

CAROLA GOMEZ ÁGREDA

**ANÁLISE COMPARATIVA POR MEIO DA DENSIDADE ÓPTICA
RADIOGRÁFICA ENTRE O GRAU DE OSTEOPENIA INDUZIDA PELA
FENITOÍNA E AUSÊNCIA HORMONAL EM RATOS**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de São José dos Campos,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
MESTRE, pelo Programa de Pós-
Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL,
Área de Radiologia Odontológica.**

CAROLA GOMEZ ÁGREDA

**ANÁLISE COMPARATIVA POR MEIO DA DENSIDADE ÓPTICA
RADIOGRÁFICA ENTRE O GRAU DE OSTEOPENIA INDUZIDA PELA
FENITOÍNA E AUSÊNCIA HORMONAL EM RATOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Radiologia Odontológica.

Orientador: Profa. Dra. Mari Eli Leonelli de Moraes

Co-orientador: Profa. Dra. Valéria Abrantes Pinheiro Carvalho

São José dos Campos

2007

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

Bellini AB. Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2006.

Ágreda, Carola Gomez

Análise comparativa por meio da densidade óptica radiográfica entre o grau de osteopenia induzida pela fenitoína e ausência hormonal em ratos / Carola Gomez Ágreda; orientador Mari Eli Leonelli de Moraes. _ São José dos Campos, 2007.
106p.; IL.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, Área de Radiologia Odontológica) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007

1. Radiografia digital – 2. Osteopenia – 3. Fenitoína

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 21 / 09 / 2007.

Assinatura :

E-mail: carolagreda@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ágreda CG. Análise comparativa por meio da densidade óptica radiográfica entre o grau de osteopenia induzida pela fenitoína e ausência hormonal em ratos [Dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2007.

São José dos Campos, 24 de julho de 2007.

Banca examinadora

- 1) Profa.Dra. Mari Eli Leonelli de Moraes
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP
- 2) Profa.Dra. Solange Maria de Almeida
Departamento de Diagnóstico Oral - Área de Radiologia
Odontológica
Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP
- 3) Profa.Dra. Rosilene Fernandes da Rocha
Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP

DEDICATÓRIA

À Deus por guiar meus passos no transcurso de minha vida socorrendo-me em todos os momentos e permitindo-me reflexão para atuar com parcimônia sobre diferentes aspectos encontrados na jornada da vida.

À minha mãe Hilda, pessoa sincera e bondosa, por todo o amor, apoio, confiança e presença nas minhas decisões.

Ao meu estimado pai Victor, pelo constante suporte, pelo exemplo de determinação e superação proporcionado pela dedicação ao estudo, a qual sempre me foi incumbido desde pequena.

Ao meu irmão Victor, pela amizade, carinho, incentivo e credibilidade que sempre depositou em mim.

Aos meus segundos pais, Benigno e Asteria, meus tios Rolando e Eduardo, tias Carmen, Bertha, Fely e Rosse Mary, que mesmo distantes, foram cruciais na formação de meus valores morais.

Ao querido Diego “D”, uma pessoa especial, ponderada e carinhosa que em pouco tempo se tornou um amigo sincero, prestativo, preocupado com meu bem-estar e felicidade, na qual tal harmonia e afinidade levaram a um carinho e amor recíproco.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora Profa. Dra. Mari Elí Leonelli de Moraes pela confiança em mim depositada, desde a época de graduação, ingresso no mestrado e transcorrer do curso, cuja convivência, proporcionou-me um grande aprendizado, com lições úteis e importantes que serão por sempre lembradas no transcurso de minha vida. Expresso por tudo isso minha sincera gratidão e respeito.

À estimada Profa. Dra. Valéria Abrantes Pinheiro Carvalho, minha co-orientadora pelo suporte científico e apoio, fundamentais e imprescindíveis para realização deste trabalho. Sua perseverança, dedicação e dinamismo são foco de admiração e inspiração a ser seguido que me incentiva para o anseio do crescimento tanto pessoal, quanto profissional.

AGRADECIMENTOS

Aos professores da disciplina de Radiologia Odontológica da FOSJC- UNESP , bem como, do Departamento de Diagnóstico Bucal e Cirurgia que me concederam a oportunidade de realizar este curso de pós-graduação.

Ao Prof. Titular Luiz Cesar de Moraes, pelas sábias e oportunas palavras no decorrer do curso, sempre ético, sucinto e prestativo em atender os alunos.

Ao Prof. Titular Edmundo Médici Filho, sempre ponderado, equilibrado e sábio, agradeço tal confortável convivência acadêmica.

Ao Prof. Adjunto Julio Cesar de Melo Castilho pelo conhecimento, vigor e persistência em pró a melhoria deste curso.

Aos amigos especiais, na qual tive a oportunidade de conhecer na disciplina de Radiologia, cuja convivência proporcionaram momentos agradáveis: Myrna, Gisele, Rafaela e Ana Cláudia.

Aos colegas sempre prestativos da Radiologia: Milton, Breno, Jefferson, Evelise, Lawrenne, Carol, Cleber, Roque e Luciano.

Aos colegas da Radiologia que já concluíram o curso: Luiz Roberto, Wilton, Marcinha, Aline, Gustavo, Patrícia, Marcos, David, Sandra Maria e Elaine Félix.

Aos funcionários da Disciplina de Radiologia: Conceição e Eliana.

Às funcionárias da Pós-graduação desta faculdade: Rose, Cidinha e Erena.

Às funcionárias da biblioteca da faculdade: Ângela, Silvana e Neide.

Aos funcionários do Biotério da faculdade: Lourival e Antônio.

Aos alunos de graduação que contribuíram ativamente com este trabalho: Aretha, Paulinha, Renata, Carol e Luciano.

Ao Dr. Fábio e sua esposa, pela presteza, disposição e colaboração.

Aos queridos amigos sinceros, prestativos e valiosos que torcem pelo meu êxito: Tamí, Kai I, Vivian, Luciana, Cristiane, Kalan, Flávio e Marcus.

Aos amigos da família de longa data: família Lopes Barbosa, José Sejas e Juana Claros.

A todas àquelas pessoas que indiretamente contribuíram para a realização desta etapa. Sinceros agradecimentos.

*" Quanto melhor é adquirir
a sabedoria do que o ouro!
E mais excelente, adquirir
a prudência do que a prata!"*

(Provérbios 16.16)

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Osteoporose/ osteopenia	15
2.2 Fenitoína.....	30
2.3 Densidade óptica.....	38
2.4 Sistemas digitais.....	45
3 PROPOSIÇÃO.....	51
4 MATERIAL E MÉTODO.....	52
4.1 Animais e grupos experimentais....	52
4.2 Medicamentos.....	53
4.3 Anestesia.....	53
4.4 Castração dos ratos machos e fêmeas.....	54
4.5 Medição da massa corpórea dos animais experimentais.....	56
4.6 Análise da densidade óptica radiográfica.....	56
4.7 Análise estatística.....	59
5 RESULTADOS.....	60
6 DISCUSSÃO.....	73
7 CONCLUSÃO.....	89
8 REFERÊNCIAS.....	90
ANEXOS.....	103
APÊNDICES.....	104
ABSTRACT.....	106

Ágreda CG. Análise comparativa por meio da densidade óptica radiográfica entre o grau de osteopenia induzida pela fenitoína e ausência hormonal em ratos [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

RESUMO

Por ser a osteoporose uma enfermidade de alta prevalência mundial, tem-se a importância de estudos que avaliem a repercussão óssea proveniente de supressão hormonal, como também de influência de fármacos. Em vista disto, a proposta desta pesquisa foi realizar a comparação radiográfica mediante a avaliação da densidade óptica em tons de cinza, entre o grau de osteopenia induzida por um fármaco e pela castração de ratos em dois períodos (trinta e sessenta dias). Utilizou-se 37 ratos adultos que foram divididos em: grupo I, com 5 fêmeas sham; grupo II, com 5 machos sham; grupo III, com 6 fêmeas ovariectomizadas; grupo IV, com 6 machos orquiectomizados; grupo V, com 8 fêmeas tratadas com fenitoína a 5mg/kg/dia e grupo VI, com 7 machos tratados com fenitoína a 5mg/kg/dia. Realizou-se a radiografia da tíbia esquerda de todos os grupos no período inicial, trinta e sessenta dias após o procedimento cirúrgico. Para isso foi utilizado o aparelho de raios X digital Gendex 765DC®, com 0,032s de tempo de exposição, distância focal de 40cm, 65kVp, 7mA, com feixe incidindo perpendicularmente ao sensor do sistema digital direto RVG (Trophy). A partir das imagens obtidas realizou-se a mensuração dos valores de densidade óptica de duas áreas selecionadas da tíbia (metáfise e diáfise) mediante a ferramenta histograma do programa Adobe Photoshop®. As médias das leituras de densidade óptica foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey (5%). De acordo com os resultados obtidos, concluiu-se que não houve diferenças estatisticamente significantes nos valores de densidade óptica no método de indução à osteopenia pela ovariectomia ou orquiectomia, ao passo que, na indução pela fenitoína houve a indicação da sua ocorrência tanto em machos quanto em fêmeas depois de 60 dias na região da diáfise.

PALAVRAS-CHAVE: Radiografia digital; osteopenia; fenitoína.

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida da população mundial, na atualidade, incluindo a da população brasileira representa decorrência direta de avanços tecnológicos em diversos setores, sendo que na área da saúde, as pesquisas de novos fármacos, técnicas e alternativas de tratamento e prevenção contra os males do envelhecimento para as diversas afecções patológicas, têm papel prioritário para a melhoria da qualidade de vida dos cidadãos. Dentro deste contexto, o estudo das alterações fisiopatológicas decorrentes da senescência faz-se imprescindível para o desenvolvimento da farmacoterapia de processos patológicos com a perda de massa muscular, o enfraquecimento do sistema imunológico, o declínio da acuidade visual e auditiva, além de doenças crônicas como hipertensão, diabetes, problemas vasculares e distúrbios sistêmicos, como a osteoporose^{4, 54 e 88}.

A osteoporose é a mais comum das doenças ósseas, apresentando, entre estas, a maior incidência mundial com grande repercussão no conjunto de problemas relacionados à saúde pública. Isto se deve ao considerável grau de morbidade, mortalidade e alto custo social. Pode ser definida como uma condição caracterizada pela redução da massa e deterioração da microarquitetura óssea, resultando no aumento da fragilidade deste tecido e conseqüente aumento do risco de ocorrência de fraturas^{17, 56, 107 e 109}.

Basicamente, pode-se considerar a existência de dois possíveis mecanismos de perda óssea na osteoporose. O primeiro está relacionado à ativação e aumento da frequência e grau de remodelação óssea decorrente do crescente número de unidades remodeladoras,

ativadas na superfície óssea resultando no predomínio da reabsorção sobre a neoformação osteóide. Este mecanismo é considerado potencialmente reversível, podendo-se restabelecer o equilíbrio da atividade remodeladora. No que se refere ao segundo mecanismo mencionado, freqüentemente, este pode coexistir com o primeiro. Desta maneira, além do aumento da freqüência de ativação de reabsorção, o desequilíbrio na remodelação leva ao decréscimo na formação ou secreção de matriz orgânica óssea devido à inibição da atividade osteoblástica, resultando desta forma em perda óssea irreversível^{1,17,47 e 52}.

Sendo assim, medidas para a prevenção e tratamento da osteoporose incluem dietas ricas em cálcio, realização de reposição hormonal para mulheres na pré e pós-menopausa, exposição solar, ingestão de alimentos ricos em vitamina D e exercícios regulares. Com relação às medidas farmacológicas, os medicamentos mais utilizados na prevenção da perda de massa óssea e ocorrência de fraturas são os estrógenos sintéticos, raloxifeno e derivados, alendronato e risedronato. O tratamento da osteoporose estabelecida preconiza o uso de estrogênios, calcitonina, alendronato, risedronato e teriparatida (PTH), como redutores dos riscos de fraturas^{1, 14, 47 e 87}.

Por outro lado, deve-se levar em conta que os medicamentos acima mencionados são de uso prolongado e, por vezes, poderão representar um risco de interação medicamentosa com outros fármacos. Além disso, existem substâncias para tratamento de processos patológicos sistêmicos diversos que podem, eventualmente, apresentar efeitos adversos e/ou colaterais que interfiram no equilíbrio do metabolismo ósseo, levando a quadros de osteopenia induzida por medicamentos. Neste contexto, sabe-se que pacientes que necessitam da utilização de fármacos anti-epiléticos, tal como, a fenitoína, podem sofrer diminuição da densidade mineral óssea, ou seja, a indução de osteopenia, considerada um estágio anterior a osteoporose, em que não existe ainda o comprometimento avançado da microarquitetura

óssea^{24,64,66 e 68}.

A fenitoína é um medicamento que tem sido utilizado com sucesso na clínica, durante cinquenta anos ou mais, contra todos os tipos de epilepsia, excetuando-se epilepsia infantil. Este fármaco pode, eventualmente, ser utilizado em casos de arritmias cardíacas, particularmente nas ventriculares⁸⁶. Seu mecanismo de ação está principalmente relacionado com a depressão do sistema motor cortical, sem a ocorrência de algum efeito na região sensitiva do sistema nervoso central. Possui atuação direta no Na-K-ATPase, no receptor complexo GABA A, receptores ionotrópicos de glutamato e bloqueio de canais de cálcio. Entretanto, a elucidação destas interações farmacodinâmicas ainda representam desafio em diversas pesquisas^{26, 71 e 94}.

Os inúmeros efeitos colaterais descritos e decorrentes do uso da fenitoína forneceram dados para que este fármaco fosse investigado para o tratamento de mais de cem afecções patológicas, incluindo dermatológicas e dores neuropáticas. Contudo, a lista de efeitos adversos também é vasta e dentre os já citados, estão relacionados o desenvolvimento da hiperplasia gengival, influência no sistema imunológico, e a longo prazo, a possibilidade de alterações cutâneas faciais, podendo, também, alterar níveis vitamínicos, diminuindo, por exemplo, os níveis de ácido fólico, constituindo fator de risco para diminuição da densidade óssea^{35 e 68}. Além disso, o medicamento pode afetar a pigmentação, induzir porfiria, induzir outros tipos de desordem de queratinização inflamatória, induzir hiperplasia linfóide benigna, pseudolinfoma, e mais raro, o linfoma maligno. A exposição fetal ao medicamento pode resultar em mudanças estruturais, comportamentais do sistema nervoso central, como na síndrome da hidantoína fetal^{78 e 83}.

Tendo em vista os dados abordados acima, sobre o fármaco fenitoína, e levando em consideração que pacientes que recebem a ministração deste medicamento, são um segmento populacional tangível ao cirurgião-dentista, deve-se considerar a

possibilidade da ocorrência de um diagnóstico de osteopenia em ossos crânio-faciais, por parte do profissional da área odontológica. Sendo assim, os métodos de diagnóstico por imagem, sobretudo, a radiografia digital dentária, representaria uma ferramenta clínica importante na possível detecção de alterações ósseas focando não somente o tecido dentário. Dentre as vantagens provenientes da utilização da radiografia digital destaca-se capacidade da produção da imagem logo após a exposição, reduzindo significativamente a dose de radiação ionizante, à qual o paciente é exposto. Além disso, tem-se a eliminação do filme e do seu processamento radiográfico, a possibilidade de armazenamento na forma de arquivos em computador, permitindo melhor organização, e também, a utilização de recursos que permitem a manipulação da imagem por meio de programas específicos, adequando-os segundo a necessidade e a particularidade de cada caso^{61 e 104}.

Toda imagem digital é constituída por pixels (menor elemento constituinte da imagem), em que o número de tonalidades de cinza (contraste) e o tamanho dos pixels (resolução espacial) determinam a resolução da imagem digital. Cada pixel da imagem representa um valor de cinza, ou seja, cada pequena área da imagem corresponde a um valor que indica o nível de escurecimento ou claridade, numa escala de tons de cinza, com base na sua densidade óptica²⁹. Esta pode ser representada em um gráfico ou histograma em que tem-se a visualização segundo o objeto radiografado.

Apesar das vantagens inerentes à radiografia digital acima mencionadas, sabe-se que existem poucos estudos sobre o possível diagnóstico por imagem da massa óssea verificada por sistemas digitais de uso odontológico. Desta maneira, no presente trabalho buscou-se enfatizar a importância de pesquisas que avaliem o grau de sensibilidade de um sistema de radiografia digital direto na detecção das repercussões biológicas advindas da utilização crônica do fármaco fenitoína, ressaltando sua freqüente indicação clínica para pacientes com crises

convulsivas. Para tanto, este trabalho teve como objetivo comparar os efeitos da indução da osteopenia pela fenitoína e pela castração de ratos utilizando para isso, a avaliação da densidade óptica em um sistema de radiografia digital direto.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Com a finalidade de facilitar e possibilitar a compreensão do conteúdo desta pesquisa, foram feitas divisões deste capítulo, abordando aspectos sobre a osteopenia/osteoporose, o medicamento fenitoína, densidade óptica e ainda noções básicas sobre sistemas digitais.

2.1 Osteopenia/osteoporose

O osso é um dos tecidos do organismo que possui grande capacidade de regeneração, por restaurar, em sua totalidade, sua estrutura e função original quando lesionado, incluindo fraturas ou defeitos locais por meio do processo de regeneração.

Encontram-se, portanto, células distintas responsáveis pela formação, reabsorção e manutenção da osteoarquitetura. São elas: os osteoblastos, os osteoclastos e os osteócitos. Os osteoblastos são responsáveis pela formação e mineralização óssea, sendo derivadas das células pluripotenciais mesenquimais. Como produtos de sua secreção tem-se: a fosfatase alcalina, ácido hialurônico, sulfato de condroitina, osteopontina, osteonectina, sialoproteína óssea, pró-colagenase, ativador de plasminogênio e proteína morfogenética do osso, entre outras^{4 e 17}. Por sua vez, os osteócitos são pequenas células aplainadas contidas dentro da matriz óssea, ligadas umas as outras e a células osteoblásticas presentes na superfície óssea ligadas por canalículos que contém fluido

ósseo extracelular. Ao passo que, os osteoclastos são células grandes, multinucleadas, responsáveis pela reabsorção óssea, derivadas de precursores hematopoiéticos, capazes de produzir fatores que podem estimular sua própria formação e atividade^{17, 52 e 95}.

O desenvolvimento de osteoclastos e seus progenitores são dependentes de células osteoblásticas-estromais, responsáveis pela maior fonte de citocininas, essenciais para a osteoclastogênese, na qual atuam a interleucina-6 e a interleucina-11, reguladas por esteróides. Quando ocorre a perda da função gonadal, a formação de osteoclastos e osteoblastos aumentam na medula, mediada pelo aumento da interleucina-6 e também pelo aumento de resposta de células progenitoras da medula óssea, como também de citocinas com propriedades osteoclastogênicas e osteoblastogênicas. A atividade celular medular pode também ser alterada pela senescência, diminuindo a habilidade de formação de precursores osteoblásticos. A associação entre a desregulação do desenvolvimento osteoclástico e osteoblástico na medula e a interrupção do balanço entre a reabsorção e formação óssea, resulta na perda óssea, como descreveram Manolagas e Jilka⁵².

No que se refere à remodelação óssea, sabe-se que é um processo fisiológico de constante aposição em que ocorre a remoção localizada de osso antigo, ou seja, reabsorção, e substituição por osso recentemente formado. É regulado por diversos fatores, como mecanismos intracelulares, por influência hormonal, fatores locais e externos. O processo de remodelação ocorre em pequenos conjuntos de células chamadas de unidades multinucleares básicas de remodelação óssea caracterizadas pelo acoplamento das funções dos osteoclastos e osteoblastos. Como primeiro estágio da remodelação, ocorre o recrutamento de células precursoras de osteoclastos. Em seguida, existe o reconhecimento das proteínas da matriz óssea extracelular por meio de proteínas de membrana celular chamadas integrinas. O próximo passo é a ativação osteoclástica por fatores liberados pelos osteoblastos.

Enquanto que na fase de reabsorção, os osteoclastos degradam tanto os componentes minerais quanto os orgânicos pela secreção de enzimas ácidas e hidrolíticas, liberando fragmentos minerais ósseos e de colágeno, estimulando os osteoblastos a se proliferarem e a sintetizar proteínas da matriz. Com isso, tem-se completo o ciclo de reabsorção. Um próximo estágio, denominado fase de reversão, células da mesma linhagem de monócitos e macrófagos preparam a superfície para novos osteoblastos iniciarem a formação óssea, com a produção de glicoproteína, na qual osteoblastos podem se unir. Posteriormente, a nova fase da formação óssea é resultante de uma complexa cascata de eventos que envolvem a proliferação de células mesenquimais primitivas, diferenciação em células precursoras osteoblásticas, maturação dos osteoblastos, formação de matriz e mineralização^{4 e 95}.

Mecanismos de regeneração e remodelação óssea possuem uma complexa regulação hormonal sistêmica, repercutindo em um processo de reações em que íons como o cálcio podem influenciar, mesmo que de forma indireta, aumentando sua absorção intestinal, tal como descreve Ikeda e Ogata³⁴. Tal importância foi descrita por Rodriguez et al.⁷⁹, na qual estudaram ratos desnutridos submetidos a uma dieta com 30% de proteínas e diferentes concentrações de cálcio para evidenciar o tamanho corporal e composição óssea, no caso o fêmur, durante a recuperação destes. Divididos em grupos que receberam cálcio nas porcentagens: zero; 0,2; 0,4; 0,6; 0,9 ou 1,2% durante 28 dias e tendo o peso e o comprimento corpóreo mensurado a cada três dias, obtiveram resultados que mostraram que os grupos tinham a relação peso/idade adequados, assim como o comprimento corpóreo/idade, porém a taxa de ganho de peso era melhor quando o cálcio foi administrado em concentração maior que 0,6%. Já na composição do fêmur evidenciaram que houve um aumento significativo expressos em mg/osso nos grupos de zero a 0,9% de cálcio e não houve diferenças para os grupos de 0,9% a 1,2%. Com isto, os autores concluíram que a relação cálcio/proteína é

um fator limitante para o alcance do tamanho normal do corpo, sendo realizado com uma concentração de cálcio de 1,2%.

Petrikowski e Overton⁷⁴ em 1995, induziram a osteopenia um grupo de animais e utilizaram uma dieta com baixo teor de cálcio, com o objetivo de determinar mudanças que ocorrem na mandíbula, no fêmur e no corpo vertebral. Os grupos controle possuíam uma alimentação normal. Ratos de cada grupo eram pesados semanalmente e subgrupos de 12 ratos de cada tratamento foram sacrificados com 18, 24, 36 e 48 semanas. Um grupo separado foi sacrificado com 12 semanas para efeito comparativo. As mandíbulas, os fêmures e as vértebras de todos os ratos foram removidos e radiografados individualmente, mensurações da espessura cortical e largura óssea foram realizadas utilizando radiografias com um sistema de análise de imagem de vídeo. Evidenciaram diferenças significantes entre os grupos de tratamento detectada para cada tipo de osso. Apesar disso, as mudanças dimensionais foram pequenas. O trabalho concluiu que a largura cortical mandibular é um indicador incerto da osteopenia em ratos.

