina/alendronato de sódio. Além disso, os grupos irradiado/ácido zoledrônico e irradiado/nicotina apresentaram uma porosidade maior com respeito aos grupos controle e alendronato de sódio. Por outro lado, quando comparado o grupo nicotina/ácido zoledrônico com o grupo irradiado/nicotina observou-se uma porosidade maior, porém quando comparado com o grupo irradiado/ácido zoledrônico a porosidade foi menor (Figura 25).

**Figura 22** – Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro porosidade total Po(tot). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min.

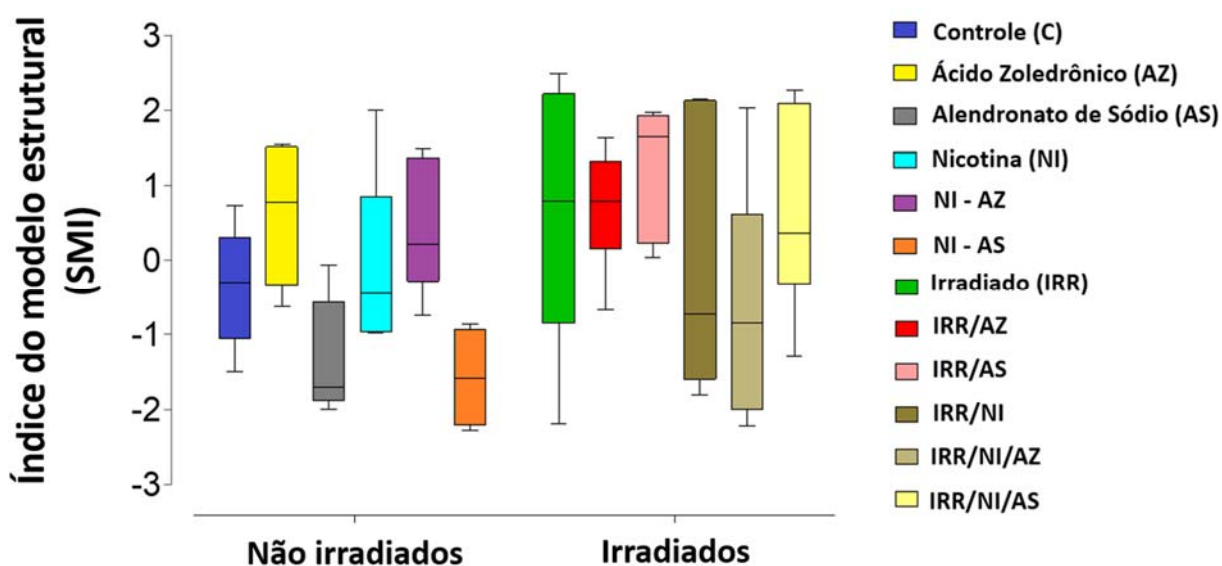


Quando comparou-se os grupos não irradiados parâmetro o índice do modelo estrutural entre as diferentes administrações na figura 26, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada ( $p \geq 0,05$ ), com exceção do grupo nicotina/alendronato de sódio que apresentou um índice mais próximo de “0” em relação aos grupos controle, nicotina e nicotina/ácido zoledrônico.

Já entre os grupos irradiados com diferentes tratamentos, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ), no grupo irradiado/nicotina/alendronato de sódio que teve índice mais próximo a “0” quando comparado com os grupos irradiado, irradiado/alendronato de sódio; irradiado/nicotina e irradiado/nicotina/ácido zoledrônico (Figura 26).

No caso da comparação dos grupos não irradiados com os irradiados, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ). O grupo alendronato de sódio apresentou um índice mais próximo de “0” quando comparado com o grupo irradiado/nicotina/ácido zoledrônico, assim como os grupos nicotina/ácido zoledrônico e nicotina quando comparado com o grupo irradiado/nicotina/alendronato de sódio. Por outro lado, o grupo nicotina/alendronato de sódio apresentou o índice mais próximo a “0” quando comparado com os grupos irradiado, irradiado/alendronato de sódio, irradiado/nicotina e irradiado/nicotina/ácido zoledrônico (Figura 26).

**Figura 23** – Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro índice do modelo estrutural (SMI). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min.

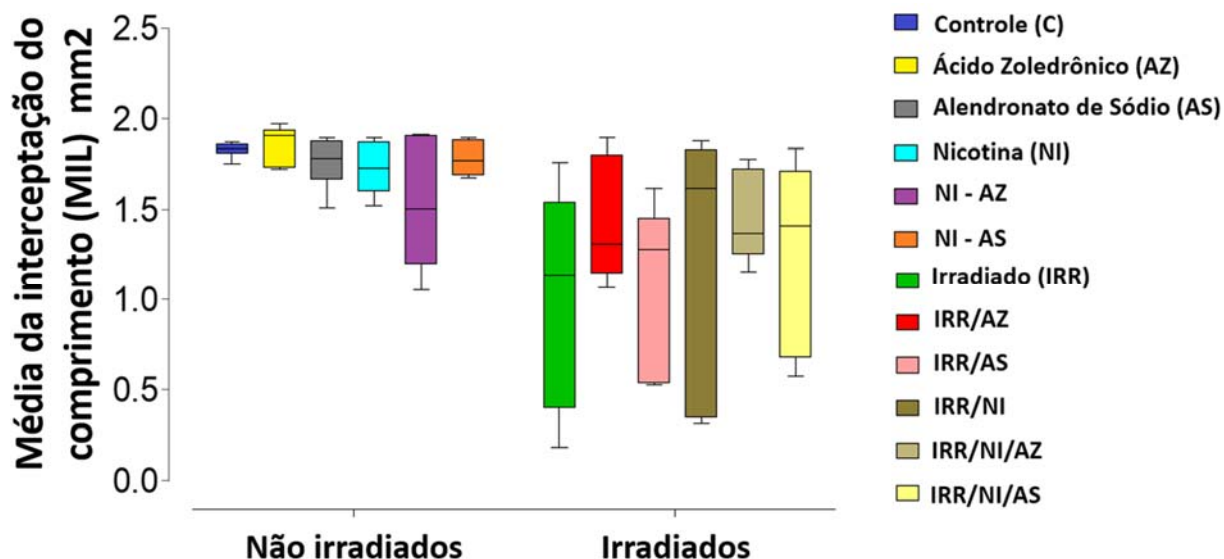


Para o parâmetro da média da interceptação do comprimento na figura 27 nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada ( $p \geq 0,05$ ), entre os grupos não irradiados.

Para os grupos irradiados, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ). O grupo irradiado foi menor com respeito aos grupos irradiado/ácido zoledrônico, irradiado/nicotina e irradiado/nicotina/alendronato de sódio; assim como o grupo irradiado/alendronato de sódio apresentou-se também menor em relação com o grupo irradiado/nicotina. Além disso, o grupo com administração de irradiado/nicotina/ácido zoledrônico foi menor e teve uma distribuição mais simétrica em relação com o grupo irradiado/nicotina/ alendronato de sódio e irradiado/nicotina, assim como esse mesmo grupo irradiado/nicotina/ácido zoledrônico foi maior quando comparado com o grupo irradiado/ácido zoledrônico (Figura 27).

Em relação a comparação entre o grupo irradiado e não irradiado, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre o grupo irradiado/nicotina que foi menor em relação ao grupo controle. Para os grupos irradiado e irradiado/nicotina/ácido zoledrônico observou-se também menor em relação aos grupos ácido zoledrônico e nicotina/alendronato de sódio. Também observou-se esta relação quando comparado o grupo irradiado/ ácido zoledrônico com respeito aos grupos alendronato de sódio e nicotina/ ácido zoledrônico, já quando comparado estes dois grupos não irradiado com o grupo irradiado/nicotina, este apresentou-se menor em relação ao grupo alendronato de sódio e maior quando comparado com o grupo nicotina/ ácido zoledrônico (Figura 27).

