

Trabajos Originales:

ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE EL GRADO DE OSTEOPENIA INDUCIDA POR LA FENITOÍNA Y POR LA AUSENCIA HORMONAL - ESTUDIO RADIOGRÁFICO

Recibido para arbitraje: 29/07/08.

Aceptado para publicación :15/05/09

- **Carola Gomez Ágreda**
Maestra en Radiología Odontológica. Facultad de Odontología de São José dos Campos de la Universidad Estatal Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', São Paulo - Brasil.
- **Mari Eli Leonelli de Moraes**
Profesora Doctora de la Disciplina de Radiología Odontológica . Facultad de Odontología de São José dos Campos de la Universidad Estatal Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', São Paulo - Brasil
- **Valéria Pinheiro Abrantes Carvalho**
Profesora Doctora de la Disciplina de Farmacología. Facultad de Odontología de São José dos Campos de la Universidad Estatal Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', São Paulo - Brasil
- **Luiz Cesar de Moraes**
Profesor Titular de la Disciplina de Radiología Odontológica . Facultad de Odontología de São José dos Campos de la Universidad Estatal Paulista 'Júlio de Mesquita Filho', São Paulo - Brasil

Dirección de los autores:

A/C Departamento de Cirugía y Diagnóstico. Facultad de Odontología de São José dos Campos- Universidad Estatal Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'-UNESP

Av: Engenheiro Francisco José Longo 777 - Jardim São Dimas- São José dos Campos- Brasil

Cep: 12245-000

E-mail: carolagreda@gmail.com / carolagreda@yahoo.com.br

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.

KEY WORDS: Digital radiographic; bone diseases; phenytoin

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue realizar la comparación radiográfica digital utilizando la densidad óptica en tonos de gris, entre el grado de osteopenia inducida por un medicamento (fenitoína) y la ausencia hormonal en ratones. Fueron utilizados, 37 ratones Wistar divididos en grupos: cinco hembras SHAM (I); cinco machos SHAM (II); seis hembras ovariectomizadas (III); seis machos orquiectomizados (IV); ocho

hembras tratadas con fenitoína en la dosis de 5mg/kg/día (V) y siete machos tratados con fenitoína en la dosis 5mg/kg/día (VI). En todos los grupos, se realizó una radiografía de la tibia izquierda en el período inicial, treinta y sesenta días de realizado el procedimiento quirúrgico. Para la adquisición de la radiografía, fue utilizado el aparato de rayos X digital Gendex 765DC® con 0,032s de tiempo de exposición, distancia de 40cm, 65kVp, 7mA, con la fuente de rayos X perpendicular al sensor del sistema digital directo RVG (Trophy). Por las imágenes obtenidas se ha realizado la medición de la densidad óptica de dos regiones seleccionadas de la tibia (metáfisis y diáfisis) utilizando la herramienta histograma del programa Adobe Photoshop®. Los promedios de las lecturas de densidad fueron sometidos a análisis de variancia (ANOVA) y test Tukey (5%). Conforme los resultados, se concluyó que no hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores de densidad óptica en el método de inducción a la osteopenia por la ovariectomía u orquidectomía, mientras que en la inducción por fenitoína hubo la indicación de la osteopenia en machos y hembras después de 60 días en la región de diáfisis.

PALABRAS- CLAVE: radiografía digital; osteopenia; fenitoína.

RESUMO

O objetivo deste trabalho 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 orquidectomizados; grupo V, com 8 fêmeas tratadas com fenitoína a 5mg/kg/día e grupo VI, com 7 machos tratados com fenitoína a 5mg/kg/día. Realizou-se a radiografia da tibia 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). Pelas imagens obtidas realizou-se a mensuração dos valores de densidade óptica de duas áreas selecionadas da tibia (metáfise e diáfise) mediante a ferramenta histograma do programa Adobe Photoshop®. As médias das leituras de densidade 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 orquidectomia, 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.