Com relação à vitamina K e seus homólogos Akiyama et al.³ descreveram que existe repercussões no metabolismo ósseo, sugestivos de prevenção contra a perda óssea em caso de supressão hormonal decorrente da ovariectomia em ratos. Outro trabalho de Akiyama et al.², em 1999, indicou que, *in vitro*, a vitamina K₂, inibe a reabsorção óssea em sistema de cultura de órgãos, por inibição de células precursoras de osteoclastos, aumentando a mineralização induzida por osteoblastos.

Em 1999, Matsunaga et al.⁵⁴, realizaram um estudo com o objetivo avaliar o efeito da suplementação da vitamina K e D na perda óssea induzida pela ovariectomia. Utilizaram 5 grupos de ratos fêmeas divididos em ovariectomizados, ovariectomizados com suplementação de vitamina K, ovariectomizados com suplementação de vitamina D, apenas suplementação de vitamina D e vitamina K e por último, o grupo SHAM. A

área trabecular óssea da tíbia foi determinada mediante histomorfometria, por microrradiografia e por exame histológico. Os resultados mostraram que os grupos que receberam suplementação de vitamina D e vitamina K tiveram menor perda óssea, e ainda que não existiram diferenças estatísticas significantes entre esses grupos nesse quesito. Concluíram que a vitamina D e K podem ter um efeito sinérgico na redução da perda óssea, sendo esta informação valiosa no tratamento de mulheres na pós-menopausa com osteoporose.

No que diz respeito a atuação da vitamina D ativa, Iwamoto et al.³⁶, afirmaram que apesar de ser utilizada em muitos países, como no Japão, não é aprovada nos Estados Unidos pela sua relativa baixa efetividade e o risco de causar hipercalcúria/hipercalcemia. Afirmaram ainda que sua melhor ação no esqueleto é na osteoclastogênese, principalmente em estados de alta remodelação óssea como na deficiência estrogênica e que *in vivo* e em doses farmacológicas não causaram hipercalcemia, contrariando o que se acreditava em experimentos *in vitro*, pois sua ação óssea é independente do cálcio e do paratormônio. A vitamina D estimula a absorção intestinal de cálcio e previne a redução na maturação periosteal do ganho ósseo por indução da acumulação de cálcio para o osso endocortical.

Com relação à manutenção da saúde óssea na vida adulta, sabe-se que está diretamente relacionada com os hormônios sexuais estrógenos e andrógenos. Os estrógenos são hormônios que produzem numerosas ações fisiológicas, incluindo efeitos no desenvolvimento, ações endócrinas envolvidas no controle da ovulação, preparo do trato reprodutor para a fertilização e implantação do óvulo e ações no metabolismo de minerais, carboidratos, proteínas e lipídeos. Tal deficiência deste hormônio na menopausa é considerada o maior fator patogênico de desenvolvimento da osteoporose em mulheres. O mecanismo de ação, todavia não é completamente elucidado, porém vem se fazendo muitos avanços no conhecimento de como o uso de

estrógenos e andrógenos influenciam na modelação e remodelação óssea na saúde e no processo patológico¹⁷.

Quanto ao mecanismo de atuação, acredita-se que envolve interação entre uma molécula ligante e um receptor, por exemplo, receptores estrogênicos em osteoblastos. Sua principal atuação é na reabsorção óssea pela capacidade de afetar a função osteoclástica pela indução da apoptose, sugerindo a possível prevenção da perda óssea excessiva antes e após a menopausa^{4, 60 e 95}.

Da mesma forma que hormônio feminino, os andrógenos também estão associados com a redução da densidade mineral óssea. Acredita-se que o hipogonadismo seja um importante fator patógeno da osteoporose, em certas situações, majoritária¹⁷.

Para tanto, a osteoporose foi reconhecida como problema público a menos de duas décadas e pode ser definido como uma diminuição da massa óssea com deterioração de sua microarquitetura, denotando no aumento da fragilidade óssea^{1, 4, 17, 30 e 108-9}. Também podendo ser considerado não propriamente uma doença, mas o resultado de muitas afecções, como um distúrbio quantitativo, já que o osso remanescente é bem mineralizado. Enquanto que, o termo osteopenia também pode ter referência à redução da massa óssea, de forma que um paciente com aspecto radiográfico osteopênico pode ter osteoporose, osteomalácia ou ainda outra doença óssea^{14, 17, 20, 52 e 95}.

A osteoporose pode ser classificada como primária ou secundária. Esta última refere-se ao tipo associado por uma terapia medicamentosa e representa 10% dos casos. A maioria dos pacientes estão englobados na primária que incluem na osteoporose idiopática em crianças e adultos. As formas principais de osteoporose involucional são a pós-menopausa e osteoporose senil, também designado em tipo I e II, respectivamente³⁸.

A densidade mineral óssea (DMO) é a forma comumente utilizada como diagnóstico da osteoporose em indivíduos que sofreram

fraturas no quadril ou na coluna. É mensurada pelo exame de densitometria por dupla emissão de raios X (DXA), que utiliza um equipamento especializado e mede a densidade óssea no esqueleto axial ou periférico. O uso de dois feixes de energia permite que a espessura do tecido mole possa ser removido, para que apenas se considere a densidade óssea, sendo considerado de maior acurácia para o diagnóstico dessa patologia óssea, tal como descrito por White¹⁰⁷ em 2002.

Apesar da ampla utilização, Paiva et al.⁶⁹ descreveram a desvantagem decorrente da utilização do DXA por também mensurar todos os componentes minerais incluindo osteófilos, calcificações vasculares e extravertebrais, o que pode influenciar os resultados da densidade óssea, dificultando a interpretação densitométrica. Seu trabalho correlacionou os achados radiográficos e densitométricos de mulheres com osteoporose e avaliou os processos degenerativos e fraturas vertebrais da coluna lombar. Para isso, o estudo foi retrospectivo e avaliou 96 mulheres na pós-menopausa com osteoporose diagnosticada. Realizou-se também a radiografia simples da coluna torácica e lombar em projeção lateral. Os resultados indicaram que os osteófitos e as fraturas de coluna lombar podem superestimar a densidade óssea, portanto os autores sugerem a complementação de radiografias simples da coluna lombar para minimizar esse efeito.

Outras formas de diagnóstico da osteoporose são possíveis através densitometria de raios X por emissão única de fóton, tomografia computadorizada quantitativa, ultrassom quantitativo, Ressonância magnética quantitativa, afirmadas por Jergas e Genant³⁷.

A indicação da realização da densitometria é proveniente a partir de evidências radiográficas de osteopenia, perda de altura, fratura decorrente de trauma baixo, o uso de terapia prolongada com corticosteróides, entre outros^{14 e 37}.

Louzada et al.⁵⁰, em 2001, realizaram um estudo que teve por objetivo determinar e analisar a densidade óssea na mandíbula de coelhos castrados mediante a análise da densitometria óptica radiográfica. Foram utilizados seis coelhos, sendo três machos e três fêmeas considerados grupo controle, enquanto outros 12, com machos e fêmeas em proporções iguais formaram o grupo que foi castrado aos cinco meses e acompanhados até os 11 meses. Após o sacrifício dos animais, as hemimandíbulas foram radiografadas juntamente com uma escala de alumínio, posteriormente, as imagens obtidas digitalizadas. As análises densitométricas foram realizadas na região do terço médio, superior ao incisivo central, por meio de um programa específico, que fornecia valores de densidade óptica expressado em níveis de cinza. A partir destes valores, fez-se a conversão para valores em espessura de alumínio. Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos e entre os sexos.

Várias partes do esqueleto humano podem estar sujeitas à diminuição da densidade óssea, incluindo a mandíbula¹⁰⁴. Pode ser evidenciado pela porosidade cortical da mandíbula, sendo mais pronunciado em mulheres que em homens, com percentuais de perda óssea por ano de 1,5% e 0,9%, respectivamente³⁰.

A importância da verificação da possibilidade da correlação da osteoporose com a massa óssea mandibular afeta diretamente ao cirurgião-dentista. Esta massa mandibular correlaciona-se com as mensurações esqueléticas, sugerindo que este fato, reflete melhor o estado do todo o esqueleto do que a vértebra ou o punho⁴¹⁻². A correlação do número de dentes com a massa mandibular é também válida, ou seja, pacientes com menor número de dentes, conseqüentemente, pouco osso mandibular devem ser levados em conta quanto ao risco de osteoporose, porém não é apropriado basear-se somente nessa mensuração óssea, uma vez que existem muitas variáveis que podem evidenciar uma justaposição entre os grupos de pacientes

sem e com osteoporose⁴¹. O trabalho de Taguchi et al.⁸⁸, em 1995, tendo como foco o fato descrito acima verificou que em homens não houve correlação significativa. Já entre as mulheres na sétima década, aquelas com 15 ou mais dentes mostraram uma significância maior entre a largura da cortical mandibular com aquelas com menos dentes, o que leva a concluir que pode-se correlacionar este fator em mulheres.

A deficiência estrogênica pode também causar mudanças na propriedade do osso alveolar, no septo interradicular até o primeiro molar, o que acelera a destruição óssea alveolar e perda dentária, especialmente em pacientes acometidos pela doença periodontal⁹¹⁻². Em ratos evidenciou-se perda e fragmentação do osso alveolar e diminuição da espessura cortical mandibular, descrito por Tanaka et al.⁹³, em 2003. Porém, em humanos, a cortical óssea mandibular é mais resistente a reabsorção, sendo por isso necessário maior duração da deficiência do hormônio para a ocorrência deste fato¹⁰⁸⁻¹⁰⁹.

Mohajery e Brooks⁵⁷ procuraram determinar se as mudanças radiográficas podem detectar na mandíbula em pacientes com osteoporose pós-menopausa e se essas mudanças podem ser usadas como ferramenta para diferenciar pacientes normais de pacientes osteoporóticos. Os indivíduos foram classificados como osteoporóticos, ou normais, com base nas mensurações da densidade da espinha lombar e pescoço fêmural, determinado por DXA. Mensurações da densidade mineral óssea foram realizadas em radiografias panorâmicas e periapicais e expressas em mm de Al. A espessura da cortical do ângulo da mandíbula, soalho sinusal e lâmina dura dos dentes foram mensurados. Não houve diferenças significantes em qualquer mensuração entre pacientes normais e osteoporóticos. Ao passo que mensurações do osso esquelético foram mensuradas e correlacionadas um com o outro, sendo que não houve nenhuma correlação entre mensurações do osso esquelético e mandibular. Mulheres com moderado grau de osteoporose

não puderam ser diferenciadas de mulheres com densidade óssea normal com o método descrito no artigo.

Quanto à utilização de recursos mais acessíveis ao cirurgião-dentista, Law et al.⁴⁹ procuraram avaliar radiografias dentárias quanto a sinais da osteoporose usando quatro métodos: dimensão fractal, microdensitometria, intensidade do pixel e análise da espessura da cortical da panorâmica. A eficácia desses métodos também foram comparados com três técnicas de mensuração da densidade óssea para diagnóstico da osteoporose: tomografia computadorizada quantitativa, densitometria por emissão única e emissão dupla de fótons. A intensidade do pixel foi significativamente mais efetivo que os outros métodos dentários na distinção entre o grupo de pacientes com osteoporose e o grupo controle, mesmo a dimensão fractal e a microdensitometria foram métodos efetivos.

Lane et al.⁴⁶ tiveram como proposta determinar o curso e o tempo da deterioração da estrutura trabecular e mudanças na remodelação óssea em ratos submetidos à ovariectomia. Ratos fêmeas com seis meses de idade tiveram a tíbia direita escaneada por microscopia tomográfica de raios X (XTM) no dia zero do experimento. Os animais foram divididos em dois grupos, em cada grupo 9 eram SHAM e 11, ovariectomizados. O escanamento foi repetido nos dias 5, 13, 29 e 42 dias pós-operatório no grupo 1 e nos dias 8, 13, 33 e 50 dias pós-operatório no grupo 2. As variáveis da estrutura óssea trabecular e os pontos finais da remodelação óssea foram calculados por dados do XTM e padrões da histomorfometria. A conectividade trabecular diminuiu 27% nos dias 5 e 8 pós-operatório e continuou sua diminuição até o dia 50. O volume ósseo trabecular diminuiu 25% no dia 8 pós-operatório e continuou até o dia 50.

Apesar da osteoporose ser uma doença predominantemente de mulheres, cerca de 30% de fraturas de quadril e 20% das fraturas em vértebras ocorrem em homens. Os fatores de risco

para fraturas osteoporóticas em homens incluem baixo índice da massa corpórea, tabagismo, consumo de álcool, terapia de corticosteróide, inatividade física e condições que aumentam o risco de quedas. A diminuição da perda óssea com o envelhecimento pode estar relacionado com a diminuição da função renal, deficiência de vitamina D, aumento do nível de paratormônios, baixo nível de testosterona, baixa ingestão de cálcio e absorção. A osteoporose pode ser diagnosticada com avaliações radiográficas da massa óssea, ou clinicamente quando sintomático. Vários marcadores bioquímicos podem ser relacionados com a saúde em homens osteoporóticos. O tratamento para homens com osteoporose incluem agentes para a reabsorção óssea ou formação e terapia específica para entender a condição patológica. A testosterona aumenta a DMO em hipogonadismo em homens e é o mais efetivo quando as epífises não estão completamente fechadas. Bifosfonatos são o tratamento de escolha para osteoporose idiopática, como também o fluoreto de sódio e esteróides anabólicos. A testosterona em ratos orquidectomizados preveniu os efeitos do processo patológico e o grau de proteção foi considerado dose-dependente. Tais afirmações acima foram descritas por Eastell et al.²⁰ e por Wakley et al.¹⁰²

Da mesma forma, condições com deficiência de estrógeno e dieta com baixo índice de cálcio, pode afetar o processo cicatricial. Este fato possui grande importância clínica quando se considera o tratamento para fraturas em pacientes com osteoporose devido à menopausa⁴³. Outro fator decorrente da deficiência de estrógenos resulta em alterações da microarquitetura do trabeculado ósseo em mandíbula e tíbia de ratos dentro do prazo de 16 semanas em ratos, como descrito por Yang et al.¹⁰⁹, em 2003.

Vanderschueren et al.⁹⁷⁻⁸ investigaram os efeitos da deficiência de andrógenos a curto e longo prazo, como também a terapia de reposição na homeostase hormonal em ratos machos com 13 meses (mais velhos). Os animais foram divididos em grupo sham com 28

espécimes e orquiectomizados com 89. Este último grupo foi dividido em cinco grupos: 26 ratos que receberam um implante vazio Silastic, e todos os outros receberam um implante contendo testosterona, 5 α -dihydrotestosterona, 17 β -estradiol ou nandrolona, sendo que cada grupo tinha de 15 a 16 animais. A metade destes foi sacrificada com um mês da implantação (experimento de curto período) e os demais foram sacrificados depois de quatro meses da implantação (experimento de longo período). Evidenciou-se que a massa óssea foi significativamente diminuída 4 meses após a orquiectomia, precedida por um rápido aumento da remodelação óssea. O rápido aumento da remodelação óssea e a diminuição lenta da massa óssea foi prevenida por andrógenos aromáticos e não-aromáticos, por estrógenos e pela nandrolona.

Em trabalho posterior, Vanderschueren et al.⁹⁸ estudaram machos e fêmeas “maduros” e machos andrógeno-resistentes feminizados(Tfm). Estes foram sacrificados com 120 dias de idade. Machos jovens e ratos Tfm foram orquiectomizados no primeiro mês de vida e sacrificados aos 120 dias, os fêmures direitos foram dissecados, limpos e escaneados com Hologic QDR-1000. Os ratos orquiectomizados e os Tfm tiveram pesos corpóreos similares e foram conceituados intermédios entre o peso corpóreo normal de um rato macho e de uma fêmea intermédia. Foi realizada o DXA e obtiveram os seguintes resultados: a massa e a área total fêmural foi menor em fêmeas, ratos Tfm e no grupo orquiectomizado comparado com o grupo de machos intactos. A densidade fêmural óssea, entretanto, diminuiu em ratos orquiectomizados em áreas contendo o osso cortical e esponjoso. Estes achados são consistentes com $\pm$ 50% de diminuição do volume do osso esponjoso em ratos orquiectomizados comparados com os demais grupos na metáfise proximal da tíbia (área que contém osso esponjoso principalmente). Os autores concluem que a densidade óssea trabecular pode ser preservada em ratos andrógenos-resistentes independente do osso ou velocidade de crescimento. Um modesto aumento de

concentrações de estrógeno em animais e/ou sítios de aromatização podem ser responsáveis pela manutenção do osso esponjoso.

Em 2003, Carvalho e Cliquet Jr¹² averiguaram os efeitos benéficos do ultrassom de baixa intensidade no processo de osteogênese de fraturas em ratos que foram induzidos à osteopenia mediante a castração. Foi realizado a estimulação do ultra-som nos fêmures durante 20 dias com sessões de 20 min/dia. Procuraram verificar na primeira parte do estudo a eficácia do modelo de indução à osteopenia no osso fêmural de ratas em um protocolo de trinta dias. Na segunda parte, foi avaliado a eficácia do ultrassom de baixa intensidade, sobre a região osteopênica dos ratos. Os autores fizeram uso de parâmetros de propriedade mecânicas e histológicas. Os resultados mostraram que no grupo tratado houve formação óssea comparado ao grupo não tratado, sugerindo que o ultrassom de baixa intensidade pode interferir positivamente na osteoporose.

Outro fato a ser descrito, são as vantagens da utilização do modelo de experimentação animal com ratos para indução da perda óssea, já que se tem a possibilidade da obtenção de um estudo padronizado, acessibilidade financeira, tempo relativamente rápido, ratos possuem osso lamelar, com remodelação do osso esponjoso em muitos sítios similares aos que ocorrem em humanos, a possibilidade de submeter a testes biomecânicos mediante condições padronizadas, a anatomia do esqueleto do rato possui muitas semelhanças com o esqueleto humano, a ovariectomia pode produzir alterações no tecido esponjoso idênticos ao visto no esqueleto humano durante a menopausa. Quanto às desvantagens, citam-se: a epífise aberta na idade de 12-24 meses (dependendo de sítios esqueléticos), possuem uma pequena remodelação intra-cortical, pronunciada modelação óssea através da vida, além de ter maior remodelação óssea em muitos sítios do esqueleto em relação ao humano, por exemplo, o final da proximal da tíbia⁵⁹.

Em 2005, Mello e Gomide⁵⁶ investigaram os efeitos da suplementação de flúor nas dosagens 0, 20, 40, 60, 80 e 100mg/L em 78 ratas com quatro meses de idade que foram submetidas à ovariectomia em relação as características dos ossos, por meio de parâmetros biomecânicos, propriedades físicas e químicas. A ovariectomia promoveu a osteopenia, observada pela menor resistência biomecânica dos fêmures quando submetidos ao ensaio de flexão. Observaram também que os ossos de ratas que ingeriram 40 mg de flúor demonstraram melhores características físicas, químicas e biomecânicas em relação a aquelas que não foram ovariectomizadas ou que não receberam a suplementação. Concluíram que o flúor promove uma proteção contra a perda óssea induzida pela deficiência de estrógenos, causada pela castração.

Quanto ao tratamento de casos clínicos de osteoporose, em 2003, Akesson¹ descreveu, a respeito de novas modalidades farmacológicas para o tratamento deste processo patológico. Como farmacoterapia para redução da perda óssea e diminuição do risco de fraturas tem-se os bisfosfonatos, terapia de reposição hormonal, calcitonina, moduladores de receptores de estrógeno, cálcio e vitamina D. A autora concluiu que a osteoporose é uma condição multifatorial e a prevenção e o tratamento envolvem diversas opções que necessitam do conhecimento dos mecanismos de ação que regulam a atividade das células ósseas.

White¹⁰⁷, em 2002, descreveu também que o tratamento mais efetivo contra a osteoporose é a prevenção por remoção dos fatores de risco, incluindo exercícios regulares, ingestão de cálcio e vitamina D, remoção do tabagismo e consumo excessivo de álcool, como também o uso de medicamentos como os bisfosfonatos que interferem na função osteoclástica, moduladores receptores seletivos de estrogênios e agentes como o paratormônio que atua na promoção da formação óssea.

Foram relacionados os fatores de risco que podem estar associados a osteoporose, sendo eles: raça (maior pico de massa óssea

em afro-americanos que em asiáticos e caucasianos); condições hormonais (exemplo, mulheres que não receberam terapia de reposição hormonal ou histerectomia); história familiar; ingestão de cálcio; atividades físicas; fatores comportamentais, como o consumo de cigarro e álcool e alguns medicamentos, como glicocorticóides^{47 e 107}.

Em 2006, Sakakura et al.⁸⁰ avaliaram a influência da ovariectomia de oito semanas depois da colocação de implantes de titânio na integração óssea. Para tanto, utilizaram 38 ratos fêmeas em que foi colocado implante na região da metáfise da tíbia. Depois de um período de cicatrização de oito semanas os animais foram divididos em três grupos: grupo controle com 10 animais, grupo SHAM (falsamente operados, com 14 animais), e o grupo ovariectomizado, com 14 animais. O grupo controle foi sacrificado para confirmação da osseointegração do implante. Depois de 12 semanas após a colocação do implante, o grupo SHAM e ovariectomizado foram sacrificados. Foi realizado o DXA para confirmar a osteopenia. Para avaliação da densidade foram realizadas incidências radiográficas. O nível de cinza da área adjacente ao implante foi mensurada através de um programa de imagem e a densidade óssea foi calculada em seis pontos ao lado do implante. As mensurações densitométricas confirmaram a perda da massa óssea sistêmica no grupo ovariectomizado. As análises individuais das diferentes regiões ao redor do implante mostraram que a densidade era significativamente menor no grupo ovariectomizado quando comparado ao grupo controle e ao grupo SHAM. Este estudo mostra a diminuição da densidade óssea radiográfica na região circundante do implante de titânio em que este foi colocado 8 semanas antes da ovariectomia em ratos.

2.2 Fenitoína

A fenitoína é um ácido fraco com solubilidade pequena na água. Administrada por via intramuscular, o fármaco precipita-se no local, proporcionando uma absorção lenta e imprevisível. Portanto, sua administração deve ser sempre por via oral, ainda assim ocasionalmente, a absorção é incompleta. Esta absorção ocorre no trato gastrointestinal, em que a maior parte do medicamento liga-se a proteínas plasmáticas, deixando 10% livre e ativo, responsáveis pelos efeitos colaterais como hirsutismo e ataxia⁴⁰. Este fármaco é caracterizado por ter uma cinética não linear ou de ordem zero, sua eliminação é dependente do metabolismo hepático, com biotransformação variável de acordo a idade, ou seja, em adultos a meia-vida varia de 10-34 horas; 5-18 horas em crianças e de 20-60 horas em recém-nascidos. Seus metabólitos possuem eliminação renal e podem produzir deslocamento da fenitoína dos seus sítios protéicos, aumentando a biotransformação hepática⁴⁰.

