

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Ciências de Saúde
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Tese de Doutorado

**Avaliação por microtomografia computadorizada das
alterações da microarquitetura óssea ocorridas em
mandíbula e colo femoral em ratas ovariectomizadas
em uso de Risedronato oral.**

Danielle Leal Vieira

Brasília
Abril/ 2023

Danielle Leal Vieira

**Avaliação por microtomografia computadorizada das alterações da
microarquitetura óssea ocorridas em mandíbula e colo femoral em ratas
ovariectomizadas em uso de Risedronato oral.**

Tese apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Odontologia da Faculdade de
Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília, como
requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Odontologia.

Orientadora: Nilce Santos de Melo

Brasília

Abril/ 2023

Danielle Leal Vieira

Avaliação por microtomografia computadorizada das alterações da microarquitetura óssea ocorridas em mandíbula e colo femoral em ratas ovariectomizadas em uso de Risedronato oral.

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Data da defesa: 28 de abril de 2023.

Banca examinadora:

Profa Dr. Nilce Santos de Melo (Orientadora)

Profa Dr. Fabiana T. Almeida

Profa. Dr Maria Alves Garcia Silva

Profa. Dr Angélica Amorim Amato

Prof. Dr Paulo Tadeu de Souza Figueiredo (Suplente)

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese àqueles que me transformaram, mudaram minha vida, rotina, e minhas prioridades, Helena e Gabriel.

AGRADECIMENTOS

Como sempre agradeço a Deus por me cuidar, proteger e guiar. Agradeço a minha família que desde do início dessa jornada aumentou e se completou dando um novo sentido a minha vida.

Ao meu marido, meu amor, meu parceiro de vida, aquele que sempre esteve ao meu lado, que me incentivou, puxou minha orelha e não me deixou desistir. Aquele que acreditou em mim, muito mais que eu mesma nos últimos anos. Só você sabe as montanhas russas que estamos vivendo nos últimos tempos: desafios, alegrias, superações e transformações. Sorte minha ter você ao meu lado. Obrigada por tudo, te amo!

Aos meus molequinhos, Helena e Gabriel, por me fazerem ser melhor a cada dia, mudarem minha rotina, meu ser acelerado, minhas prioridades e foco. Me mostram a cada final do dia que apesar de todo o cansaço, desafio, doação um sorriso incompleto e outro completinho de dentinhos de leite são a maior recompensa que se pode ter. Gratidão por ter vocês, minhas preciosidades!

Aos meus pais por sempre serem exemplo e incentivo de estudo, dedicação e trabalho. Aos meus irmãos pela parceria de sempre.

A minha orientadora, Nilce, que sempre foi muito mais que orientadora, é exemplo de profissional e pessoa. Obrigada por acolher minhas demandas, ter paciência e carinho, que não foi de mãe, foi de avó. Obrigada por não desistir de mim. Ao meu co-orientador de coração prof André, obrigada por toda a ajuda, orientações e conversa. Prof Paulo e toda a equipe do diagnóstico que fizeram e fazem muita diferença na minha formação. Aos professores que estão compondo essa banca obrigada pela disponibilidade nessa fase final.

Obrigada ao departamento da pós-graduação por todas as orientações e disponibilidade em ajudar. Obrigada aos meus amigos pela parceria e incentivo ao longo de todo esse tempo e as parcerias ao longo dessa caminhada acadêmica.

RESUMO

A osteoporose é a doença óssea metabólica mais comum e é a principal causa de fraturas por fragilidade esquelética. Impacta na saúde individual, saúde pública e nos gastos em saúde em todo o mundo. Desenvolver mecanismos de diagnóstico, prevenção e tratamento são fundamentais, assim como também conhecer e prever seus impactos a longo prazo. Com isso analisar o comportamento das medicações antirreabsortivas amplamente utilizadas para manejo e prevenção da osteoporose na mandíbula elucida possibilidades de rastreamento da doença na odontologia como também analisar que consequências essas medicações podem provocar em procedimentos odontológicos. A utilização de protocolos animais contribui para esse processo de elucidação. Foram utilizados 20 animais fêmeas da linhagem WISTAR, divididos em 4 grupos: Controle (CON), Ovariectomizada (OVX), Ovariectomizada+ Risedronato (ORI), Risedronato (RIS). Foram realizadas microtomografias computadorizadas (micro CT) em tempos distintos: a primeira (T1) animais com 20 semanas de vida e a segunda (T2) animais com 24 semanas de vida, e 4 semanas de uso de Risedronato oral. Foram analisados em ambos os tempos regiões mandíbula e colo femoral. Para todos os dados foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) e foram realizados os testes de Turkey e correlação de Pearson, com significância de 5%. Foi observado em osso trabecular mandibular: todos os grupos apresentaram aumento da espessura trabecular; em OVX redução da densidade mineral óssea (BMD) e volume/área (BV/TV), aumento porosidade (Po) e separação trabecular (TbSp); nos grupos ORI e RIS aumento BMD, TBTh, redução TbSp. Já em osso do femoral: redução de BMD em OVX e aumento em ORI; aumento TBTh em ORI, RIS; aumento de BV/TV em RIS, aumento TbSp em OVX. Quando avaliado o osso cortical de ambos os sítios se observou aumento da separação cortical (CtTh), e em colo femoral redução Po em RIS. Ao teste de Pearson a BMD foi o parâmetro que se observou correlação positiva em relação aos dois sítios. Conclui-se que o Risedronato favoreceu a manutenção da estrutura nos sítios avaliados, impedindo a sua deterioração e que comparar outras regiões da mandíbula podem colaborar para o aumento estatístico da correlação de comportamento de ambos os sítios.

PALAVRAS- CHAVES: Microtomografia computadorizada, Risedronato oral, osteoporose, mandíbula, colo femoral.

ABSTRACT

Osteoporosis is the most common metabolic bone disease and is the leading cause of skeletal fragility fractures. It impacts on individual health, public health and health spending worldwide. Developing diagnostic, prevention and treatment mechanisms are essential, as well as knowing and predicting their long-term impacts. Thus, analyzing the behavior of anti-resorptive medications widely used for the management and prevention of osteoporosis in the mandible elucidates possibilities for tracking the disease in dentistry, as well as analyzing the consequences these medications can cause in dental procedures. The use of animal protocols contributes to this elucidation process. Twenty female animals of the WISTAR strain were used, divided into 4 groups: Control (CON), Ovariectomized (OVX), Ovariectomized + Risedronate (ORI), Risedronate (RIS). Computerized microtomography scans were performed at different times: the first (T1) animals with 20 weeks of life and the second (T2) animals with 24 weeks of life, and 4 weeks of use of oral Risedronate. The mandible and femoral neck regions were analyzed at both times. For all data, the Analysis of Variance (ANOVA) was performed and the Turkey test and Pearson's correlation were performed, with a significance of 5%. It was observed in mandibular trabecular bone: all groups showed increased trabecular thickness; in OVX reduction in bone mineral density (BMD) and volume/area (BV/TV), increased porosity (Po) and trabecular separation (TbSp); in the ORI and RIS groups, BMD increase, TBTh, TbSp reduction. In the femoral bone: reduction of BMD in OVX and increase in ORI; TBTh increase in ORI, RIS; BV/TV increase in RIS, TbSp increase in OVX. When the cortical bone of both sites was evaluated, an increase in cortical separation (CtTh) was observed, and in the femoral neck, a Po reduction in RIS. In Pearson's test, BMD was the parameter with a positive correlation between the two sites. It is concluded that Risedronate favored the maintenance of the structure in the evaluated sites, preventing its deterioration and that comparing other regions of the mandible can collaborate for the statistical increase of the correlation of behavior of both sites.

KEYWORDS: Computed microtomography, oral Risedronate, osteoporosis, mandible, femoral neck.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CON - Grupo controle

OVX- Grupo ovariectomizadas

ORI- Grupo ovariectomizadas+ uso Risedronato

RIS- Grupo Risedronato

micro CT - Microtomografia computadorizada

T1- 1 microtomografia computadorizada após 12 semanas de procedimento cirúrgico

T2- 2 microtomografia computadorizada após 12 semanas de procedimento cirúrgico

BMD- Densidade mineral óssea

BV/TV- Volume/área

Po- Porosidade

TbSp- Separação trabecular

TBTh- Espessura trabecular

TbN- Número de trabéculas

SUMÁRIO

1. Introdução	11
1.1 Revisão da Literatura	11
1.2 Objetivos	14
1.2.1 Objetivo Geral	14
1.2.2 Objetivo Específico	14
1.3 Justificativa	14
2. Materiais e Métodos	16
2.1 Amostra	16
2.2 Cálculo amostral	16
2.3 Cirurgia Ovariectomia	16
2.4 Mensuração utilizando microtomografia computadorizada	17
2.5 Manipulação e administração medicamentosa	20
2.6 Análise estatística	20
3. Resultados	22
3.1 Densidade mineral óssea	25
3.1.1 Osso trabecular mandibular	25
3.1.2 Osso trabecular femoral	25
3.1.3 Osso cortical mandibular	26
3.1.4 Osso cortical femoral	27
3.2 Volume/ área	27
3.2.1 Osso trabecular mandibular	28
3.2.2 Osso trabecular femoral	28
3.2.3 Osso cortical mandibular	29
3.2.4 Osso cortical femoral	29
3.3 Espessura Trabecular	30

3.3.1 Osso trabecular mandibular-----	30
3.3.2 Osso trabecular femoral-----	31
3.3.3 Osso cortical mandibular-----	31
3.3.4 Osso cortical femoral-----	32
3.4 Porosidade -----	33
3.4.1 Osso trabecular mandibular-----	33
3.4.2 Osso trabecular femoral-----	34
3.4.3 Osso cortical mandibular-----	34
3.4.4 Osso cortical femoral-----	35
3.5 Número de trabéculas-----	36
3.5.1 Osso trabecular mandibular-----	36
3.5.2 Osso trabecular femoral -----	36
3.6 Separação trabecular -----	37
3.6.1 Osso trabecular mandibular -----	37
3.6.2 Osso trabecular femoral-----	37
3.7 Análise de correlação -----	39
4. Discussão-----	41
4.1 Limitações do estudo-----	43
4.2 Perspectivas-----	44
5. Conclusões -----	45
6. Referências-----	46
7. Press Release -----	50
8. Anexo-----	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

A osteoporose é a doença óssea metabólica mais comum na população, sendo a principal causa de fraturas por fragilidade esquelética. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) é uma desordem esquelética caracterizada por redução da massa óssea com alterações da microarquitetura do tecido ósseo levando a redução da resistência óssea e ao aumento da suscetibilidade a fraturas ¹. Apresentou uma prevalência em 2017 de 200 milhões de pessoas com o diagnóstico, ou seja, 1 em cada 3 mulheres e 1 em cada 5 homens apresentam a doença².

