CIBELE PIDORODESKI NAGANO

Osteoporose induzida por glicocorticoides: expressão salivar de biomarcadores ósseos em pacientes submetidos à corticoterapia prolongada e sua correlação radiomorfométrica

São Paulo

2018

CIBELE PIDORODESKI NAGANO

Osteoporose induzida por glicocorticoides: expressão salivar de biomarcadores ósseos em pacientes submetidos à corticoterapia prolongada e sua correlação radiomorfométrica

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Diagnóstico Bucal) para obter o título de Doutor em Ciências.

Orientador: Profa. Dra. Silvia Vanessa Lourenço

São Paulo

2018

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

Catalogação-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Nagano, Cibele Pidorodeski.
Osteoporose induzida por glicocorticoides: expressão salivar de biomarcadores ósseos em pacientes submetidos à corticoterapia prolongada e sua correlação radiomorfométrica / Cibele Pidorodeski Nagano ; orientador Silvia Vanessa Lourenço. -- São Paulo, 2018.
148 p. : tab., fig., graf. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal, Radiologia Odontológica e Imaginologia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão original

1. Osteoporose induzida por glicocorticoides. 2. Biomarcadores ósseos. 3. Saliva. 4. Índices radiomorfométricos. 5. Radiografia panorâmica. I. Lourenço, Silvia Vanessa. II. Título.

Nagano CP. Osteoporose induzida por glicocorticoides: expressão salivar de biomarcadores ósseos em pacientes submetidos à corticoterapia prolongada e sua correlação radiomorfométrica. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: / /2019

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____
Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____
Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____
Instituição: _____Julgamento: _____

À minha amada mãe,
luz que norteia toda e qualquer conquista em meu caminho,
por seu amor infindável e incondicional.
Por ser o maior exemplo de humanidade, empatia, persevença e caráter que eu pudera ter. Obrigada por cada conselho, incentivo e sua dedicação de alma. Eu nada, nada conseguiria sem você.
Я тебé люблю!

Às jóias preciosas de nossa família,
meus sobrinhos,
Heitor, Helena e Heloísa,
por presentearem nossas vidas com tantos sorrisos genuínos (dois destes, ainda banguelos), e serem nossa fonte de pureza e amor.

À Michael,
pour m'avoir apporté du bonheur et de la sublimité dans toutes les perspectives possibles.
Pour avoir vécu entièrement ces moments-ci avec moi, même face à un océan de distance.

Ao meu pai,
por nos ensinar que nenhuma vitória é impossível.
Você não está sozinho, nesta luta.

À minha estimada orientadora,
Profª Drª Silvia Vanessa Lourenço,
por ter me ensinado a caminhar com passos firmes, quando minhas pernas ainda eram trêmulas. Não há palavras suficientes para agradecer por tamanha confiança, amizade e carinho; pelos infindáveis ensinamentos e, sobretudo, pelo imensurável suporte em todos os (bons e maus) momentos, ao longo de minha formação profissional e pessoal. Minha gratidão, admiração e carinho são eternos.

"Se vi mais longe, foi por estar de pé sobre ombros de gigantes".
(Robert Hooke)

A todos os pacientes,
pelo carinho em cada gesto e palavra.
Pela confiança.
Pela perserverança.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, meu segundo lar, há mais de 13 anos, a qual me proporcionara seguir rumos, até então, intangíveis, junto a tantas mentes reluzentes.

À minha orientadora, Profª Drª Silvia Vanessa Lourenço, e ao Prof. Dr. Marcello Menta Simonsen Nico, por terem me acolhido de braços calorosamente abertos, no Ambulatório de Estomatologia do Hospital das Clínicas (HC-FMUSP), e proporcionado, durante mais de uma década, (um universo de) ensinamentos indiscutivelmente preciosos. Ambos, cuidadosamente, cultivaram e regaram meu amor pela ciência e vida clínica. Meu mais profundo agradecimento (ao som de Ella Fitzgerald) pela rara amizade, convivência, carinho e tantas alegrias partilhadas. Não poderia ter melhores maestros responsáveis pela condução de minha "sonata acadêmica".