INTRODUCCIÓN

Con la constatación del aumento de la expectativa de vida de la población mundial, ganan mayor notoriedad estudios relacionados a disturbios de la senilidad. Pueden ser citados disturbios endocrinos, sistémicos como la diabetes y la hipertensión y todavía procesos patológicos que pueden interferir en la fisiología del tejido óseo. En este último, está relacionado la osteoporosis, considerada la más común de las enfermedades del hueso. Por definición es un estado caracterizado por la reducción de la masa y deterioro óseo, resultando en el aumento de fragilidad del tejido y consecuente aumento del riesgo de ocurrencia de fracturas. Existen condiciones que favorecen el riesgo y que pueden explicar el desarrollo de la osteoporosis. En este contexto, tal condición patológica está relacionado principalmente en mujeres en la posmenopausia, ya que en este período ocurre la disminución o mismo, la eliminación de la producción de estrógeno, hormona sexual que tiene influencia directa con la manutención de la salud ósea en la vida adulta (1).

Existen también medicamentos utilizados para el tratamiento de otras afecciones patológicas que pueden interferir en la homeostasis del metabolismo óseo, como es el caso de la fenitoína. Este medicamento es largamente utilizado en pacientes que tienen desordenes convulsivos, sin embargo, la utilización por largos períodos puede ocasionar la disminución de la densidad mineral ósea, llevando inicialmente a

cuadros de osteopenia (2-4). Otros estudios también evaluarán la fenitoína y demostraron un potencial osteogénico in vivo e in vitro (5).

Para estudios de alteraciones óseas, diversos trabajos utilizan la radiografía digital directa, por ser un examen eficiente, de la misma forma que la radiografía convencional y presenta ventajas como la posibilidad de utilización de herramientas y programas que ayudan en la visualización, delimitación y medición de lesiones óseas (6).

Por estos motivos, en el presente estudio, se realizó la comparación entre el grado de osteopenia inducida por la fenitoína y la ausencia hormonal en ratones, utilizando las medidas de tonos de gris (densidad óptica) en imágenes obtenidas por un sistema digital directo en diferentes períodos de observación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue realizado según los Principios Éticos para Experimentación Animal, conforme al Colegio Brasileiro de Experimentación Animal (COBEA), aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Odontología de São José dos Campos-UNESP, n° 032/2005-PA/CEP. Fueron utilizados 37 ratones adultos jóvenes, 18 machos y 19 hembras (*Rattus norvegicus*, variación *albinus*, Wistar), tenían tres meses de vida y peso aproximado de 350g. Estos animales fueron asignados por el Bioterio de la Facultad de Odontología de São José dos Campos-UNESP y mantenidos en jaulas en temperatura ambiente, alimentados con ración de comida y agua ad libitum. Fueron divididos en seis grupos: a) grupo I: cinco hembras SHAM, b) grupo II: cinco machos SHAM, c) grupo III: seis hembras sometidas a cirugía de ovariectomía, d) grupo IV: seis machos sometidos a cirugía de orquiectomía, e) grupo V: ocho hembras tratadas con fenitoína -Epelin® (Pfizer) en la dosis de 5mg/ kg/día, vía oral mediante gavaje durante sesenta días, f) grupo VI: siete machos tratados con fenitoína- Epelin® (Pfizer) en la dosis de 5mg/kg/día, vía oral mediante gavaje, durante sesenta días.

Para el procedimiento quirúrgico, los animales fueron anestesiados por la solución de 1,0 mL Clorhidrato de 2-(2,6-xilidino)-5-6-dihidro-4H-1,3 tiazina-sedativo y relajante muscular- Anazedam, (Vetbrands) para 0,5 mL de ketamina (Dopalen), en dosis de 0,1mL para cada 100g de peso corpóreo. Los grupos I y II fueron sometidos apenas al estrés quirúrgico, mientras en el grupo III, se realizó tricotomía y antisepsia con alcohol iodado y bajo la costilla, se hizo una incisión de 1cm en la piel y en secuencia, en la camada muscular, posibilitando la visualización del ovario. Con el auxilio de una pinza clínica, el ovario fue traccionado hacia fuera de la cavidad abdominal y, en seguida se realizó la ligadura de la vasculatura local, para la escisión. Posteriormente, la camada muscular y la piel fueron suturadas, este proceso se realizó bilateralmente. En el grupo IV, el procedimiento consistió en desinfección de las bolsas escrotales con alcohol iodado. Se realizó una incisión longitudinal siguiendo la línea mediana, en que se visualizó uno de los testículos. En seguida, se hizo la interrupción del flujo sanguíneo por ligadura del pedículo vascular, para que se haga la escisión. El mismo procedimiento fue repetido del lado opuesto y la incisión, suturada con hilo de sutura de algodón.