Apesar da fenitoína ser utilizada para a maioria das desordens convulsivas, em 1998, Perucca et al.⁷³ descreveram sobre o paradoxo dos fármacos anti-epilépticos aumentarem a atividade convulsiva. Os mecanismos são pouco entendidos, porém acredita-se no envolvimento de uma manifestação não-específica de intoxicação pela substância, neste caso, esse tipo de reação é reversível pela redução da dose ou eliminação desnecessária do fármaco.

O mecanismo de ação da fenitoína consiste na depressão do sistema motor cortical. A molécula estabiliza a membrana neuronal bloqueando o canal de sódio, prevenindo a entrada do íon necessário para a geração do potencial de ação e bloqueando o contra-fluxo de potássio durante o potencial de ação, impedindo a liberação de neurotransmissores excitatórios^{26, 40 e 106}. Ocorre também o efeito de bloquear a entrada de cálcio reduzindo a permeabilidade da membrana

pelo íon. Isso resulta na inibição da liberação do cálcio intracelular, reduzindo e inibindo a função secretora da célula. Pode atuar no feto diminuindo a síntese de DNA por inibição direta na proliferação celular. Exerce efeitos farmacológicos nos canais de sódio, cálcio e potássio, resultando em efeitos estabilizadores em membranas excitáveis de neurônios e miócitos cardíacos. Estas propriedades farmacológicas explicam porque a fenitoína tem se mostrado uma droga efetiva no tratamento das arritmias ventriculares⁷⁸.

A terapia crônica deste fármaco pode causar náusea, vômito, dor abdominal, constipação, complicação hematopoietica fatal, confusão mental, acne, eritema multiforme, hepatite e hiperplasia gengival medicamentosa, pode alterar também o metabolismo da vitamina D. Discrasias sanguíneas são incomuns, embora possa causar leucopenia e supressão da medula óssea^{35, 63 e 71}.

Este fármaco também é usado com sucesso durante anos no tratamento de epilepsia em mulheres gestantes. Seu efeito deletério na descendência é conhecido como síndrome da hidantoína fetal, caracterizada por defeitos craniofaciais, deficiências de crescimento pré e pós-natal, microcefalia, defeitos cardíacos, dificuldade de aprendizado e diminuição no quociente intelectual. Em ratos, a fenitoína intra-uterina causa mudanças na função cognitiva da descendência, como também no desenvolvimento, atividade locomotora, peso corpóreo e cerebral. Em fêmeas evidencia-se a erupção do incisivo mais severa, geotaxia negativa, alterações na respiração e atividade locomotora. Machos foram mais afetados na abertura de olho, orientação olfatória e diminuição do tempo de resposta⁵⁵.

Sabe-se também que a fenitoína é um dos fármacos anti-epilépticos mais utilizados no tratamento de desordens convulsivas e que apresenta como efeito colateral de extensão e/ou secundário o desenvolvimento a longo prazo de hipocalcemia e osteomalacia, podendo ocorrer a diminuição de fosfatase alcalina, da massa óssea e aumento da

taxa de fratura. Também existe a sugestão da correlação da hipocalcemia e osteomalacia com a diminuição de níveis biologicamente ativos de metabólitos da vitamina D⁴⁸.

Por outro lado, estudos já mostraram que a fenitoína em baixas doses (menores que 5mg/kg/dia a micromolares), estimula a proliferação de osteoblastos tanto em células animais, quanto em estudos em humanos, já em doses terapêuticas ocorre a inibição da proliferação de precursores de osteoblastos^{21 e 24}. Portanto, a fenitoína apresenta ação osteogênica tanto in vitro, quanto in vivo, em concentrações micromolares⁴⁸.

A avaliação da possibilidade que baixas doses de fenitoína são osteogênicas in vivo, em ratos, foi estudado também por Ohta et al.⁶³, em 1995. No primeiro experimento, foram utilizados quatro grupos de ratos que receberam a administração intraperitoneal diária de 0, 5 ou 150 mg/kg/dia de fenitoína, respectivamente, durante 47 dias. Observaram que os níveis séricos de fosfatase alcalina e osteocalcina eram maiores no grupo de 5 e 50 mg/kg/dia. A taxa de aposição mineral da diáfise tibial foi significativamente maior naqueles que receberam 5mg/kg/dia. Ao passo que o grupo que recebeu 150mg/kg/dia teve resultados inversos em relação a taxa de aposição mineral, nível de fosfatase alcalina e osteocalcina. Num segundo experimento, três grupos de ratos receberam a dose diária de fenitoína de 0, 1 ou 5 mg/kg/dia respectivamente por 42 dias. O grupo que recebeu a dosagem de 5mg/kg/dia aumentou significativamente as mensurações de formação óssea, nível sérico de fosfatase alcalina, osteocalcina, taxa de aposição mineral da diáfise tibial e volume trabecular ósseo. Já os ratos que receberam 1mg/kg/dia não mostraram aumento desses parâmetros da formação óssea. Porém houve o aumento da superfície osteoblástica metafiseal, número de osteoblastos, espessura osteóide, superfície e volume o que não ocorreu naqueles que receberam 5mg/kg/dia, sugerindo que a metáfise e a diáfise tibial possuem respostas diferentes

quanto a resposta dos parâmetros de formação óssea, na administração de dosagens diferentes de fenitoína. Nos dois experimentos não houve alteração do ganho de peso corpóreo decorrentes da administração do medicamento. Concluíram que esta pesquisa tinha os primeiros achados *in vivo* que demonstravam evidências que a fenitoína em baixas doses (entre 1 e 5 mg/kg/dia) são agentes osteogênicos em ratos.

Diante destes dados, num trabalho posterior Ohta et al.⁶², 1995, associaram a possibilidade de que uma dose mitogênica de fluoreto aumenta significativamente a estimulação dose-dependente da proliferação normal de células humanas e a atividade da fosfatase alcalina na cultura de células. Ainda tinha por objetivo verificar se a interação destes aumentariam a formação óssea nos ratos *in vivo*. Utilizaram quatro grupos de ratos machos que receberam injeção intra-peritoneal de 0, 5 mg/kg/dia de fenitoína, 5mg/kg/dia de fenitoína com 50 ppm de NaF e somente 50 ppm de NaF durante 36 dias. Foram analisados nos níveis séricos de osteocalcina, fosfatase alcalina, cálcio, fósforo e 25(OH)D3. Foi realizado também o exame histomorfométrico da tíbia, obteve-se mensurações da formação óssea, taxa de aposição mineral óssea, porcentagem de formação óssea na superfície. Os resultados indicaram que quando da associação da fenitoína e do fluoreto ocorre um maior aumento de cada parâmetro de comparado à ação de cada composto agindo sozinho, indicando que esses agentes não promoveram osteomalacia, e sim estimularam a formação óssea e aumento do volume trabecular ósseo sem causar defeitos na mineralização *in vivo*. A combinação pode ser um potencial terapêutico para o tratamento de perda de massa óssea na osteoporose.

Considerando o possível potencial proliferativo celular e cicatricial da fenitoína, em 1998, DaCosta et al.¹⁸, determinou a força tênsil em ratos machos em um modelo incisional. Evidenciou-se que ocorreu o aumento desta força em feridas tratadas com fenitoína. O exame histopatológico explica esse fato pelo aumento da infiltração de

fibroblastos com marcação de infiltrado inflamatório e neovascularização nas feridas que receberam fenitoína, como ocorre na hiperplasia gengival provocada também por este fármaco e descrita por autores como Spolidorio et al.⁸⁶. O estudo conclui que a fenitoína altera o curso da cicatrização e pode beneficiar situações clínicas em que existe uma deposição de colágeno insatisfatória. Isto ratifica a sua utilização tópica em úlceras traumáticas, queimaduras, úlceras diabéticas, úlceras de hanseníase⁸.

Assim sendo, Ikeda et al.³⁵ em 1999, estudaram o efeito da fenitoína na diferenciação osteoblástica de células em cultura da calvária de fetos de ratos na formação de nódulo ósseo, crescimento celular, atividade da fosfatase alcalina, síntese de colágeno e expressão de RNAm da osteocalcina e osteopontina com ou sem dexametasona. O tratamento das células com fenitoína foi realizado durante 18 dias e é dose-dependente aumentando o número de mineralização do nódulo ósseo em concentrações de 12,5-200 $\mu\text{mol/L}$ de fenitoína. Já o crescimento celular não foi afetado pelas mesmas concentrações de fenitoína, enquanto a atividade da fosfatase alcalina foi estimulada sendo dose-dependente e mantida nos níveis mais altos nas células tratadas com fenitoína. O colágeno tipo I também foi influenciado pela fenitoína, o nível de RNAm estava aumentado e a porcentagem de colágeno sintetizado também estava aumentado significativamente, (200 $\mu\text{mol/L}$ de fenitoína). Quando a fenitoína foi colocada em três diferentes estágios de cultura celular, do dia 1 ao 6 dia (crescimento), do 7-12 dia (desenvolvimento da matriz) e do 13-18 (mineralização). Verificou-se que a formação de núcleos ósseos ocorreram primariamente no estágio de crescimento e secundariamente no estágio de desenvolvimento, mas não ocorreu no último estágio. O autor indica que a fenitoína estimulou a formação do núcleo de osteogênese *in vitro* não somente por células osteoprogenitoras mas também por células osteoblásticas.

Por outro lado, o fato de fármacos antiepiléticos, incluindo a fenitoína estarem associados à diminuição da densidade mineral óssea com o desenvolvimento de osteopenia ou osteomalacia ou ainda lesões atróficas ósseas foi descrito em diversos trabalhos, como o de Kulak et al.⁴⁵, Feldkamp et al.²⁴, Ensrud et al.²¹, Pack et al.⁶⁷, Pack e Morrell⁶⁸. Os autores referidos, seguindo protocolos similares, com pacientes usuários crônicos de fármacos anti-epiléticos, de ambos os sexos analisaram a densidade mineral óssea por meio de DEXA, ou ainda radiografia digital quantitativa. As áreas mensuradas compreendiam regiões como a espinha lombar e ainda o calcâneo.

Além disso, a associação da vitamina D em estudos com fármacos anti-epiléticos em pacientes masculinos, Filardi et al.²⁵, em 2000, não evidenciaram diferenças significativas entre os pacientes tratados e os do grupo controle, sugerindo que a suplementação não é necessária para pacientes de regiões ensolaradas, pois nestes, a densidade mineral óssea e os níveis plasmáticos de vitamina D permaneceram em níveis satisfatórios. Dessa maneira, os autores, consideraram que diminuição da DMO está, de maneira direta, associada a uma remodelação óssea acelerada, por exemplo, por anti-epiléticos, independente de uma possível hipovitaminose D⁹⁶.

No que se refere às análises de marcadores bioquímicos da remodelação óssea, o uso crônico da fenitoína também pode alterar os níveis séricos de fosfatase alcalina, aumentando-os²⁵. Geralmente os efeitos da fenitoína e seu maior metabólito, 5-(4-hidroxifenil)-5-fenilhidantoína (HPPH) , na atividade reabsortiva de células em cultura primária da calvária de ratos foi examinada *in vitro*. Ambos, a fenitoína e o HPPH induziram significativamente a atividade osteoclástica quando comparada ao grupo controle depois de 72 hrs em cultura de células. Estes dados podem significar que, *in vivo*, a fenitoína poderia levar à perda óssea por indução da reabsorção deste tecido⁹⁰.

Onodera et al.⁶⁴, em 2001, verificaram os efeitos da perda óssea induzida pela fenitoína e sua possível prevenção com alfacalcidol ou calcitrol de ratos em crescimento. A administração de 20mg/Kg/dia de fenitoína por 5 semanas não alterou a curva de crescimento dos animais experimentais. Porém, evidenciou-se que houve uma diminuição dos valores de densidade mineral óssea nas regiões testadas (cabeça da mandíbula, metáfise e diáfise da tíbia, metáfise e diáfise do fêmur). Após análise histomorfométrica, observou-se diminuição do volume e da espessura trabecular óssea e aumento do número de osteoclastos por área de superfície óssea no osso trabecular secundário da tíbia. Não houve diferenças significantes na espessura da matriz osteóide. No grupo na qual foi aplicada a combinação da administração do alfacalcidol ou calcitrol com a fenitoína por 5 semanas preveniu-se a redução da densidade óssea mineral induzida. Os autores concluíram que a administração crônica de fenitoína pode causar osteopenia devido a inibição da formação óssea por aceleração da reabsorção em detrimento da secreção de matriz osteóide. Desta forma, a combinação do alfacalcidol ou calcitrol mostraram ação moduladora na prevenção da perda óssea em ratos em crescimento.

Num trabalho posterior, Onodera et al.⁶⁵, em 2002 seguiram protocolo semelhante, porém verificando a menatetrenona como substância de ação preventiva do processo de perda óssea induzida. Verificaram os valores da DMO significativamente menores na diáfise e na metáfise da tíbia no grupo tratado com a fenitoína, durante as cinco semanas já mencionadas. Nesse período, mensuraram também, o nível sérico da proteína vitamina K -dependente, osteocalcina, um marcador da neo-formação óssea, que apresentou um decréscimo no grupo tratado. Combinando a administração de menatetrenona (30mg/kg/dia na dieta) com a fenitoína por cinco semanas houve a redução da DMO, e o nível de osteocalcina estava ligeiramente aumentado. Estes dados sugeriram que à longo prazo, a exposição à fenitoína pode inibir a formação óssea,

sobretudo se for associada à insuficiência de vitamina K. Dentro deste contexto, os achados, podem representar alternativa terapêutica do uso da menatetrenona em moderado grau de anormalidade óssea em condições de osteopenia induzida com fármaco.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Onodera et al.⁶⁶, em 2003, realizaram outro estudo, ainda analisando os efeitos da associação da menatetrenona com a fenitoína, assim como de seus derivados, nessa mesma metodologia em ratos, apenas diferindo o osso estudado, sendo este fêmur de ratos em crescimento. Após análise por detecção eletroquímica em cromatografia líquida de alta performance, constatou-se que os valores de densidade mineral óssea diminuíram significativamente em todas as porções ósseas fêmurais mensuradas (diáfise e metáfise) no grupo tratado com fenitoína. Entretanto, a perda óssea foi prevenida pela combinação da administração da fenitoína e menatetrenona, e níveis séricos de ósseos de menatetrenona. Concluíram que a fenitoína, a longo prazo, pode inibir a formação óssea concomitante à insuficiência de vitamina K.

Em 2004, Kulak et al.⁴⁵, realizaram um estudo clínico que tinha por objetivo avaliar a densidade mineral óssea (DMO) e os níveis de 25hidroxi vitamina D em pacientes com epilepsia e usuários crônicos de fármacos antiepilépticos, entre estes, a fenitoína em doses médias de 268,7 mg/dia. Avaliaram 58 pacientes emparelhados por idade, sexo e índice de massa corporal com tempo de tratamento entre dois e 38 anos, com 29 indivíduos aparentemente saudáveis. Ambos os grupos foram submetidos a anamnese e exame clínico, coleta de amostras de sangue para dosagens de cálcio, albumina, fósforo, creatinina, fosfatase alcalina, transaminases e gama T. Avaliaram também a DMO na coluna lombar, fêmur e antebraço. Analisaram também a dosagem de 25OHD e paratormônio (PTH). Os resultados mostraram que a DMO da coluna lombar e do fêmur foi menor nos pacientes tratados com antiepilépticos, do que no grupo controle. Os pacientes tratados apresentaram, também,

os níveis de fosfatase alcalina mais elevados e níveis de 25OHD mais baixos, porém não houve correlação entre a DMO e os níveis de 25OHD. Já o uso da fenitoína esteve correlacionado com a maior incidência de fraturas.

2.3 Densidade óptica

Dentre os primeiros estudos sobre densidade óssea utilizando análise de tons de cinza de estruturas anatômicas, destaca-se o trabalho realizado por Duinkerke et al.¹⁹, em 1977. Os autores compararam os resultados obtidos da análise densitométrica com análise visual em mandíbulas maceradas humanas, na qual produziram lesões periapicais artificiais. Para isso, foi removido o osso da região do periápice das raízes mesial e distal do primeiro molar inferior em seis etapas. Em cada etapa, realizava-se uma radiografia periapical, totalizando de sete radiografias, incluindo-se a inicial. Um penetrômetro de alumínio foi fixado a um dispositivo semelhante a um bloco de mordida, que se encontrava perpendicularmente a parte extra-oral do posicionador tipo Rinn, sendo que, este apresentava degraus que variavam de 1,0 a 9,0mm. O penetrômetro serviu como padrão de referência para a análise densitométrica, pois os valores foram expressos em milímetros-equivalentes-alumínio. Os avaliadores foram dez cirurgiões-dentistas, para tanto, os resultados demonstraram que a análise densitométrica foi mais coerente, sendo então, mais útil no diagnóstico de lesões periapicais durante as fases iniciais, já que a análise visual deixava dúvidas em função da variabilidade na interpretação.

A possibilidade de influência dos tecidos moles na análise da densidade óssea, foi o objetivo do trabalho de Souza et al.⁸⁵, para isso, utilizaram água, cera utilidade e músculo bovino como simuladores

dos tecidos moles, nas quais foram comparados entre si e colocados na região retromolar de 15 mandíbulas maceradas, posteriormente radiografadas e as imagens digitalizadas. Após a análise óptica da densidade óssea, pelo sistema DentScan-DentView dos simuladores individualmente, e mesmo quando comparados entre si, verificaram que os valores das densidades ópticas obtidos variaram mais em função da variação do tempo de exposição utilizado para a realização das incidências, do que pelo simples fato da densidade do simulador. Encontraram também valores semelhantes da cera utilidade com o músculo bovino e verificaram não existir diferenças estatisticamente significativas entre os valores ópticos da densidade óssea com relação aos lados direito e esquerdo das mandíbulas estudadas.

Já o estudo de Bodner et al.⁹, avaliaram radiograficamente as mudanças que ocorrem durante o processo de reparação óssea após extração dos primeiros molares esquerdos de ratos. Após a remoção das mandíbulas, estas foram expostas à radiação com um dispositivo de alumínio, o penetrômetro, que possuía degraus de 0,5 a 3,0mm. Após a mensuração das incidências em um densitômetro digital, comparou-se à densidade equivalente de alumínio, concluindo que as imagens indicaram mineralização óssea de acordo com os estudos histológicos realizados e que o método radiográfico com a utilização do penetrômetro evidenciou-se como método seguro e reprodutível para avaliar a formação e mineralização do tecido ósseo.

A utilização do penetrômetro também foi verificada no estudo de Scarparo et al.⁸², que buscaram desenvolver uma metodologia para avaliar a densidade óptica da mandíbula, por meio de radiografias periapicais. A escala de alumínio (penetrômetro) possuía sete degraus, variando entre 4 a 10mm de espessura, e serviu como parâmetro comparativo com o tecido ósseo na determinação dos valores densitométricos que teriam sua expressão em milímetros equivalentes de alumínio (mm-eq-Al). As radiografias obtidas foram colocadas sobre o

negatoscópio, e as imagens captadas por uma câmera de vídeo acopladas ao computador, posteriormente, analisadas quanto à densidade óptica, utilizando-se um programa desenvolvido especificamente para esta pesquisa, denominado DENS. Os resultados obtidos demonstraram que com a utilização do referido programa, realizou-se as medidas ópticas de densidade óssea e que a fonte luminosa do negatoscópio influenciou como um fator importante na possível variabilidade nos resultados das leituras.

Metodologia semelhante ao trabalho acima, foi realizado por Puppín et al.⁷⁵, em 1998, na leitura óptica da densidade óssea da região de molares inferiores de ambos os lados, de 9 mandíbulas secas. Realizaram a técnica padronizada com filmes periapicais em que foi adaptado um penetrômetro de alumínio com 8 degraus de variação, para referência de comparação dos valores obtidos a partir das leituras ópticas das densidades do tecido ósseo e da escala de alumínio, de modo que os resultados fossem expressos em milímetros-equivalente-alumínio. Posteriormente, as imagens foram captadas por uma câmera de vídeo com um negatoscópio de luz fluorescente estável (Visual Plus-VP 6050 V) e analisadas conforme o programa DENS. Os autores comprovaram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os valores das leituras ópticas da densidade óssea.

Em 1999, Tavano et al.⁹³ avaliaram a densidade radiográfica, ou seja, os tons de cinza da imagem radiográfica em defeitos nas tíbias de coelhos em que se colocou implantes de polímero derivado da mamona. As imagens radiográficas digitais das peças foram obtidas pelo sistema Digora (*Soredex*®), que emprega placa de fósforo, na qual é sensibilizada por um aparelho de raios X convencional e posteriormente a imagem é processada por meio da leitura realizada por um *scanner* a laser do próprio sistema. A densidade óptica das áreas selecionadas nos diferentes períodos de tempo (15, 30, 90 e 120 dias) foi comparada com a radiopacidade subjetiva obtida de radiografias convencionais. Os autores

concluíram que a imagem digital oferece boas condições de visualização para a realização da interpretação radiográfica e que a análise da densidade óptica proporciona a evolução e o retardo do processo de reparo, da mesma forma que ocorre na avaliação pelo método radiográfico convencional. Com isso, proporciona ao profissional a obtenção de valores numéricos para analisar quantitativamente a evolução do reparo ósseo.

Em 2000, Pavan e Tavano⁷⁰, analisaram a densidade radiográfica como substituto da densidade ótica no controle de processamento radiográfico de filmes periapicais. Estes foram divididos em cinco faixas, sendo que uma não foi exposta, servindo para avaliação da densidade base e velamento e outras quatro faixas foram expostas com 1, 10, 60, 300 impulsos, nas quais foram processados manualmente. Na avaliação da densidade ótica utilizou-se o fotodensitômetro e para a avaliação das densidades radiográficas escanearam-se as radiografias e utilizaram o Digora que forneceu dados para ser comparados com o método tradicional. Os resultados mostraram que a densidade radiográfica apresentou uma variação correspondente aos níveis de cinza e variou conforme o número de impulsos nas faixas. Conclui-se que as imagens das radiografias digitalizadas nas diferentes combinações de temperatura/tempo forneceu grande precisão de resultados e rapidez no controle de qualidade e podendo substitui o fotodensitômetro na avaliação das imagens de filmes radiográficos processados manualmente.