Há vários fatores que podem contribuir para a patogenia da osteoporose: estilo de vida, fatores genéticos, hormonais e atividade física reduzida são alguns deles. O fator hormonal mais relevante ocorre em mulheres, pós-menopausa, devido a redução da produção de estrogênio levando a uma severa diminuição da densidade mineral óssea ^{3; 4; 5}.

Além disso sua relevância impacta não somente na saúde do indivíduo como também na saúde e políticas públicas ^{6; 7}. Estudos mostram que os custos de tratamento devido a fraturas só aumentam em todo mundo. Na China, o país mais populoso do mundo, a projeção é que alcance uma despesa de 25 bilhões em 2050 ⁸. Nos Estados Unidos as projeções estimam que em 2030 haverá cerca de 3,3 milhões de novos casos de fratura. No Brasil, estimou-se um gasto entre 2008-2010 de mais de 40 milhões de dólares e projeções apresentam para 2040 uma incidência de 198 mil casos/ano ^{9; 10}.

Ter pesquisas que trabalhem em todas as frentes desde a epidemiologia, avaliação de incidência/ prevalência, métodos de rastreamento, análises de comportamento ósseo e suas mudanças de microarquitetura, além de avaliação das terapêuticas a médio e longo prazo são fundamentais para políticas públicas assertivas e resolutivas.

Ainda hoje, o exame padrão ouro para a identificação de indivíduos com riscos de fratura, é densitometria óssea associada ao questionário FRAX, porém outros exames têm sido analisados como possibilidades de rastreamento/diagnóstico¹.

Por definição operacional sugerida indica que valores de densidade óssea inferiores a 2,5 desvios padrão da média de valor de pico em adultos jovens (escore T < -2,5) são compatíveis com o diagnóstico de osteoporose, devido ao risco de fratura. Todavia esse método demonstra falta de sensibilidade e especificidade, uma vez que mostrou incapaz de diferenciar alterações na microestrutura do osso ou da densidade.

A utilização dos métodos como ressonância magnética de estado sólido/ alta resolução de líquido (RM) e tomografia por emissão de pósitrons combinado (PET) podem potencialmente avaliar a biologia óssea e arquitetura, uma vez que se avalia a atividade metabólica através de absorção de traçadores radioativos em tecido e imagem em alta resolução, permitindo o estudo mais aprofundado¹¹.

A utilização de protocolos animais contribui nesse processo de análise. A utilização de ratos para estudo do metabolismo ósseo é possível uma vez que estes apresentam alto grau de conservação de fatores relevantes como moléculas reguladoras, receptores, moléculas secretadas e/ou proteínas.

Considerando a área de interesse do Cirurgião-dentista, há trabalhos que apontam a correlação entre osteoporose, a diminuição da DMO e outros parâmetros em mandíbula de ratas^{3; 12; 13; 14; 15}.

A verificação dessa perda de massa óssea pode ser alcançada com o uso da microtomografia computadorizada¹⁶. Nesse exame, os parâmetros geométricos ósseos, tanto corticais quanto trabeculares, podem ser detectados^{12; 17; 18}.

Jeong-Hee Lee et al.¹⁹, realizaram uma revisão sistemática sobre as mudanças encontradas na microarquitetura óssea de ratas ovariectomizadas e concluíram que há mudança no osso mandibular. Além disso, sugeriram como protocolo padrão para indução de osteoporose através da ovariectomia: animais

com mais de 12 semanas de idade, a região de interesse mandibular selecionada ser o septo intraradicular do 1 molar e um período de observação mínimo para que haja mudanças, superior a 8 semanas.

Entretanto apesar de estudos mostrarem alterações na mandíbula em ratas induzidas a osteoporose, com limitação da heterogeneidade dos trabalhos, também se observa poucos estudos que verificam o efeito de medicações que tratam a osteoporose nesse sítio^{20; 21}.

Há uma diversidade de medicações antirreabsortivas, com diversas apresentações, vias de administração e efeitos colaterais. Elucidar o comportamento delas e seus benefícios e malefícios a longo prazo pode ser um fator determinante na escolha da droga e seu sucesso a longo prazo ao risco de fraturas e com menos efeitos adversos/ colaterais.

Os bisfosfonatos (BF) são medicamentos de escolha para o tratamento da osteoporose. Eles são compostos sintéticos com estrutura química semelhante ao de pirofosfato inorgânico, um endógeno regulador de mineralização óssea²². São divididos em duas classes, de acordo com sua composição química estrutural e mecanismo de ação. Os BF nitrogenados (pamidronato, zoledronato, alendronato, risedronato) são inibidores significativamente mais potentes por aderirem mais fortemente a hidroxiapatita do osso²³.

O risedronato é um BF com administração oral, encontrada no mercado com 2 posologias, 5mg e 35 mg, amplamente utilizada no Brasil. No Sistema Público de Saúde Brasileiro (SUS), o risedronato se encontra disponível nas farmácias de Alto custo na posologia 35mg, há mais de 10 anos, sendo este e o alendronato orientado a ser o tratamento preferencial juntamente com cálcio e vitamina D para prevenção/ tratamento da Osteoporose para população em geral²⁴.

Na odontologia, avaliar as alterações microestruturais presentes em pacientes que usam essas medicações podem contribuir para decisão de conduta sobre procedimentos de intervenção e elucidar a fisiopatologia das osteonecroses, por exemplo.

Com isso, verificar as possíveis alterações microestruturais óssea mandibular e suas possíveis correlações de comportamento com outros sítios ósseos contribui para fortalecer as evidências do uso da mandíbula como possível osso para rastreamento da osteoporose, como também elucidar e entender os efeitos da medicação nesse osso tão importante para a odontologia.

1.2) OBJETIVOS

1.2.1 Geral

Avaliar em um modelo animal as alterações microestruturais da mandíbula e colo de fêmur em ratas que utilizaram como tratamento o antirreabsortivo, risedronato oral.

1.2.2 Específicos

- Verificar quais mudanças microestruturais aconteceram nos dois sítios;
- Avaliar os parâmetros: densidade mineral óssea (BMD), volume/ área (BV/TV), espessura trabecular (TBTh), separação trabecular (TbSp), número de trabéculas (TbN), porosidade (Po) em osso trabecular;
- Avaliar os parâmetros: densidade mineral óssea (BMD), volume/ área (B.ar/Tar), espessura trabecular (CtTh), porosidade (Po) em osso cortical;
- Verificar se há correlação nos parâmetros a serem avaliados nos dois sítios;

1.3 JUSTIFICATIVA

Analisar as mudanças na microestrutura óssea dos ossos de atuação odontológica são importantes para fortalecer as evidências que a mandíbula pode ser utilizada para rastreamento da osteoporose, como também verificar as mudanças provocadas pelo risedronato nesse sítio contribuindo para elucidação e cuidados em relação ao manejo de procedimentos/ patologias orais em pacientes em uso desta medicação.

Para isso, nos propusemos a avaliar em um modelo animal as alterações microestrutural da mandíbula e colo de fêmur em ratas que utilizaram como tratamento antirreabsortivo o risedronato oral e verificar se há correlação de comportamento nesses dois sítios e quais mudanças microestruturais são verificadas uma vez que o colo femoral é um dos ossos de escolha padrão para análise de risco de fratura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

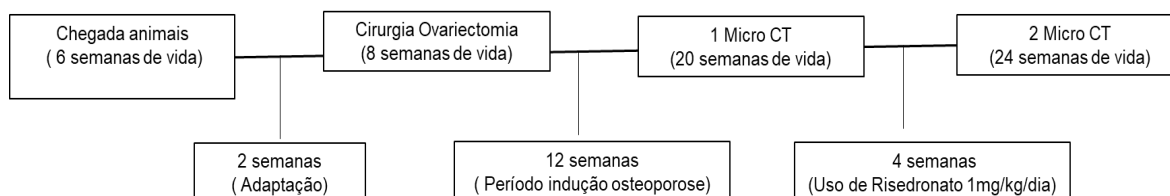
2.1 Amostra

A amostra foi composta de 20 fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) catalogadas no banco de dados do nosso grupo de estudo nos últimos anos. Foram utilizados 5 animais de cada grupo, sendo estes: grupo CON (sem nenhuma intervenção); grupo OVX (ratas ovariectomizadas); grupo RIS (ratas sem intervenção cirúrgica com uso de risedronato); grupo ORI (ratas com intervenção cirúrgica e uso de uso de risedronato).