À Profª Drª Emiko Saito Arita, por ser um dos maiores exemplos que tive em minha formação. Agradeço infinitamente por todos ensinamentos, delicada e respeitosamente transmitidos; pelo carinho e elegância em cada palavra pronunciada, assim como pelo apoio valiosíssimo na realização deste trabalho. *Domo arigatō gozaimashita.*

À Profª Drª Fani Anagnostou e à toda equipe do *Laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaire* (B2OA) - *Université* Paris VII, por terem me acolhido com tanto zelo, respeito e partilhado de tão primorosos ensinamentos, durante o período do doutorado-sanduíche. *Mes plus sincères remerciements et ma très grande appréciation à toute la famille B2OA.*

A todos os docentes do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da USP, por terem moldado minha formação da maneira mais criteriosa e respeitosa possível.

À Profª Drª Valéria Aoki e à Profª Drª Celina Maruta pelo valioso período no Ambulatório de Doenças Bolhosas do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas.

Ao grande tesouro do nosso departamento, Cidinha. Obrigada por ser a pessoa e profissional única que és; por ser a figura angelical que guiou meus passos, durante o doutorado e em tantos outros momentos.

À Sheyla Batista Bologna Lopes, minha querida amiga com quem, junto, trilhei esta jornada, desde o primeiro dia de iniciação científica, até a conclusão desta etapa. Obrigada por ter sua mão sempre estendida em direção à minha. À Ana Hoyos, Claudia Arruda e Lara Gimenez, por terem sido muito mais do que companheiras, desde o mestrado. A amizade de vocês é um presente em minha vida.

À melhor equipe de amigos com quem eu poderia ter alegremente convivido e trabalhado, nos últimos anos: Fernanda de Paula, Milena Antunes, Ricardo Hsieh, Jaqueline Vaz, Giovanna Fiorezi, Tathyane Teshima, Wanessa Siqueira, Thais Borguezan, Edu Aoki, Isabela Choi, Luciana Munhoz, Camila Esteves, Daniela Richarte, Denise Haddad, Arthur Cortez, Jum Kim, Moses Park, Malu Ducati, Camila Gavioli, Marcela Ricaurte, Carol Martin e Leonardo Koyama.

Aos meus queridos Amadeu e Rosângela, por terem iluminado todos meus dias, no HC, assim como toda a equipe do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina (HC-FMUSP).

À enfermeira Sandra, pela ajuda imensurável com a coleta das amostras séricas, sempre disposta e com um lindo sorriso no rosto. Às demais enfermeiras Rosinha, Roberta, Denise e Andressa, por todo carinho, em todos os momentos.

Ao Adauto, por sempre nos ajudar com tanto carinho, em qualquer situação.

Ao Fabio Andriolo, pela grandiosa atenção e contribuição inestimável com as análises estatísticas.

À Glauci, pelo carinho imensurável, por reluzir sua luz em todas as direções e, ainda, por sua dedicação na normalização desta tese.

À minha irmã, Fabíola, e às de coração, Amanda Nakazato, Carol Dantas e Carol Vivan, por estarem ao meu lado, em todos os momentos, recarregando minhas “baterias” com amor infinito, luz e cores.

Às minhas queridas tias Helena, Joana e Regina, cujo amor foi crucial para minha formação pessoal e, sobretudo, para a finalização dessa tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro na realização deste estudo, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio à realização do doutorado-sanduíche.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e conclusão desta etapa memorável em minha vida, meu muito obrigada!

“La sagesse écarte les orages…"
(Voltaire)

“Only the tame birds have a longing.
The wild ones fly…"

(D. Gildenlöw)

RESUMO

Nagano CP. Osteoporose induzida por glicocorticoides: expressão salivar de biomarcadores ósseos em pacientes submetidos à corticoterapia prolongada e sua correlação radiomorfométrica [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Original.