Em 2001, Barros et al.⁵ avaliaram a densidade óptica da região retromolar mandibular de cadáveres que também possuíam tecidos moles intactos no local de interesse do estudo, por meio de imagens digitalizadas. Após a realização das radiografias e a avaliação das mesmas por dois sistemas digitais distintos (Digora e DentScan Dent View), obtiveram resultados que mostraram que na avaliação densitométrica dos sistemas com os mesmo tempos de exposição, não houve diferenças estatisticamente significantes, porém, ao diminuir o

tempo de exposição para 0,9 s, o DentScan DentView forneceu um valor médio das densidades menor quando comparado ao tempo anterior. Apesar disso, concluíram que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os valores de densidade óptica da região retromolar entre lados direito e esquerdo das mandíbulas, apesar da diferença proveniente da variação do tempo de exposição das radiografias.

Em 2001, Puppín et al.⁷⁶ realizaram uma pesquisa que teve como objetivo avaliar a influência de valores de cinza na densidade óssea da região periimplantar em imagens digitalizadas pelo sistema digital Digora. Para isso, utilizaram as imagens de hemimandíbulas humanas maceradas que foram submetidas a três situações diferentes. Analisaram hemimandíbulas sem implantes; com implantes; com implantes e interposto a um simulador de tecido mole. Procuraram detectar alterações nos valores médios de densidade óssea sob a influência do implante metálico, de tamanhos diferentes de áreas de análise (2 x 50 e 6 x 50), da distância existente entre a área de análise e o implante, e ainda, a influência do simulador de tecido. Demonstraram que o implante metálico aumentou os valores médios da leitura dos níveis de cinza da região periimplantar, além disso, as áreas de análise de 2x50 apresentaram valores médios de densidade maiores que a de 6x50, assim como áreas mais próximas ao implante também apresentaram valores médios de densidade mais elevados que as áreas de análise mais afastadas, por último, verificaram que o simulador de tecido mole aumentou os valores médios da leitura da densidade óssea.

Pereira et al.⁷², em 2004 compararam valores médios de densidade óssea relativa de diferentes regiões mandibulares por meio de níveis de cinza em pixels, em radiografias convencionais digitalizadas. Utilizaram 6 mandíbulas humanas secas que foram submetidas às tomadas radiográficas padronizadas e com a presença de um simulador de tecidos moles. As medições das densidades foram realizadas no programa Image Tool, utilizando o recurso histograma. De acordo com a

análise estatística realizada, constataram que não houve diferenças estatísticas significativas entre os valores médios de pixels nas diferentes regiões analisadas.

Martins et al.⁵³, em 2005, realizaram um estudo que teve como proposta avaliar a influência do cetoprofeno no processo de reparação óssea em tíbias de ratos mediante análise da densidade óptica. Vinte ratos foram divididos em dois grupos (controle e o tratado). O sistema de radiografia digital utilizado foi o Visualix GX-S-HDI. As imagens foram adquiridas no períodos inicial, sete, 14, 21 e 30 dias pós-operatório e analisadas posteriormente no sistema Vix win 1.4. Os valores médios foram submetidos ao teste ANOVA e teste Tukey com significância de 5%. No grupo controle, houve diferença estatisticamente significativa entre o tempo e a densidade óptica, enquanto no grupo tratado não houve diferenças estatisticamente significantes entre as medias de densidade óptica. O trabalho sugestiona a influência do cetoprofeno no processo de reparação óssea , já que na primeira semana o medicamento proporcionou um aumento da densidade óptica e provocou atraso na neoformação óssea após o vigésimo primeiro dia.

Moraes et al.⁵⁸, estudaram em 2005, a influência do estresse na reparação óssea em tíbias de ratos por meio da avaliação da densidade óptica em radiografias digitais diretas. Para isso utilizaram vinte ratos divididos em dois grupos (controle e submetidos ao estresse agudo), em que foi realizado um defeito ósseo com broca esférica carbide e radiografados pelo sistema digital direto Visualix Gx-S HDI nos tempos 7, 14 e 21 dias pós-operatórios. Realizaram-se a avaliação da densidade óptica mediante a ferramenta histograma do próprio sistema digital referido. Os resultados foram submetidos a análise de variância e teste Tukey ao nível de 5% de significância. Com isso, os autores concluíram que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos , apesar disso observaram que as médias de densidade óptica do grupo de

ratos estressados foi sempre menor que a do grupo controle denotando a influência do estresse no processo de reparação óssea.

Em 2006, Werkman et al.¹⁰⁵, tiveram como objetivo avaliar o efeito de um medicamento alopático, no caso o risedronato e um homeopático (*calcareo phosphorica*), no reparo de lesões ósseas em ratos submetidos à castração. Utilizaram para isso, 84 ratos que foram separados em quatro grupos iguais, sendo que três deles foram submetidos à castração e o outro a falsa cirurgia. Após um mês da cirurgia, realizaram lesões corticais na tíbia de todos os animais no dia seguinte começaram os tratamentos experimentais. Os animais foram sacrificados, aos 7, 14 e 28 dias após o início do tratamento e removidas as tíbias. Realizou-se radiografias digitais e avaliadas a densidade óptica da região do defeito mediante o programa Image Tool, ainda fez-se análise histológica e histomorfométrica. Mediante os resultados concluíram que os tratamentos alopático e homeopático levaram a formação óssea de aspecto diferente considerando a remodelação e maturação.

Silva et al.⁸⁴ em 2007, avaliaram o efeito do alcoolismo crônico sobre a densidade óssea radiográfica em 20 ratos, mediante a utilização do sistema digital Digora. Os animais foram divididos em grupo experimental e controle. Sendo que os do grupo experimental receberam aguardente na concentração de 30% por 10 dias, 60% por mais 10 dias e pura por 40 dias. Após 60 dias todos os animais foram sacrificados, removidos os fêmures direitos e avaliados nos terços médio e condilar pela densidade óptica radiográfica. Os valores obtidos foram submetidos ao teste t de Student, verificando diferença estatisticamente significativa. Estes resultados indicaram valores de densidade óssea radiográfica reduzida no terço médio e cômilar nesses animais.

2.4 Sistemas digitais

A análise radiográfica é de suma importância na área da saúde, incluindo na Odontologia, para realização de um diagnóstico correto, elaboração de um planejamento e posterior estabelecimento do tratamento adequado para cada caso^{15, 29 e 103}. Com o avanço tecnológico, ocorreu a possibilidade de aquisição de imagens radiográficas transcritas para linguagem binária dos computadores e exibidas no monitor. Essa transferência de informações analógicas para o sistema digital pode ocorrer de forma direta ou indireta. Os métodos indiretos exigem a aquisição das radiografias convencionais que serão digitalizadas por câmeras de vídeo ou escaners⁸¹. A partir da década de 70, surgiu a radiografia digital direta, na qual foi introduzido o conceito de CCD ("charge-coupled-device" ou dispositivo de carga acoplada) que tinha a capacidade de converter duplamente a energia primeiramente luminosa e posteriormente em elétrica. Desta forma o CCD foi utilizado como um detector sólido com propósitos científicos, como em telescópios e satélites¹⁵.

Em 1989, Mouyen et al.⁶¹ introduziram o primeiro sistema de imagem computadorizada direta que foi denominado de radiovisiografia (RVG). Consistia de um aparelho de raios X convencional conectado a um microprocessador de tempo de alta resolução, com um mínimo de tempo de exposição e um sensor intra-bucal, que armazena a entrada de sinais durante a exposição de raios X, mais sensível que os filmes radiográficos convencionais. Além disso, nesse trabalho, houve também o estudo comparativo das propriedades físicas de uma radiográfica convencional com filmes periapicais de sensibilidade D com o processamento do sistema digital direto em questão. Concluíram a capacidade de formação da imagem imediatamente após a exposição com uma menor dose de radiação no sistema digital que a necessária para sensibilizar o filme radiográfico.

O sistema de radiografia digital direta possui como componentes básicos um aparelho de raios X convencional, um sensor intra-oral de plástico podendo ser rígido ou não, com dimensões normalmente aproximadas a de um filme radiográfico periapical convencional. É neste sensor que o feixe de raios X incide e tem-se a transformação da energia ionizante em energia elétrica que será transmitida até o conversor análogo-digital, responsável pela transformação dos sinais elétricos em sinais digitais. Posteriormente, estes sinais serão estabilizados e potencializados e direcionados a um programa específico para a tela do computador¹¹. É no estágio da conversão digital que as informações contidas nos sinais serão decompostas em pixels, menor unidade formadora da imagem. Cada pixel da imagem representa um valor de cinza, que corresponde a um nível de escurecimento ou claridade da área. Os tons de cinza do sistema digital direto alcançam 256 tons de cinza, numa escala que se inicia do 0 (preto) ao 255 (branco). Mediante o tamanho do pixel tem-se a resolução dos contornos da imagem, ou seja, quanto menor o tamanho deste, maior será a nitidez da imagem^{29 e 39}.

A partir deste fato, tem-se a imensa capacidade deste sistema em mostrar pequenas diferenças de densidade óptica da imagem, já que oferece maior quantidade de nuances de cinza, mesmo que todavia imperceptíveis ao olho humano. Quanto maior esta quantidade de tons de cinza, mais sensível será a mensuração da densidade óptica e alterações mais sutis poderão ser demonstradas^{13 e 27}. Isto facilita a interpretação radiográfica, sendo que Khademi²⁷, em 1996, enfatizou a importância desta interpretação e descreveu-a basicamente um processo de discriminar contrastes, sendo que a captura de uma radiografia com uma resolução espacial suficiente para diagnóstico não representa um empecilho, porém evidenciou-se a dificuldade em capturar todos os níveis de cinza de uma imagem.

Muitos autores ressaltam que a radiografia digital direta é promissora e apresenta inúmeras vantagens e benefícios para a prática clínica, além da utilização para cunho científico. Dentre as principais vantagens descritas pelos autores, destacam-se a redução da dose de radiação que chega a ser de 60 a 90% menor, tendo como consequência, também, a diminuição do tempo de exposição; a aquisição de radiografias praticamente instantâneas, dispensando o processamento químico, reduzindo o tempo operatório; a possibilidade de tratamento da imagem como o contraste, a inversão, o relevo, a rotação, entre outros; possibilidade de armazenamento das imagens em disco rígido, como também a impressão destas; a utilização do recurso de “zoom”, com a verificação de detalhes em maior aumento; a possibilidade de mensuração de medidas de forma rápida e eficiente; a verificação da densidade da imagem que será representativa de alterações que pretende-se verificar nas imagens. Por outro lado, deve-se citar algumas limitações destes sistemas, que incluem o custo relativamente alto; falta de padronização e incompatibilidade entre algumas tecnologias, dificultando a comunicação entre os computadores; o fato do sensor intra-bucal apresentar uma rigidez que pode causar algum desconforto ao paciente, além de uma espessura maior. Porém, estas limitações tendem a reduzir-se ou ainda serem amenizadas com o transcorrer do tempo, já que a tecnologia está em constante progressão visando a melhoria desta tecnologia^{13, 15, 27, 33 e 103}.

Benz e Mouyen⁶, em 1991, compararam duas versões de RVG (o mais recente e seu antecessor) e também com o filme periapical mais sensível no comércio, segundo as propriedades físicas verificando a evolução do sistema, evidenciando a melhoria de suas qualidades e vantagens.

Hintze et al.³¹, em 1994, procuraram comparar a acurácia de dois filmes radiográficos convencionais (D e E-speed) e dois sistemas de radiografias digitais diretos (Visualix e RVG) na detecção de lesões

cariosas no esmalte e na dentina na região interproximal e ainda comparar os dois filmes referidos com o sistema digital direto Visualix na detecção de lesões cariosas que atingem dentina na face oclusal. Três observadores examinaram 122 superfícies proximais *in vitro* e 2 observadores examinaram 65 superfícies oclusais. O diagnóstico de lesão cariosa foi sustentado pelo exame histológico. A acurácia para diagnóstico para cada método radiográfico foi expresso mediante a área de uma curva característica operante. Verificaram que não ocorreram diferenças estatisticamente significantes entre as médias destas áreas para os métodos em questão tanto na superfície proximal quanto na oclusal. Com isso, chegaram a conclusão que a radiografia não obteve um bom desempenho da detecção de lesão cariosa proximal, diferente na detecção em superfícies oclusais em que o desempenho foi melhor.

Farman et al.²², em 1995, também descreveram sobre sistemas digitais diretos, os tipos existentes no mercado, tais como o RVG e também as formas deste (RVG-S, RVG-Si, RVG-PC, RVG-PCi), o VIXA, o Sens-A-Ray, entre outros. Os autores também descrevem sobre a forma de funcionamento destes sistemas digitais, a característica e qualidade das imagens produzidas verificando a utilidade no que diz respeito à utilização para o diagnóstico.

Versteeg et al.⁹⁹ em 1997, descreveram sobre a eficácia da radiografia digital na clínica odontológica, enfatiza a comparação com o filme radiográfico, ressaltando a qualidade da imagem e do diagnóstico, a forma de aquisição, as aplicações de programas. Relata também que imagens digitalizadas necessitam de um processamento adequado, e a utilização de escaners sofisticados para que as imagens sejam consideradas apropriadas para o diagnóstico. Relata as vantagens do sistema digital direto e concluem o grande potencial deste sistema principalmente no que se refere à qualidade diagnóstica.

Bóscolo et al.¹⁰, em 2001, procuraram avaliar a qualidade da imagem proveniente de dois sistemas digitais CCD (Sens-A-Ray e o

CDR), um sistema de armazenamento de fósforo (Digora), além de comparar com filme digitalizado e com um filme de alta sensibilidade (E-speed). Foram cinco, os objetos de análise que foram radiografadas com 50, 60 e 70 kVp e tempos de exposição de 0,08; 0,13; 0,2; 0,4 e 0,8 s. Seis avaliadores calibrados analisaram um total de 375 imagens em que classificaram em uma escala de 0 a 4, quanto a condições de diagnóstico. Os resultados do estudo mostraram que ocorreu diferenças entre os sistemas de estudo, sendo que o sistema de armazenamento de fósforo obteve o melhor desempenho. Concluíram que os sistemas avaliados possuíam condições de oferecer imagens em condição ideal para diagnóstico, excetuando-se o Sens-A-Ray.

Em 2001, Clasen e Aun¹⁶ realizaram um estudo em que compararam a eficácia do sistema de radiografia digital direta RVG com a radiografia convencional com o filme F Insight, no que se refere ao diagnóstico de reabsorções radiculares externas. Para isso utilizaram 24 incisivos centrais superiores em que simulou-se reabsorções radiculares externas com 0,5, 0,8 e 1,0 mm de diâmetro no terço médio da superfície radicular, nas faces mesial, vestibular ou distal. Posteriormente, reposicionaram os dentes nos alvéolos de um crânio macerado e obtiveram as radiografias pelos dois métodos citados acima. Quatro examinadores avaliaram as imagens obtidas. Os resultados do trabalho mostraram que houve diferenças estatisticamente significantes entre os dois métodos avaliados sendo que o sistema digital proporcionou maior número de acertos por parte dos avaliadores do que a radiográfica convencional, independente da utilização das ferramentas que o sistema digital propicia.

Berkhout et al.⁷, em 2004, estudaram cinco tipos de sistemas de radiografias intra-orais, sendo dois sistemas digitais diretos, dois sistemas de armazenamento de fósforo e um filme periapical convencional, quanto à qualidade diagnóstica aceitável, tendo como variável o tempo de exposição e com isso relacionando a dose de

exposição ao paciente. Para isso utilizaram diferentes regiões em mandíbula macerada (incisivos, caninos, premolares e molares) para análise das imagens das referidas regiões em que o tempo de exposição era aumentado gradativamente. Sete observadores avaliaram 25 séries de radiografias em que tinham que classificar quanto ao grau de radiografia aceitável para diagnóstico e apontar o de sua preferência. Como resultado, obtiveram que para o filme convencional, o tempo de exposição mais adequado foi de 0,52, sendo que a média de tempo de exposição para a obtenção de radiografias aceitáveis para diagnóstico de 0,23 a 1,02s. Verificaram também que os dois sistemas digitais diretos requereram o menor tempo de exposição à radiação que o filme. Por outro lado, os sistemas de armazenamento de fósforo necessitaram de um tempo de exposição maior. Os autores concluíram os sistemas digitais necessitam de um menor tempo de exposição que o filme.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo foi realizar a análise comparativa entre o grau de osteopenia induzida pelo medicamento antiepiléptico fenitoína e pela castração, tanto em ratos machos como em ratos fêmeas, por meio da avaliação da densidade óptica radiográfica em dois períodos, 30 e 60 dias.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP, sob o protocolo nº 032/2005-PA/CEP (Anexo A).

4.1 Animais e grupos experimentais

Para realização deste trabalho foram utilizados 37 ratos adultos jovens, sendo 18 machos e 19 fêmeas (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar) com três meses de vida e peso aproximado de 350g, os quais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP e mantidos em gaiolas em temperatura ambiente, alimentados com ração e água *ad libitum*. Estes animais foram divididos em seis grupos:

- a) grupo I : cinco ratos fêmeas normais-SHAM;
- b) grupo II: cinco ratos machos normais-SHAM;
- c) grupo III: seis ratos fêmeas submetidas à cirurgia de castração;

- d) grupo IV: seis ratos machos submetidos à cirurgia de castração;
- e) grupo V: oito ratos fêmeas tratadas com fenitoína na dose de 5mg/ kg/dia, por via oral mediante gavagem;
- f) grupo VI: sete ratos machos tratados com fenitoína na dose de 5mg/kg/dia, por via oral mediante gavagem.

4.2 Medicamentos

- a) Fenitoína – Epelin® (Pfizer);
- b) Cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5-6-dihidro-4H-1,3 tiazina-sedativo e relaxante muscular- Anasedan (Vetbrands);
- c) Ketamina base – Dopalen (Vetbrands).

4.3 Anestesia

Os ratos foram submetidos à anestesia, por via intramuscular, da associação de 1,0 mL de cloridrato de tiazina (Anasedan) para 0,5 mL de ketamina (Dopalen), na dosagem de 0,1mL para cada 100g de peso corpóreo.

4.4 Castração dos ratos machos e fêmeas

Os ratos fêmeas foram fixados em posição lateral em uma placa de cortiça, permitindo a visualização e o fácil acesso ao flanco lateral. O campo operatório sofreu tricotomia e antissepsia com álcool iodado e, logo abaixo da costela, fez-se uma incisão de 1cm na pele (Figura 1A) e seqüencialmente na camada muscular, possibilitando a visualização do ovário. Com o auxílio de uma pinça clínica, o ovário foi tracionado para fora da cavidade abdominal e, após amarra da vasculatura local, realizou-se a excisão (Figura 1B e 1C). Em seguida, a camada muscular e a pele foram suturadas, sendo esse processo realizado bilateralmente (Figura 1D, 1E e 1F).

Por outro lado, os ratos machos foram fixados em decúbito dorsal sobre uma placa de cortiça, sendo o escroto desinfetadas com álcool iodado. Realizou-se uma incisão longitudinal ao longo da linha média, expondo-se um dos testículos (Figura 2B). Em seguida, fez-se a interrupção do fluxo sanguíneo por amarra pedículo vascular, para que este pudesse ser seccionado (Figura 2C). O mesmo procedimento foi repetido do lado oposto e a incisão, suturada com fio de sutura de algodão (Figura 2D, 2E e 2F).

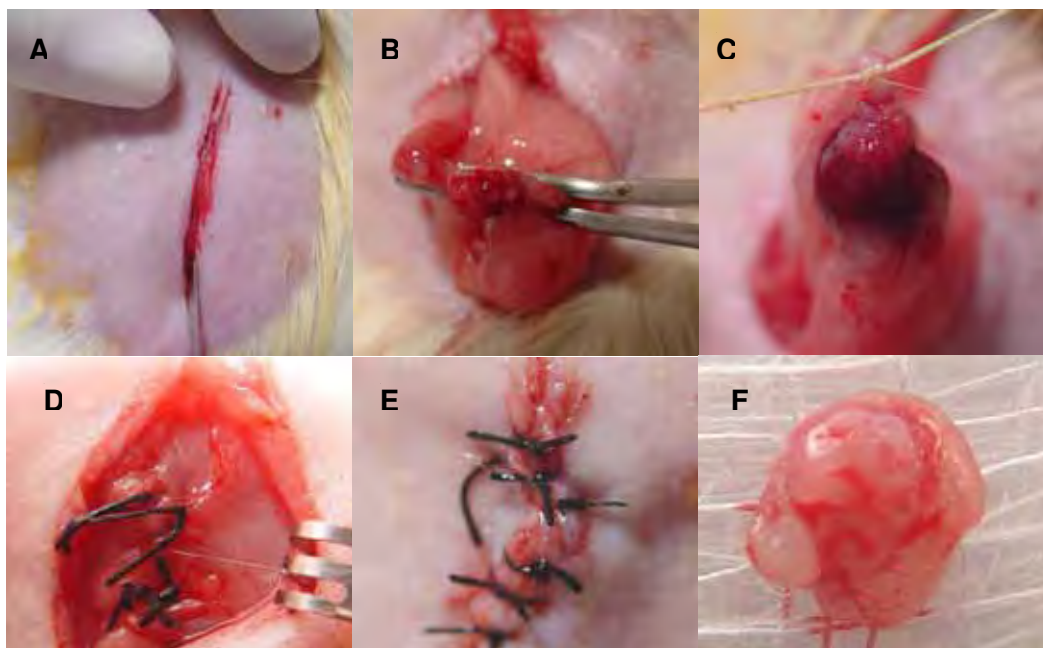


FIGURA 1 - Etapas seqüenciais do procedimento cirúrgico de ovariectomia.

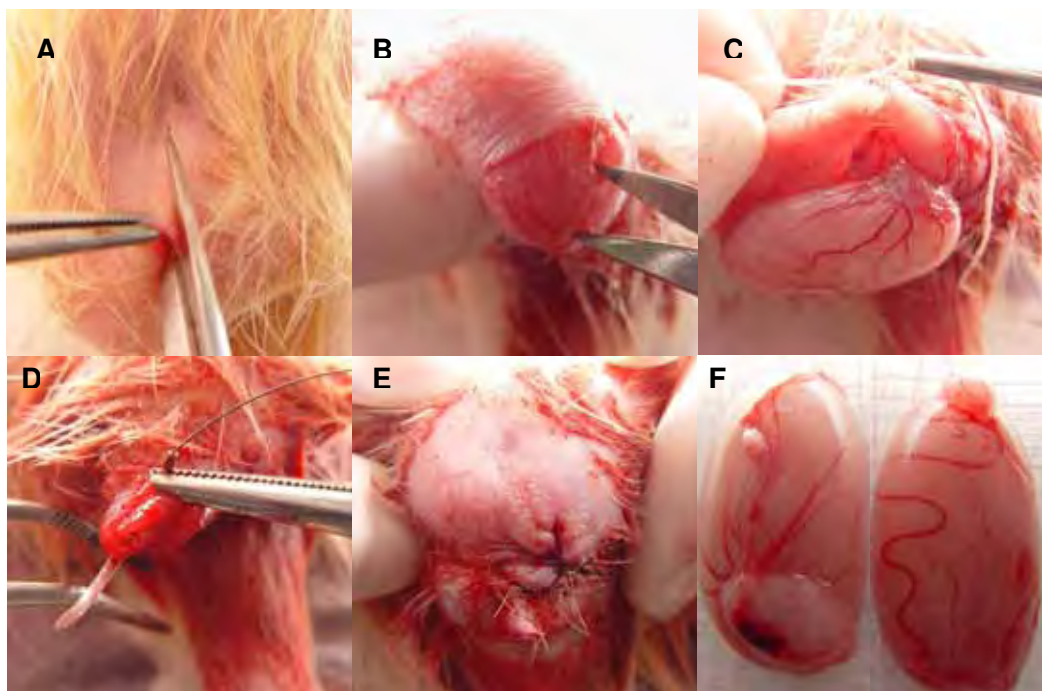


FIGURA 2 - Etapas seqüenciais do procedimento cirúrgico de orquidectomia.