Los animales de todos los grupos tuvieron la tibia izquierda radiografiada en los períodos inicial, treinta y sesenta días del inicio del experimento, en que estaban anestesiados según la solución ya mencionada.

Para obtener las imágenes radiográficas, fue utilizado el sistema *Radiovisiography*, RVG, (*Trophy, vicennes, França*) con el auxilio del software *Trophy Windows versión 5.00*. Ese sistema utiliza un sensor intrabucal CCD (*Charge Coupled Device*) de dimensiones, 22,2 mm de ancho por 33 mm de largo y área activa de 17 mm de ancho por 26 mm de largo, acoplado a una computadora Pentium III 128 Mb memoria RAM (*Random Acces Memory*), disco rígido de 40 Gb. El aparato de rayos X utilizado, fue el 765 DC (*Gendex Dental Systems, Dentsply International, IL, USA*), 65 kVp, corriente de 7mA, área focal efectiva de 6cm, distancia foco-sensor de 40 cm, y 0,032 s de tiempo de exposición, con el rayos X incidiendo perpendicularmente al sensor. Los animales fueron acomodados en decúbito dorsal sobre una tabla de madera que tenía un espacio específico para la colocación del sensor del sistema digital. De esta manera, las tibias del lado izquierdo ocuparon toda la extensión del sensor, manteniendo una misma posición para la adquisición de la imagen radiográfica digital. Estas imágenes fueron guardadas en el formato TIFF (*Tagged Image File Format*). Posteriormente, para análisis de la densidad óptica

radiográfica, se utilizó el programa de edición de imágenes *Adobe Photoshop 7.0* (*Adobe systems incorporated, 345 Park Avenue, San Jose, California 95110, USA*). Dos mediciones fueron realizadas de la tibia del animal. Para eso, en cada imagen fue seleccionado una área pre-determinada y estandarizada de tamaño fijo de 20 x 20 píxeles, en el cual fue posicionada en el campo central de la tibia, sin tocar las corticales laterales, en la transición entre la porción condilar y diáfisis, denominada de metafisis. La otra medición fue realizada en la región de diáfisis. Posteriormente, seleccionado el área de interés, se utilizó la herramienta histograma, que suministró el promedio de la densidad óptica en píxeles, de la región evaluada. La evaluación por la medición de cada región fue repetida tres veces, con intervalos de una semana para cada una de ellas, por el mismo examinador, previamente calibrado. Los promedios de densidad óptica fueron analizados estadísticamente por el ANOVA y test Tukey a 5% de significancia.