Os animais apresentavam o peso entre 240- 270g (oito semanas de vida). Os animais foram alocados no Biotério de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília e climatizados por duas semanas, antes do início do experimento. (Figura 1)

Os animais foram aleatoriamente distribuídos de acordo com a data de chegada, em caixas de polipropileno com tampa zincada, mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12h (ciclo claro com início às 7:00h AM), em temperatura média de $23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ e com acesso à ração e água à vontade.

Figura 1- Etapas experimento



2.2 Cálculo Amostral

O cálculo amostral foi realizado no programa GPower 3.19, assumindo um poder de análise de 0.94, erro tipo I de 0.05 e um tamanho de efeito de 0.40 em uma distribuição do tipo F para efeitos fixos, serão utilizadas 24 ratas, com 8 semanas de idade (230-250 g) da linhagem wistar, sendo 8 animais por grupo.

2.3 Cirurgia Ovariectomia

A cirurgia de ovariectomia ocorreu na oitava semana de vida dos animais. Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina 10% e sedados

com xilazina 2% (doses de 90 e 15mg/Kg respectivamente) aplicados por via intramuscular com agulha hipodérmica 0,30x 13mm.

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

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

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

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

2.4 Mensuração utilizando microtomografia computadorizada (μ CT)

O aparelho utilizado foi Skyscan 1076 in-vivo micro-CT Bruker Micro-CT, seguindo os parâmetros: 100Kv, 100 μ A, resolução voxel 18, filtro Alumina 1.0mm (dia zero do experimento). O protocolo sedativo utilizado foi o cloridrato de quetamina 10% e xilazina 2% (doses de 90 e 15mg/ Kg respectivamente) aplicados por via intramuscular com agulha hipodérmica 0,30 X 13mm.

A aquisição das imagens ocorreu em dois tempos distintos (T1 e T2). A primeira aquisição ocorreu com os animais com 20 semanas de vida, ou seja após a décima segunda semana pós-cirurgia já que trabalhos apontam já ocorrer alterações na microarquitetura óssea pós ovariectomia^{14; 25; 26}. A segunda aquisição ocorreu com os animais com 24 semanas de vida, após os grupos ORI e RIS receberem o Risedronato por 4 semanas.

Mandíbula e colo do fêmur foram escaneados em sequência. As imagens obtidas foram reconstruídas através do software do próprio equipamento NRecon Reconstruction. Após essa etapa os arquivos foram manipulados no software DataViewer, onde foram rotacionadas as imagens de mandíbula, fazendo que ficassem paralelas ao longo eixo do dente referente ao lado direito, padronizando a posição da amostra (Figura 2). O mesmo foi feito com o fêmur para posicionar de maneira que se conseguisse obter o corte do colo do femoral (Figura 3).

Figura 2- Posicionamento mandíbula DataViewer

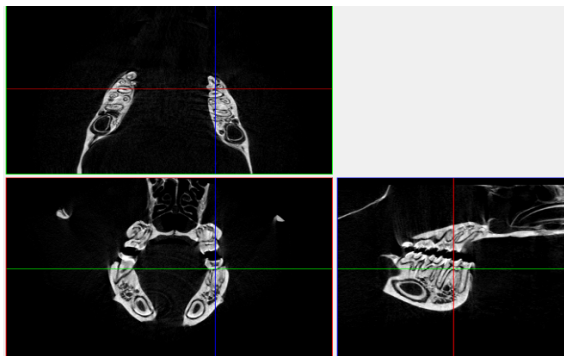
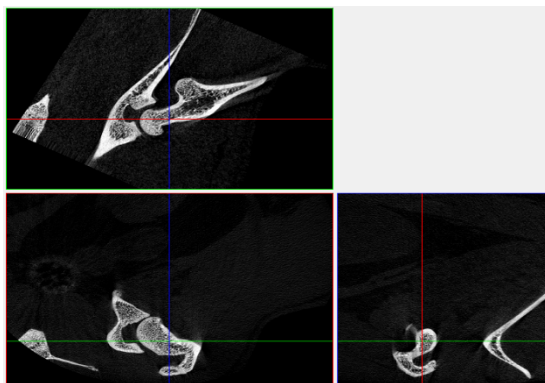
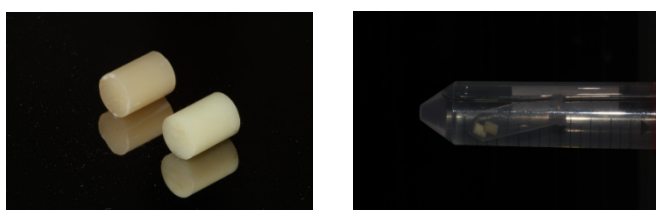


Figura 3 - Posicionamento colo femoral DataViewer



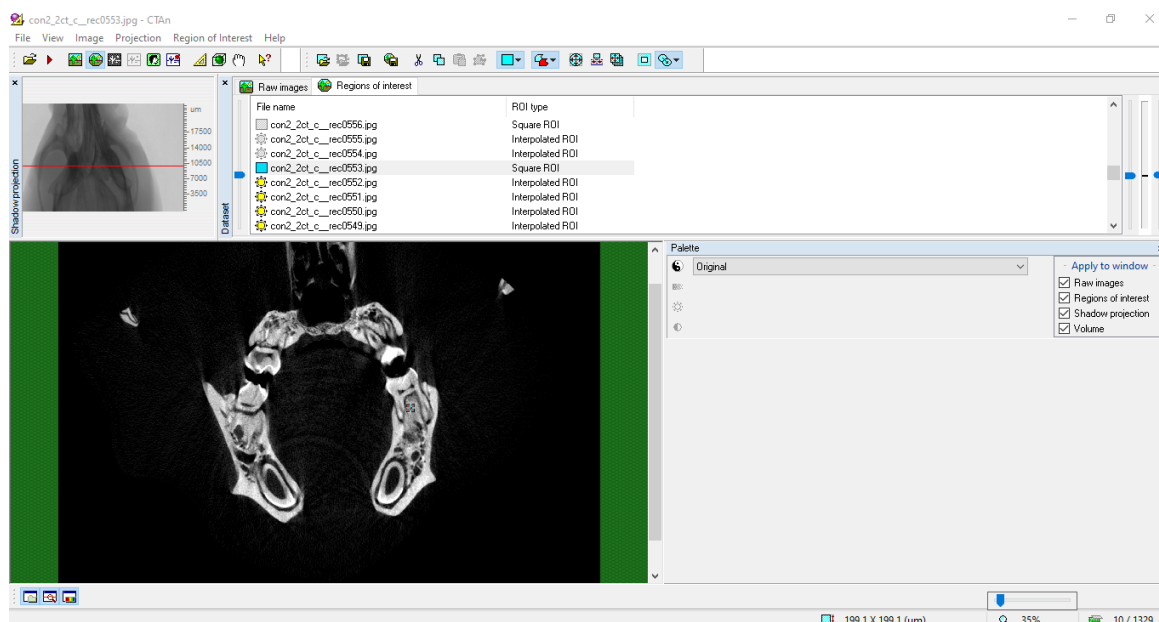
Após a rotação das imagens foi utilizado o software CT analyser (CtAn) para mensurar a densidade e morfologia óssea da mandíbula e colo femoral. Para calibração da densidade é utilizado padrões de hidroxiapatita, “phantom”, com os valores padrões de 0,75 e 0,25 g/cm² (Figura 4).

Figura 4 – “Phantom” com os padrões



A região de interesse (ROI) foi determinada de acordo com o consenso na literatura em relação a mandíbula região entre as raízes do primeiro molar, diâmetro de 200x200 µm, forma quadrada, selecionando 10 imagens de interesse por animal (Figura 5)¹⁹.

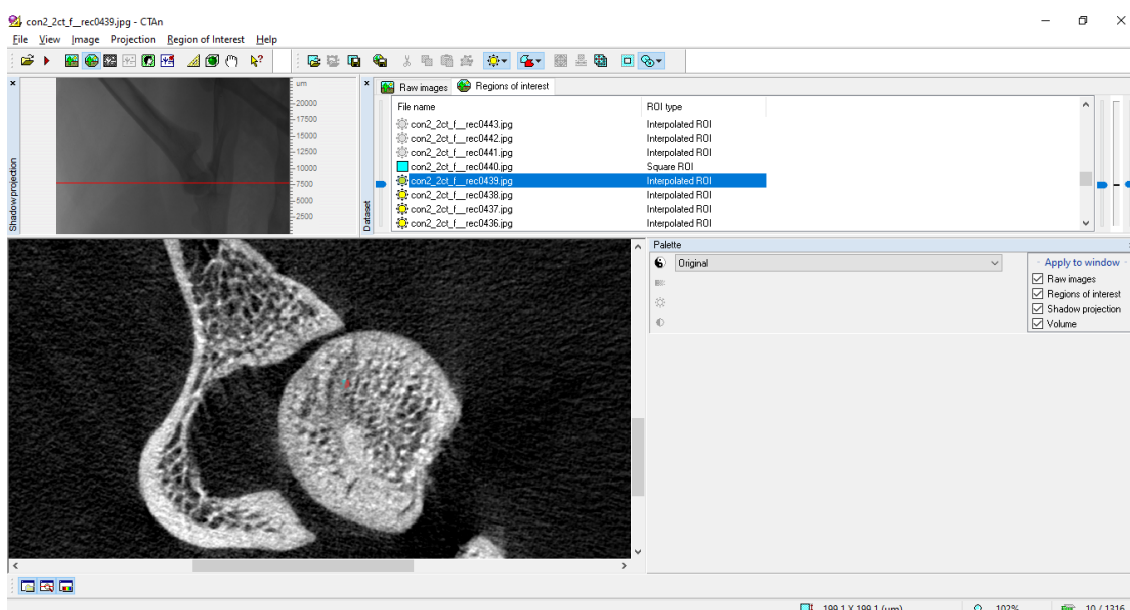
Figura 5– Tela software CTAn- mandíbula



O ROI utilizado na cabeça do fêmur foi a região central da cabeça, diâmetro de 200x200 µm, forma quadrada, selecionando 10 imagens de interesse por animal (Figura 6).