4.5 Medição da massa corpórea dos animais experimentais

Semanalmente todos os animais do grupo V e VI foram pesados em balança analítica de forma que a medicação estivesse na dosagem correta acompanhando a evolução da massa corpórea dos mesmos. Os animais dos demais grupos foram pesados antes da cirurgia, trinta e sessenta dias após este procedimento, ou seja, nos mesmos dias correspondentes ao dia dos exames radiográficos.

4.6 Análise da densidade óptica radiográfica

Para o trabalho, foi utilizado o sistema *Radiovisiography*, RVG, (*Trophy, vicennes, França*) (Figura 3) com o auxílio do *software Trophy Windows versão 5.00*. Esse sistema utiliza um sensor intrabucal CCD (*Charge Coupled Device*) de dimensões, 22,2mm de largura por 33mm de comprimento e área ativa de 17mm de largura por 26mm de comprimento, acoplado a um computador *Pentium III* 128 Mb memória RAM (*Random Acces Memory*), disco rígido de 40 Gb.

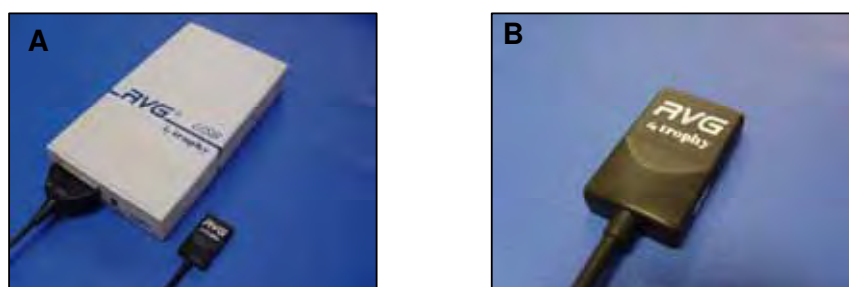


FIGURA 3 – Sistema de aquisição de imagem radiográfica digital direta RadioVisiography, com seus constituintes; a) Dispositivo intermediário e sensor CCD; b) vista ampliada do sensor CCD.

O aparelho de raios X utilizado para aquisição das radiografias, foi o 765 DC (*Gendex Dental Systems, Dentsply International, IL, USA*), operando com 65kVp, corrente de 7mA, área focal efetiva de 6cm, distância foco-sensor de 40 cm, e 0,032 s de tempo de exposição, com o feixe central de raios X incidindo perpendicularmente ao sensor. Esse aparelho pertence à disciplina de Radiologia da FOSJC – UNESP.

Para proceder as incidências radiográficas, todos os animais foram devidamente anestesiados e apoiados sobre uma tábua de madeira que possuía um espaço específico para a colocação do sensor do sistema digital. Os ratos foram acomodados em decúbito ventral, de forma que a tíbias do lado esquerdo deste, ocupasse toda a extensão do sensor, mantendo assim, um mesmo padrão de posicionamento para a aquisição da imagem radiográfica digital, (Figura 4). As imagens foram capturadas e armazenadas no formato TIFF (*Tagged Image File Format*) para que não ocorresse perda de qualidade que poderia prejudicar a análise das imagens.

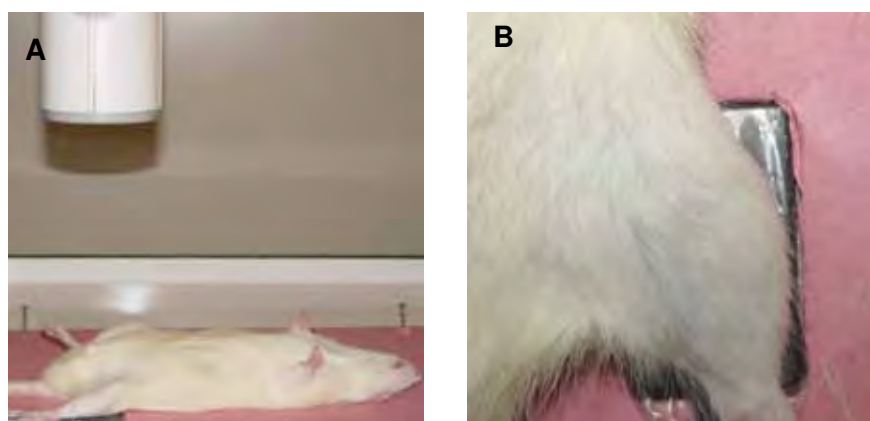


FIGURA 4 – Procedimentos radiográficos: a) Posicionamento do animal para a incidência radiográfica; b) Vista ampliada da coxa esquerda sobre o sensor CCD.

Para análise da densidade óptica radiográfica, utilizou-se o programa de edição de imagens *Adobe Photoshop 7.0* (Figura 5) (Adobe systems incorporated, 345 Park Avenue, San Jose, California 95110, USA). A partir das imagens arquivadas referentes às tíbias dos animais, foi selecionada uma área pré-determinada e padronizada de tamanho fixo de 20 x 20 pixels, a qual foi posicionada em campo da região medular correspondente à metáfise e à diáfise da peça em questão, sem abranger as áreas corticais laterais. Dessa forma, utilizou-se a ferramenta histograma, a qual forneceu a média da densidade óptica em pixels, da região selecionada (Figura 5). Os valores de cinza da imagem baseiam-se numa escala de 256 possíveis tonalidades de cinza, variando do preto absoluto com valor zero, ao branco absoluto valendo 255.

A avaliação pela mensuração de cada região foi repetida por três vezes, com intervalos de uma semana para cada uma delas, pelo mesmo examinador, previamente treinado, autor principal deste trabalho. Os dados foram sendo armazenados no programa Excel para posterior análise estatística.



FIGURA 5 – Imagem da tíbia no programa Adobe Photoshop, mostrando a área da diáfise selecionada para mensuração e o gráfico em histograma fornecendo a média da densidade óptica radiográfica da região analisada.

4.7 Análise estatística

Os dados obtidos por meio da análise da densidade óptica foram submetidos à análise estatística descritiva seguida da Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Comparação Múltipla de Tukey, com nível de significância de 5% mediante a utilização do programa Excel 2003 para *Windows*.

5 RESULTADOS

Neste capítulo foram analisados os dados das leituras das densidades ópticas de todos os grupos quanto ao sexo (macho e fêmea), variações de tratamento (SHAM, castração e medicação), períodos de observação experimental (zero, 30 e 60 dias) e a áreas ósseas da tíbia delimitadas para análise (metáfise (m) e diáfise (d)).

Os dados foram organizados e demonstrados no Apêndice A.

Os dados referentes à estatística foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com intervalo de confiança de 95%, uma vez que o objetivo deste teste consistiu em diferenças observadas entre as médias das amostras são estatisticamente significantes, sem, entretanto, especificar os grupos que diferem estatisticamente.

Os resultados da análise de variância foram representados na Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 – Valores da ANOVA para os dados de densidade óptica.

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	50920,3	35	1454,9	19,0	9,15E-45	1,49
Entre períodos de observação	14214,8	186	76,4			
Total	65135,1	221				

De acordo com a Tabela 1, evidenciou-se o valor de $p \leq 0,05$ e, por esta razão, determinou-se a presença de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos avaliados. Em seguida, aplicou-se o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) a fim de

identificar os grupos que diferiram estatisticamente. Os resultados foram representados nas Tabelas 2 a 5.

Tabela 2 – Médias e erros das médias dos valores das densidades ópticas dos grupos experimentais e períodos de observação de machos (diáfise de tibia); Teste de Tukey* ($p \leq 0,05$).

Grupos	SHAM (II)		Orquidectomizados (IV)		Fenitoína (VI)	
Dias	Média	Erro	Média	Erro	Média	Erro
0	186	2,7	189,7	2,3	200,2	0,8
	Aa		Aa		Aa	
30	179,6	4,9	186,3	7	184,2	5,1
	Aa		Aa		Aa	
60	179,8	2,1	184,7	3,4	136,2	9,2
	Aa		Aa		Bb	

*Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal) diferem entre si.

(Vieira¹⁰¹, em 2002)

Na Tabela 2 verificou-se que o grupo tratado com fenitoína na dose de 5mg/kg/dia (VI), por um período de 60 dias foi o único que diferiu estatisticamente em relação aos demais grupos.

Tabela 3 – Médias e erros das médias dos valores das densidades ópticas dos grupos experimentais e períodos de observação de machos (metáfise de tíbia); Teste de Tukey* ($p \leq 0,05$).

Grupos	SHAM (II)		Orquidectomizados (IV)		Fenitoína (VI)	
Dias	Média	Erro	Média	Erro	Média	Erro
0	191,8	2,3	196	3,5	199,1	3,1
	Aa		Aa		Aa	
30	190,9	3,1	181,2	5,8	187,2	1,8
	Aa		Aa		Aa	
60	186,9	1,9	179,6	3	182,6	2,8
	Aa		Aa		Aa	

*Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal) diferem entre si.

(Vieira¹⁰¹, em 2002)

Na Tabela 3, constatou-se a inexistência de diferenças estatísticas entre os grupos avaliados, quando comparados os valores de densidade óptica radiográfica nas metáfises das tíbias.

Tabela 4 – Médias e erros das médias dos valores das densidades ópticas dos grupos experimentais e períodos de observação de fêmeas (diáfise de tíbia); Teste de Tukey* ($p \leq 0,05$).

Grupos	SHAM (I)		Ovariectomizados (III)		Fenitoína (V)	
Dias	Média	Erro	Média	Erro	Média	Erro
0	174,3	2,2	173,4	2,8	181,9	1,4
	Aa		Aa		Aa	
30	179,5	3,6	177,6	4,3	180	1
	Aa		Aa		Aa	
60	174,5	3,1	175,9	2,5	125,3	3,3
	Aa		Aa		Bb	

*Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal) diferem entre si.

(Vieira¹⁰¹, em 2002)

A Tabela 4, acima demonstrada revelou que o grupo V, tratado com fenitoína na dose de 5mg/kg/dia obteve valores estatísticos significantes aos demais grupos avaliados.

Tabela 5 – Médias e erros das médias dos valores das densidades ópticas dos grupos experimentais e períodos de observação de fêmeas (metáfise de tíbia); Teste de Tukey* ($p \leq 0,05$).

Grupos	SHAM (I)		Ovariectomizados (III)		Fenitoína (V)	
Dias	Média	Erro	Média	Erro	Média	Erro
0	184,2	2,5	178,5	4,9	194,9	2,4
	Aa		Aa		Aa	
30	193	2,3	181,8	2,7	190,2	2,8
	Aa		Aa		Aa	
60	189,4	4,2	174,7	2,6	178,7	1,8
	Aa		Aa		Aa	

*Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas na vertical e minúsculas na horizontal) diferem entre si.

(Vieira¹⁰¹, em 2002)

De acordo com a Tabela 5, verificou-se que, entre os grupos avaliados, não houve diferenças estatisticamente significantes.

A seguir, foram representados os resultados acima em gráficos compreendidos nas Figuras 7 a 15.

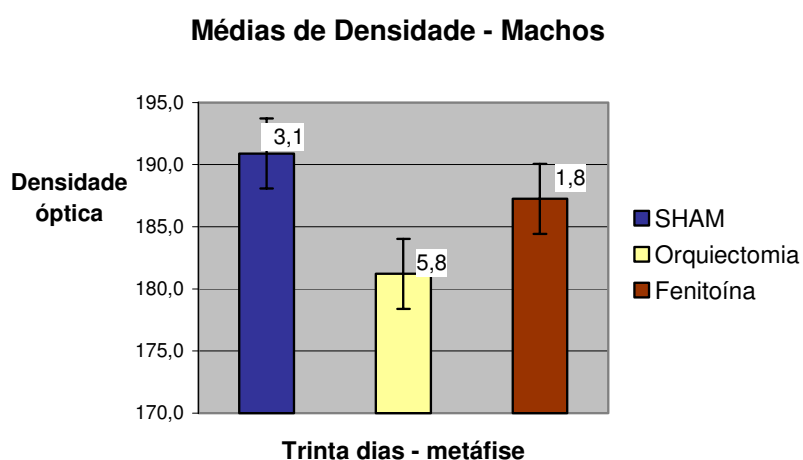


FIGURA 7 – Gráfico das médias dos valores de densidade óptica e erros das médias dos grupos experimentais no período de 30 dias (metáfise de tibia) em ratos machos.

No gráfico da Figura 7, foram representados as médias dos valores de densidade óptica em machos, no período de trinta dias e na região da metáfise. Observou-se maior média de densidade no grupo SHAM, seguido do grupo tratado com fenitoína na dose de 5mg/kg/dia e, o grupo submetido a orquitectomia, respectivamente. Estas diferenças, entretanto, não foram estatisticamente significantes.

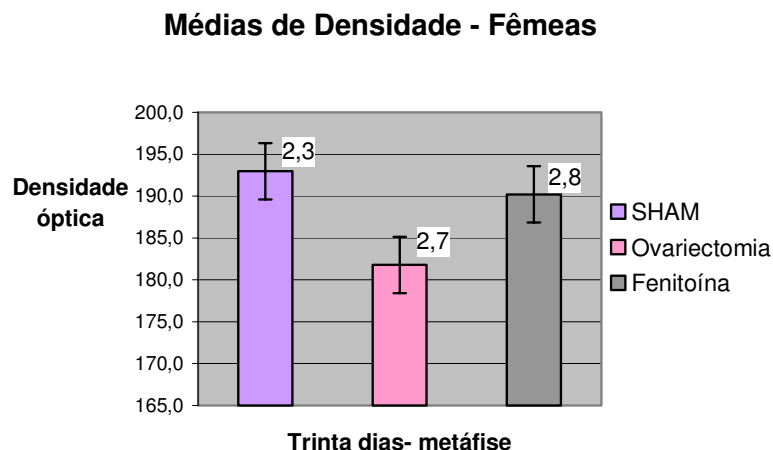


FIGURA 8 – Gráfico das médias dos valores de densidade óptica e erros das médias dos grupos experimentais no período de 30 dias (metáfise de tibia) em ratos fêmeas.

O gráfico acima (Figura 8) corresponde às médias de densidade óptica radiográfica nos três grupos experimentais, no período de 30 dias, na área de análise óssea correspondente à metáfise em ratos fêmeas. Observou-se o mesmo padrão visto no gráfico anterior, sendo o valor maior de densidade no grupo SHAM, seguido pelo grupo tratado com a fenitoína na dose de 5mg/kg/dia e por último, o grupo de ratas submetidos à ovariectomia. Contudo, estas diferenças não foram significativas.

Em uma comparação, em relação ao sexo, dos valores das médias de densidade óptica radiográfica no período de trinta dias de observação, na região da metáfise, nos seis grupos avaliados nesta pesquisa, evidenciou-se, progressão de valores similares entre machos e fêmeas, nos diferentes grupos, sendo que as fêmeas apresentaram um ligeiro aumento nas médias de densidade óptica em relação aos machos, em todos os grupos analisados. Tais diferenças, porém, não foram significantes, à análise estatística.

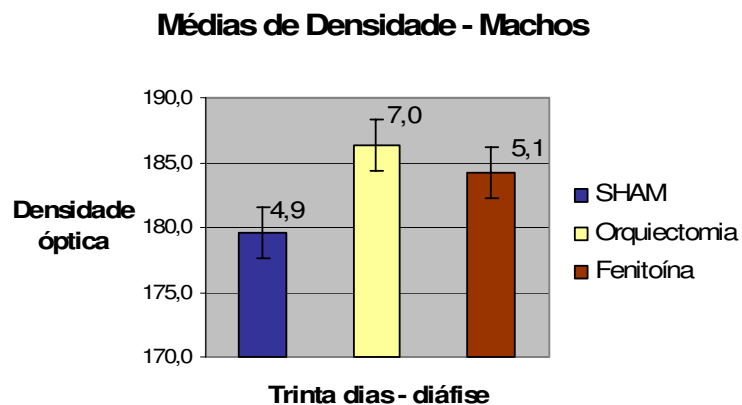


FIGURA 9 – Gráfico das médias dos valores de densidade óptica e erros das médias dos grupos experimentais no período de 30 dias (diáfise de tíbia) em ratos machos.

O gráfico representado na Figura 9 corresponde aos valores médios de densidade óptica radiográfica em machos, dos grupos SHAM, Orquitectomizados e Fenitoína, no período de trinta dias, na região de análise da diáfise. Evidencia-se que o grupo submetido à castração teve um valor meio de densidade maior nesse período, seguido pelo grupo tratado com o fármaco em questão e, posteriormente, pelo grupo SHAM.

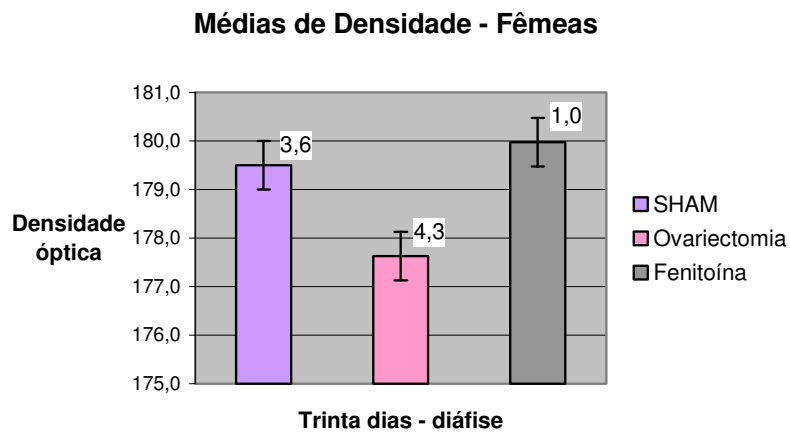


FIGURA 10 – Gráfico das médias dos valores de densidade óptica e erros das médias dos grupos experimentais no período de 30 dias (diáfise de tíbia) em ratos fêmeas.

Por sua vez, no gráfico correspondente às mesmas variáveis da Figura 9, porém ocorrendo em fêmeas, está representado pela Figura 10, na qual evidenciou-se que o grupo ovariectomizado apresentou valores médios de densidade óptica, seguido pelo grupo que recebeu a fenitoína na dose de 5mg/kg/dia e por último, o grupo SHAM. Embora evidenciadas pequenas diferenças de valores em relação ao sexo, pela análise estatística, esses valores não diferiram entre si.

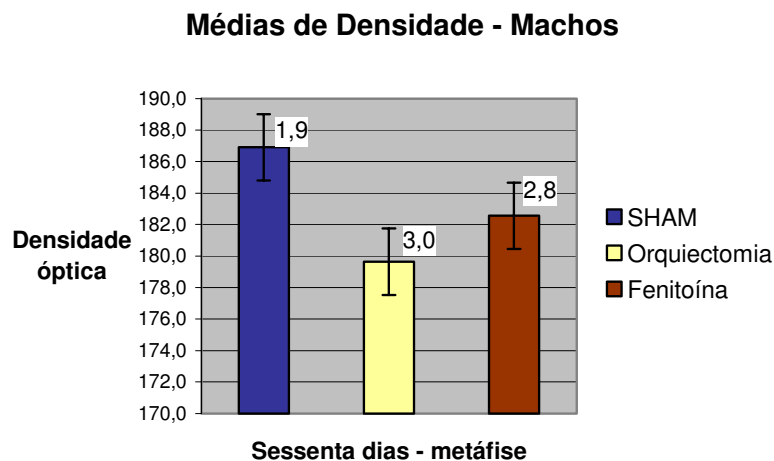


FIGURA 11 – Gráfico das médias dos valores de densidade óptica e erros das médias dos grupos experimentais no período de 60 dias (metáfise de tíbia) em ratos machos.

O gráfico da Figura 11 representa os valores médios de densidade óptica radiográfica em ratos machos no período de 60 dias, na região da metáfise, referente aos três grupos experimentais. Evidenciou-se maior valor no grupo SHAM, em segundo lugar, no grupo que recebeu a fenitoína na dose de 5mg/kg/dia, seguido do grupo de animais orquiectomizados. Tais diferenças não tiveram significância estatística.

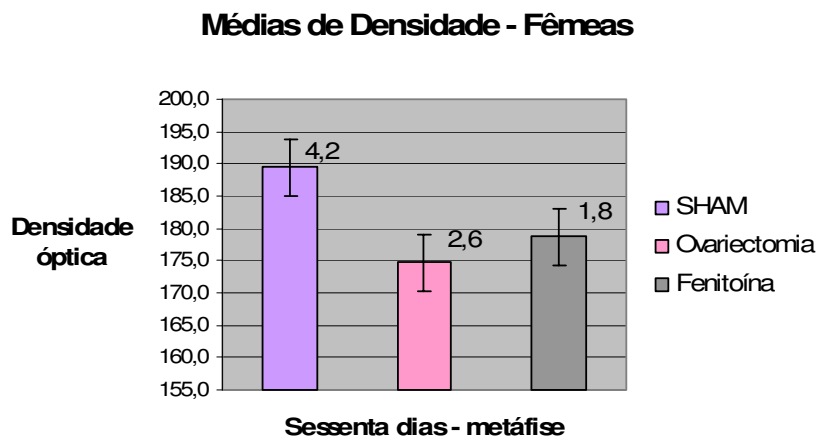


FIGURA 12 – Gráfico das médias dos valores de densidade óptica e erros das médias dos grupos experimentais no período de 60 dias (metáfise de tibia) em ratos fêmeas.

O gráfico da Figura 12 apresenta os valores médios de densidade óptica radiográfica em ratos fêmeas no período de 60 dias, na região da metáfise, referente aos três grupos experimentais. Observou-se maior valor no grupo SHAM, em segundo lugar, no grupo que recebeu a fenitoína na dose de 5mg/kg/dia, sendo o grupo de animais ovariectomizados, o que apresentou menores valores de densidade óptica radiográfica, seguindo padrão semelhante ao gráfico da Figura 11. No entanto, tais diferenças não tiveram significância estatística.