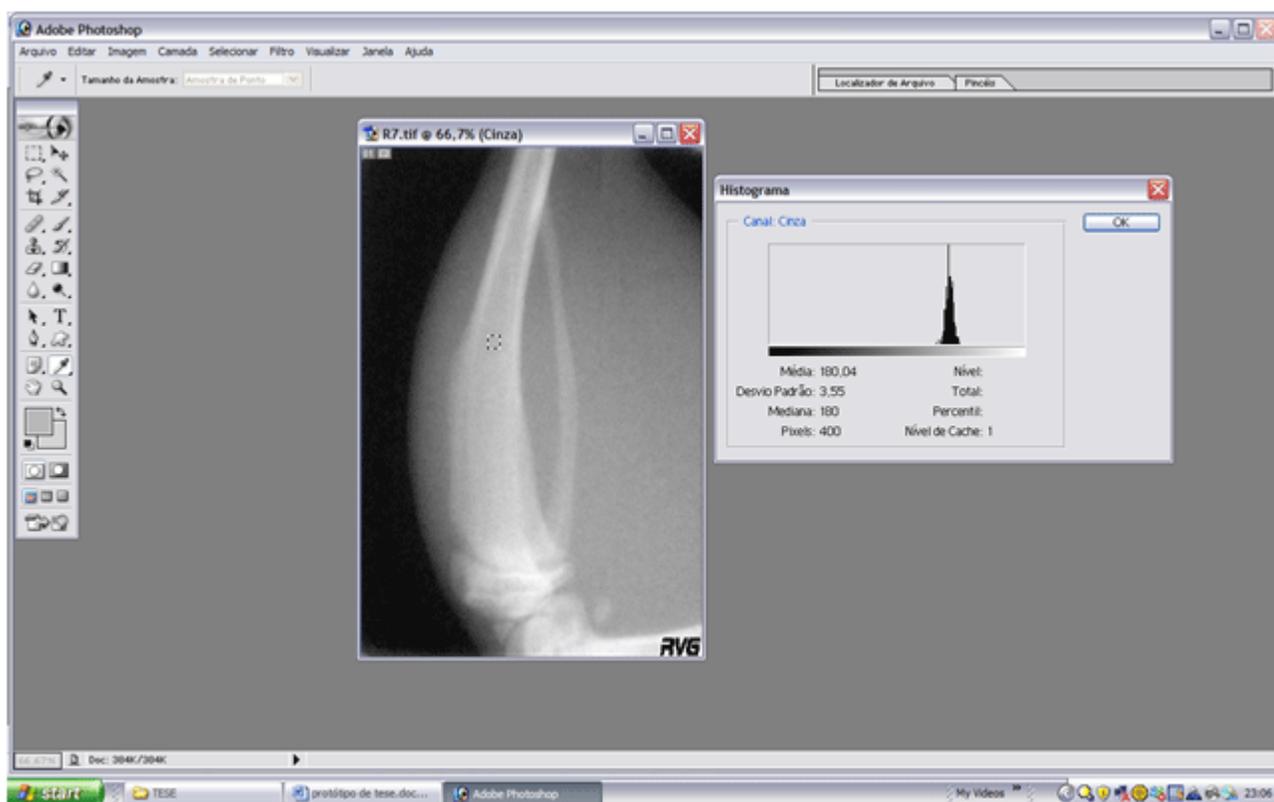


Figura 1

Imagen de la tibia en el programa Adobe Photoshop, demostrando el área de diáfisis seleccionada para la medición y el gráfico en histograma suministrando el promedio de la densidad óptica radiográfica de la región analizada.

RESULTADOS

Por el test ANOVA, se verificó que hubo diferencias estadísticamente significantes ($p < 0,05$) entre los promedios de densidad óptica. Posteriormente por el test Tukey se ha evidenciado que tal diferencia correspondía a los grupos V e VI, o sea, ratones hembras y machos que recibieron la administración de fenitoína en la dosis de 5mg/kg/día a los sesenta días en la región de diáfisis de tibia. En esos dos grupos se registro una disminución significativa de la densidad óptica radiográfica, con valores 136.2 ± 9.2 e 125.3 ± 3.3 , respectivamente. Los demás grupos no tuvieron diferencias estadísticamente significantes en ningún período evaluado.

Tabla 1
Resultados en machos, en diáfisis de tibia; Test de Tukey (p<0,05)

Grupos	SHAM (II)		Orquidectomizados (IV)		Fenitoína (VI)	
	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	179,6	2,1	184,7	3,4	136,2	9,2
	Aa		Aa		Bb	

Tabla 2
Resultados en hembras, en diáfisis de tibia; Test de Tukey (p<0,05)

Grupos	SHAM (I)		Ovariectomizados (III)		Fenitoína (V)	
	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	

Tabla 3
Resultados en machos, metáfisis de tibia; grupos homogéneos

Grupos	SHAM (II)		Orquidectomizados (IV)		Fenitoína (VI)	
	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	

Tabla 4
Resultados en hembras, metáfisis de tibia; grupos homogéneos

Grupos	SHAM (I)		Ovariectomizados (III)		Fenitoína (V)	
	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	

DISCUSIÓN

Nuevas tecnologías relativas a los métodos de diagnóstico están siendo perfeccionadas en diversas áreas, como en la Odontología, lo que proporciona una base científica sólida con la intención de mayor alcance y confiabilidad en la aplicabilidad clínica en beneficio de la población en general. En este escenario, están agregados estudios referentes al comportamiento de medicamentos, no solamente en relación a su actuación directa, pero también en los posibles efectos colaterales y/o adversos en el organismo humano, tal como la fenitoína, cuyo abordaje era de interés en este estudio para alteraciones óseas.