A osteoporose, alteração osteometabólica crônico-degenerativa, de etiologia multifatorial, caracteriza-se pela redução da densidade mineral óssea, na qual observa-se a deterioração da microarquitetura óssea, com consequentes alterações nas propriedades físicas e quantitativas do esqueleto humano, tornando-o frágil e suscetível ao desenvolvimento de fraturas. A doença é classificada em primária e secundária, de acordo com sua etiopatogênese, sendo a osteoporose induzida por glicocorticoides (OPIG) a mais incidente dentre as tipologias secundárias. Evidencia-se alterações microarquiteturais ósseas, resultantes do regime crônico de altas doses medicamentosas, sendo seu diagnóstico realizado a partir da análise quantitativa da massa óssea pelo exame padrão densitometria óssea por absorciometria por dupla emissão de raios X. Não obstante, ainda se perpetua como um grande desafio às equipes multidisciplinares de saúde, caracterizando-se como uma técnica de alto custo e de acesso limitado a maior parte da população. Com o intuito de implementar abordagens menos invasivas e mais acessíveis no rastreio de osteoporose induzida por glicocorticoides, o presente estudo propôs analisar o impacto da corticoterapia prolongada pela avaliação bioquímica salivar comparativa de biomarcadores ósseos, associada ao estudo radiomorfométrico de radiografias panorâmicas de mandíbula, pelo índice mandibular cortical (IMCo), em dois tempos distintos. Nossa investigação observou reduções estatisticamente relevantes, em relação aos dados densitométricos de pacientes submetidos à corticoterapia prolongada, os quais, um ano após a instituição medicamentosa (T_1), resultaram em valores de T-score de coluna e femoral significativamente alterados ($p<0,0001$ e $p=0,0122$, respectivamente), sendo que mais da metade (56%) dos pacientes apresentou redução da densidade mineral óssea, quando comparado ao início da corticoterapia ($p=0,0002$). O impacto do regime terapêutico prolongado refletiu significativamente no índice de massa corpórea dos doentes ($p=0,0156$). A partir da aferição do índice mandibular cortical em radiografias panorâmicas dos

participantes, pôde-se observar diferença estatisticamente significante (p<0,0001), entre os dois tempos avaliados, e uma forte correlação entre si (r_s=0,7952); tal como correlação positiva entre o índice mandibular e a classificação densitométrica instituída pela Organização Mundial da Saúde (T_0, *p*=0,0443 e, em T_1, *p*=0,3266). Adicionalmente, por meio do imunoensaio Luminex®, avaliamos a expressão salivar dos biomarcadores relacionados ao turnover ósseo Osteoprotegerina, Vitamina D, Osteopontina, Col1A1 e RANK-L entre o grupo de doentes e em controles saudáveis pareados, em T_1. O fluido salivar detectou a expressão de todos os cinco marcadores, sendo observado diferença estatística para Osteoprotegerina (*p* <0,0001), Vitamina D BP (*p* = 0,0274) e TRANCE/RANK L (*p* <0,0001)**.** Ademais, a correlação entre a expressão salivar e sérica, no próprio grupo de doentes, evidenciou diferença estatística significativa em todos os marcadores (*p* <0,0001), com exceção ao TRANCE/RANK L (*p* <0,9421)**.** A aferição de alterações ósseas, por meio do índice mandibular cortical, mostrou-se associada à densidade mineral óssea vertebral e femoral, sugerindo o papel da radiografia panorâmica como indicador de modificações da massa óssea, sendo uma ferramenta auxiliar à diagnose; porém, não substituível à densitometria óssea. A saliva mostrou-se como uma alternativa biológica aos demais fluidos corporais, na detecção de alterações sistêmicas pertinentes ao metabolismo ósseo, resultantes da corticoterapia crônica, em indivíduos com pênfigo vulgar.

Palavras-chave: Osteoporose induzida por glicocorticoides. Biomarcadores ósseos. Saliva. Índices radiomorfométricos. Radiografia panorâmica.