**Figura 24** – Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro média da interceptação do comprimento (MIL). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min.



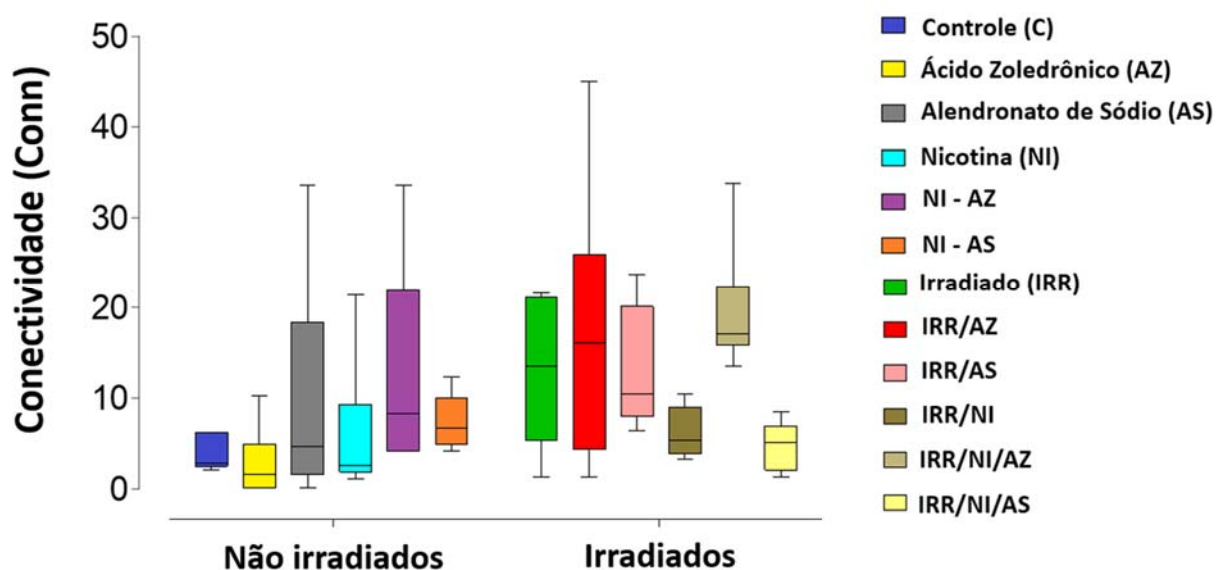
Para o parâmetro conectividade na figura 28, comparando os grupos não irradiados, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) apenas no grupo alendronato de sódio com uma conectividade maior em relação aos grupos controle, ácido zoledrônico, e menor em relação ao grupo nicotina/ácido zoledrônico.

Nos grupos irradiados observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ). Os grupos irradiado e irradiado/alendronato de sódio tiveram uma conectividade maior quando comparado com o grupo irradiado/nicotina. Também o grupo irradiado/ácido zoledrônico apresentou uma conectividade maior do que o grupo irradiado/alendronato de sódio, e menor comparado com o grupo irradiado/nicotina/ácido zoledrônico. Além disso, o grupo irradiado/nicotina/ácido zoledrônico mostrou uma conectividade maior em relação ao grupo irradiado/nicotina (Figura 28).

Com respeito à comparação dos grupos não irradiados e os irradiados, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ). O grupo irradiado/ácido zoledrônico em relação ao grupo alendronato de sódio; assim o grupo irradiado/nicotina) teve diferença com os grupos alendronato de sódio e o grupo nicotina. Também verificou-se nos grupos irradiado e não irradiado de nicotina/ácido zoledrônico, além do grupo irradiado/nicotina/ácido zoledrônico com o grupo ácido

zoledrônico. Esta diferença mostrou que os grupos não irradiados tiveram menor conectividade em relação aos irradiados (Figura 28).

**Figura 25** – Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro conectividade (Conn). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min.

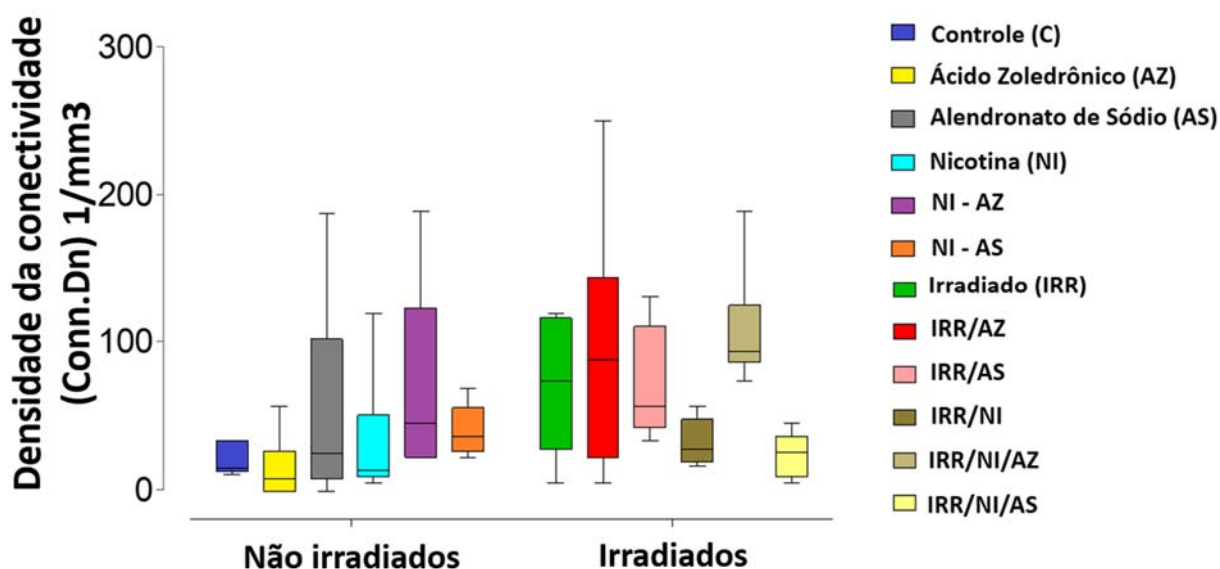


Ao comparar os grupos não irradiados no parâmetro da densidade da conectividade na figura 29, apenas quando comparado o grupo alendronato de sódio que apresentou uma maior Conn.Dn em relação aos animais do grupo controle e ácido zoledrônico, assim como uma menor Conn.Dn com respeito ao grupo nicotina/ácido zoledrônico, verificou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ).

Nos grupos irradiados, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre o grupo irradiado/nicotina que teve uma Conn.Dn menor em relação aos grupos irradiado e irradiado/alendronato de sódio. Também o grupo irradiado/ácido zoledrônico mostrou uma Conn.Dn menor em relação ao grupo irradiado/nicotina/ácido zoledrônico, e maior quando comparado com o grupo irradiado/alendronato de sódio. Já o grupo irradiado/nicotina/ácido zoledrônico teve diferença estatística quando comparado com o grupo irradiado/nicotina, apresentando uma Conn.Dn maior (Figura 29).