Con relación a la dosis y esquema terapéutico aplicados al uso de la fenitoína para esta investigación, se considero adecuada la posología de 5mg/kg/día. Esta dosis corresponde a la transformación de una dosis terapéutica normalmente administrada en seres humanos que padecen de crisis convulsivas, para que sean aplicados en ratones llevando en cuenta, la masa corporal del animal. Sin embargo, otros trabajos como los de Onodera et al. (2-4), utilizaron la dosis de 20mg/kg/día del medicamento, o sea, cuatro veces mayor a la realizada en este estudio, resaltamos que el interés principal fue verificar la ocurrencia de la posibilidad de osteopenia en dosis eminentemente terapéutica y administrada según la indicación

principal del fabricante. Otro factor a ser considerado es la vía de administración de la fenitoína. Este medicamento tiene una absorción más efectiva por vía oral según Kliemann y Monte (7), aparte de eso, el autor relata que otras vías de administración no son indicadas, por la posibilidad de actuar de forma imprevisible y no tener la eficacia en la absorción. Por estos motivos y asociando a la intención que se buscó reproducir la vía de administración realizada en humanos, se optó por utilizar la vía oral, de la misma forma que el trabajo de McCartney et al.(8), 5mg/kg/día y en oposición a los estudios de Onodera et al.(2-4), que escogieron la vía subcutánea y también a otros dos trabajos realizados por Ohta et al.(5,6), que utilizaron la vía intraperitoneal.

Como método de evaluación, se considera que la radiografía digital directa es una tecnología considerada innovadora y de rápida evolución. En este contexto, los sistemas digitales ofrecen definición y balance entre contraste y brillo equilibrados en todas las imágenes observadas, o sea, permite la manipulación con el objetivo de mejorar el análisis y observación del foco de estudio. Esta ventaja asociada a factores como la velocidad en que las imágenes son registradas, la reducción de la dosis de radiación ionizante al paciente, la ausencia del procesamiento efectuado en la cámara oscura, proporcionan la preservación del medio ambiente y todavía, el beneficio de archivamiento de la imagen digital en la memoria de la computadora sin perder la calidad (9,10). El archivamiento de esa imagen permite la transferencia para programas de fácil acceso y de dominio público, como en el programa Adobe Photoshop aplicado en este trabajo. Su utilización permitió evaluar numéricamente la densidad óptica del tejido óseo de forma más objetiva y descartando factores como la variación de interpretación por el ojo humano. En recurrencia de esa subjetividad pueden suceder fallas de informaciones debido a la naturaleza sutil del hallazgo radiológico. Para registro y evidenciación, se utilizó un histograma representativo de la distribución de los niveles de gris, con la herramienta presente en el propio programa de edición. Según Sarmento et al.(11), cuando se mide la densidad óptica, la imagen ofrece mayor cantidad de tonos de gris, aun cuando sean imperceptibles al ojo humano, en el momento en que se determina la correspondencia numérica de aquellos tonos, la mayor cantidad de tonos torna esta medición más sensible y por esto, con mayor capacidad de mostrar diferencias pequeñas de densidad, evidentes apenas cuando son comparados numéricamente.