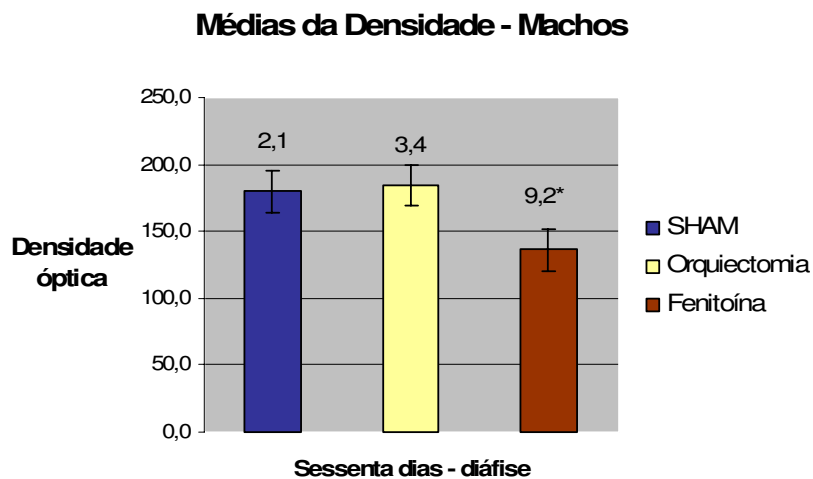


FIGURA 13 – Gráfico das médias dos valores de densidade óptica e erros das médias dos grupos experimentais no período de 60 dias (diáfise de tíbia) em ratos machos; (*): indica a diferença estatística significativa.

O gráfico da Figura 13 apresenta os valores médios de densidade óptica radiográfica dos grupos estudados, em ratos machos no período de 60 dias, na região da diáfise. Constatou-se que o grupo tratado com o fármaco fenitoína apresentou o menor valor de densidade óptica em relação aos outros dois grupos, sendo que esta diferença foi estatisticamente significativa. No gráfico, esta diferença indicada por um (*).

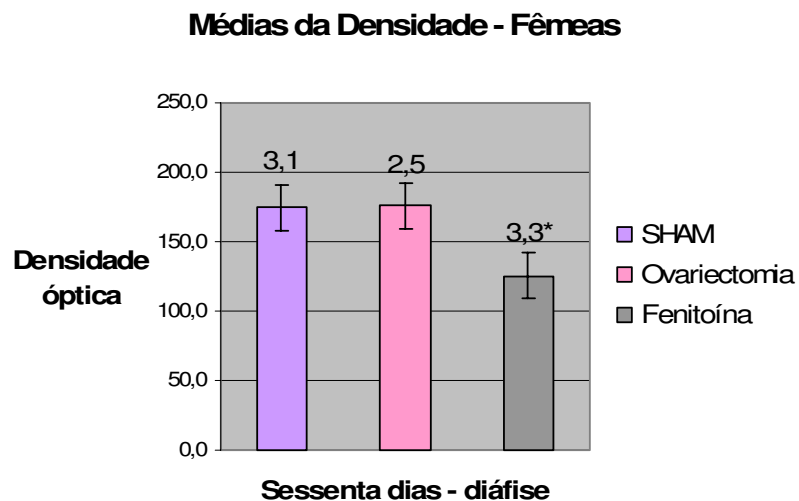


FIGURA 14 – Gráfico das médias dos valores de densidade óptica e erros das médias dos grupos experimentais no período de 60 dias (diáfise de tíbia) em ratos fêmeas; (*): indica a diferença estatística significativa.

Na Figura 14, o gráfico apresenta os valores médios de densidade óptica radiográfica em ratos fêmeas no período de 60 dias, na região da diáfise. Observou-se menor valor de densidade óptica no grupo tratado com fenitoína (5mg/kg/dia), sendo que tal diferença em relação aos demais grupos foi considerada estatisticamente significativa (*).

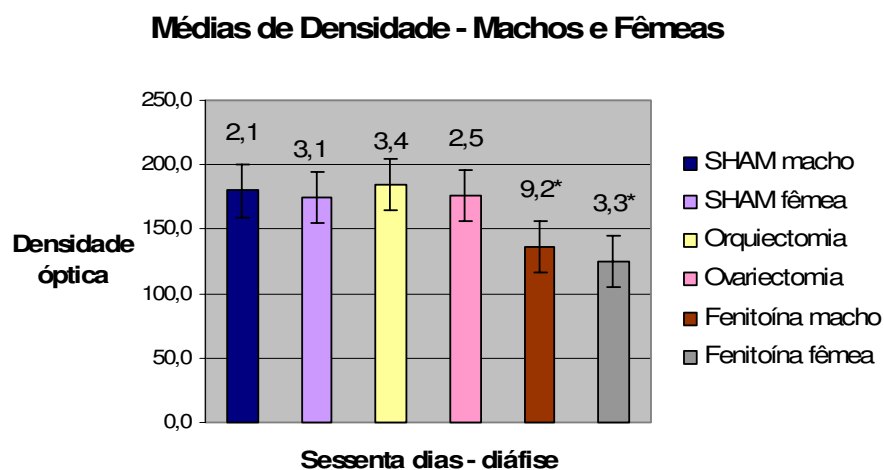


FIGURA 15 – Gráfico comparativo das médias dos valores de densidade óptica e erros das médias dos grupos experimentais no período de 60 dias (diáfise de tíbia) em ambos os sexos; (*): indica a diferença estatística significativa.

O gráfico da Figura 15 representa os valores médios de densidade óptica radiográfica analisados comparativamente em ratos machos e fêmeas no período de 60 dias, na região da diáfise dos três grupos experimentais. Evidenciou-se que o grupo tratado com a medicação estudada obteve os menores valores de densidade óptica em relação aos demais grupos, sendo que tais diferenças apresentam significância estatística.

6 DISCUSSÃO

Novas tecnologias relativas aos métodos diagnósticos, vêm sendo aprimoradas em diversas áreas, como na Odontologia, o que proporciona bases científicas sólidas no intuito de maior alcance e confiabilidade na aplicabilidade clínica em benefício da população em geral. Neste cenário, estão incluídos estudos referentes ao comportamento de fármacos, não somente em relação à atuação direta destes, mas também nos possíveis efeitos colaterais e/ou adversos dos mesmos no organismo humano.

Sendo assim, o presente trabalho teve como parte das propostas, o estudo do fármaco fenitoína. Sua principal indicação está no tratamento e prevenção de crises epiléticas, podendo também ser utilizado para enxaquecas, neuralgia trigeminal, alguns tipos de psicose, além do tratamento de arritmias cardíacas, como foi evidenciado por Bhatia e Prakash⁸ em 2004, Ohta et al.⁶³ em 1995, Ribeiro et al.⁷⁸ em 2003, Scheinfeld⁸³ em 2003. Contudo, apesar de ser um medicamento que na sua principal indicação, tenha efetividade comprovada, deve-se salientar os inúmeros efeitos colaterais e/ou adversos provenientes de sua ministração. Mencionados e estudados por diversos autores, cada um enfatizando um aspecto desses efeitos, tem-se autores como Ikeda et al.⁸ em, 1999; DaCosta et al.¹⁸ em 1998, Pedron et al.⁷¹ em 2005, Ribeiro et al.⁷⁸ em 2003, Spolidorio et al.⁸⁶ em 2000. Dentre estas manifestações estão englobadas complicações dermatológicas, desordens do sistema hematopoiético, interferência na fisiologia do tecido conjuntivo e na embriogênese, além de alterações no metabolismo ósseo. Com relação a este último, caracteriza-se como efeito secundário e/ou de extensão,

resultante da ministração a longo prazo do fármaco, a possibilidade de ocorrência da alteração da microarquitetura óssea, levando a quadros de osteopenia, com diminuição da massa óssea e posterior evolução para a osteoporose.^{21, 24, 28, 44, 45, 67, 68 e 90}

Este efeito adverso e/ou de extensão mencionado acima despertou-nos o interesse para o estudo da fenitoína no protocolo proposto no presente trabalho, ou seja, a possível indução à osteopenia pelo uso prolongado deste fármaco. A osteopenia é considerada como um estágio anterior à osteoporose, salientando-se sua importância clínica para a prevenção contra o acometimento do processo patológico ósseo mais prevalente no contexto mundial^{69, 74, 104 e 109}.

Desta forma, evidencia-se a necessidade de constantes estudos que avaliem o mecanismo fisiopatológico desta enfermidade, além de formas de diagnóstico, medidas preventivas e de tratamento, como também manifestações clínicas e seqüelas observadas pela ocorrência de fraturas^{1, 4, 14, 37 e 87}.

O mecanismo multifatorial que está vinculado ao desenvolvimento da osteoporose é descrito por diversos autores tais como Manolagas e Jilka⁵² em 1995, Turner et al.⁹⁵ em 1994, Amadei et al.⁴ em 2006, Compston¹⁷ em 2001. Pode-se constatar, em um contexto geral, que essa anormalidade óssea está intimamente relacionada com a diminuição ou mesmo eliminação da produção hormonal tanto em homens quanto em mulheres. Isto porque os hormônios sexuais atuam na modulação de mecanismos de regeneração e remodelação óssea, influenciando diretamente na atividade osteoclástica e osteoblástica. Apesar de verificar-se que a literatura aponta uma necessidade de maiores pesquisas que expliquem o mecanismo fisiopatológico da osteoporose, acredita-se que este processo esteja relacionado à interação entre uma molécula ligante e seu receptor, como por exemplo, a atuação de receptores estrogênicos em osteoblastos^{4, 17, 60 e 95}.

Portanto, para o desenvolvimento de pesquisas e o constante estudo da osteoporose, o protocolo mais freqüentemente utilizado é o que envolve modelos de experimentação animal, incluindo, principalmente, a ampla utilização de ratos^{38, 43, 59 e 77}. Para tanto, os animais devem ser privados da produção hormonal mediante o procedimento cirúrgico de ovariectomia ou orquiectomia. O uso de modelos de experimentação animal também é eficaz na avaliação de testes farmacológicos para o tratamento deste processo patológico, como evidenciado no trabalho de Pytlik et al.⁷⁷ que teve como objetivo, a avaliação do fármaco doxiciclina, já que este poderia ter influência na inibição da reabsorção e intensificação na formação óssea, nas propriedades mecânicas de ossos de ratos ovariectomizados e induzidos à osteopenia. Outros estudos que também confirmam a importância da utilização de animais experimentais (ratos) no protocolo de castração para pesquisas que visam o desenvolvimento de medidas terapêuticas contra a osteoporose é o de Akiyama et al.²⁻³, em 1993 e 1999, que estudaram o potencial preventivo da menatetrenona, homólogo da vitamina K₂ contra a perda óssea em ratas ovariectomizadas. Assim, também, os trabalhos de Iwamoto et al.³⁶ e de Matsunaga et al.⁵⁴ utilizaram a vitamina K e também a vitamina D em pesquisas tendo o mesmo propósito já descrito.

Sabe-se que, em decorrência da supressão hormonal em ratos, ocorre a evolução a quadros que apresentam muitas características similares à perda óssea em humanos. Em 1991, Kalu³⁸ cita essas similaridades tais como: aumento na taxa de remodelação óssea, fase inicial de perda óssea mais rápida seguida de uma fase muito mais lenta e também uma resposta terapêutica óssea semelhante com uso de diversos fármacos. Mosekilde⁵⁹, em 1995, também afirmou tais semelhanças e enfatizou outras vantagens da utilização de ratos em pesquisas, tais como, a facilidade de um estudo com boas condições de padronização, além de propiciar um tempo relativamente menor de

pesquisa para a obtenção dos resultados. Tal afirmação é decorrente do acelerado metabolismo basal de ratos, por ser um animal de pequeno porte.

Compston¹⁷, em 2001 afirmou que a ovariectomia leva ao rápido desenvolvimento de perda óssea no tecido esponjoso em ratas, aumentando a atividade osteoclástica, o número e tamanho de osteoblastos, decorrendo em aumento da taxa remodeladora óssea podendo perdurar até um ano após do ato cirúrgico. Outro trabalho que confirma este fato é o de Tanaka et al.⁹², em 2003, que realizaram ovariectomia em ratas com seis meses de idade e, decorrido um ano do procedimento cirúrgico, evidenciaram perda óssea e fragmentação trabecular no osso alveolar mandibular.

No estudo em questão, optou-se pela utilização de ratos adultos jovens tanto machos, quanto fêmeas com três meses de idade. Estes animais são facilmente disponíveis e preconizados amplamente pelas normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Podem manifestar os efeitos da ovariectomia ou orquiectomia em um mês ou menos, com perda óssea de características muito próximas ao do rato senil. Ressalta-se ainda, que ratos em crescimento respondem com maior taxa de perda óssea e em maior magnitude em relação a ratos adultos após a castração, tendo por isso a recomendação para que estudos de agentes com potencial terapêutico sejam feitos em animais com não mais que seis meses de vida após a castração^{17 e 38}.

No presente estudo, escolheu-se como parâmetro de análise a tíbia por ser um osso longo bastante envolvido na osteoporose. Outro fator que veio corroborar com esta escolha, foi a melhor acessibilidade deste osso à metodologia radiográfica já descrita.

Dentre os métodos de diagnóstico da osteoporose, Jergas e Genant³⁷, descreveram os mais utilizados como também enfatizaram o desenvolvimento dos mais recentes. Estão relacionados a densitometria por emissão única de raios X, a tomografia

computadorizada quantitativa, a ressonância magnética quantitativa, a ultra-sonometria óssea e a densitometria de dupla emissão de raios X (DXA), sendo que estes dois últimos ainda são os mais utilizados no Brasil como enfatizou Szejnfeld⁸⁷, em 2004.

No exame por DXA ocorre a quantificação da densidade mineral óssea de um indivíduo mediante escores que são comparados a valores de referência com o de adultos jovens saudáveis^{37 e 87}. Essas formas de exames aplicam-se a seres humanos, porém para a realização de pesquisas científicas com a utilização de animais de pequeno porte, houve o desenvolvimento de um programa adaptado para estes, possibilitando o uso do DXA, como foi descrito por Holdsworth et al.³², em 2000. Entretanto, a dificuldade de acesso a esses recursos, levou-nos à indagação sobre o grau de eficácia que um aparelho especificamente de uso odontológico, com um sistema de aquisição de imagem digital, poderia oferecer no estudo de alterações de densidade óssea. Assim, sabe-se que este sistema possui acessibilidade e disponibilidade no meio acadêmico odontológico onde estudos de processos que afetam a massa óssea, são de suma importância para o conhecimento do cirurgião-dentista. Neste contexto, estudos que avaliem a eficácia de tal aparelhagem são extremamente importantes e necessários, o que justifica a utilização de um sistema digital direto nesta metodologia de avaliação óssea.

Adotou-se, nesta pesquisa o sistema Trophy, uma vez que este oferece capacidade de auxílio ao diagnóstico com imagens radiográficas que podem ser observadas em monitor de alta resolução com boa qualidade. A radiografia digital direta (RDD) é uma tecnologia considerada inovadora e desde seu surgimento até a atualidade vêm apresentando rápida evolução¹⁶.

Neste contexto, os sistemas digitais oferecem definição e balanço entre contraste e brilho equilibrados em todas as imagens observadas, ou seja, permite a manipulação com o intuito da melhoria da

análise e observação do objeto de estudo. Esta vantagem proveniente desse sistema e associado a fatores como a velocidade em que as imagens são adquiridas, a redução da dose de radiação ionizante ao paciente, a ausência de processamento efetuado na câmara escura, propiciam a preservação do meio ambiente e ainda, o benefício de arquivamento da imagem digital na memória do computador sem perda da qualidade^{13, 15, 33 e 103}. O arquivamento dessa imagem permite a transferência para programas de fácil acesso e de domínio público, como é o caso do Adobe Photoshop aplicado neste trabalho. A utilização deste programa, tornou possível avaliar numericamente a densidade óptica do tecido ósseo, possibilitando uma melhor interpretação da imagem. Este fato aumenta a acurácia para interpretação, sendo de grande utilidade, uma vez que o diagnóstico dado por um radiologista é baseado em avaliação subjetiva, podendo estar sujeito a variações intra e interpessoais. Em decorrência dessa subjetividade podem ocorrer perda de informações devido a natureza sutil do achado radiológico, fadiga visual ou mesmo distração.

No que se refere à interpretação da densidade óptica, sabe-se que os tons de cinza da imagem que possuem a mesma densidade aparecem na mesma tonalidade. Para registro e evidenciação, utiliza-se um histograma representativo da distribuição dos níveis de cinza, sendo esta uma ferramenta presente no próprio programa de edição. De acordo com Sarmento et al.⁸¹, quando se mede a densidade óptica, se a imagem oferece maior quantidade de nuances de cinza, mesmo que sejam imperceptíveis ao olho humano, no momento em que se determina a correspondência numérica daqueles tons, a maior quantidade de tons torna esta mensuração mais sensível e, por isto, com maior capacidade de mostrar diferenças sutis de densidade, evidentes apenas quando comparados numericamente.

Quanto ao sensor CCD do sistema digital, sabe-se que possui ampla latitude em relação a radiação ionizante, portanto, variações

de posicionamento e no tempo de exposição aos raios X podem influenciar na medição da densidade óptica. Tendo conhecimento deste fato, é necessário o cuidado com a metodologia radiográfica para aquisição das imagens. Portanto, no presente trabalho, para efetuar uma análise da densidade óptica mais fidedigna, procurou-se seguir uma padronização, eliminando variáveis que podem influenciar nos resultados. Utilizou-se a técnica de paralelismo, com distância focal de 40 cm, sendo que o posicionamento da tíbia do animal estava o mais próximo possível do sensor, diminuindo o espaço entre eles e com isto, buscou-se as condições para a obtenção de uma imagem com melhor projeção no filme ou no sensor, que são raios X paralelos e incidindo perpendicularmente ao filme ou sensor e ao objeto. O objetivo consiste em aumentar a precisão da radiografia, resultando em menor distorção da imagem. Nesta pesquisa, tomou-se o cuidado de adquirir uma imagem isenta da sobreposição da fíbula com a tíbia, já que os animais foram radiografados *in vivo* e anestesiados (Figura 4).

Considerando que este trabalho possuiu apenas o foco radiográfico como exame comparativo e de análise, enfatiza-se que os mesmos animais que começaram a pesquisa foram sacrificados depois de dois meses e, com isso, houve a oportunidade de acompanhamento e evolução destes em relação a massa corpórea, eliminando a variável de alteração biológica decorrente do próprio indivíduo (Apêndice B). O fato do número de animais dos grupos avaliados neste trabalho serem diferentes, refere-se à consideração por parte dos autores de uma necessidade maior de animais destinados ao grupo tratado com fenitoína, já que o comportamento e a resposta destes ao fármaco poderia apresentar efeitos idiossincráticos e, portanto, não relatados na literatura, que poderiam levar ao óbito do espécime. Tendo em vista esta possibilidade, considerou-se uma margem de segurança no tratamento desses animais, contando com oito espécimes. No período experimental de 30 dias, houve a perda de apenas um macho do grupo tratado com

fenitoína. Já o grupo SHAM, contou com cinco animais, pois não se considerou necessário um número maior, visto que estes apenas iriam sofrer o estresse cirúrgico, já descrito na literatura. O grupo de ratos submetidos à castração contou com seis espécimes, não sendo necessário maior número, pois a resposta biológica frente ao protocolo de castração já é conhecido^{2, 36, 38 e 59}.

No que se refere à dosagem e esquema terapêutico aplicados ao uso da fenitoína nesta pesquisa, adotou-se como sendo adequada a posologia de 5mg/kg/dia. Esta dosagem corresponde à transformação da dosagem terapêutica usualmente ministrada em seres humanos que sofrem crises convulsivas, para que sejam aplicados em ratos levando em consideração a massa corporal do animal. Embora outros trabalhos como o de Onodera et al.⁶⁴, em 2001, Onodera et al.⁶⁵, em 2002 e Onodera et al.⁶⁶, em 2003 tenham utilizado a dosagem de 20mg/kg/dia do fármaco, ou seja, quatro vezes maior que a ministrada nesta pesquisa, reitera-se que esta escolha é decorrente à aplicabilidade clínica da fenitoína, pois não foi uma das propostas deste estudo a verificação de manifestações biológicas provenientes de uma superdosagem do fármaco. Teve-se como interesse principal verificar a ocorrência da possibilidade da osteopenia em dose eminentemente terapêutica e ministrada segundo a indicação principal do medicamento. Para tanto, estudou-se muitos trabalhos, como os de Kubota et al.⁴⁴, em 1999, Ensrud et al.²¹, em 2004, Kulak et al.⁴⁵, em 2004, Pack e Morrell⁶⁸, em 2004, Pack et al.⁶⁷, em 2005, realizados em humanos, os quais acompanharam e verificaram a repercussão do uso de fármacos antiepiléticos, entre eles, a fenitoína, a longo prazo. Outra variável interessante de tais trabalhos é a faixa etária que compreendia a pesquisa, já que não raro, acometia mulheres que estavam recebendo terapia de reposição hormonal. Em todos eles verificou-se a associação com a diminuição da densidade mineral óssea.

Outro fato a ser abordado com relação ao presente trabalho é a via de administração da fenitoína. Este medicamento possui uma absorção mais eficiente pela via oral segundo Kliemann e Monte⁴⁰, e além disso, o autor relata que outras vias de administração não são indicadas, visto que o fármaco em questão pode atuar de forma imprevisível e não ter eficácia na absorção. Tendo estes motivos em vista, e associando ao fato de que procurou-se reproduzir a via de administração realizada em humanos, optou-se por usar a via de administração oral, da mesma forma que o trabalho de McCartney et al.⁵⁵ (5mg/kg/dia) em 1999 e contrapondo aos trabalhos de Onodera et al.⁶⁴⁻⁶, que optaram pela via subcutânea e também a outros dois trabalhos realizados por Ohta et al.⁶²⁻³, em 1995, que optaram pela via intraperitoneal. Provavelmente, a escolha dessas vias de administração pelos autores mencionados acima, seja referente a facilidade de manuseio técnico em relação aos animais, visto que a administração por via oral mediante gavagem, como foi realizado nesta pesquisa, exige um maior cuidado e tempo despendido, como também um domínio técnico da gavagem para que esta seja realizada de forma adequada sem causar danos nos animais.