Os parâmetros avaliados no osso trabecular foram: densidade mineral óssea (BMD), volume/ área (BV/TV), espaço trabecular (TBTh), separação trabecular (TbSp), número de trabéculas (TbN), porosidade (Po) em osso trabecular; já no osso cortical: densidade mineral óssea (DMO), volume/área (B.ar/Tar), espaço trabecular (CtTh), porosidade (Po) em osso cortical;

Figura 6 – Tela software CTAn - colo femoral



2.5 Manipulação e administração medicamentosa

Foi utilizado o Risedronato na posologia de 5mg na dosagem de 1 mg/kg/dia por 4 semanas. Seu fracionamento foi realizado diariamente minutos antes de sua administração devido a estabilidade medicamentosa e diluída ao soro para a realização da gavagem oral. Os grupos não- medicamentosos receberam apenas soro fisiológico para simular igualmente o possível estresse do uso da medicação. Todos os animais também tinham sua dieta retirada 4 horas antes da administração da medicação sendo a mesma retornada após 2 horas da ingestão da medicação.

2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software SPSS (versão 24.0, SPSS Inc., Chicago, EUA). As análises foram realizadas considerando os fatores grupo

animal (CON, OVX, ORI, RIS) e tempo de análise (1º e 2º micro CT). Para todos os dados, foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) medidas repetidas dois fatores (grupo de animal e tempo), seguido do teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

A correlação de Pearson foi realizada para verificar a relação entre as análises de correlação das comparações entre os valores médios dos marcadores avaliados para trabecular mandibular e femoral e para cortical mandibular e femoral, com significância de 5%.

3. RESULTADOS

Foram analisados seis parâmetros referentes ao osso trabecular: BMD, BV/TV, TBTh, TbN, TbSp, Po e quatro parâmetros ao osso cortical: BMD, B.Ar/tar, CtTh, Po. A maior parte dos trabalhos encontrados apenas analisam osso trabecular, pois é o primeiro a apresentar mudanças na sua arquitetura. Neste trabalho optamos por analisar osso cortical também, para verificar se com o tempo de análise desse experimento poderiam ocorrer alterações nas corticais, já que no tempo T2 nossos animais, estavam com 24 semanas de vida. Além de verificar se o Risedronato promove alterações nos dois tipos ósseos: trabecular e cortical num período de uso de 4 semanas.

Tabela 1- Valores médios (desvio padrão) do osso trabecular mandibular para os grupos analisados, de acordo com o tempo.

Osso trabecular- MANDIBULA			
Micros- CT			
Parâmetro	Grupo	T1	T2
BMD	CON	0,96 (0,15) Aa	1,12 (0,16) Aa
	OVX	0,89 (0,16) Aa	0,90 (0,06) Ba
	ORI	0,89 (0,11) Ab	1,10 (0,12) Aa
	RIS	0,95 (0,07) Ab	1,18 (0,06) Aa
BV/TV	CON	88,50 (11,70) Aa	93,11 (10,53) ABa
	OVX	91,92 (14,15) Aa	81,75 (19,55) Bb
	ORI	90,52 (9,32) Aa	97,11 (4,66) Aa
	RIS	97,88 (3,26) Aa	100,00 (0,0) Aa
TBTh	CON	140,75 (26,89) Ab	206,72 (7,81) Aa
	OVX	158,07 (26,48) Ab	188,37 (35,38) Aa
	ORI	133,11 (38,24) Ab	209,53 (9,52) Aa
	RIS	164,53 (6,88) Ab	205,06 (23,66) Aa
Po	CON	11,50 (11,70) Aa	6,89 (10,53) ABa
	OVX	8,08 (14,15) Ab	18,25 (19,55) Aa
	ORI	9,48 (9,32) Aa	2,89 (4,66) Ba
	RIS	1,92 (3,37) Aa	0,00 (0,00) Ba
TbN	CON	0,0063 (0,0005) ABa	0,0045 (0,0004) Ab
	OVX	0,0058 (0,0007) Ba	0,0044 (0,0008) Ab
	ORI	0,0072 (0,0017) Aa	0,0046 (0,0001) Ab
	RIS	0,0060 (0,0001) Aba	0,0049 (0,0007) Aa
TbSp	CON	35,79 (32,81) Ab	78,62 (13,88) ABa
	OVX	38,51 (26,11) Ab	97,28 (34,08) Aa
	ORI	42,22 (8,21) Aa	43,45 (39,67) Ba
	RIS	36,21 (0,00) Aa	0,00 (0,00) Cb

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e letra minúscula na linha não diferem ao nível de 5% de significância ($P < 0.05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 2- Valores médios (desvio padrão) do osso trabecular femoral para os grupos analisados, de acordo com o tempo.

OssO trabecular- COLO FEMORAL				
Micros- CT				
Parâmetro	Grupo	T1		T2
BMD	CON	0,83 (0,03)	Aba	0,86 (0,08) Aa
	OVX	0,85 (0,05)	Aba	0,79 (0,05) Ba
	ORI	0,78 (0,06)	Bb	0,88 (0,02) Aa
	RIS	0,91 (0,15)	Aa	0,91 (0,05) Aa
BV/TV	CON	71,05 (16,15)	Aba	79,95 (11,59) ABa
	OVX	79,04 (12,34)	Aa	71,64 (17,78) Ba
	ORI	52,87 (16,24)	Ba	70,48 (11,94) Ba
	RIS	65,67 (26,45)	ABb	90,20 (6,86) Aa
TBTh	CON	100,53 (22,00)	Ab	132,64 (7,93) Ba
	OVX	105,39 (24,91)	Aa	130,19 (17,69) Ba
	ORI	77,44 (18,44)	Ab	126,93 (7,79) Ba
	RIS	90,12 (23,58)	Ab	158,83 (24,16) Aa
Po	CON	28,95 (16,15)	Aba	20,05 (11,59) ABa
	OVX	21,04 (12,34)	Ba	28,36 (17,78) Aa
	ORI	47,13 (16,24)	Aa	29,52 (11,94) Aa
	RIS	35,12 (25,84)	Aba	9,79 (6,86) Bb
TbN	CON	0,0071 (0,0005)	Aa	0,0060 (0,0006) Ab
	OVX	0,0076 (0,0009)	Aa	0,0055 (0,0009) Ab
	ORI	0,0068 (0,0007)	Aa	0,0055 (0,0007) Ab
	RIS	0,0070 (0,0018)	Aa	0,0058 (0,0007) Ab
TbSp	CON	69,40 (20,36)	Aa	81,91 (13,26) Aa
	OVX	54,55 (14,40)	Ab	79,14 (15,04) Aa
	ORI	77,27 (18,18)	Aa	89,90 (26,37) Aa
	RIS	69,90 (35,31)	Aa	72,42 (0,00) Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e letra minúscula na linha não diferem ao nível de 5% de significância ($P < 0.05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 3- Valores médios (desvio padrão) do osso cortical mandibular para os grupos analisados, de acordo com o tempo.

Osso cortical- MANDIBULA			
Parâmetro	Grupo	Micros- CT	
		T1	T2
BMD	CON	1,40 (0,07) Aa	1,49(0,04) Aa
	OVX	1,22 (0,15) Aa	1,42 (0,12) Aa
	ORI	1,37 (0,14) Aa	1,35 (0,10) Aa
	RIS	1,22 (0,26) Aa	1,27 (0,09) Aa
BAr/Tar	CON	100,00 (0,00) Aa	100,00 (0,00) Aa
	OVX	100,00 (0,00) Aa	100,00 (0,00) Aa
	ORI	100,00 (0,00) Aa	100,00 (0,00) Aa
	RIS	94,07 (13,25) Aa	100,00 (0,00) Aa
CtTh	CON	169,55 (0,002) Ab	215,64 (0,000) Aa
	OVX	169,55 (0,001) Ab	215,64 (0,000) Aa
	ORI	169,55 (0,000) Ab	215,64 (0,000) Aa
	RIS	142,88 (59,64) Ab	198,34 (38,68) Aa

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e letra minúscula na linha não diferem ao nível de 5% de significância ($P < 0.05$) pelo teste de Tukey

Tabela 4 - Valores médios (desvio padrão) do osso cortical femoral para os grupos analisados, de acordo com o tempo.