Para trabajos que envuelven análisis radiográficas en tejido óseo, fue encontrada una mayor prevalencia de estudios en aquellos en los que los defectos óseos son una constante, como en la investigación de Moraes et al.(12), en que acompañaron radiográficamente la evolución del proceso de reparación ósea en determinados períodos mediante análisis de la densidad óptica del defecto creado. Esta metodología también puede ser evidenciada en el trabajo de Martins et al.(13), que tuvo como objetivo evaluar la efectividad de un antiinflamatorio en el proceso de reparación ósea en defectos realizados en ratones mediante la densidad óptica radiográfica. En los referidos trabajos es cada vez más evidente y rápido el acompañamiento del proceso de reparo óseo, debido a la delimitación específica del área. De esa forma, la variación de los tonos de gris de la región es analizada en el transcurso del proceso evolutivo de reparación, en que se debe interpretar con respaldos de conocimiento fisiológico la ocurrencia de tal proceso. De la misma forma ocurre también en el estudio de Werkman et al.(14), donde evaluaron los efectos terapéuticos de dos medicamentos en el reparo de lesiones óseas en ratones sometidos a la castración por examen histológico, histomorfométrico y también radiográfico, en que este último fue mediante la evaluación de la densidad óptica radiográfica obtenida por la radiografía digital. Se verificó que existió concordancia de los resultados de la evaluación radiográfica con las metodologías de análisis, comprobándose la efectividad de esa metodología. De otra forma, se verificaron pocos trabajos en la literatura que analizan alteraciones óseas sin involucrar los procedimientos quirúrgicos realizados, o sea, estudios específicamente en huesos íntegros. En este sentido, existe el trabajo de Silva et al.(15), en 2007, quienes verificaron el efecto del alcoholismo crónico sobre la densidad ósea mediante la evaluación de la densidad óptica radiográfica en ratones y en el que se utilizó un sistema digital como herramienta de evaluación. El parámetro óseo de análisis, en el estudio mencionado, fue el fémur. Los autores seleccionaron dos áreas estandarizadas de este hueso. La región de la porción mediana de tamaño (60 x 20 píxeles) y la región condilar (20 x 20 píxeles). En esta investigación, también fueron seleccionadas dos regiones estandarizadas del mismo tamaño, (20 x 20 píxeles), colocadas en la región del tercio mediano de la tibia, correspondiente a la diáfisis, sin comprometer de las corticales laterales, y en la

región de transición entre la porción condilar (epífisis) y la diáfisis, denominado de metáfisis(2-4).

Los resultados de disminución de densidad ósea encontrados en este trabajo, están en concordancia con los trabajos de Onodera et al.(2-4) que realizaron también una inducción a la osteopenia por el mismo medicamento, teniendo como punto de evaluación, la menatetrenona, un homólogo de la vitamina K2, con la intención de verificar la posibilidad de prevención del efecto osteoclastogénico de la fenitoína. La administración del medicamento en los trabajos referidos, por cinco semanas fue efectiva para la ocurrencia de la alteración de masa ósea, en cuanto en este trabajo fue evidenciado a los 60 días. Otro aspecto a ser discutido, es que en los trabajos mencionados se verificó el efecto de la fenitoína tanto en la metáfisis cuanto en la diáfisis femoral y/o tibial, evidencia que en la presente investigación ocurrió apenas en la diáfisis. Esos resultados permiten apuntar que en esta investigación, la fenitoína tuvo mayor acción de la región diafisaria, y que, por la metodología empleada, esa fue la única evidencia del efecto del medicamento, al igual que diferencias de respuesta de la metáfisis y diáfisis frente a la fenitoína podrían ser esperadas, conforme el trabajo de Ohta et al. (5), en 1995, en que evidenciaron, mediante parámetros óseos histomorfométricos, que la metáfisis y diáfisis poseen respuestas diferentes a alteraciones óseas, y que son por esto, dosis-dependientes en relación a la utilización de la fenitoína. Evidencia interesante observada en el trabajo referido, es que estos autores evaluarán diferentes dosis de fenitoína incluyendo la dosis administrada en esta investigación, que fue de 5mg/kg/día. Para dosis mayores que esta, como de 50 o 150 mg/kg/día resultó en reabsorción ósea. En dosis menores, como las de 1 y 5 mg/kg/día, los resultados que los autores tenían sugieren que hubo formación ósea, o sea, un potencial osteogénico. Se resalta todavía que, el tiempo administración en el trabajo de Ohta et al (5) fue de 47 días para las dosis mayores y de 42 días para las menores. En estudio posterior a este, Ohta et al.(6) asociaron el flúor con la misma dosis de fenitoína usada en esta investigación y administrada por 36 días, verificando que la asociación estimuló la neoformación ósea. Lau et al. (8), también evidenciaron en su trabajo un aumento de marcadores osteogénicos in vitro (en concentraciones micromolares) e in vivo, en humanos.

La variable comportamental farmacocinética de los efectos terapéuticos de la fenitoína con relación a los resultados de los trabajos ya descritos y sumados al presente estudio, ratifican que este medicamento es considerado de cinética de orden cero, o sea, no tiene un comportamiento uniforme cuando es analizada su curva dosis-respuesta para parámetros fármaco-cinéticos, como es el caso de la mayoría de los otros fármacos de cinética de primer orden pudiendo estar sujeto a variaciones de dosis, forma de administración y variables individuales (9).