Comparando os grupos não irradiado e irradiados verificou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ). O grupo alendronato de sódio em relação aos grupos irradiado/ácido zoledrônico, irradiado/nicotina e irradiado/nicotina/alendronato de sódio. Também observou-se entre o grupo ácido zoledrônico com relação aos grupos irradiado/alendronato de sódio e o grupo irradiado/nicotina/ácido zoledrônico. Por outro lado, entre o grupo irradiado e não irradiado com administração de nicotina/ácido zoledrônico, assim como dos grupos com administração de nicotina irradiado e não irradiado. Toda esta diferença encontrada mostrou que os grupos irradiados tiveram maior Conn.Dn quando comparado com os não irradiados (Figura 29).

**Figura 26** – Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro densidade da conectividade (Conn.Dn). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min.

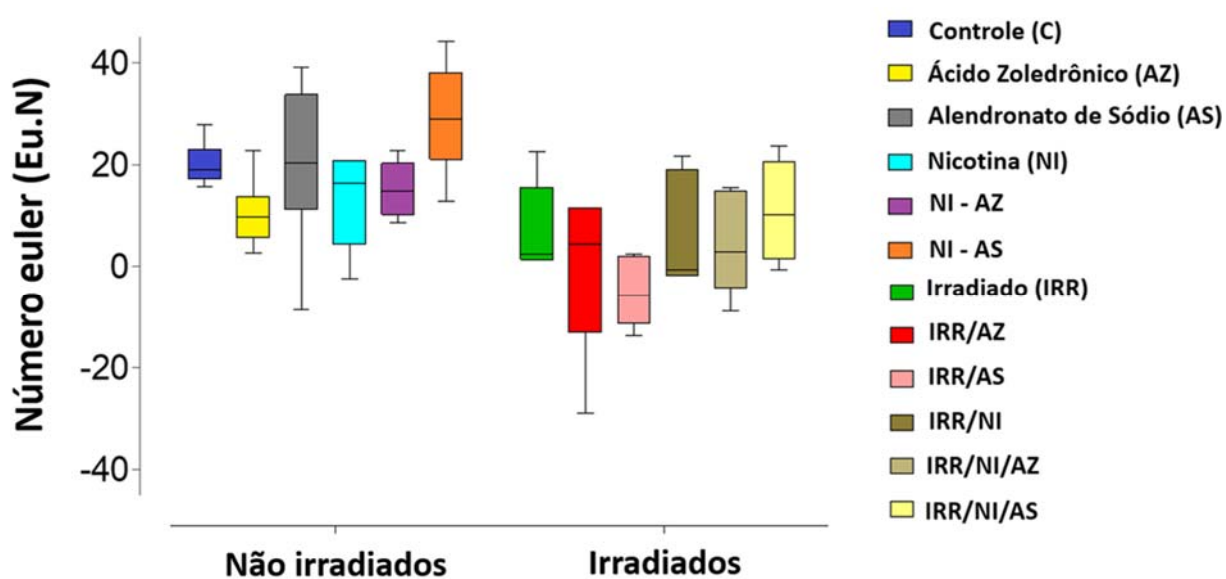


Ao ser avaliado o parâmetro número euler na figura 30, nos grupos não irradiados dentro dos diferentes tratamentos, verificou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) apenas quando foi comparado o grupo nicotina/alendronato de sódio que apresentou um Eu.N maior em relação aos grupos controle, alendronato de sódio e nicotina/ácido zoledrônico.

Quando comparado os grupos irradiados observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ). O grupo irradiado/ácido zoledrônico teve um maior Eu.N comparado com os grupos irradiado/alendronato de sódio e irradiado/nicotina/ácido zoledrônico; também o grupo irradiado/nicotina/alendronato de sódio apresentou um maior Eu.N quando comparado com os grupos irradiado/alendronato de sódio e irradiado/nicotina/ácido zoledrônico (Figura 30).

Já quando comparou-se o grupo não irradiado e irradiado, observou-se diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) no grupo nicotina/alendronato de sódio em relação com os grupos irradiado, irradiado/alendronato de sódio e irradiado/nicotina. Assim como, quando comparado o grupo alendronato de sódio e controle com respeito ao grupo irradiado/ácido zoledrônico, além do grupo alendronato de sódio em relação ao grupo irradiado/nicotina/alendronato de sódio. Também verificou-se esta diferença significativa entre o grupo irradiado/nicotina/ácido zoledrônico respeito a todos os grupos com exceção dos grupos controle e alendronato de sódio. Esta diferença mostrou que os grupos não irradiados tiveram um Eu.N maior que os grupos irradiados (Figura 30).

**Figura 27** – Análise da microarquitetura óssea da região do reparo ósseo pelo parâmetro número euler (Eu.N). Linha central = Medianas; Caixa = 1º e 3º quartis; Suíças = valores máx. e min.



## 6 DISCUSSÃO

O reparo ósseo alveolar tem sido estudado extensivamente e se tornou assim um processo bem conhecido. No entanto, há pouca informação disponível na literatura sobre a influência da nicotina e/ou dos bisfosfonatos na cicatrização óssea alveolar quando existe deficiência de estrogênio e/ou exposição à radiação ionizante.

A osteoporose é uma condição patológica óssea provocada pelo desequilíbrio no processo de remodelação do osso (Parfitt, 1987; Finkelstein 1998), caracterizada por diminuição da massa óssea e alterações na sua microarquitetura (Mardas et al. 2016). No período pós-menopausa, esse quadro de osteopenia atinge milhares de mulheres em todo o mundo, devido à deficiência de estrogênio (Chavassieux et al. 1997; Akhter et al. 2007; Erdogan et al. 2009; Jee et al. 2010; Adams et al. 2013; Dai et al. 2014; O'Connor et al. 2016 e Eiken e Vestergaard 2016). Neste estudo, a amostra constituída por ratas que foram submetidas à ovariectomia, procedimento amplamente usado na literatura como um modelo pré-clínico para avaliar alterações ósseas na osteoporose (Francisco et al. 2011; Yoon et al. 2012; Chen et al. 2013; Salazar et al. 2015; Bauer et al. 2015; Mardas et al. 2016), e é relatado como o melhor modelo representativo de osteoporose pós-menopausa (Bauer et al. 2015).

Fumar 15 cigarros por dia é considerado, para mulheres, um fator de risco associado ao diagnóstico de qualquer tipo de câncer na região de cabeça e pescoço no período pós-menopausa (Baccaro et al. 2015), todavia outros reportam um aumento no risco de fratura óssea (Shen et al. 2015). A dose selecionada no presente estudo está baseada em estudos anteriores (Lamota et al. 2008; López-Moreno et al. 2004) que relataram que a administração de 0.8 mg/kg de nicotina produz níveis elevados da mesma no plasma dos ratos, que foram comparáveis ao registrado em humanos fumantes de 10 cigarros por dia, que é considerado fumante moderado. No intuito de atingir níveis mais elevados, foi administrada a dose de 1,0 mg/kg de nicotina às ratas do presente estudo.

Em relação aos bisfosfonatos usados, a dosagem utilizada no caso do alendronato de sódio foi de 5 mg/kg, 3 vezes por semana, totalizando 15 mg/kg. Esta dose, que também foi usada por Kim et al. (2011) na avaliação do reparo ósseo alveolar, seria comparável com uma dose dez vezes maior que a administrada aos



humanos, baseado no princípio do fator de segurança de dez vezes, que considera as diferenças potenciais entre espécies na sensibilidade a uma droga ao investigar um novo *endpoint*, como neste caso, o reparo ósseo do alvéolo (Aguirre et al. 2010). Por outro lado, o ácido zoledrônico foi administrado por uma dose sistêmica de 0,1 mg / kg, com base na dose terapêutica comumente usada em seres humanos (Amanat et al. 2007), equivalente à dose humana de 5 mg a qual suprime a reabsorção óssea, protege contra a perda do osso cortical e trabecular, e evita a deterioração dos parâmetros mecânicos (Gasser et al. 2008). Quando comparado com o alendronato, o ácido zoledrônico apresenta uma potência 10 vezes mais elevada na prevenção da perda óssea, como relatado no estudo de Gasser et al. (2008), dados que suportam a utilização de um regime de dosagem anual para o tratamento da osteoporose. Não se administrou doses maiores do ácido zoledrônico devido ao fato de estudos anteriores terem relatado comprometimento significativo do reparo ósseo pós-extração, áreas de exposição óssea ou formação de sequestro ósseo por administração de doses elevadas de bisfosfonatos em ratos, especialmente pelo ácido zoledrônico (Hikita et al. 2009; Allen et al. 2011; Barba-Recreo et al. 2014; Adler 2016).