ABSTRACT

Nagano CP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: salivary expression of bone turnover biomarkers and radiomorphometric analysis in long-term corticotherapy [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Original.

Osteoporosis is a chronic, degenerative osteometabolic disorder with a multifactorial etiology, characterized by the reduction of bone mineral density, in which the deterioration of the bone microarquitecture is observed; this leads to changes in the physical and quantitative properties of the human skeleton, resulting in fragility and increased risk of fractures. The desease is classified as primary and secondary osteoporosis, whereas glucocorticoid-induced osteoporosis (GIOP) corresponds the most incident among the secondary typologies. Microarquitectural bone changes result from the chronic regime of high steroid doses, and its diagnosis is performed by dual-emission X-ray absorptiometry (DXA). Nevertheless, it is characterized as a high-cost and limited access technique for most of the population, remaining as major challenge to multidisciplinar health teams. In order to implement less invasive and more accessible approaches for the screening of glucocorticoid-induced osteoporosis, the present study analyzed the impact of prolonged corticosteroid therapy through comparative salivary biochemical evaluation of bone biomarkers, associated with radiomorphometric study of mandibular cortical index (IMCo), in two different periods. Our study observed significant reductions in the densitometric data of patients submitted to prolonged corticosteroid therapy, who showed significantly altered values of vertebral and femoral T-score ($p<0.0001$ and $p=0.0122$, respectively), one year after the drug institution (T_1). Fifty-six per cent of the patients presented a reduction in bone mineral density (BMD) when compared to the initial therapy ($p=0.0002$). The impact of the prolonged therapeutic regimen significantly reflected in patients' body mass index ($p=0.0156$). Cortical mandibular index assessment on panoramic radiographs resulted in statistically significant differences ($p<0.0001$), exhibiting a strong correlation (rs = 0.7952) between the two periods, as well as a positive correlation between the cortical mandibular index and the densitometric classification (T_0, $p=0.0443$ and in T_1, $p=0.3626$). Additionally,

Luminex® immunoassay was performed in order to evaluate the salivary expression of bone turnover biomarkers (Osteoprotegerin, Vitamin D, Osteopontin, Col1A1 and RANK-L) in the studied group (n=25) and health-matched control group (n=25), in T_1. The expression of all five markers employed in this investigation was detected in saliva, with statistical difference for Osteoprotegerin ($p < 0.0001$), Vitamin D BP ($p = 0.0274$) and TRANCE / RANK L ($p < 0.0001$). Moreover, the correlation between salivary and serum expression in the studied group showed a statistically significant difference in all markers ($p < 0.0001$), except for TRANCE / RANK L ($p < 0.9421$). Cortical mandibular index was significantly associated with BMD status, suggesting the role of panoramic radiography as an indicator of changes in bone mass; nevertheless, not a replaceable tool for DXA. Saliva was shown to be a biological alternative to other body fluids in the detection of systemic changes related to bone metabolism, resulting from chronic steroids, in individuals with pemphigus vulgaris.

Keywords: Glucocorticoid-induced osteoporosis. Saliva. Bone. Biomarkers. Radiomorphometric index.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Funções do tecido ósseo 34

Figura 2.2 - Equilíbrio dinâmico em uma unidade multicelular óssea (UMO) 36

Quadro 2.1 Desordens associadas ao desenvolvimento de osteoporose secundária 40

Figura 2.3 - Diferenciação osteoclástica, a partir da fusão de células da linhagem mieloide..... 38

Figura 2.4 - Diferenciação do padrão trabecular na osteoporose 48

Quadro 2.2 - Fármacos associados ao desenvolvimento de osteoporose secundária 52

Figura 2.5 - Acometimento oral por pênfigo vulgar 56

Figura 2.6 - Imagem densitométrica da DMO em coluna lombar 60

Figura 2.7 - Medição da DMO em cabeça femoral 60

Figura 2.8 - Classificação da cortical inferior mandibular, de acordo com Klemetti (1994) 63