Con relación al protocolo de pérdida ósea, lo más frecuentemente utilizado es lo que utiliza modelos de experimentación en animales, incluyendo principalmente, la utilización de ratones. Por lo tanto, los animales deben ser privados de la producción hormonal mediante el procedimiento quirúrgico de ovariectomía u orquiectomía, ocurriendo la supresión hormonal, llevando a cuadros que presentan muchas características similares a la pérdida ósea en humanos (17,18). Se evidenció que la ocurrencia de la disminución de masa ósea puede ser observada en el período de 30 días posteriores al procedimiento quirúrgico. En este estudio, por la metodología empleada no fue posible detectar la ocurrencia de pérdida ósea, tanto en machos cuanto en hembras, mismo después de transcurridos sesenta días del inicio del experimento. Se sugiere que para la evidenciación de diferencia estadísticamente significativa, sería necesario un período mayor de observación.

Lo que fue descrito no invalida la utilización del sistema digital, la evaluación mediante densidad óptica radiográfica, una vez que este método fue sensible en verificar la diferencia de densidad óptica radiográfica ocasionada por la fenitoína (5mg/kg/día). Por lo tanto, no está demás afirmar que por los datos considerados, el fármaco utilizado en las condiciones de este estudio, actuó como un factor indicativo de disminución de masa ósea mayor de lo que fue provocada por la supresión hormonal a los sesenta días del experimento, en la región de diáfisis en tibias de ratones.

CONCLUSIONES:

No hubo diferencia estadísticamente significativa en los valores de densidad óptica radiográfica del hueso evaluado (tibia) en los grupos ovariectomizado (III) y orquiectomizado (IV) en los períodos evaluados; los efectos de la fenitoína (5mg/kg/día) en la pérdida de masa ósea fueron observadas radiográficamente mediante la disminución de la densidad óptica radiográfica en ambos los sexos a los 60 días de observación en la diáfisis de tibia; el sistema digital directo Trophy actuó como indicador de la disminución de la densidad ósea en hueso íntegro provocada por la fenitoína en la dosis de 5mg/kg/día; la disminución de densidad ósea en ratones ovariectomizados y/o orquiectomizados en los períodos de análisis propuestos en esta investigación no fue detectada por el sistema digital Trophy.

REFERENCIAS

1. Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev.* 2001; 81: 419-47.
2. 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.
3. 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; 70: 1533-42.
4. 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; 19: 446-50.
5. Ohta JE, Wergedal JE, Gruber HE, Bayling DJ, Lau KHW. Low dose phenytoin is an osteogenic agent in the rat. *Calcif. Tissue Int.* 1995; 56: 42-48.
6. 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.
7. Gröndahl HG. Digital radiography in dental diagnosis: a critical view. *Dentomaxillofac Radiol.* 1992; 21: 198-202.
8. 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: 2347-53.
9. Kliemann FAD, Monte TL. Antiepilepticos. In: Fuchs FD, Wannmacher L, Ferreira MBC. *Farmacología clínica: fundamentos da terapêutica racional.* São Paulo: Guanabara Koogan; 2006. p. 536-53.
10. McCartney MA, Scinto PL, Wang S-S, Altan S. Developmental effects of phenytoin may differ depending on sex of offspring. *Neurotoxicol Teratol.* 1999; 21:119-28.
11. Horner K, Shearer AC, Walker A, Wilson NHF. Radiovisiography: an initial evaluation. *Br Dent J.* 1990; 168: 244-248.
12. Sarmiento VA, Pretto SM, Rubira IRF, Costa NP. Sistemas digitais de imagens odontológicas-

fatores eletrônicos. Rev FOUFBA. 2000; 20: 46-49.

13. 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; 20: 257-261.
14. 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; 16:207-212.
15. 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, 20:196-201.
16. 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; 22:77-81.
17. Mosekilde L. Assessing bone quality: Animal models in preclinical osteoporosis research. Bone. 1995; 17:343-52.
18. Kalu DN. The ovariectomy rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner. 1991; 15:175-192.