Não há estudos de comparação destas drogas para ajudar a determinar a eficácia no reparo ósseo alveolar. Consequentemente, a escolha do medicamento deve se basear na sua capacidade de melhorar a densidade óssea e reduzir o risco de fraturas ósseas (Gasser et al. 2008; Bilezikian et al. 2009; Chen et al. 2013; Baiomy et al. 2014; Zhou et al. 2016; O'Connor et al. 2016). Um bisfosfonato oral como o alendronato de sódio é recomendado como terapia de primeira escolha devido ao seu baixo custo e à disponibilidade de dados sobre seus efeitos ao longo prazo (Bilezikian et al. 2009; O'Connor et al. 2016). Se os pacientes apresentam alterações gastrointestinais significativas, a administração do ácido zoledrônico uma vez por ano pode ser uma melhor escolha (Bilezikian et al. 2009), além de apresentar uma potência 10 vezes mais elevada quando comparada ao alendronato de sódio (Gasser et al. 2008), acelerando muitas vezes a consolidação óssea em caso de fraturas (Baiomy et al. 2014; Zhou et al. 2016) ou a osseointegração em caso de implantes (Baiomy et al. 2014). Além disso, O'Connor et al. (2016) citam que existe diferença entre o ácido zoledrônico e o alendronato de sódio na redução do risco de fratura vertebral, sendo 70% e 50% respectivamente. Do ponto de vista clínico em pacientes com câncer, o ácido zoledrônico é mais indicado não só por diminuir a dor óssea devido à lise,

melhorando a microarquitetura óssea e força, e reduzindo o risco de fraturas, mas também por mostrar uma atividade anticancerígena direta e indireta (Curtis et al. 2016), embora nesses casos a dose seja mais elevada quando comparado à dose empregada nesse estudo, uma vez que nossa dose é para o tratamento de osteoporose.

Com relação à radiação ionizante, quando aplicada na região de cabeça e pescoço, pode afetar os componentes do osso com diferentes graus de sensibilidade dependendo da dose aplicada (Hopewell et al. 2003; Hamilton et al. 2006, Kondo et al. 2009). Os efeitos da radiação no osso podem provocar diminuição na vascularização intra-óssea, no número e na atividade dos osteoblastos, assim como degradação da morfologia e de suas propriedades biomecânicas devido a uma alteração celular e vascular. Além disso, em casos extremos, pode ser seguido por fibroses progressivas e necrose local (Michel et al. 2015). No entanto, o seu impacto na microarquitetura óssea ainda é controverso.

A análise radiográfica é uma ferramenta auxiliar importante para a avaliação clínica, pois é um método rápido, não invasivo, de baixo custo e que pode produzir resultados semelhantes aos dos estudos histológicos (Lucisano et al. 2013). A medição da densidade óssea radiográfica por densitometria foi executada em uma série de estudos, e a sua eficácia tem sido confirmada (Nackaerts et al. 2006; Erdogan et al. 2009; Lucisano et al. 2013). Apesar da densitometria radiográfica não ser o método mais sensível na medição da densidade óssea, não deixa de ser um método facilmente disponível, embora amplamente subutilizado (Griffith et al. 2010). De acordo com Erdogan et al. (2009), os parâmetros radiológicos poderiam facilitar o estabelecimento de um diagnóstico definitivo da osteoporose. Além disso, o uso de densitometria radiográfica poderia aumentar o número de estudos no campo da biologia óssea, contribuindo para avanços no diagnóstico, tratamento e acompanhamento de doenças ósseas, o que aumentaria a qualidade e expectativa de vida dos pacientes (Lucisano et al. 2013).

Diante do exposto, nesse estudo foi realizada a densitometria radiográfica mediante uma escala de densidade de alumínio para a normalização das imagens obtidas e o equivalente em mm de alumínio foi utilizada para a análise, como realizado

---

em estudos anteriores (Nackaerts et al. 2006; Erdogan et al. 2009; Lucisano et al. 2013).

Os resultados do presente estudo sugerem uma redução significativa da densidade radiográfica no grupo irradiado, sendo este muito mais afetado na presença da nicotina. Esses resultados, quando confrontados aos de Chicarelli et al. (2007), estão de acordo em relação à densidade óssea volumétrica, que no grupo ovariectomizado/irradiado se apresentou menor que no grupo ovariectomizado. Assim, observou-se em ambos os estudos que a exposição à radiação ionizante é um fator que provocou retardo no processo de neoformação óssea. Em relação à nicotina, Machado et al. (2010) mostraram que houve uma diminuição da formação de osso neoformado nos alvéolos desencadeada pela nicotina, como também foi observado em nosso estudo.

Já ao analisar o grupo que não recebeu irradiação, os grupos que tiveram administração dos dois bisfosfonatos aumentaram a densidade radiográfica da região, mesmo quando houve administração da nicotina. Observação semelhante foi relatada por Aguirre et al. (2010), Lucisano et al. (2013) e Tanoue et al. (2015), os quais avaliaram a densidade radiográfica em ratos após administração sistêmica de alendronato de sódio, sugerindo um aumento da densidade nestes grupos. Quando se compara os resultados da administração dos bisfosfonatos, Baiomy et al. (2014) e Chen et al. (2013) concluíram que o alendronato e o ácido zoledrônico se mostraram eficazes na consolidação óssea, no entanto o ácido zoledrônico se mostrou mais eficaz que o alendronato, resultado com o qual o presente estudo está de acordo uma vez que a densidade radiográfica aumentou nos grupos com administração de ácido zoledrônico, o que também foi corroborado em estudos mediante a densidade mineral óssea (Greenspan et al. 2015). Por outro lado, esses resultados diferem dos encontrados por Barba-Recreo et al. (2014), que não encontraram diferenças estatísticas no grupo com administração de ácido zoledrônico, e isso pode ser devido a dose elevada que foi administrada por esses autores, já que o intuito do trabalho foi reproduzir um modelo de osteonecrose.

Hirvasniemi et al. (2016) investigaram a relação entre a densidade óssea e parâmetros da estrutura óssea em imagens bidimensionais e tridimensionais por meio de radiografias e a microtomografia computadorizada. Entre os parâmetros obtidos,

os autores concluíram que a radiografia tem uma correlação significativa quando comparado com a arquitetura tridimensional. Além disso, com base em estudos anteriores que avaliam o reparo ósseo após exodontia mediante a microtomografia (Hikita et al. 2009, Jee et al. 2010; Allen et al. 2011), o presente estudo usou esta tecnologia por fornecer uma análise não destrutiva, tridimensional, que proporciona dados detalhados sobre o osso trabecular, semelhante à análise histológica, porém a desvantagem desta tecnologia é que está limitada a estudos de amostras de biopsia e de animais pequenos (Griffith et al. 2010, Sales et al. 2012).