Nesta pesquisa utilizou-se ratos machos e fêmeas, visando também, evidenciar se ocorreria diferenças nos valores de densidade óptica radiográfica entre os mesmos, e com isso indicando a possível diferença no comportamento fisiológico e farmacológico a que foram submetidos. Sabe-se, na literatura, que estas diferenças podem ser observadas, uma vez que o mecanismo de regulação hormonal e outras variáveis, podem ter uma resposta fisiopatológica e farmacológica diferindo entre machos e fêmeas. Um trabalho que avalia especificamente diferenças entre os sexos da prole de ratas tratadas com fenitoína é o de McCartney et al.⁵⁵, o qual teve como variáveis de estudo, efeitos comportamentais e de desenvolvimento tais como: alterações de abertura de olho, orientação olfatória e tempo de resposta a um estímulo, entre

outras. Num contexto geral, os autores verificaram que os machos foram mais afetados no que concerne às variáveis descritas. Com relação às diferenças entre os sexos quando aplicado o protocolo de castração e/ou ovariectomia, evidencia-se que existe maior quantidade de trabalhos que avaliam a osteopenia em ratos fêmeas, fato que pode ser relacionado ao acometimento da osteoporose em maior grau e prevalência estatística em mulheres na pós-menopausa. Estão englobados neste quesito, trabalhos como o de Akyama et al.²⁻³, Carvalho e Cliquet Jr¹², em 2003, Lane et al.⁴⁶, em 1998, Matsunaga et al.⁵⁴, em 1999, Mello e Gomide⁵⁶, em 2005, Tanaka et al.⁹¹⁻⁹², em 2002 e em 2003, Yang et al.¹⁰⁷⁻¹⁰⁸, em 2003 e em 2005. Por outro lado, trabalhos que envolvam como foco a avaliação em ratos orquiectomizados encontram-se em menor número podendo serem citados os de Vanderschueren et al.⁹⁸ e de Wakley et al.¹⁰². Um trabalho que avalia ambos os sexos, ou seja, na realização da ovariectomia e orquidectomia é o de Most et al.⁶⁰ que verificou que em ambos os gêneros ocorreu um aumento osteoclastogênico em ratos, o que está associado com a fase inicial rápida da perda óssea.

A despeito dos fatos abordados acima, nesta pesquisa, ao se realizar o teste Tukey, verificou-se que os valores de densidade óptica radiográfica não foram estatisticamente significantes entre os sexos, denotando que na metodologia empregada não foi possível observar-se dados a respeito de possíveis diferenças existentes no processo de perda de massa óssea em machos e fêmeas.

Com relação à utilização do sistema digital, anteriormente já foram descritos fatores que tornam tal uso favorável. Entretanto, faz-se necessário algumas colocações em relação às limitações inerentes a estes sistemas. Entre elas, podem ser destacadas o alto custo inicial, sensor constituído com área relativamente pequena e dimensões externas consideravelmente grandes dificultando o correto posicionamento na cavidade bucal^{11, 15 e 103}.

Levando em consideração todas as características dos sistemas digitais já abordados, evidencia-se trabalhos que tiveram como propósito comparar a efetividade deste sistema com o filme periapical, tal como o realizado por Bóscolo et al.¹⁰, em 2001, na qual constatou-se que os sistemas digitais avaliados, excetuando-se o Sens-A-Ray, ofereceram imagens em condições ideais de diagnóstico. Os sistemas digitais possuem ampla utilização em diversas áreas do setor odontológico, incluindo na Endodontia, Dentística, Implantodontia, como pode ser evidenciado nos trabalhos de Clasen e Aun¹⁶, em 2001, Gröndahl²⁷, em 1992, Hintze et al.³¹, em 1994, Puppín et al.⁷⁶, em 2001, Versteeg et al.⁹⁹, em 1997. Em trabalhos que envolvem análises radiográficas em tecido ósseo, foi encontrada maior prevalência de estudos nos quais a realização de defeitos ósseos são uma constante, como na pesquisa de Moraes et al.⁵⁸, na qual acompanharam radiograficamente a evolução do processo de reparação óssea em determinados períodos mediante análise da densidade óptica do defeito criado. Esta metodologia também pode ser evidenciada no trabalho de Martins et al.⁵³ que tiveram como foco avaliar a efetividade de um antiinflamatório no processo de reparação óssea em defeitos realizados em ratos por meio da densidade óptica radiográfica. Nos referidos trabalhos, torna-se mais evidente e rápido o acompanhamento do processo de reparo ósseo, em virtude da delimitação específica da área. Desta forma, a variação dos tons de cinza da região é analisado no transcurso do processo evolutivo de reparação, devendo-se interpretar com subsídios de conhecimento fisiológico a ocorrência de tais fatos. Fato semelhante também ocorre no estudo de Werkman et al.¹⁰³, em 2006, que avaliou os efeitos terapêuticos de dois medicamentos no reparo de lesões ósseas em ratos submetidos à castração por exame histológico, histomorfométrico e também radiográfico, sendo este último por meio da avaliação da densidade óptica radiográfica obtida mediante radiografia digital. Pôde-se verificar que existiu concordância dos resultados da avaliação radiográfica com os das

metodologias de análise, evidenciando-se assim a efetividade desta metodologia de avaliação do diagnóstico.

Por outro lado, verifica-se poucos trabalhos na literatura que analisem alterações ósseas sem o envolvimento de defeitos cirúrgicos realizados, ou seja, estudos especificamente em ossos íntegros. Neste quesito, tem-se o trabalho de Silva et al.⁸⁴, em 2007, que verificou o efeito do alcoolismo crônico sobre a densidade óssea por meio da avaliação da densidade óptica radiográfica em ratos e no qual se utilizou um sistema digital como ferramenta de avaliação. O parâmetro ósseo de análise, no estudo mencionado, foi o fêmur, por ser este um osso longo amplamente acometido pela osteoporose. Os autores escolheram duas áreas padronizadas deste osso. A região da porção média de tamanho (60 x 20 pixels) e a região condilar (20 x 20 pixels). Tendo a especificação como base, no presente trabalho também foram selecionadas duas áreas padronizadas de mesmo tamanho, abrangendo 20 x 20 pixels, dispostos na região do terço médio da tíbia, correspondente à diáfise, sem o envolvimento das corticais laterais, e na região de transição entre a porção condilar (epífise) e a diáfise, denominado de metáfise⁶⁴⁻⁶.

Com relação aos resultados desta pesquisa, verifica-se diferenças estatisticamente significantes e estas estão dispostas nas Tabelas de 4 a 7 do teste Tukey, nas quais evidencia-se os grupos heterogêneos. A Tabela 4, correspondente às médias de densidade óptica nos grupos experimentais, e períodos de avaliação em machos na região da diáfise. Verificou-se que apenas o grupo VI, ou seja, o tratado com a fenitoína (5mg/kg/dia), diferiu dos demais grupos no período de 60 dias. Da mesma forma, pôde-se evidenciar na tabela 6 que ocorreu a mesma manifestação biológica em fêmeas, ou seja, apenas o grupo tratado com a medicação proposta, após 60 dias, diferiu em relação aos demais grupos. Esta diferença foi representada graficamente nas Figuras 14, correspondente a este aspecto em machos e 15, evidenciado em

fêmeas. No gráfico da Figura 16, pôde-se verificar claramente tais diferenças do grupo tratado com fenitoína em ambos os sexos, quando comparados aos demais no período de 60 dias, na diáfise. Estes resultados de diminuição de densidade óssea, estão de acordo com os trabalhos de Onodera et al.⁶⁴⁻⁶ em 2001, 2002 e 2003 que realizaram também uma indução à osteopenia pelo mesmo medicamento, tendo como foco de avaliação, a menatetrenona, um homólogo da vitamina K₂, a fim de verificar a possibilidade de prevenção do efeito osteoclastogênico do fármaco.

A ministração da fenitoína nos trabalhos referidos acima, por cinco semanas foi efetiva para a ocorrência da alteração de massa óssea, enquanto neste trabalho foi evidenciado aos 60 dias. Outro aspecto a ser abordado, é que nos trabalhos mencionados encontrou-se efeito da fenitoína tanto na metáfise quanto na diáfise femural e/ou tibial, fato que na presente pesquisa ocorreu apenas na diáfise. Nas Tabelas 5 e 7 do teste Tukey, em machos e fêmeas na metáfise respectivamente, verificou-se a homogeneidade dos grupos estudados, independente do período avaliado. Estas duas Tabelas foram representadas graficamente nas Figuras 7 a 13. Nestes gráficos, embora não se tenha evidenciado nenhuma diferença estatisticamente significativa na metáfise tanto no período de 30 quanto no de 60 dias, pôde-se verificar que houve uma diminuição da densidade óptica quando comparado ao grupo SHAM, que representa neste caso, o grupo controle. Tais resultados permitem apontar que neste trabalho, a fenitoína teria tido maior ação da região diafisária, ainda que na metodologia empregada, essa foi a única evidenciação do efeito do fármaco, embora diferenças de resposta da metáfise e diáfise frente ao medicamento poderiam ser esperadas, de acordo com o trabalho de Ohta et al.⁶³, em 1995, no qual evidenciou-se, mediante parâmetros ósseos histomorfométricos, que a metáfise e diáfise possuem respostas diferentes à alterações ósseas, sendo, então, dose-dependentes em relação à utilização da fenitoína. Fato interessante

observado no trabalho de Ohta et al.⁶³, é que estes autores avaliaram diferentes doses de fenitoína incluindo a dose ministrada nesta pesquisa, que foi de 5mg/kg/dia. Para doses maiores que esta em questão, no caso 50 ou 150 mg/kg/dia verificou-se, por parâmetros bioquímicos, que o nível de osteocalcina e fosfatase alcalina estavam aumentados. Estes dados denotam aumento da remodelação, já que estes são parâmetros da reabsorção óssea. Em doses menores, como as de 1 e 5 mg/kg/dia, os resultados que os autores obtiveram sugeriram que houve formação óssea, tendo, portanto, um potencial osteogênico. Deve-se ressaltar que o tempo de administração no trabalho de Ohta et al.⁶³ foi de 47 dias para as dosagens maiores e de 42 para as menores. Em trabalho posterior a este, Ohta et al.⁶², associaram o fluoreto com mesma dose de fenitoína usada nesta pesquisa e ministrada por 36 dias, verificando que a associação destes estimulou a neoformação óssea. Lau et al.⁴⁸, também evidenciaram em seu trabalho um aumento de marcadores osteogênicos *in vitro* (em concentrações micromolares) e *in vivo*, em humanos.

A variável comportamental farmacocinética dos efeitos terapêuticos da fenitoína diante dos resultados desses trabalhos descritos e somados ao presente estudo, ratificam o fato deste medicamento ser considerado de cinética de ordem zero, ou seja, não possui um comportamento uniforme quando analisada sua curva dose-resposta para parâmetros fármaco-cinéticos, como é o caso da maioria dos outros fármacos de cinética de primeira ordem, podendo estar sujeito a variações de dose, forma de administração e variáveis individuais⁴⁰.

Outro aspecto que deve ser abordado no que se refere aos resultados desta pesquisa, são os resultados dos grupos ovariectomizado e orquiectomizado. Como descrito anteriormente, verificou-se que não existiram diferenças significantes entre os grupos submetidos à castração, tanto no período de 30 dias, nas duas áreas analisadas, como também no período de 60 dias. Apesar disso, nos gráficos das Figuras 7, 8, 9, 11, 12 e 13, de forma geral, pôde-se

evidenciar que houve sempre uma média de densidade óptica menor no grupo castrado, em relação aos demais grupos, inclusive quando foi comparado com o grupo tratado com fenitoína, uma vez que este último apresentou significância apenas em diáfise de 60 dias em ambos os sexos, como já discutido. O fato de não termos encontrado significância no grupo submetido à castração pode não ser indicativo de que não tenha ocorrido a diminuição da massa óssea, pois como já foi descrito anteriormente, sabe-se que o modelo experimental de castração neste período foi eficaz no estudo da indução à osteopenia, em diversos trabalhos como os de Akyama et al.²⁻³, Carvalho e Cliquet Jr¹², Lane et al.⁴⁶, Matsunaga et al.⁵⁴, Mello e Gomide⁵⁶, Tanaka et al.⁹¹⁻⁹², Yang et al.¹⁰⁸⁻¹⁰⁹, Vanderschueren et al.⁹⁷⁻⁹⁸, Wakley et al.¹⁰², que utilizaram tal protocolo de indução em seus estudos, sendo este intensamente pesquisado. Como demonstrado por tais autores, a ocorrência da diminuição da massa óssea pode ser evidenciada no período de 30 dias decorrido o procedimento de ovariectomia ou orquiectomia. Portanto, por dados extensamente discutidos e validados na literatura, torna-se válido afirmar a possível ocorrência de perda óssea não detectada pela metodologia radiográfica em nossa pesquisa. Pode-se sugerir que para a evidenciação de diferença significativa estatisticamente, para tal metodologia, fosse necessário um período maior de observação, ou seja, trata-se da sensibilidade insuficiente apresentada pela forma diagnóstica para detecção de perda óssea em períodos precoces.

O fato apresentado acima não invalida a utilização do sistema digital e por sua vez, a avaliação por meio da densidade óptica radiográfica, uma vez que este método foi sensível em apurar a diferença de densidade óptica radiográfica causada pela fenitoína. Por isto, não é demais afirmar que, em vista dos dados considerados, o fármaco em questão, nas condições utilizadas nesta pesquisa, atuou como um fator indicativo de diminuição da massa óssea maior do que a provocada pela supressão hormonal. Entretanto, apesar do fator indicativo da ocorrência

da condição osteopênica, não se pode afirmar de forma conclusiva tal situação, o que proporciona a constatação que o exame radiográfico deve atuar como um meio a ser complementado por outros métodos, como histomorfométrico e bioquímico como evidenciado nos trabalhos já discutidos. Dessa forma, com o conjunto global de informações obtidas, pode-se ter maior contribuição científica do comportamento fisiológico dos modelos de estudo, frente à medicamentos que provoquem alterações ósseas, enriquecendo e explicando com maior parcimônia as variações a que estes animais foram submetidos. Torna-se interessante ressaltar que uma das observações naturais e inerentes a esta pesquisa, embora não explicitada como objetivo primordial, foi a avaliação do desempenho do sistema digital na análise de condições clínicas de osteopenia, como meio eficaz de diagnóstico de perda óssea. Esta avaliação poderá, juntando-se a pesquisas futuras, suprir de respostas as indagações referentes à eficácia dos sistemas digitais diretos frente à necessidade de avaliação clínica do cirurgião-dentista no que se refere ao planejamento de condutas terapêuticas para pacientes que, eventualmente, estejam submetidos ao tratamento crônico com fármacos antiepilépticos e, simultaneamente, necessitados de intervenções cirúrgicas odontológicas que envolvam a reparação óssea crânio-facial.

7 CONCLUSÃO

Baseado nas condições experimentais da presente pesquisa, e a partir dos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- a) não houve diferença estatística significativa nos valores de densidade óptica radiográfica do osso avaliado (tíbia) nos grupos ovariectomizado (III) e orquiectomizado (IV) nos períodos avaliados;
- b) os efeitos da fenitoína (5mg/kg/dia) na perda de massa óssea foram observadas radiograficamente por meio da diminuição da densidade óptica radiográfica em ambos os sexos aos 60 dias de observação na diáfise de tíbia;
- c) o sistema digital direto Trophy atuou como indicador da diminuição da densidade óssea em osso íntegro provocada pela fenitoína na dose de 5mg/kg/dia;
- d) a diminuição de densidade óssea em ratos ovariectomizados e/ou orquidectomizados nos períodos de análise propostos nesta pesquisa não foi detectada por meio do sistema digital Trophy.

8 REFERÊNCIAS*

1. Akesson K. New approaches to pharmacological treatment of osteoporosis. Bull World Health Organ. 2003 Sept.; 81(9): 657-664.
2. Akiyama Y, Hara K, Kobayashi M, Tomiuga T, Nakamura T. Inhibitory effect of vitamin K2 (menatetrenone) on bone resorption in ovariectomized rats: a histomorphometric and dual energy x-ray absorptiometric study. Jpn J Pharmacol. 1999, 80: 67-74.
3. Akiyama Y, Hara K, Ohkawa I, Tajima T. Effects of menatetrenone on bone loss induced by ovariectomy in rats. Jpn J Pharmacol. 1993, 62(2): 145-53.
4. Amadei SU, Silveira VAS, Pereira AC, Carvalho YR, Rocha RF. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. J Bras Patol Med Lab. 2006 fev.; 42(1): 7-15.
5. Barros FJBC, Brito JHM, Veeck EB, Costa NP. Avaliação óptica da densidade óssea na região retromolar em mandíbulas de cadáveres através do uso de imagens digitalizadas. Rev Odonto Cienc- Fac Odonto/PUCRS. 2001 maio/ago.; 16(33): 103-10.
6. Benz C, Mouyen F. Evaluation of the new radiovisiography system image quality. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1991 Nov.; 72(5): 627-31.

* Baseado em:

International Comitê of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referents [homepage na Internet]. Bethesda: US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

7. Berkhout WER, Beuger DA, Sanderink GCH, Van der Stelt PF. The dynamic range of digital radiographic systems: dose reduction or risk of overexposure? *Dentomax Radiol.* 2004, 33: 1-5.
8. Bhatia A, Prakash S. Topical phenytoin for wound healing. *Dermatol Online J* [periodical on line]. 2004 [cited 2005 Nov.01]; Disponível em : <http://dermatology.cdlib.org/101/reviews/phenytoin/bhatia.html>
9. Bodner L, Kaffe I, Littner MM, Cohen J. Extraction site healing in the rats: a radiologic densitometric study. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol.* 1993, Mar; 75(3): 367-72.
10. Bóscolo FB, Oliveira AMF, Almeida SM, Haiter CFS, Haiter Neto FI. Estudo clínico comparativo da qualidade de imagem de três sistemas radiográfico digitais, filme E-speed e filme digitalizado. *Pesqui Odontol Bras.* 2001 out/dez.; 15(4): 327-33.
11. Bueno NO, Dotto SR, Ferreira R, Silveira BL, Dotto G, Casa Grande L et al. Radiologia odontológica e a imagem digital. *JAO.* 1999, 3(15): 28-33.
12. Carvalho DCL, Cliquet A Jr . Low intensity ultrasound effects over osteopenic female rats bones. *Acta Ortop Bras*, [periodical on line] 2003 [cited 2006 Feb.09]; 11(1):[about 10p.]
13. Castilho JCM, Moraes LC, Costa NP, Dotto GN. Radiografia digital-histórico e evolução. *Rev Odonto Cienc- Fac Odonto/PUCRS.* 2003 jul./set.; 18(41): 279-83.
14. Christodoulou C, Cooper C. What is osteoporosis? *Postgrad Med J.* [periodical on line] 2003 [cited 2007 Mar 20] 79: 133-8.
15. Clasen NF, Aun AE. Radiografia digital direta: análise dos principais sistemas e recursos. *Rev Odontol UNICID.* 1998 jul./dez.; 10(2):109-20.

16. Clasen NF, Aun CE. Estudo comparativo entre radiografia convencional e radiografia digital direta no diagnóstico de reabsorções radiculares externas. *Rev Odontol UNICID*. 2001 maio/ago.; 13(2): 95-102.
17. Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev*. 2001 Jan.; 81(1): 419-47.
18. DaCosta ML, Regan MC, Al Sader M, Leader M, Bouchier-Hayes D. Diphenylhydantoin sodium promotes early and marked angiogenesis and results in increased collagen deposition and tensile strength in healing wounds. *Surgery*. 1998 Mar.; 123(3):287-93.
19. Duinkerke ASH, Van de Poel ACM, Doesburg WH, Lemmens WASJG. Densitometric analysis of experimentally produced periapical radiolucencies. *Oral Surg*. 1977 May; 43(5): 782-97.
20. Eastell R, Boyle IT, Compston J, Cooper C, Fogelman I, Francis RM et al. Management of male osteoporosis: report of the UK Consensus Group. *Q J Med*. 1998, 91:71-92.
21. Ensrud KE, Walczak TS, Blackwell T, Ensrud ER, Bowman PJ, Stone KL. Antiepileptic drug use increases rates of bone loss in older women. *Neurology*. 2004 June; 62(11): 2051-7.
22. Farman AG. Basic technical properties of a system for direct acquisition of digital intraoral radiographs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1993 Apr.; 75(4): 506-16.
23. Farman AG, Scarfe WC, Schick DB, Rumack PM. Computed dental radiography: evaluation of a new charge-coupled device-based intraoral radiographic system. *Quintessence Int*. 1995, 26: 399-404.
24. Feldkamp J, Becker A, Witte OW, Scharff D, Scherbaum WA. Long-term anticonvulsant therapy leads to low bone mineral density-evidence for direct drug effects of phenytoin and carbamazepine on human osteoblast-like cells. *Exp Clin End Diabetes*. 2000, 108(1): 37-43.

25. Filardi S, Guerreiro CAM, Magna LA, Marques JFN. Bone mineral density, vitamin D and anticonvulsant therapy. *Arq Neuropsiquiatr* . 2000, 58(3-A):616-20.
26. Filgueiras MAS. Mecanismo de ação das drogas antiepilépticas. *Neurobiol*. 1996 jul./set.; 59(3):107-116.
27. Gröndahl HG. Digital radiography in dental diagnosis: a critical view. *Dentomaxillofac Radiol*. 1992 Nov.; 21: 198-202.
28. Hahn TJ, Scharp CR, Richardson CA, Halstead LR, Kahn AJ, Teitelbaum SL. Interaction of diphenylhydantoin (phenytoin) and phenobarbital with hormonal mediation of fetal rat bone resorption in vitro. *J Clin Invest*. 1978, 62:406-14.
29. Haiter Neto F, Oliveira AM, Tuji FM, Rocha NA. Estágio atual da radiografia digital. *Rev ABRO* 2000 set./dez.; 1(3): 1-6.
30. Hildebolt CF. Osteoporosis and oral bone loss. *Dentomaxillofac Radiol*. 1997, 26: 3-15.
31. Hintze H, Wenzel A, Jones C. In vitro comparison of D- and E-speed film radiography, RVG, and visualix digital radiography for the detection of enamel approximal and dentinal occlusal caries lesions. *Caries Res*. 1994, 28: 363-67.
32. Holdsworth DW, Thornton MM, Drost D, Watson PH, Fraher LJ, Hodsman AB. Rapid small-animal dual-energy X-Ray absorptiometry using digital radiography. *J Bone Min Res*. 2000, 15(12): 2451-7.
33. Horner K, Shearer AC, Walker A, Wilson NHF. Radiovisiography: an initial evaluation. *Br Dent J*. 1990, 168: 244-8.
34. Ikeda K, Ogata E. Modulation of bone remodeling by active vitamin D: its role in the treatment of osteoporosis. *Mech Ageing Dev*. 2000 July; 116(2/3):103-11.
35. Ikeda D, Ohishi K, Yamauchi N, Kataoka M, Kido J, Nagata, T. Stimulatory effects of phenytoin on osteoblastic differentiation of fetal rat calvaria cells in culture. *Bone* 1999 Dec.; 25(6):653-60.