Osso cortical- COLO FEMORAL			
Parâmetro	Grupo	Micros- CT	
		T1	T2
BMD	CON	1,14 (0,10) Aa	1,19 (0,16) Aa
	OVX	1,09 (0,14) Aa	1,11 (0,11) Aa
	ORI	1,13 (0,16) Aa	1,17 (0,06) Aa
	RIS	1,13 (0,16) Aa	1,15 (0,07) Aa
BAr/Tar	CON	99,99 (0,09) Aa	100,00 (0,00) Aa
	OVX	99,71 (0,28) Aa	81,0 (40,00) Aa
	ORI	97,34 (4,61) Aa	99,96 (0,08) Aa
	RIS	99,95 (0,04) Aa	99,95 (0,11) Aa
CtTh	CON	154,53 (30,87) Ab	215,66 (0,06) Aa
	OVX	170,93 (0,55) Ab	209,09 (14,06) Aa
	ORI	142,30 (40,04) Ab	215,17 (0,71) Aa
	RIS	169,02 (1,27) Ab	215,64 (0,01) Aa
Po	CON	0,04 (0,09) Aa	0,00 (0,00) Ba
	OVX	0,29 (0,27) Aa	1,00 (1,18) Aa
	ORI	2,66 (4,61) Aa	0,04 (0,08) Bb
	RIS	0,16 (0,28) Aa	0,05 (0,11) Ba

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e letra minúscula na linha não diferem ao nível de 5% de significância ($P < 0.05$) pelo teste de Tukey

3.1 DENSIDADE MINERAL ÓSSEA

3.1.1 Osso trabecular mandibular

A análise foi realizada intra/entre grupos para os diversos parâmetros. Por meio da Tabela 5, é possível observar que o fator grupo ($p = 0,007$) e tempo de análise ($p = 0,002$) interferiram significativamente nos valores de BMD (g/cm^2) do osso trabecular mandibular. No tempo final, o grupo OVX apresentou valor significativamente menor quando comparado aos demais grupos. Houve um aumento significativo nos valores no tempo final para os grupos ORI e RIS, Tabela 1.

Tabela 5- Análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do BMD (g/cm^2) do osso trabecular mandibular para os grupos analisados.

Fatores de Variação	SS	df	MS	F	P
Grupos	0,168	3	0,056	5,891	0,007*
Entre amostras	0,152	16	10		
Tempo	0,241	1	0,241	13,087	0,002*
Grupos x Tempo	0,072	3	0,024	1,306	0,307
Intra amostras	0,295	16	0,018		

* $P < 0,05$ denota diferença estatística significativa.

3.1.2 Osso trabecular colo femoral

Quando comparados os dois tempos observa-se que não tem diferença significativa da mudança de densidade mineral óssea ($p = 0,103$), tabela 6. No tempo final, o grupo OVX apresentou valor significativamente menor quando comparado aos demais grupos, mostrando mais evidente o efeito da osteoporose com o tempo. Já o aumento de ORI se deve a intervenção medicamentosa e seus benefícios na densidade, tabela 2.

Tabela 6. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do BMD (g/cm²) do osso trabecular femoral para os grupos analisados.

Fatores de Variação	SS	df	MS	F	P
Grupos	0,051	3	0,017	3,006	0,061
Entre amostras	0,090	16	6		
Tempo	0,004	1	0,004	0,826	0,377
Grupos x Tempo	0,036	3	0,012	2,431	0,103
Intra-amostras	0,080	16	0,005		

*P<0.05 denota diferença estatística significativa.

3.1.3 Osso cortical mandibular

Observa-se que não houve mudanças nos valores de BMD quando avaliado fator grupo x tempo, tabela 7, e não havendo diferença entre os grupos, tabela 3.

Tabela 7. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do BMD (g/cm²) do osso cortical mandibular para os grupos analisados.

Fatores de Variação	SS	Df	MS	F	P
Grupos	4365,821	3	1455,27	1,00	0,41
			4	9	5
Entre amostras	23084,183	1	1442,76		
		6	1		
Tempo	1458,467	1	1458,46	1,00	0,33
			7	9	0
Grupos x Tempo	4319,237	3	1439,74	0,99	0,42
			6	6	0
Intra amostras	23126,689	1	1445,41		
		6	8		

*P<0.05 denota diferença estatística significativa

3.1.4 Osso cortical colo femoral

Observa-se que não houve mudanças nos valores de BMD quando avaliado fator grupo x tempo, tabela 8, e não havendo diferença entre os grupos, tabela 4.

Tabela 8. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do BMD (g/cm²) do osso cortical femoral para os grupos analisados.

Fatores de Variação	SS	df	MS	F	P
Grupos	23	3	0,008	0,988	0,423
Entre amostras	0,124	16	8		
Tempo	0,011	1	0,011	0,444	0,515
Grupos x Tempo	0,001	3	0	0,017	0,997
Intra amostras	0,391	16	24		

*P<0.05 denota diferença estatística significativa.

3.2 Volume/ área

Quando foi analisado o fator grupo x tempo observou-se mudança significativa dos valores em osso trabecular ($p = 0,038$), Tabela 9.

Tabela 9. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do BV/TV (%) do osso trabecular mandibular para os grupos analisados.

Fatores de Variação	SS	df	MS	F	P
Grupos	781,450	3	260,483	1,318	0,303
Entre amostras	3162,364	16	197,648		
Tempo	6,184	1	6,184	0,156	0,698
Grupos x Tempo	425,292	3	141,764	3,568	0,038*
Intra amostras	635,781	16	39,736		

*P < 0.05 denota diferença estatística significativa.

3.2.1 Osso trabecular mandibular

No tempo T2, todos os grupos apresentaram aumento dos valores de volume/ área provavelmente se deve pela maturidade óssea adquirida com acréscimo de 4 semanas de análise, porém o grupo OVX como esperado foi o grupo que apresentou menor valor de percentual, dando diferença estatística quando comparado com os grupos ORI e RIS, Tabela 1, mostrando que a redução de estrógeno decorrente da ovariectomia, sem intervenção medicamentosa altera esse parâmetro.

3.2.2 Osso trabecular femoral

Na tabela 10, é possível observar que a interação entre o fator grupo e tempo de análise não interferiu significativamente nos valores de BV/TV (%) do osso trabecular femoral ($p = 0,203$). No tempo final, os grupos OVX e ORI apresentaram valores significativamente menores que o do grupo RIS. Houve um aumento significativo nos valores no tempo final para o grupo RIS (Tabela 2).

Tabela 10. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do BV/TV (%) do osso trabecular femoral para os grupos analisados.

Fatores de Variação	SS	Df	MS	F	P
<i>Grupos</i>	1637,693	3	545,898	2,392	0,107
<i>Entre amostras</i>	3651,005	16	228,188		
<i>Tempo</i>	1190,336	1	1190,336	4,312	0,054
<i>Grupos x Tempo</i>	1424,877	3	474,959	1,720	0,203
<i>Intra amostras</i>	4417,031	16	276,064		

* $P < 0.05$ denota diferença estatística significativa.

3.2.3 Osso cortical mandibular

Na Tabela 11, é possível observar que a interação entre o fator grupo e tempo de análise não interferiu significativamente nos valores de B.Ar/Tar (%) do osso cortical mandibular ($p = 0,418$), não havendo diferenças entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 11. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do B.Ar/Tar (%) do osso cortical mandibular para os grupos analisados.

Fatores de Variação	de	SS	df	MS	F	P
Grupos		65,863	3	21,954	1,000	0,418
Entre amostras		351,270	16	21,954		
Tempo		21,954	1	21,954	1,000	0,332
Grupos x Tempo		65,863	3	21,954	1,000	0,418
Intra amostras		351,270	16	21,954		

* $P < 0.05$ denota diferença estatística significativa.

3.2.4 Osso cortical femoral

Na Tabela 12, é possível observar que a interação entre o fator grupo e tempo de análise não interferiu significativamente nos valores de B.Ar/Tar (%) do osso cortical femoral ($p = 0,338$), não havendo diferenças entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 12. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do B.Ar/Tar (%) do osso cortical femoral para os grupos analisados.

Fatores de Variação	SS	Df	MS	F	P
Grupos	642,671	3	214,224	1,051	0,397
Entre amostras	3262,718	16	203,920		
Tempo	161,026	1	161,026	0,800	0,384
Grupos x Tempo	731,809	1	243,936	1,211	0,338
Intra amostras	3222,422	16	201,401		

*P<0.05 denota diferença estatística significativa.

3.3 Espessura Trabecular

3.3.1 Osso trabecular

Na Tabela 13, é possível observar que o fator tempo interferiu significativamente nos valores de TBTh (mm³) do osso trabecular mandibular (p < 0,001), com aumento significativo nos valores no tempo final para todos os grupos (Tabela 1). Provavelmente pelo tempo de envelhecimento dos animais o parâmetro espessura teve esse aumento independente de grupo.

Tabela 13. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do TBTh (mm³) do osso trabecular mandibular para os grupos analisados.

Fatores de Variação	SS	Df	MS	F	P
Grupos	1119,687	3	373,229	0,47 4	0,705
Entre amostras	12608,675	1 6	788,042		
Tempo	28410,766	1	28410,766	65,1 48	<0,001*
Grupos x Tempo	3468,467	3	1156,156	2,65 1	0,084
Intra amostras	6977,496	1 6	436,093		

*P<0.05 denota diferença estatística significativa

3.3.2 Osso trabecular colo femoral

Na Tabela 14, é possível observar que o fator tempo interferiu significativamente nos valores de TBTh (mm^3) do osso trabecular femoral ($p < 0,001$). No tempo final, o grupo RIS teve resultado significativamente maior que os demais grupos. Houve um aumento significativo nos valores no tempo final para todos os grupos, exceto OVX (Tabela 2).

Tabela 14. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do TBTh (mm^3) do osso trabecular femoral para os grupos analisados.

Fatores de Variação	SS	Df	MS	F	P
Grupos	2640,414	3	880,138	2,590	0,089
Entre amostras	5437,893	1 6	339,868		
Tempo	19164,214	1	19164,21 4	46,14 5	<0,001*
Grupos x Tempo	2876,567	3	958,856	2,309	0,115
Intra amostras	6644,898	1 6	415,306		

* $P < 0,05$ denota diferença estatística significativa.