O presente trabalho buscou apresentar a quantificação direta da microarquitetura óssea utilizando a microtomografia computadorizada, a fim de se conhecer as reais alterações que acometem o tecido ósseo em animais que receberam administração da nicotina e/ou bifosfonatos, assim como a influência da radiação X no reparo ósseo alveolar, uma vez que nenhum trabalho foi encontrado na literatura comparando a associação de tais substâncias, tridimensionalmente.

Ao analisar os resultados apresentados pela microtomografia computadorizada, verificou-se uma redução significativa no BV e BV/TV para todos os grupos que receberam irradiação, afetando principalmente aqueles com administração de nicotina. Achados semelhantes aos nossos resultados foram vistos também por Hamilton et al. (2006), Chicarelli et al. (2007), Kondo et al. (2009) e Michel et al. (2015), que observaram uma redução significativa no BV após a irradiação, apresentando um retardo no processo de reparo do grupo irradiado, ou no BV/TV na presença da ovariectomia, como observado por Dai et al. (2014) e Bauer et al. (2015). A nicotina também mostrou alteração no BV/TV em outros estudos que administraram esta droga (Hapidin et al. 2011) e retardou o processo do reparo ósseo alveolar (Pinto et al. 2010, Machado et al. 2011). Por outro lado, o grupo ácido zoledrônico foi o que mostrou um volume ósseo maior e mais constante quando comparado aos grupos irradiados, assim como o alendronato de sódio quando comparado ao grupos IRR e IRR/AS, concordando assim com os trabalhos de Arrington et al. (2010), Keenawinna et al. (2015), Curtis et al. (2016) e Li et al. (2016), que encontraram um aumento no volume e conteúdo mineral ósseo nos grupos com administração de ácido zoledrônico. No caso do alendronato de sódio, um comportamento semelhante foi observado por Aguirre et al. (2010), Jee et al. (2010) e Kim et al. (2011) na avaliação do reparo ósseo alveolar, mostrando uma melhoria da cicatrização após exodontia.

Quanto às análises das trabéculas ósseas realizadas por meio da microtomografia computadorizada, foi possível observar que os grupos que receberam a administração dos bisfosfonatos, ainda quando houve a presença da nicotina e irradiação, mostraram um aumento do Tb.N e Tb.Th, porém com diferenças estatísticas na maioria dos casos para o grupo AZ. Esse dado corrobora os dados apresentados por Keenawinna et al. (2013), que afirmaram o potencial do tratamento do ácido zoledrônico para minimizar os efeitos deletérios da irradiação. Nos grupos de combinação dos bisfosfonatos com a nicotina, houve um aumento em tais parâmetros, mas ainda assim estes foram significativamente menores em relação aos grupos controle com e sem irradiação. Assim, discordamos dos achados por Hapidin et al. (2011), que não encontraram diferenças significativas para o Tb.N entre o grupo com administração de nicotina e o controle. Entretanto, autores como Campbell et al. (2011) mostraram também que não houve um aumento no Tb.N na presença do alendronato de sódio, mas sim um aumento da Tb.Th, levando a um volume ósseo mais elevado, o que corresponde a uma rigidez elevada do osso. Este aumento de Tb.Th também é observado no estudo de Mardas et al. (2016).

Ainda com respeito as trabéculas, observou-se com o parâmetro Tb.Sp que os grupos irradiados mostraram um aumento na separação trabecular, no entanto os grupos que tiveram administração dos bisfosfonatos mostraram uma diminuição em relação ao grupo que foi somente irradiado, ainda quando a nicotina estivesse presente, sendo mais significativo na presença do ácido zoledrônico. Esses achados concordam com os resultados de Keenawinna et al. (2013); Mardas et al. (2016) e Li et al. (2016), que afirmaram que a utilização de um ácido zoledrônico provoca alterações morfológicas no osso recentemente formado nos animais osteoporóticos, aumentando não só a Tb.Th, mas também diminuindo a Tb.Sp, ; e concorda-se também com outros estudos, que mostraram um aumento da Tb.Sp no grupo irradiado (Kondo et al. 2009, Willey et al. 2010) ou ovariectomizados (Yoon et al. 2012; Dai et al. 2014, Bauer et al. 2015).

Nos resultados encontrados para a Po (tot), observou-se que houve um aumento nos grupos irradiados em geral, e dentro deste grupo significativamente no grupo irradiado em comparação aos outros, assim como não se observou diferença significativa entre os grupos não irradiados. Assim, concordamos com o trabalho de Osterhoff et al. (2016), que sugere que a competência mecânica do osso depende da

sua porosidade, por conseguinte, a resistência à fratura também diminuiu significativamente com o aumento da porosidade, mostrando que a irradiação parece prejudicar a resistência do osso. Em relação ao grupo irradiado com administração de alendronato de sódio, este mostrou um aumento da porosidade quando comparado aos demais grupos irradiados, concordando com os estudos de Campbell et al. (2011) e Rabelo et al. (2015), sugerindo aumento da porosidade na presença do alendronato e ácido zoledrônico, respectivamente. Estes resultados mostram que a administração do alendronato melhora a biomecânica dos ossos osteoporóticos, já que estudos como de Sales et al. (2012) e Bauer et al. (2015) referiram que os ossos osteoporóticos apresentaram uma porosidade aumentada.

A presente pesquisa considerou importante a avaliação do SMI, já que indica a predominância de bastonetes ou placas no osso trabecular, parâmetro importante em amostras com certo grau de osteoporose na avaliação da biomecânica do osso, considerando que as placas são mecanicamente superiores aos bastonetes. Não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliaram a SMI no osso trabecular na presença das substâncias testadas, mas apenas no caso da avaliação de amostras com osteoporoses (Akhter et al. 2007, Francisco et al. 2011; Wu et al. 2015; Bauer et al. 2015, Osterhoff et al. 2016) e risco de fratura (Ito et al. 2005), que mostraram que houve um aumento da reabsorção óssea mediante este parâmetro. Assim, os trabalhos de Arrington et al. (2010) e Willey et al. (2010) mostraram que o osso trabecular irradiado foi geralmente mais desconectado e semelhante a bastonetes, representado pelo aumento do SMI. Essa mesma forma da arquitetura semelhante a bastonetes foi observada em nosso trabalho, no grupo irradiado, afetado ainda mais na presença da nicotina. Por outro lado, os grupos com administração de alendronato de sódio se mostraram mais conectados e semelhantes a placas, com a média mais próxima a zero.

Seguindo com as avaliações da microarquitetura óssea, avaliou-se o parâmetro da MIL, já que este forma parte dos parâmetros de avaliação da arquitetura do osso trabecular por Bouxsein et al. (2010). A importância desse parâmetro é que, na avaliação da biomecânica do osso, mediante a contagem em uma seção plana de osso trabecular do número de interseções entre uma grade de linhas paralelas e a interface trabecular, é mostrada o grau de anisotropia, a qual é uma propriedade do osso trabecular (Odgaard 1997). No nosso estudo, encontramos que o grupo não irradiado

se encontrou mais estável nos valores que demonstram a anisotropia, já que mostraram uma média maior quando comparado ao grupo irradiado, já o grupo irradiado foi o que apresentou uma média menor quando comparado aos outros grupos irradiados. Não se encontraram trabalhos que avaliem este parâmetro com as substâncias empregadas ou mesmo em caso de osso irradiado, só no caso do risco de fratura, onde os autores usam o grau de anisotropia para a avaliação deste parâmetro, foi mostrado que o grau de anisotropia foi maior em mulheres que apresentaram fraturas (Ito et al. 2005). Por consequente, podemos aferir que a irradiação diminui a resistência óssea mediante este parâmetro.