Figura 2.9 - Indice cortical mandibular (IMCo) 64

Figura 4.1 - Indice cortical mandibular (IMCo) C1: cortical normal 77

Figura 4,2 - Indice cortical mandibular (IMCo) C2: ligeira a moderada erosão 77

Figura 4.3 - Indice cortical mandibular (IMCo) C3: afilamento da cortical e porosidade severa. 77

Figura 4.4 - Pré-desenho da placa de 96 poços para dosagem de biomarcadores 82

Figura 4.5 - Esquema das diluições em série para o preparo da curva padrão 83

Figura 4.6 - (A) Preparo dos reagentes para o imunoensaio; (b) incubação da placa sob agitação 85

Figura 4.7 - Placa magnética 85

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1 - Distribuição dos participantes da pesquisa, segundo o sexo 89

Gráfico 5.2 - Distribuição das faixas etárias correspondentes aos participantes da pesquisa (n=25) 90

Gráfico 5.3 - Distribuição das doses diárias de Prednisona utilizadas no início da terapia (T_0) e após 12 meses (T_1) 91

Gráfico 5.4 - Distribuição dos valores de T-score em coluna, em T_0 e T_1 92

Gráfico 5.5 - Distribuição dos valores de T-score em fêmur, em T_0 e T_1 92

Gráfico 5.6- Gráficos de dispersão da proporção de T-score em coluna, analisada nos pacientes, em T_0 e T_1 93

Gráfico 5.7- Gráficos de dispersão da proporção de T-score femoral, analisada nos pacientes, em T_0 e T_1 94

Gráfico 5.8- Distribuição dos valores de DMO em coluna, em T_0 e T_1 95

Gráfico 5.9- Distribuição dos valores de DMO em fêmur, em T_0 e T_1 95

Gráfico 5.10- Gráficos de dispersão da proporção de densidade mineral óssea (DMO) da coluna, analisada em T_0 e T_1 96

Gráfico 5.11- Gráficos de dispersão da proporção de densidade mineral óssea (DMO) em fêmur, analisada em T_0 e T_1 96

Gráfico 5.12- Distribuição do diagnóstico densitométrico avaliado em T_0 e T_1 97

Gráfico 5.13- Gráficos de dispersão do diagnóstico densitométrico, analisado em T_0 e T_1 97

Gráfico 5.14- Distribuição do índice de massa corporal, avaliado em T_0 e T_1 98

Gráfico 5.15- Gráficos de dispersão do índice de massa corporal (IMC), analisado em T_0 e T_1 99

Gráfico 5.16- Gráficos de dispersão do índice de massa corporal (IMC) x Corticoterapia, analisado em T_0 e T_1 99

Gráfico 5.17- Distribuição do consumo alimentar diário de cálcio, em T_1 100

Gráfico 5.18- Distribuição da prática de exercícios físicos entre os participantes da pesquisa, em T_1 100

Gráfico 5.19- Distribuição do índice de mandibular cortical, avaliado em T_0 e T_1 102

Gráfico 5.20- Gráficos de dispersão do índice mandibular cortical (IMCo), analisado em T_0 e T_1 102

Gráfico 5.21- Gráficos de dispersão do índice mandibular cortical (IMCo) e correlação entre idade e sexo 104

Gráfico 5.22- Gráfico de dispersão do índice mandibular cortical (IMCo) e correlação entre diagnóstico densitométrico, em T_0 104

Gráfico 5.23- Gráficos de dispersão das concentrações salivares de Col1A1 e Osteoprotegerina avaliadas entre os dois grupos estudados 107

Gráfico 5.24- Gráficos de dispersão das concentrações salivares de Vitamina D e RANK-L avaliadas entre os dois grupos estudados 107

Gráfico 5.25- Gráfico de dispersão da concentração salivar de Osteopontina avaliada entre os dois grupos estudados 108