36. Iwamoto J, Yeh JK, Takeda T, Ichimura S, Sato Y. Comparative effects of vitamin K and vitamin D supplementation on prevention of osteopenia in calcium-deficient young rats. *Bone*. 2003, 33:557-66.
37. Jergas M, Genant HK. Current methods and recent advances in the diagnosis of osteoporosis. *Athr Rheum*. 1993 Dec.; 36(12):1649-62.
38. Kalu DN. The ovariectomy rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. 1991 Dec.; 15(3):175-92.
39. Khademi JA. Digital images & sound. *J Dent Educ*. 1996 Jan.; 60(1): 41-6.
40. Kliemann FAD, Monte TL. Antiepilépticos. In: Fuchs FD, Wannmacher L, Ferreira MBC. *Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional*. São Paulo: Guanabara Koogan; 2006. p. 536-53.
41. Kribbs PJ, Chesnut CH, Ott SM, Kilcoyne RF. Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. *J Prosthet Dent*. 1989 Dec.; 62(6):703-7.
42. Kribbs PJ. Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. *J Prosthet Dent*. 1990 Feb.; 63(2):218-22.
43. Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe M et al. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999; 68(5-6): 197-202.
44. Kubota F, Kifune A, Shibata N, Akata T, Takeuchi K, Takahashi S et al. Bone mineral density of epileptic patients on long-term antiepileptic drug therapy: a quantitative digital radiography study. *Epilepsy Res*. 1999; 33:93-97.
45. Kulak CA, Borba VZ, Bilezikian JP, Silvado CE, Paola L, Boguszewski CL. Bone mineral density and serum levels of 25 OH vitamina D in chronic users of antiepileptic drugs. *Arq Neuropsiquiatr*. [periodical on line]. 2004 Dec; [cited 2005 Out.14]; 62(4):940-8.

46. Lane NE, Thompson JM, Haupt D, Kimmel DB, Modin G, Kinney JH. Acute changes in trabecular bone connectivity and osteoclast activity in the ovariectomized rat in vivo. *J Bone Miner Res.* 1998 Feb.; 13(2): 229-36.
47. Lanzillotti HS, Lanzillotti RS, Trotte APR, Dias AS, Bornand B, Costa EMM. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa, cálcio dietético e outros fatores de risco. *Rev Nutr.* 2003 abr./jun.; 16(2):181-93.
48. Lau KHW, Nakade O, Barr B, Taylor AK, Houchin K, Baylink DJ. Phenytoin increases markers of osteogenesis for the human species in vitro and in vivo. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1995; 80(8): 2347-53.
49. Law AN, Bollen AM, Chen SK. Detecting osteoporosis using dental radiographs: a comparison of four methods. *J Am Dent Assoc.* 1996 Dec.; 127: 1734-42.
50. Louzada MJQ, Nogueira GP, Garcia Junior IR, Carvalho CA, Paula GA. Densitometria óptica radiográfica em análise de densidade óssea de mandíbulas de coelhos castrados. *Fac Odontol Lins-UNIMEP* 2001 jan./jun.; 13(1): 33-8.
51. Machado GB, Albejante PTC, Crivello Junior O, Chilvarquer I, Chinellato LEM. Odontologia em imagens. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 1996 maio/jun.; 50(3): 213-28.
52. Manolagas SC, Jilka RL. Mechanisms of diseases: bone marrow. cytokines, and bone remodeling-emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med.* 1995 Feb.; 332(5): 305-11.
53. Martins MV, Silva MAS, Médici Filho E, Moraes LC, Castilho JCM, Rocha RF. Evaluation of digital optical density of bone repair in rats medicated with ketoprofen. *Braz Dent J.* 2005; 16(3):207-12.

54. Matsunaga S, Ito H, Sakou T. The effect of vitamin K and D supplementation on ovariectomy-induced bone loss. *Calcif Tissue Int.* 1999; 65:285-89.
55. McCartney MA, Scinto PL, Wang S-S, Altan S. Developmental effects of phenytoin may differ depending on sex of offspring. *Neurotoxicol Teratol.* 1999 Mar./Apr.; 21(2):119-28.
56. Mello LCP, Gomide LB. Respostas físicas, químicas e biomecânicas do osso de ratas ovariectomizadas submetidas a diversas ingestões de flúor suplementar. *Rev Nutr.* 2005 set./out.; 18(5): 593-600.
57. Mohajery M, Brooks SL. Oral radiographs in the detection of early signs of osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992; 73: 112-7.
58. Moraes MEL, Soares MG, Takeshita WM, Moraes LC, Médici Filho E, Castilho JCM. Estudo radiográfico da reparação óssea em tíbias de ratos estressados: densidade óptica por meio de radiografia digital. *Rev Odonto Ciência- Fac Odonto/PUCRS.* 2005 jul./set.; 20(49): 257-61.
59. Mosekilde L. Assessing bone quality: Animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone.* 1995 Oct.; 17(4):343-52.
60. Most W, Wee-Pals VD, Ederveen A, Papapoulos S, Löwik C. Ovariectomy and orchidectomy induce a transient increase in the osteoclastogenic potential of bone marrow cells in the mouse. *Bone.* 1997 Jan.; 20(1):27-30.
61. Mouyen F, Benz C, Sonabend E, Lodter JP. Presentation and physical evaluation of radiovisiography. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1989, Aug.; 68(2):238-42.
62. Ohta JE, Wergedal JE, Gruber HE, Bayling DJ, Lau KHW. Low dose phenytoin is not an osteogenic agent in the rat. *Calcif. Tissue Int.* 1995; 56: 42-48.

63. Ohta JE, Wergedal JE, Matsuyama T, Baylink DJ, Lau KHW. Phenytoin and fluoride act in concert to stimulate bone formation and to increase bone volume in adult male rats. *Calcif Tissue Int.* 1995; 56: 390-97.
64. Onodera K, Takahashi A, Mayanagi H, Wakabayashi H, Kamei J, Shinoda H. Phenytoin-induced bone loss and its prevention with alfacalcidol or calcitriol in growing rats. *Calcif Tissue Int.* 2001; 69: 109-16.
65. Onodera K, Takahashi A, Sakurada S, Okano Y. Effects of phenytoin and/or vitamin K₂ (menatetrenone) on bone mineral density in the tibiae of growing rats. *Life Sci.* 2002 Feb.; 70: 1533-42.
66. Onodera K, Takahashi A, Wakabayashi H, Kamei J, Sakurada S. Effects of menatetrenone on bone and serum levels of vitamin K₂ (menaquinone derivatives) in osteopenia induced by phenytoin in growing rats. *Nutrition.* 2003 May; 19(5): 446-50.
67. Pack AM, Morrell MJ, Marcus R, Holloway L, Flaster E, Doñe S et al. Bone mass and turnover in women with epilepsy on antiepileptic drug monotherapy. *Ann Neurol.* 2005, 57(2): 252-7.
68. Pack AM, Morrell MJ. Epilepsy and bone health in adults. *Epilepsy Behav.* 2004 Feb.; 5(2): 24-9.
69. Paiva LC, Filardi S, Pinto-Neto AM, Samara A, Marques Neto JF. Impact of degenerative radiographic abnormalities and vertebral fractures on spinal bone density of women with osteoporosis. *Med J/Rev Paul Med.* 2002; 120(1):9-12.
70. Pavan AJ, Tavano O. Avaliação da solução Kodak no que se refere às densidades ótica e radiográfica, analisadas pelo fotodensitômetro MRA e pelo sistema digital Digora, no filme Kodak DF-58. *Rev Fac Odontol Bauru.* 2000 jan./jun.; 8(1/2): 51-7.

71. Pedron IG, Aburad A, Tortamano IP, Borsatti MA, Adde CA. Conduta clínica no atendimento odontológico ao paciente submetido à terapia com fenitoína. *Rev Odonto*. 2005 jan./jun.; 25(1): 59-64.
72. Pereira BR, Souza PHC, Westphalen FH. Estudo dos níveis de cinza da densidade óssea mandibular mediante radiografias convencionais digitalizadas. *Rev Odonto Ciênc- Fac Odonto/PUCRS*. 2004 abr./jun.; 19(44): 176-9.
73. Perucca E, Gram L, Avanzini G, Dulac O. Antiepileptic drugs as a cause of worsening seizures. *Epilepsia*. 1998 Jan.; 39(1):5-17.
74. Petrikowski CG, Overton TR. Quantitative radiographic changes in the mandible, femur and vertebra in lactating rats fed a low-calcium diet. *Dentomaxillofac Radiol*. 1996; 25(3): 136-45.
75. Puppin AAC, Costa NP, Garcia RS. Análise da densidade óptica pela leitura óptica na região de molares em mandíbulas secas. *Rev Odonto Ciênc*. 1998; 25:151-65.
76. Puppin AAC, Souza PHC, Costa NP, Veeck EB. Influência do implante na leitura dos níveis de cinza em imagens digitalizadas da região periimplantar. *Rev Odonto Ciênc*. 2001 set./dez.; 16(34): 209-21.
77. Pytlik M, Folwarczna J, Janiec W. Effects of doxycycline on mechanical properties of bones in rats with ovariectomy-induced osteopenia. *Calcif Tissue Int*. 2004; 75: 225-230.
78. Ribeiro JR, Lopes RA, Contrera MGD, Oliveira C, Sala MA, Salai MS et al. Ação da fenitoína na glândula submandibular de fetos de rato: estudo cariométrico. *R Esc Farm Odontol Alfenas* 2003 jan./dez.; 23: 81-91.
79. Rodriguez PN, Friedman SM, Boyer P, Portela ML. Influence of dietary calcium concentration on body size and bone composition in rats during recovery from malnutrition. *J Am Coll Nutr*. 1998; 17(1): 86-91.

80. Sakakura CE, Giro G, Gonçalves D, Pereira RMR, Orrico SRP, Marcantonio Jr E. Radiographic assessment of bone density around integrated titanium implants after ovariectomy in rats. Clin Oral Impl Res. 2006; 17: 134-38.
81. Sarmiento VA, Pretto SM, Rubira IRF, Costa NP. Sistemas digitais de imagens odontológicas- fatores eletrônicos. Rev FOUFBA. 2000 jan./jun.; 20: 46-9.
82. Scarparo HC, Costa NP, Souza ACA. Apresentação de uma metodologia exploratória para análise de densidade óssea na mandíbula. Rev Odonto Ciênc. 1995; 20: 29-45.
83. Scheinfeld N. Phenytoin in cutaneous medicine: its uses, mechanisms and side effects. Dermatol Online J. [periodical on line] 2003 [cited 2005 Nov.01]; 9(3):[about 20p.]. Disponível em: <http://dermatology.cdlib.org/93/reviews/dilantin/scheinfeld.html>
84. Silva ARS, Ribeiro ACP, Salzedas LMP, Soubhia AMP, Sundefeld MLMM. Análise da densidade óssea radiográfica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico utilizando imagem digital. Rev Odonto Ciência- Fac Odonto/PUCRS. 2007 jan./mar.; 22(55): 77-81.
85. Souza PHC, Costa NP, Puppim AAC. Análise óptica de densidade óssea retromolar mandibular por meio de imagens digitalizadas, utilizando simuladores de tecidos moles. Rev Odonto Ciênc- Fac Odonto/PUCRS. 1999; 28: 27-53.
86. Spolidorio LC, Gonzaga HFS, Spolidorio DMP. Análise quantitativa dos tecidos gengivais de ratos tratados com fenitoína e ciclosporina. Pesqui Odontol Bras. [periodical on line] 2000 out./dez., [cited 2005 Oct.31]; 14(4)
87. Szejnfeld VL. Osteoporose. Rev Bras Med. 2004[cited 2005 Oct.31] jul.; 61(7): 417-28.

88. Taguchi A, Tanimoto K, Suei Y, Otani K, Wada T. Oral signs as indicators of possible osteoporosis in elderly women. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995, Nov.; 80(5): 612-6.
89. Taguchi A, Tanimoto K, Suei Y, Wada T. Tooth loss and mandibular osteopenia. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995, Jan.; 79(1): 127-32.
90. Takahashi A, Onodera K, Shinoda H, Mayanagi H. Phenytoin and its metabolite, 5-(4-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin, show bone resorption in cultured neonatal mouse calvaria. *Jpn J Pharmacol.* 2000, 82:82-4.
91. Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Periodontal Res.* 2000 Apr.; 37(2):161-5.
92. Tanaka M, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H, Sadakazu E. Long-term changes in trabecular structure of aged rat alveolar bone after ovariectomy. *Oral Maxillofac Radiol.* 2003 Apr.; 95(4): 495-502.
93. Tavano O, Pavan AJ, Silva MJA, Guimarães SAC. Estudo da densidade radiográfica digital do tecido ósseo face ao implante do polímero de mamona em coelhos. *Rev Fac Odontol Bauru.* 1999 jul./dez.; 7(3/4): 53-8.
94. Tunnicliff G. Basis of the antiseizure action of phenytoin. *Gen Pharma.* 1996, 27(7): 1091-7.
95. Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocrine Rev.* 1994, 15(3):275-300.
96. Välimäki MJ, Tiihonen M, Laitinen K, Tähtelä R, Käkkinen M, Lamberg-Allardt C et al. Bone mineral density measured by Dual-Energy X-ray Absorptiometry and novel markers of bone formation and resorption in patient on antiepileptic drugs. *J Bone Min Res.* 1994, 9(5): 631-37.

97. Vanderschueren D, Herck EV, Geusen P, Suikei A, Visser W, Chung K et al. Androgen and deficiency have different effects on the growing skeleton of the rat. *Calcif Tissue Int.* 1994, 55: 198-203.
98. Vanderschueren D, Herck EV, Suiker AMH, Visser WJ, Schot LPC, Bouillon R. Bone and mineral metabolism in aged male rats: short and long term effects of androgen deficiency. *Endocrinology.* 1992; 130(5): 2906-16.
99. Versteeg CH, Sanderink GCH, Van Der Stelt PF. Efficacy of digital intra-oral radiography in clinical dentistry. *J Dent.* 1997, 25(3/4): 215-24.
100. Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Fracture risk associated with use of antiepileptic drugs. *Epilepsia* 2004 Nov.; 45(11): 1330-7.
101. Vieira S. *Introdução à Bioestatística.* Rio de Janeiro: Ed. Campus; 2002. 203 p.
102. Wakley GK, Schutte HD, Hannon KS, Turner RT. Androgen treatment prevents loss of cancellous bone in the orchidectomized rat. *J Bone Min Res.* 1991, 6(4): 325-30.
103. Watanabe PCA, Tanaka EE, Fenyo-Pereira M, Panella J. Estado atual da arte da imagem digital em odontologia. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* 1999 jul./ago.; 53(4): 320-5.
104. Watson EL, Katz RV, Adelezzi R, Gift HC, Dunn SM. The measurement of mandibular cortical bone height in osteoporotic vs non-osteoporotic postmenopausal women. *Spec Care Dent.* 1995, 15(3): 124-8.
105. Werkman C, Senra GS, Rocha RF, Brandão AAH. Comparative therapeutic use of risedronate and calcarea phosphorica- allopathy versus homeopathy: in bone repair in castrated rats. *Bras Oral Res.* 2006, 20(3):196-201.
106. White HS. Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potencial antiepileptic drugs. *Epilepsia.* [periodical on line] 1997 [cited 2007 Feb.12], 38(1): 9-17.

107. White SC. Oral radiographic predictors of osteoporosis. *Dentomaxillofac Radiol.* 2002 Mar.; 31(2): 84-92.
108. Yang J, Farnell D, Devlin H, Horner K, Graham J. The effect of ovariectomy on mandibular cortical thickness in the rat. *J Dent.* 2005 Feb; 33(2): 123-9.
109. Yang J, Pham SM, Crabbe DL. Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture. *Dentomaxillofac Radiol.* 2003, 32: 247-51.

Anexo A – Documento comprobatório da aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 032/2005-PA/CEP, sobre "Análise comparativa entre o grau de osteopenia induzida pela fenitoina e pela castração de ratos machos e fêmeas por meio da avaliação da densidade óptica radiográfica", sob a responsabilidade de CAROLA GOMEZ ÁGREDA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 25 de novembro de 2005



Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Apêndice A

Tabela 8 - Média, variância, erro da média e coeficiente de variação dos dados de densidade óptica segundo as variáveis: tratamento, período de observação e área óssea de análise em ratos machos.

	<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>erro média</i>	<i>Coef Variação(%)</i>
SHAM	MS0m	5	191,8	27,0	2,3	14,1
	MS0d	5	186,0	37,5	2,7	20,1
	MS30m	5	190,9	47,6	3,1	24,9
	MS30d	5	179,6	119,5	4,9	66,6
	MS60m	5	186,9	17,2	1,9	9,2
	MS60d	5	179,8	21,3	2,1	11,8
CASTRADO	MC0m	6	196,0	72,3	3,5	36,9
	MC0d	6	189,7	31,6	2,3	16,7
	MC30m	6	181,2	200,9	5,8	110,9
	MC30d	6	186,3	290,1	7,0	155,7
	MC60m	6	179,6	55,4	3,0	30,8
	MC60d	6	184,7	69,3	3,4	37,5
FENITOÍNA	MF0m	8	199,1	76,4	3,1	38,4
	MF0d	8	200,2	5,3	0,8	2,6
	MF30m	7	187,2	21,8	1,8	11,7
	MF30d	7	184,2	185,3	5,1	100,6
	MF60m	6	182,6	46,4	2,8	25,4
	MF60d	6	136,2	506,9	9,2	372,0

Tabela 9 - Média, variância, erro da média e coeficiente de variação dos dados de densidade óptica segundo as variáveis: tratamento, período de observação e área óssea de análise em ratos fêmeas.

	<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	<i>erro média</i>	<i>Coef Variação(%)</i>
SHAM	FS0m	5	184,2	31,6	2,5	17,2
	FS0d	5	174,3	23,9	2,2	13,7
	FS30m	5	193,0	26,2	2,3	13,6
	FS30d	5	179,5	64,9	3,6	36,2
	FS60m	5	189,4	89,4	4,2	47,2
	FS60d	5	174,5	48,3	3,1	27,7
CASTRADA	FC0m	6	178,5	144,3	4,9	80,8
	FC0d	6	173,4	47,7	2,8	27,5
	FC30m	6	181,8	44,3	2,7	24,4
	FC30d	6	177,6	109,9	4,3	61,9
	FC60m	6	174,7	42,0	2,6	24,0
	FC60d	6	175,9	38,6	2,5	22,0
FENITOÍNA	FF0m	8	194,9	44,2	2,4	22,7
	FF0d	8	181,9	15,1	1,4	8,3
	FF30m	8	190,2	61,3	2,8	32,2
	FF30d	8	180,0	8,2	1,0	4,5
	FF60m	8	178,7	26,6	1,8	14,9
	FF60d	8	125,3	85,2	3,3	68,0

Apêndice B

Massa corpórea (gramas)- Machos

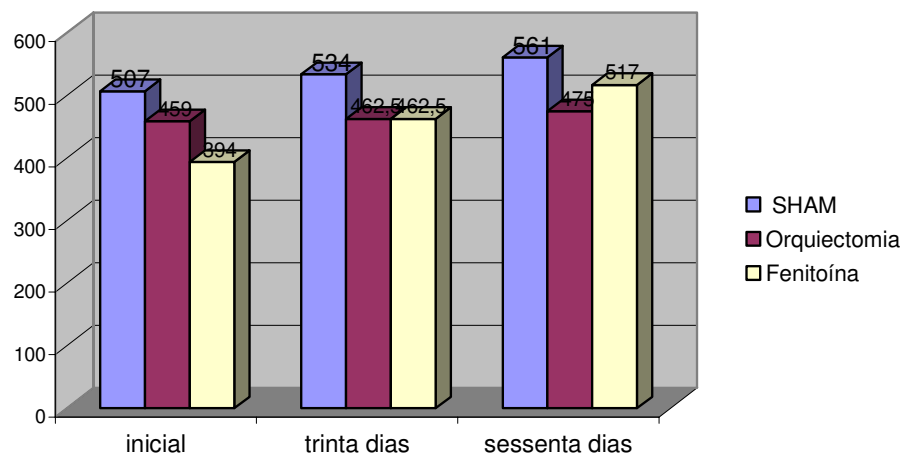


FIGURA 16 – Gráfico das massas corpóreas dos três grupos experimentais em ratos machos.

Massa corpórea (gramas)- Fêmeas

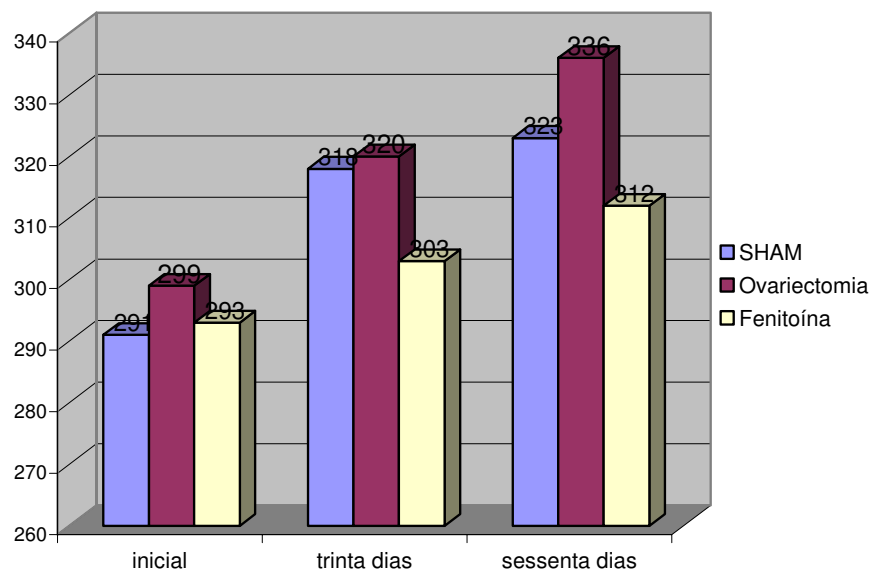


FIGURA 17 – Gráfico das massas corpóreas dos três grupos experimentais em ratos fêmeas.

ÁGREDA, C.G. Comparative analysis through evaluation radiographic optical density between the osteopenia degree induced by phenytoin and hormonal absence of rats [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos. UNESP- São Paulo State University; 2007.

ABSTRACT

The aim of this research was to compare the osteopenia degree induced by phenytoin with the castration in rats for thirty and sixty days. Thirty seven rats were divided into six experimental groups: five Sham female (I); five Sham male (II); six female ovariectomy-operated (III); six male orchidectomy-operated (IV); eight female phenytoin-treated with 5mg/kg/day (V) and seven male phenytoin-treated with 5mg/kg/day. Digital radiographs were taken at baseline, thirty and sixty days from the left tibiae of the all groups. The X-Ray machine used was the 765 DC[®] with 65 kVp, 7mA, 40 cm distance focus- sensor and exposure time of the 0,032s. The direct digital device used was the RVG[®] (Trophy) and the values of the optical density were obtained from metaphysis and diaphysis tibial using the histogram of the software Adobe Photoshop. The measurements were submitted to ANOVA and Tukey test (5%). The results showed no possess statistically significant difference between ovariectomy-treated and orchidectomy-treated groups from osteopenia induced, however, the phenytoin medication indicates this situation in male and female for diaphysis tibial at sixty days.

KEYWORDS: *Digital radiographic; bone diseases; phenytoin.*