Outra propriedade mecânica é avaliada mediante a Conn e Conn.Dn., já que esses são parâmetros que influenciam na resistência mecânica do osso, mostrando uma diminuição no osso osteoporótico (Gasser et al, 2008, Adams et al. 2013, Wu et al. 2015, Osterhoff et al. 2016). No nosso estudo, encontramos que ambos os parâmetros diminuíram significativamente no grupo irradiado com administração de nicotina quando comparado entre os grupos irradiados. Já quando comparados os grupos que receberam ou não radiação X, os grupos que apresentaram menor valor foram a combinação da nicotina com os bisfosfonatos. Esse fato demonstra que a radiação X afeta muito mais a qualidade óssea, concordando com o trabalho de Willey et al. (2010), e que neste caso os bisfosfonatos não apresentaram melhorias na Conn e Conn.Dn. Uma possível explicação para isso é que o osso já é osteoporótico, resultando numa estrutura trabecular enfraquecida (Akhter et al. 2007). Para o alendronato de sódio, Campbell et al. (2011) também avaliaram a Conn e Conn.Dn., concordando com nosso estudo, que demonstrou que este bisfosfonato foi incapaz de aumentar ambos os parâmetros. Apesar que encontramos que para o ácido zoledrônico houve um aumento na Conn.Dn., no trabalho de Gasser et al. 2008, foi só significativo com altas doses deste fármaco. Outro estudo associa mais a Conn com a reposição de testosterona (Griffith et al. 2010), então poderíamos dizer que a Conn parece estar mais relacionada com os hormônios.

Finalmente, foi avaliado o Eu.N, que é a chave para todas as determinações da conectividade, pois relaciona a conectividade e o número de partículas do osso e medula (Odgaard 1997). Neste estudo, observou-se que os grupos irradiados apresentaram números inferiores em relação aos não irradiados, e que foi significativo ainda nos grupos que tiveram administração combinada da nicotina com os

bisfosfonatos. Na literatura, não encontramos estudos que avaliaram este parâmetro na avaliação do reparo ósseo pós exodontia independentemente da conectividade para as substâncias testadas. Só encontramos o estudo de Ito et al. (2005), que avaliaram o risco de fratura no fêmur, e encontraram uma associação deste parâmetro à fragilidade do osso.

Para o osso trabecular, os parâmetros estruturais derivados de dados da microtomografia computadorizada são baseados em histomorfometria de osso estático tradicional, na qual se deve avaliar a espessura, a conectividade, a distribuição e o espaçamento trabecular (Wu et al. 2015), que na maioria dos estudos não vêm sendo avaliados. No estudo de Ito et al. (2005), foi demonstrado que parâmetros como SMI, Eu.N e BV/TV são altamente associados ao risco da fratura, sendo superiores à densitometria mineral óssea medida através da absorção por dupla emissão de raios X. Além disso, os parâmetros SMI e Eu.N representam um recurso não métrico da estrutura trabecular, e parecem ser mais úteis que os parâmetros métricos, tais como Tb.N, Tb.Th ou Tb.Sp, razão pela qual acreditamos ser relevante mostrar os dados destes parâmetros para a avaliação da microarquitetura óssea no reparo ósseo alveolar. Todavia, Hirvasniemi et al. (2016), realçou em seu trabalho que a densidade óssea radiográfica foi significativamente relacionada ao BV/TV, e que o SMI e BV/TV estão relacionados ao Conn.Dn, assim como com o Tb.Sp.

Como limitações, esse estudo apresentou apenas um tempo de acompanhamento para se evidenciar outros resultados positivos que poderiam ser observados em curto ou longo prazo. Por outro lado, devido à ausência de estudos na literatura utilizando parâmetros como MIL, SMI e número Euler avaliados pela microtomografia, não se conseguiu realizar uma comparação mais aprofundada destes. Sendo assim, torna-se necessário o desenvolvimento de novos trabalhos a fim de aprimorar o conhecimento sobre as alterações ósseas em decorrência desses processos e a consolidação dos parâmetros de análise.

Clinicamente, os resultados obtidos alertam quanto aos efeitos da nicotina junto à radiação X ao se indicar exames e tratamentos envolvendo esse tipo de radiação para mulheres pós-menopausa fumantes, pois os efeitos destes fatores na microarquitetura óssea podem influenciar na resistência do osso e conseqüentemente



no risco à fratura óssea nesses indivíduos. Além disso, benefícios significativos foram encontrados quando houve administração do ácido zoledrônico (Gasser et al. 2008; Bilezikian et al. 2009; Zhou et al. 2016; O'Connor et al. 2016), assim como com a administração do alendronato de sódio (Jee et al. 2010, Aguirre et al. 2011, Tanoue et al. 2015). Mas apesar de ter aumentado a dose deste fármaco, se comparamos com o ácido zoledrônico, ele foi menos eficaz na maioria dos parâmetros como descrito por Chen et al. (2013), Baiomy et al. (2014) e Eiken e Vestergaard (2016).

Em síntese, dentro das condições experimentais utilizadas, o uso do ácido zoledrônico mostrou um efeito positivo em relação ao efeito deletério da radiação X e nicotina na microarquitetura e reparo ósseo. Entretanto, deve ser investigado se doses menores também podem causar esses efeitos (Hsieh 2016), já que quando se compara esses resultados com os demais estudos, percebe-se que esse medicamento tem uma alta ocorrência de provocar osteorradiocrose nos pacientes (Delmas et al. 2002; Allen et al. 2011; Barba-Recreo et al. 2014; Bléry et al. 2015; Adler 2016; Voss et al. 2016). No entanto, a maioria desses estudos utilizou doses muito maiores que as administradas no presente trabalho.

## **7 CONCLUSÃO**

Dentro das condições experimentais utilizadas, conclui-se que:

A administração da nicotina e/ou radiação X resultou numa diminuição na neoformação óssea alveolar. Quando administrados os bisfosfonatos, ácido zoledrônico e o alendronato de sódio, houve um aumento na neoformação óssea, independente da utilização de nicotina e radiação X. Entretanto, o ácido zoledrônico mostrou um potencial superior no reparo ósseo quando comparado ao alendronato de sódio. Assim, este estudo mostrou que houve uma boa relação entre os parâmetros calculados a partir da densidade radiográfica e micro-TC e as propriedades biomecânicas relatadas.

---

**REFERÊNCIAS\***

Adams JE. Advances in bone imaging for osteoporosis. *Nat Rev Endocrinol*. Nature Publishing Group; 2013;9(1):28–42.

Adler RA. Osteoporosis treatment: complexities and challenges. *J Endocrinol Invest*. Springer International Publishing; 2016 Jul 25;39(7):719–20.

Aguirre JI, Altman MK, Vanegas SM, Franz SE, Bassit a CF, Wronski TJ. Effects of alendronate on bone healing after tooth extraction in rats. *Oral Dis*. 2010 Oct;16(7):674–85.

Akhter MP, Lappe JM, Davies KM, Recker RR. Transmenopausal changes in the trabecular bone structure. *Bone*. 2007;41(1):111–6.

Allen MR, Kubek DJ, Burr DB, Ruggiero SL, Chu T-MG. Compromised osseous healing of dental extraction sites in zoledronic acid-treated dogs. *Osteoporos Int*. 2011 Feb;22(2):693–702.

Amanat N, McDonald M, Godfrey C, Bilston L, Little D. Optimal timing of a single dose of zoledronic acid to increase strength in rat fracture repair. *J Bone Miner Res*. 2007 Jun;22(6):867–76.