3.3.3 Osso cortical mandibular

Na Tabela 15, é possível observar que o fator tempo de análise interferiu significativamente nos valores de CtTh (mm) do osso cortical mandibular ($p < 0,001$). Houve aumento significativo nos valores no tempo final para todos os grupos (Tabela 3).

Tabela 15. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do CtTh (mm) do osso cortical mandibular para os grupos analisados.

Fatores de Variação	SS	Df	MS	F	P
Grupos	3625,062	3	1208,354	2,479	0,098
Entre amostras	7798,749	16	487,422		
Tempo	23456,833	1	23456,833	30,236	< 0,001*
Grupos x Tempo	164,649	3	54,883	0,071	0,975
Intra amostras	12412,552	16	775,785		

*P<0.05 denota diferença estatística significativa.

3.3.4 Osso cortical colo femoral

Na Tabela 16, é possível observar que o fator tempo de análise interferiu significativamente nos valores de CtTh (mm) do osso cortical femoral ($p < 0,001$). Houve aumento significativo nos valores no tempo final para todos os grupos (Tabela 4). A maior maturidade óssea deve ser considerada.

Tabela 16. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do CtTh (mm) do osso cortical femoral para os grupos analisados.

Fatores de Variação	SS	df	MS	F	P
Grupos	1084,741	3	361,580	1,038	0,403
Entre amostras	5575,554	16	348,472		
Tempo	29918,564	1	29918,564	87,803	< 0,001*
Grupos x Tempo	1776,366	3	592,122	1,738	0,200
Intra amostras	5451,940	16	340,746		

*P<0.05 denota diferença estatística significativa.

3.4 Porosidade

3.4.1 Osso trabecular mandibular

Na Tabela 17, é possível observar que a interação entre o fator grupo e tempo de análise interferiu significativamente nos valores de PO(total) do osso trabecular mandibular ($p = 0,038$). No tempo final, os grupos ORI e RIS apresentaram valores significativamente menores que o grupo OVX. Houve aumento significativo no valor no tempo final para o grupo OVX (Tabela 1)

Tabela 17. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do PO(tot)% do osso trabecular mandibular para os grupos analisados.

Fatores de Variação	SS	Df	MS	F	P
Grupos	794,013	3	264,671	1,339	0,297
Entre amostras	3163,451	16	197,716		
Tempo	5,437	1	5,437	0,137	0,717
Grupos x Tempo	424,215	3	141,405	3,550	0,038*
Intra amostras	637,291	16	39,831		

*P<0.05 denota diferença estatística significativa.

3.4.2 Osso trabecular colo femoral

Na Tabela 18, é possível observar que o fator tempo de análise ($p = 0,049$) interferiu significativamente nos valores de PO(tot)% do osso trabecular femoral. No tempo inicial, o grupo OVX teve resultado significativamente menor que o grupo ORI. No tempo final, o grupo RIS teve valor significativamente menor que os grupos OVX e ORI. Houve diminuição significativa nos valores no tempo final para o grupo RIS (Tabela 2).

3.4.3 Osso cortical mandibular

Os valores de PO (tot)% do osso cortical mandibular foram de 0 para todos os grupos e períodos. Não sendo observado nenhuma alteração desse parâmetro.

Tabela 18. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do PO(tot)% do osso trabecular femoral para os grupos analisados.

Fatores de Variação	de	SS	Df	MS	F	P
Grupos		1594,109	3	531,370	2,394	0,106
Entre amostras		3551,059	16	221,941		
Tempo		1238,999	1	1238,999	4,517	0,049*
Grupos x Tempo	x	1471,763	3	490,588	1,789	0,190
Intra amostras		4388,470	16	274,279		

*P<0.05 denota diferença estatística significativa.

3.4.4 Osso cortical colo femoral

O osso cortical femoral, na Tabela 19, é possível observar que a interação entre o fator grupo e tempo de análise não interferiu significativamente nos valores de PO (tot)% do osso cortical femoral ($p = 0,178$). No tempo final, o grupo OVX teve resultado significativamente maior que os demais grupos. Houve diminuição significativa no valor no tempo final para o grupo ORI (Tabela 4).

Tabela 19. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do PO(tot)% do osso cortical femoral para os grupos analisados.

Fatores de Variação	de	SS	Df	MS	F	P
Grupos		11,254	3	3,751	1,307	0,307
Entre amostras		45,930	16	2,871		
Tempo		2,670	1	2,670	0,937	0,347
Grupos x Tempo		15,860	3	5,287	1,856	0,178
Intra amostras		45,578	16	2,849		

*P<0.05 denota diferença estatística significativa.

3.5 Número de trabéculas

3.5.1 Osso trabecular mandibular

Observa-se que o fator tempo de análise ($p < 0,001$) interferiu significativamente nos valores de TbN (1/mm) do osso trabecular mandibular, tabela 19. Houve diminuição significativa nos valores no tempo final para todos os grupos, exceto RIS (Tabela 1). Com a maturidade óssea, o número de trabéculas se reduziu, entretanto, a espessura delas teve um aumento. Indicando uma mudança do padrão microestrutural.

Tabela 19. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do TbN (1/mm) do osso trabecular mandibular para os grupos analisados.

Fatores de Variação	SS	df	MS	F	P
Grupos	0,00000331	3	0,000001103	1,840	0,180
Entre amostras	0,000009592	16	0,0000005995		
Tempo	0,00002953	1	0,00002953	45,369	<0,001*
Grupos x Tempo	0,000003056	3	0,000001019	1,565	0,237
Intra amostras	0,00001041	16	0,0000006509		

* $P < 0,05$ denota diferença estatística significativa.

3.5.2 Osso trabecular colo femoral

Na Tabela 20, é possível observar que o fator tempo de análise ($p < 0,001$) interferiu significativamente nos valores de TbN (1/mm) do osso trabecular femoral. Houve diminuição significativa nos valores no tempo final para todos os grupos (Tabela 2).

Tabela 20. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do TbN (1/mm) do osso trabecular femoral para os grupos analisados.

Fatores de Variação	SS	df	MS	F	P
Grupos	0,000001049	3	0,0000003498	0,287	0,834
Entre amostras	0,00001948	16	0,000001217		
Tempo	0,00002065	1	0,00002065	35,250	<0,001*
Grupos x Tempo	0,000001795	3	0,0000005982	1,021	0,409
Intra amostras	0,000009373	16	0,0000005858		

*P<0.05 denota diferença estatística significante.

3.6 Separação trabecular

3.6.1 Osso trabecular mandibular

Na Tabela 21, é possível observar que a interação entre o fator grupo e tempo de análise interferiu significativamente nos valores de TbSp (mm) do osso trabecular mandibular ($p = 0,003$). No tempo final, o grupo RIS apresentou valor significativamente menor que os demais grupos. Houve aumento significativo nos valores no tempo final para os grupos Controle e OVX e diminuição para o grupo RIS (Tabela 1).

3.6.2 Osso trabecular colo femoral

Na Tabela 22, é possível observar que o fator tempo de análise interferiu significativamente nos valores de TbSp (mm) do osso trabecular femoral ($p = 0,049$). Houve aumento significativo nos valores no tempo final para o grupo OVX (Tabela 2).

Tabela 21. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do TbSp (mm) do osso trabecular mandibular para os grupos analisados.

Fatores de Variação	SS	Df	MS	F	P
Grupos	13920,046	3	4640,015	8,811	0,001*
Entre amostras	8425,720	16	526,608		
Tempo	2774,468	1	2774,468	4,193	0,057
Grupos x Tempo	13728,122	3	4576,041	6,916	0,003*
Intra amostras	10586,289	16	661,643		

*P<0.05 denota diferença estatística significante.

Tabela 22. Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas com dois fatores de análise do TbSp (mm) do osso trabecular femoral para os grupos analisados.

Fatores de Variação	SS	Df	MS	F	P
Grupos	1543,704	3	514,568	1,155	0,357
Entre amostras	7126,985	16	445,437		
Tempo	1712,761	1	1712,761	4,523	0,049*
Grupos x Tempo	611,047	3	203,682	0,538	0,663
Intra amostras	6059,005	16	378,688		

*P<0.05 denota diferença estatística significante.

3.7 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO

As análises de correlação das comparações entre fêmur e mandíbula estão apresentadas nas Tabelas 23 e 24. Foi verificada correlação positiva entre BMD (g/cm^2) do osso trabecular mandibular e femoral ($p = 0,045$). Entretanto em outros parâmetros apesar de alguns apresentarem um perfil semelhante de comportamento, ou seja, aumento ou diminuição de valores, não foi confirmada estatisticamente essa correlação.

Tabela 23. Coeficiente de correlação de Pearson entre os valores médios dos marcadores avaliados para trabecular mandibular e trabecular femoral na 1º e 2º micro CTs.

Coeficiente de Pearson		1º Micro CT	2º Micro CT
		Trabecular Mandibular x Femoral	Trabecular Mandibular x Femoral
BMD (g/cm^2)	Coeficiente de correlação	,142	,452*
	Significância	,550	,045
	N	20	20
BV/TV (%)	Coeficiente de correlação	,078	,041
	Significância	,745	,864
	N	20	20
TBTh (mm^3)	Coeficiente de correlação	,254	-,048
	Significância	,279	,840
	N	20	20
TbN (1/mm)	Coeficiente de correlação	-,297	-,045
	Significância	,203	,852
	N	20	20
TbSp (mm)	Coeficiente de correlação	,283	,091
	Significância	,227	,702
	N	20	20
PO(tot)%	Coeficiente de correlação	,077	,041
	Significância	,746	,864
	N	20	20

* $P < 0.05$ denota diferença estatística significativa.

Tabela 24. Coeficiente de correlação de Pearson entre os valores médios dos marcadores avaliados para cortical mandibular e cortical femoral na 1º e 2º micro CTs.

Coeficiente de Pearson		1º Micro CT	2º Micro CT
		Cortical Mandibular x Femoral	Cortical Mandibular x Femoral
BMD (g/cm ²)	Coeficiente de correlação	,198	,227
	Significância	,403	,336
	N	20	20
B.Ar/Tar (%)	Coeficiente de correlação	-,068	-§
	Significância	,776	-
	N	20	20
CtTh (mm)	Coeficiente de correlação	-,094	-,058
	Significância	,693	,807
	N	20	20
PO(tot)%	Coeficiente de correlação	-§	-§
	Significância	-	-
	N	20	20

§ Não pode ser calculado porque pelo menos uma das variáveis é constante

4. Discussão

O presente estudo avaliou, por meio de um modelo animal as mudanças microestrutura em ratas induzidas a osteoporose em uso de Risedronato Oral em dois sítios, mandíbula e colo femoral. Neste trabalho encontramos como principal resultado que o Risedronato favoreceu a manutenção da estrutura óssea nos sítios avaliados impedindo ou dificultando a sua deterioração, em ambos os sítios quando avaliado o osso trabecular. Estes resultados estão de acordo com a literatura^{11; 19}.

A utilização de modelos animais, principalmente o uso de roedores, é a abordagem pré-clínica mais amplamente utilizada para estudar a deterioração esquelética, isso devido aos ratos terem um esqueleto bem caracterizado que se assemelha um pouco ao dos humanos²⁹. Há diversos protocolos experimentais que levam a perda óssea, como por exemplo, as intervenções hormonais (ovariectomia, hipofisectomia, paratireoidectomia) e a imobilização^{3; 30}.

Modelos utilizando a remoção do ovário como técnica de escolha para redução da massa óssea são mencionados em vários trabalhos, assim como no presente estudo^{2; 14; 16}, este apresenta como vantagem o custo de execução e o método mais rápido de indução a osteoporose. No entanto, a heterogeneidade dos tempos de análise e idade dos animais têm sido um desafio para determinação de protocolos de indução a osteoporose^{2; 10; 15; 27; 28}.

Sabe-se que as ratas entram na menopausa entre 15 a 18 meses, e que intervenções para acelerar a redução da massa óssea, podem ser feitas pós seis semanas de vida, quando já há maturidade sexual do animal^{3; 12}. Lee et al, 2019 através de uma revisão sistemática sugeriram como protocolo um modelo de rato de 12 semanas de idade²¹. Entretanto em nossa pesquisa utilizamos ratas com 8 semanas de vida para realizar o procedimento de ovariectomia e a primeira análise tomográfica, ocorreu após 12 semanas, como resultado tivemos que os animais dos grupos ORI e OVX apresentaram valores menores de BMD, ou seja, o objetivo de indução foi exitoso.³⁴

Em relação a escolha do sítio a ser comparado com a mandíbula levou-se em consideração o fato de o fêmur ser amplamente utilizado para predição de fraturas relacionadas à osteoporose e a existência de trabalhos que compararam esses sítios^{14; 16; 23; 27}. Há também trabalhos que avaliaram o comportamento de medicações antirreabsortivas sobre a mandíbula e outros sítios³¹. Entretanto ainda há lacunas no entendimento desse processo, uma vez que parece que medicações se comportam de maneira diferente de acordo com via de administração, posologia, tempo e região analisada.

O Risedronato é uma medicação para tratamento amplamente utilizada no Brasil para prevenção/ tratamento da osteoporose no SUS²⁶. Provavelmente isso se deve ao seu custo baixo comparando a outros medicamentos antirreabsortivos, resposta terapêutica a longo prazo^{32; 33}. Apesar de alguns trabalhos mostrarem seu desuso e limitação devido à baixa absorção gastrointestinal, necessidade de jejum antes e após consumo e a não comercialização em vários países, como Estados Unidos, atualmente³³. No entanto, Sabri, et al 2022, apresentaram os principais impactos de cada medicação na redução de fratura pós menopausa. Risedronato 35mg/ semana, via oral, apresenta ser a melhor medicação benefício na prevenção de fraturas não vertebrais mesmo comparada a medicações intravenosas, ou subcutâneas. Não sendo essa vantagem vista na prevenção de fraturas de quadril e vertebra¹.

A avaliação por microtomografia é considerada padrão ouro para avaliação de densidade mineral e microarquitetura trabecular óssea³⁴. Foram analisados os parâmetros BMD, BV/TV, TBTh, PO, TbN, Tbsp em osso trabecular de ambos os sítios. Em mandíbula podemos destacar que a redução de porosidade significativa nos grupos ORI e RIS, o aumento da densidade mineral e da espessura trabecular. Já no colo femoral, observamos que a redução da porosidade foi apenas significativa em RIS, e o aumento da densidade mineral e espessura trabecular em todos os grupos. Esses parâmetros foram selecionados de acordo com Bouxsein et al, 2010³⁴.

Observou-se que o uso do Risedronato oral teve impactos significativos em osso trabecular nos parâmetros porosidade, volume/ área e espessura femoral. Já em osso cortical o comportamento mais relevante foi o aumento da

espessura em osso cortical. Khajuria et al, 2018 avaliaram o comportamento do risedronato em ratas induzidas a osteoporose por glicocorticoides em ratos em crescimento. Assim como em nosso trabalho o risedronato aumentou a densidade mineral óssea e houve mudanças na microarquitetura³⁵. Outro resultado a ser considerado é o uso da medicação no grupo sem indução a osteoporose gerou uma redução significativa da separação trabecular mandibular podendo ser vantajoso para realização de alguns procedimentos odontológicos.

Em relação ao osso cortical o tempo de análise não foi suficiente para verificar alterações significativas, apesar de ambos os sítios apresentarem aumento da espessura, podendo sugerir que em um tempo maior de análise poderia acarretar num aumento da densidade cortical decorrente da medicação. Podemos verificar também que houve correlação de comportamento, fortalecendo as evidências que a mandíbula pode ser utilizada como osso para rastreamento populacional à risco de fratura³⁶.

Ao analisar o comportamento da microarquitetura óssea no osso trabecular se manteve como encontrado na maioria dos trabalhos anteriores quando analisado o grupo induzido a osteoporose por ovariectomia²¹. A detecção mais significativa das mudanças ósseas estruturais no trabeculado ósseo é justificada na literatura, uma vez que esse tipo ósseo apresenta taxa de *turn over* mais acelerado¹¹.

4.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Uma das limitações desse estudo são que os animais utilizados apresentam um metabolismo mais acelerado e rápido em relação aos estágios de desenvolvimento. A infância é breve e acelerada, chegando a maturidade sexual em cerca de 6 semanas. Na fase adulta, um mês de vida do rato corresponde a 2,5 anos humanos²⁷ não sendo os modelos mais fidedignos, porém são amplamente aceitos e frequentemente utilizados^{4; 28; 29}. Todavia, muitas vezes os resultados não podem ser transportados para os seres humanos²⁸.

Outra limitação se deve à impossibilidade do uso de micro-Ct em humanos. O grande benefício de se usar o micro-CT se deve a ter imagens de aquisição, reconstrução contendo as atenuações máximas para cada imagem reconstruída³⁰.

4.2 PERSPECTIVAS

Considerando o impacto que a osteoporose apresenta no atual cenário mundial e as perspectivas de sua expansão em função do envelhecimento da população, novas ferramentas para rastreamento da doença e os efeitos das medicações para tal se tornam necessárias. A inteligência artificial no estudo da Osteoporose pode ser um grande aliado para conseguir aumentar as taxas de detecção da doença na população. Yang et al, 2022 avaliaram tomografias de tórax usando inteligência artificial para medir os valores de atenuação (HU) se mostrou uma aliada na triagem de osteopenia/ osteoporose. Já na odontologia trabalhos têm utilizado vários índices radiomorfométricos em mandíbula aliados a inteligência artificial para identificação dos sinais iniciais de osteoporose^{31; 32}.

Os resultados deste trabalho permitem-nos apontar que a análise de parâmetros microestrutural na mandíbula pode representar mais uma alternativa nesse arsenal, como um auxiliar no enfrentamento do desafio que se avizinha com o crescimento dos casos de osteoporose e que o uso de risedronato oral por um tempo relativamente curto pode até beneficiar alguns procedimentos odontológicos, como instalação de implantes, tratamento doenças periodontais com as mudanças de parâmetros encontrados^{33; 34}.

Está cada vez mais evidente que o cirurgião dentista precisa se capacitar, se informar e se fazer presente no monitoramento de doenças crônicas, e a osteoporose representa uma delas, tanto para sermos instrumentos de rastreamento como monitoramento dos efeitos das medicações antirreabsortivas na cavidade oral a longo prazo.

5. Conclusão

Podemos concluir neste estudo que há correlação de comportamento da densidade mineral óssea em mandíbula e colo femoral. A utilização do risedronato em pouco tempo, 4 semanas, já traz alterações na microarquitetura óssea trabecular, reduzindo a porosidade, aumentando região de volume/ área. Já no osso cortical, houve um aumento da espessura trabecular, aumentando a resistência do osso a fratura em ambos os sítios.