Arrington SA, Fisher ER, Willick GE, Mann KA, Allen MJ. Anabolic and Antiresorptive Drugs Improve Trabecular Microarchitecture and Reduce Fracture Risk following Radiation Therapy. *Calcif Tissue Int*. 2010;1–10.

Baccaro LF, Conde DM, Costa-Paiva L, de Souza Santos Machado V, Pinto-Neto AM. Cancer in Women over 50 Years of Age: A Focus on Smoking. *Cancers (Basel)*. 2015;7:450–9.

\*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

---

Baiomy AA, Nassan MA, Abdellatif EM, Abdel Fattah A, El-Fekey AAH, Abdel Aal ABM. Experimental comparison of the effects of locally administered zoledronic acid and alendronate on the rate of mandibular distraction osteogenesis in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2014;118(1):35–42.

Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo De Vera JL, García-Arranz M, Yébenes L, Burgueño M. Zoledronic acid - Related osteonecrosis of the jaws. Experimental model with dental extractions in rats. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 2014;42(6):744–50.

Bauer NB, Khassawna T El, Goldmann F, Stirn M, Ledieu D, Schlewitz G, et al. Characterization of bone turnover and energy metabolism in a rat model of primary and secondary osteoporosis. *Exp Toxicol Pathol.* 2015;67(4):287–96.

Bilezikian JP. Efficacy of Bisphosphonates in Reducing Fracture Risk in Postmenopausal Osteoporosis. *Am J Med.* Elsevier Inc. Elsevier Inc.; 2009;122(2):S14–21.

Bléry P, Espitalier F, Hays A, Crauste E, Demarquay C, Pilet P, et al. Development of mandibular osteoradionecrosis in rats: Importance of dental extraction. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 2015 Nov;43(9):1829–36.

Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldborg RE, Jepsen KJ, Müller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res.* 2010;25(7):1468–86.

Butterworth KT, Prise KM, Verhaegen F. Small animal image-guided radiotherapy: Status, considerations and potential for translational impact. *Br J Radiol.* 2015;88(1045):4–6.

Campbell GM, Bernhardt R, Scharnweber D, Boyd SK. The bone architecture is enhanced with combined PTH and alendronate treatment compared to monotherapy while maintaining the state of surface mineralization in the OVX rat. *Bone.* Elsevier Inc.; 2011;49(2):225–32.

---

Chavassieux PM, Arlot ME, Reda C, Wei L, Yates AJ, Meunier PJ. Histomorphometric assessment of the long-term effects of alendronate on bone quality and remodeling in patients with osteoporosis. *J Clin Invest.* 1997;100(6):1475–80.

Chen B, Li Y, Yang X, Xu H, Xie D. Zoledronic acid enhances bone-implant osseointegration more than alendronate and strontium ranelate in ovariectomized rats. *Osteoporos Int.* 2013;24(7):2115–21.

Chicarelli M, Ramos FM de M, Manzi FR, Novaes PD, Bóscolo FN, Almeida SM De. Effect of gamma rays on the bone repair process in rats with estrogen deficiency. *Braz Oral Res.* 2007 Mar;21(1):75–80.

Curtis RC, Custis JT, Ehrhart NP, Ehrhart EJ, Condon KW, Gookin SE, et al. Combination Therapy with Zoledronic Acid and Parathyroid Hormone Improves Bone Architecture and Strength following a Clinically-Relevant Dose of Stereotactic Radiation Therapy for the Local Treatment of Canine Osteosarcoma in Athymic Rats. *PLoS One.* 2016;11(6):e0158005.

Dai QG, Zhang P, Wu YQ, Ma XH, Pang J, Jiang LY, et al. Ovariectomy induces osteoporosis in the maxillary alveolar bone: An in vivo micro-CT and histomorphometric analysis in rats. *Oral Dis.* 2014;20(5):514–20.

Delmas PD. Treatment of postmenopausal osteoporosis. *Lancet.* 2002;359:2018–26.  
Eiken P, Vestergaard P. Treatment of osteoporosis after alendronate or risedronate. *Osteoporos Int.* 2016;27(1):1–12.

Erdogan O, Incki KK, Benlidayi ME, Seydaoglu G, Kelekci S. Dental and radiographic findings as predictors of osteoporosis in postmenopausal women. *Geriatr Gerontol Int.* 2009 Jun;9(2):155–64.

Francisco JI, Yu Y, Oliver RA, Walsh WR. Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. *J Orthop Res.* 2011;29(2):189–96.

- 
- Finkelstein JS, Klibanski A, Arnold AL, Toth TL, Hornstein MD, Neer RM. Prevention of estrogen deficiency-related bone loss with human parathyroid hormone-(1-34): a randomized controlled trial. *JAMA*. 1998; Sep;23-30;280(12):1067-73.
- Gasser JA, Ingold P, Venturiere A, Shen V, Green JR. Long-term protective effects of zoledronic acid on cancellous and cortical bone in the ovariectomized rat. *J Bone Miner Res*. 2008;23(4):544–51.
- Greenspan SL, Perera S, Ferchak MA, Nace DA, Resnick NM. Efficacy and Safety of Single-Dose Zoledronic Acid for Osteoporosis in Frail Elderly Women. *JAMA Intern Med*. 2015 Jun 1;175(6):913.
- Griffith JF, Engelke K, Genant HK. Looking beyond bone mineral density: Imaging assessment of bone quality. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1192:45–56.
- Hamilton S a, Pecaut MJ, Gridley DS, Travis ND, Bandstra ER, Willey JS, et al. A murine model for bone loss from therapeutic and space-relevant sources of radiation. *J Appl Physiol*. 2006;101(3):789–93.
- Hapidin H, Othman F, Soelaiman IN, Shuid AN, Mohamed N. Effects of nicotine administration and nicotine cessation on bone histomorphometry and bone biomarkers in Sprague-Dawley male rats. *Calcif Tissue Int*. 2011;88(1):41–7.
- Hikita H, Miyazawa K, Tabuchi M, Kimura M, Goto S. Bisphosphonate administration prior to tooth extraction delays initial healing of the extraction socket in rats. *J Bone Miner Metab*. 2009;27(6):663–72.
- Hirvasniemi J, Thevenot J, Kokkonen HT, Finnilä MA, Venäläinen MS, Jämsä T, et al. Correlation of Subchondral Bone Density and Structure from Plain Radiographs with Micro Computed Tomography Ex Vivo. *Ann Biomed Eng*. 2016 May 14;44(5):1698–709.
- Hopewell JW. Radiation-therapy effects on bone density. *Med Pediatr Oncol*. 2003;41(3):208–11.

---

Hordon LD, Itoda M, Shore PA, Shore RC, Heald M, Brown M, et al. Preservation of thoracic spine microarchitecture by alendronate: Comparison of histology and microCT. *Bone*. 2006;38(3):444–9.

Hsieh P-C. Effectiveness and Safety of Zoledronic Acid in the Treatment of Osteoporosis. *Orthopedics*. 2016;39(2):1–8.

INCA. Estimativa Incidência de Câncer no Brasil: 2016. Available from <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>. 2016.

Ito M, Ikeda K, Nishiguchi M, Shindo H, Uetani M, Hosoi T, et al. Multi-detector row CT imaging of vertebral microstructure for evaluation of fracture risk. *J Bone Miner Res*. 2005;20(10):1828–36.

Jee JH, Lee W, Lee B Do. The influence of alendronate on the healing of extraction sockets of ovariectomized rats assessed by in vivo microcomputed tomography. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2010;110(2):e47–53.

Kanis JA, McCloskey E V., Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int*. 2013;24(1):23–57.