O risedronato favoreceu a manutenção da microarquitetura óssea impedindo sua deterioração, em ambos os sítios analisados. Além disso, observou-se mudanças na microestrutura mandibular no grupo RIS consideráveis sugerindo maior investigação sobre possíveis benefícios a curto prazo da medicação ao osso mandibular.

6. Referências

- 1 SABRI, S. A. et al. Osteoporosis: An Update on Screening, Diagnosis, Evaluation, and Treatment. **Orthopedics**, v. 46, n. 1, p. e20-e26, Jan-Feb 2023. ISSN 0147-7447.
- 2 SÖZEN, T.; ÖZİŞİK, L.; BAŞARAN, N. An overview and management of osteoporosis. **Eur J Rheumatol**, v. 4, n. 1, p. 46-56, Mar 2017. ISSN 2147-9720 (Print) 2147-9720.
- 3 JIANG, G. Z. et al. Correlation among geometric, densitometric, and mechanical properties in mandible and femur of osteoporotic rats. **J Bone Miner Metab**, v. 26, n. 2, p. 130-7, 2008. ISSN 0914-8779 (Print) 0914-8779.
- 4 LELOVAS, P. P. et al. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. **Comp Med**, v. 58, n. 5, p. 424-30, Oct 2008. ISSN 1532-0820 (Print) 1532-0820.
- 5 YONG, E. L.; LOGAN, S. Menopausal osteoporosis: screening, prevention and treatment. **Singapore Med J**, v. 62, n. 4, p. 159-166, Apr 2021. ISSN 0037-5675 (Print) 0037-5675.
- 6 KANIS, J. A. et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporos Int**, v. 30, n. 1, p. 3-44, Jan 2019. ISSN 0937-941X (Print) 0937-941x.
- 7 ARCEO-MENDOZA, R. M.; CAMACHO, P. M. Postmenopausal Osteoporosis: Latest Guidelines. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 50, n. 2, p. 167-178, Jun 2021. ISSN 0889-8529.
- 8 SI, L. et al. Projection of osteoporosis-related fractures and costs in China: 2010-2050. **Osteoporos Int**, v. 26, n. 7, p. 1929-37, Jul 2015. ISSN 0937-941x.
- 9 ZERBINI, C. A. et al. Incidence of hip fracture in Brazil and the development of a FRAX model. **Arch Osteoporos**, v. 10, p. 224, 2015.

- 10 BACCARO, L. F. et al. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. **Clin Interv Aging**, v. 10, p. 583-91, 2015. ISSN 1176-9092 (Print) 1176-9092.
- 11 LUU, A. N. et al. Microstructural, densitometric and metabolic variations in bones from rats with normal or altered skeletal states. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e82709, 2013. ISSN 1932-6203.
- 12 HSU, P. Y. et al. Cortical Bone Morphological and Trabecular Bone Microarchitectural Changes in the Mandible and Femoral Neck of Ovariectomized Rats. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0154367, 2016. ISSN 1932-6203.
- 13 YANG, J. et al. The effect of ovariectomy on mandibular cortical thickness in the rat. **J Dent**, v. 33, n. 2, p. 123-9, Feb 2005. ISSN 0300-5712 (Print) 0300-5712.
- 14 LIU, X. L. et al. Skeletal site-specific response to ovariectomy in a rat model: change in bone density and microarchitecture. **Clin Oral Implants Res**, v. 26, n. 4, p. 392-398, Apr 2015. ISSN 0905-7161.
- 15 YANG, J.; PHAM, S. M.; CRABBE, D. L. Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture. **Dentomaxillofac Radiol**, v. 32, n. 4, p. 247-51, Jul 2003. ISSN 0250-832X (Print) 0250-832x.
- 16 WU, Y.; ADEEB, S.; DOSCHAK, M. R. Using Micro-CT Derived Bone Microarchitecture to Analyze Bone Stiffness - A Case Study on Osteoporosis Rat Bone. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 6, p. 80, 2015. ISSN 1664-2392 (Print) 1664-2392.
- 17 LEE, C. et al. Site-specific and time-course changes of postmenopausal osteoporosis in rat mandible: comparative study with femur. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, p. 14155, Oct 2 2019. ISSN 2045-2322.
- 18 DAI, J. et al. Initial changes in alveolar bone volume for sham-operated and ovariectomized rats in ligature-induced experimental periodontitis. **Clin Oral Investig**, v. 20, n. 3, p. 581-8, Apr 2016. ISSN 1432-6981.

- 19 LEE, J. H. et al. Microarchitectural changes in the mandibles of ovariectomized rats: a systematic review and meta-analysis. **BMC Oral Health**, v. 19, n. 1, p. 128, Jun 26 2019. ISSN 1472-6831.
- 20 CHATTERJEE, M. et al. Is the Jaw Bone Micro-Structure Altered in Response to Osteoporosis and Bisphosphonate Treatment? A Micro-CT Analysis. **Int J Mol Sci**, v. 22, n. 12, Jun 18 2021. ISSN 1422-0067.
- 21 JIANG, L. et al. Effects of bisphosphonates on mandibular condyle of ovariectomized osteoporotic rats using micro-ct and histomorphometric analysis. **J Oral Pathol Med**, v. 46, n. 5, p. 398-404, May 2017. ISSN 0904-2512.
- 22 KUŹNIK, A. et al. Bisphosphonates-much more than only drugs for bone diseases. **Eur J Pharmacol**, v. 866, p. 172773, Jan 5 2020. ISSN 0014-2999.
- 23 SYVERSEN, U.; HALSE, J. I. [Bisphosphonate treatment of osteoporosis and other skeletal diseases]. **Tidsskr Nor Laegeforen**, v. 131, n. 3, p. 244-7, Feb 4 2011. ISSN 0029-2001.
- 24 SAÚDE, M. D. Relatório de recomendação: Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas da osteoporose. https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2022/20220919_pcdt_osteoporose.pdf, 2022. Acesso em: April 13th, 2023.
- 25 DU, Z. et al. Estrogen Deficiency-Associated Bone Loss in the Maxilla: A Methodology to Quantify the Changes in the Maxillary Intra-radicular Alveolar Bone in an Ovariectomized Rat Osteoporosis Model. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 21, n. 5, p. 458-66, May 2015. ISSN 1937-3384.
- 26 DAI, Q. G. et al. Ovariectomy induces osteoporosis in the maxillary alveolar bone: an in vivo micro-CT and histomorphometric analysis in rats. **Oral Dis**, v. 20, n. 5, p. 514-20, Jul 2014. ISSN 1354-523x.

- 27 ANDREOLLO, N. A. et al. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **Arq Bras Cir Dig**, v. 25, n. 1, p. 49-51, Jan-Mar 2012. ISSN 0102-6720.
- 28 RASKA, O.; BERNÁŠKOVÁ, K.; RASKA, I., JR. Bone metabolism: a note on the significance of mouse models. **Physiol Res**, v. 58, n. 4, p. 459-471, 2009. ISSN 0862-8408 (Print)0862-8408.
- 29 JEE, W. S.; YAO, W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 1, n. 3, p. 193-207, Mar 2001. ISSN 1108-7161 (Print)1108-7161.
- 30 KHANDELWAL, S.; LANE, N. E. Osteoporosis: Review of Etiology, Mechanisms, and Approach to Management in the Aging Population. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 52, n. 2, p. 259-275, Jun 2023. ISSN 0889-8529.
- 31 YANG, J. et al. Opportunistic osteoporosis screening using chest CT with artificial intelligence. **Osteoporos Int**, v. 33, n. 12, p. 2547-2561, Dec 2022. ISSN 0937-941x.
- 32 SELVAKUMAR, R. et al. Osteoporosis risk group: Screening for osteoporosis in dental clinics using panoramic radiographs. **J Educ Health Promot**, v. 11, p. 271, 2022. ISSN 2277-9531 (Print)2277-9531.
- 33 ZYMPERDIKAS, V. F. et al. Bisphosphonates as Supplement to Dental Treatment: A Network Meta-Analysis. **J Dent Res**, v. 100, n. 4, p. 341-351, Apr 2021. ISSN 0022-0345.
- 34 ERVOLINO DA SILVA, A. C. et al. Improvement of Peri-Implant Repair in Estrogen-Deficient Rats Fed a Cafeteria Diet and Treated with Risedronate Sodium. **Biology (Basel)**, v. 11, n. 4, Apr 11 2022. ISSN 2079-7737 (Print) 2079-7737.

7. Press Release

Esse trabalho teve como objetivo verificar através de uma pesquisa com modelo animal o comportamento do Risedronato Oral, medicação utilizada no tratamento da osteoporose, na mandíbula e no colo femoral e verificar se essas mudanças no osso de ratas induzidas a osteoporose apresentam semelhança. Isso pode ajudar a elucidar melhor as mudanças ósseas presentes nos ossos de atuação do cirurgião dentista, e confirmar cada vez mais o papel do cirurgião dentista na contribuição de rastreio de doenças crônicas como a osteoporose.

ANEXO- APROVAÇÃO DE COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL


Brasília, 26 de fevereiro de 2015.


DECLARAÇÃO


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

wpaua

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

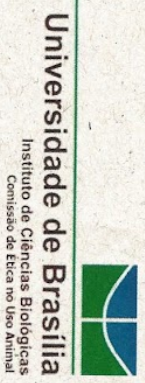

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal


UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
- UnB -


COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAL
- UnB -

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

Brasília, 13 de maio de 2016.



DECLARAÇÃO – Prorrogação de Prazo

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

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Paula Diniz Galera".

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



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