Keenawinna L, Oest ME, Mann K a, Spadaro J, Damron T a. Zoledronic acid prevents loss of trabecular bone after focal irradiation in mice. *Radiat Res*. 2013;180(1):89–99.

Kim JH, Park YB, Li Z, Shim JS, Moon HS, Jung HS, et al. Effect of alendronate on healing of extraction sockets and healing around implants. *Oral Dis*. 2011;17(7):705–11.

Kondo H, Searby ND, Mojarrab R, Phillips J, Alwood J, Yumoto K, et al. Total-body irradiation of postpubertal mice with (137)Cs acutely compromises the microarchitecture of cancellous bone and increases osteoclasts. *Radiat Res*. 2009;171(3):283–9.

---

Lamota L, Bermudez-Silva FJ, Marco E-M, Llorente R, Gallego A, Rodríguez de Fonseca F, et al. Effects of adolescent nicotine and SR 147778 (Surinabant) administration on food intake, somatic growth and metabolic parameters in rats. *Neuropharmacology*. 2008 Jan;54(1):194–205.

Li CL, Lu WW, Seneviratne CJ, Leung WK, Zwahlen R a., Zheng LW. Role of periodontal disease in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in ovariectomized rats. *Clin Oral Implants Res*. 2016 Jan;27(1):1–6.

López-Moreno JA, Trigo-Díaz JM, Rodríguez de Fonseca F, González Cuevas G, Gómez de Heras R, Crespo Galán I, et al. Nicotine in alcohol deprivation increases alcohol operant self-administration during reinstatement. *Neuropharmacology*. 2004 Dec;47(7):1036–44.

Lucisano MP, Nelson-Filho P, Morse L, Battaglino R, Watanabe PCA, Silva RAB da, et al. Radiodensitometric and DXA analyses for the measurement of bone mineral density after systemic alendronate therapy. *Braz Oral Res*. 2013;27(3):252–7.

MacHado GJR, Dias SMD, Bosco ??lvaro Fancisco, Okamoto T, Bedran De Castro JC, Dornelles RCM. Action of nicotine and ovariectomy on bone regeneration after tooth extraction in rats. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010;68(11):2675–81.

Mardas N, Buseti J, de Figueiredo JAP, Mezzomo LA, Scarparo RK, Donos N. Guided bone regeneration in osteoporotic conditions following treatment with zoledronic acid. *Clin Oral Implants Res*. 2016;1–10.

Michel G, Blery P, Pilet P, Guicheux J, Weiss P, Malard O, et al. Micro-CT Analysis of Radiation-Induced Osteopenia and Bone Hypovascularization in Rat. *Calcif Tissue Int*. 2015;97(1):62–8.

Nackaerts O, Jacobs R, Pillen M, Engelen L, Gijbels F, Devlin H, et al. Accuracy and precision of a densitometric tool for jaw bone. *Dentomaxillofacial Radiol*. 2006;35(4):244–8.



---

O'Connor KM. Evaluation and Treatment of Osteoporosis. *Med Clin North Am.* 2016 Jul;100(4):807–26.

Odgaard A. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. *Bone.* 1997;20(4):315–28.

Osterhoff G, Morgan EF, Shefelbine SJ, Karim L, McNamara LM. Bone mechanical properties and changes with osteoporosis. *Injury.* 2016;47:S11–20.

Parfitt AM. Bone histomorphometry: proposed system for standardization of nomenclature, symbols, and units. *Calcif Tissue Int.* 1987 May;42(5):284–6.

Pinto JR, Bosco AF, Okamoto T, Guerra JB, Piza IG. Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats. A histological study. *Braz Dent J.* 2002;13(1):3–9.

Rabelo GD, Travençolo BAN, Oliveira MA, Beletti ME, Gallottini M, Silveira FRX da. Changes in cortical bone channels network and osteocyte organization after the use of zoledronic acid. *Arch Endocrinol Metab.* 2015;59(6):507–14.

Ritman EL. Micro-computed tomography-current status and developments. *Annu Rev Biomed Eng.* 2004;6(1):185–208.

Salazar M, Hernandez L, Ramos AL, Salazar BDO, Micheletti KR, Paranhos LR, et al. Effect of alendronate sodium on tooth movement in ovariectomized rats. *Arch Oral Biol.* 2015;60(5):776–81.

Sales E, Lima I, de Assis JT, Gómez W, Pereira WCA, Lopes RT. Bone quality analysis using X-ray microtomography and microfluorescence. *Appl Radiat Isot.* 2012;70(7):1272–6.

Shen GS, Li Y, Zhao G, Zhou H Bin, Xie ZG, Xu W, et al. Cigarette smoking and risk of hip fracture in women: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Injury. Elsevier Ltd;* 2015;46(7):1333–40.

---

Tanoue R, Koi K, Yamashita J. Effect of Alendronate on Bone Formation during Tooth Extraction Wound Healing. *J Dent Res*. 2015;94(9):1251–8.

Tillner F, Thute P, B??tof R, Krause M, Enghardt W. Pre-clinical research in small animals using radiotherapy technology - a bidirectional translational approach. *Z Med Phys*. 2014;24(4):335–51.

Voss PJ, Stoddart MJ, Bernstein A, Schmelzeisen R, Nelson K, Stadelmann V, et al. Zoledronate induces bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in osteopenic sheep. *Clin Oral Investig*. 2016;20(1):31–8.

Willey JS, Livingston EW, Robbins ME, Bourland JD, Tirado-Lee L, Smith-Sielicki H, et al. Risedronate prevents early radiation-induced osteoporosis in mice at multiple skeletal locations. *Bone*. 2010 Jan;46(1):101–11.

Wu Y, Adeb S, Doschak MR. Using Micro-CT Derived Bone Microarchitecture to Analyze Bone Stiffness - A Case Study on Osteoporosis Rat Bone. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015 May;6:80.



Yoon KH, Cho DC, Yu SH, Kim KT, Jeon Y, Sung JK. The change of bone metabolism in ovariectomized rats: Analyses of MicroCT scan and biochemical markers of bone turnover. *J Korean Neurosurg Soc*. 2012;51(6):323–7.

Zecchin KG, Jorge S, Jorge J. A new method for extraction of mandibular first molars in rats. *Brazilian J Oral Sci*. 2007;6(21):1344–8.

Zhang J, Wang R, Zhao Y-L, Sun X-H, Zhao H-X, Tan L, et al. Efficacy of intravenous zoledronic acid in the prevention and treatment of osteoporosis: a meta-analysis. *Asian Pac J Trop Med*. Hainan Medical College 2012;5(9):743–8.

Zhou J, Ma X, Wang T, Zhai S. Comparative efficacy of bisphosphonates in short-term fracture prevention for primary osteoporosis: a systematic review with network meta-analyses. *Osteoporos Int*. 2016 Nov;27(11):3289-3300.

ANEXO



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp

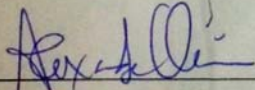
CERTIFICADO

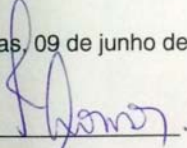
Certificamos que o projeto "ANÁLISE DO PROCESSO DE REPARO ÓSSEO EM RATAS IRRADIADAS, OVARIECTOMIZADAS E TRATADAS COM NICOTINA E/OU BISFOSFONATOS" (protocolo nº 3344-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Solange Maria de Almeida / Gina Roque Torres, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 09 de junho de 2014.

Campinas, 09 de junho de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Atonso  
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP  
Caixa Postal 6109  
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359  
E-mail: [comisib@unicamp.br](mailto:comisib@unicamp.br)  
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>