Gráfico 5.26- Gráfico de dispersão da concentração salivar e sérica de Colágeno I e Osteoprotegerina avaliada no grupo de estudo 109

Gráfico 5.27- Gráfico de dispersão da concentração salivar e sérica de Vitamina D e RANK-L avaliada no grupo de estudo 110

Gráfico 5.28- Gráfico de dispersão da concentração salivar e sérica de Osteopontina avaliada no grupo de estudo 110

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Órgãos, hormônios e íons intervenientes no metabolismo cálcio-fosfato.... 42

Tabela 4.1 - Classificação de osteoporose, a partir da DMO (Organização Mundial da Saúde, OMS) 78

Tabela 4.2 - Classificação internacional da obesidade, segundo o índice de massa corporal.. 78

Tabela 4.3 - Biomarcadores relacionados ao metabolismo ósseo 81

Tabela 4.4 - Interpretação do teste Kapa 87

Tabela 5.1 - Distribuição das doses diárias de Prednisona utilizadas na avaliação inicial (T_0) e após 12 meses (T_1) 90

Tabela 5.2- Distribuição dos valores de T-*score* avaliados em coluna e fêmur, em T_o e T_1 91

Tabela 5.3- Resultado do teste de Wilcoxon para os pares de variáveis densitométricas T-*score* 93

Tabela 5.4- Distribuição dos valores de densidade mineral óssea avaliados em coluna e fêmur, em T_0 e T_1 94

Tabela 5.5- Resultado do teste pareado de Wilcoxon para os pares de variáveis de DMO, em coluna e fêmur, estudados em T_o e T_1 96

Tabela 5.6- Distribuição dos índices de massa corporal (IMC) avaliados em T_0 e T_1 98

Tabela 5.7- Resultado do teste pareado de Wilcoxon para o par de variável IMC, estudado em T_0 e T_1 98

Tabela 5.8- Resultado do teste pareado de Wilcoxon para o par de variável IMC x Corticoterapia, estudado em T_o e T_1 99

Tabela 5.9- Classificação da amostra quanto ao índice mandibular cortical e distribuição de sexo, em T_o e T_1 101

Tabela 5.10- Resultado do teste pareado de Wilcoxon para o índice mandibular cortical, avaliado em T_0 e T_1 103

Tabela 5.11- Resultado da correlação entre IMCo e demais variáveis, em T_0 e T_1 103

Tabela 5.12- Distribuição de ausências dentárias avaliadas em T_o e T_1..... 105

Tabela 5.13- Distribuição dos níveis salivares dos biomarcadores (valor mínimo, máximo, média ± desvio-padrão) presentes nas amostras dos dois grupos avaliados..... 106

Tabela 5.14- Resultado do teste U-Mann Whitney para avaliação da expressão salivar entre o grupo de estudo e grupo controle 106

Tabela 5.15- Distribuição dos níveis séricos dos biomarcadores (valor mínimo, máximo, média ± desvio-padrão) presentes nas amostras no grupo de estudo 108

Tabela 5.16- Resultado do teste U-Mann Whitney para correlação entre a expressão salivar e sérica dos biomarcadores no grupo de estudo..... 109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
BMP	Bone morphogenetic protein
CA2	Anidrase carbónica 2
CATK	Catepsina K
CTR	Calcitonin receptor
DBP	Vitamin d-binding protein
DC-STAMP	Dendritic cell-specific transmembrane protein
DXA	Densitometria óssea por absorciometria por dupla emissão de raio X
DMO	Densidade mineral óssea
FGF	Fibroblast growth factor
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GLA	Gamma-carboxy-L-glutamic acid
GC	Glicocorticoides
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IGF	Insulin-like growth factors
IL	Interleucina
LGR4	Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4
M-CSF	Macrophage-colony stimulationg factor
mVDR	Membrane vitamin d-receptor
nVDR	Nuclear vitamin d-receptor
OB	Osteoblasto
OC	Osteoclasto
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPG	Osteoprotegerina
OIG	Osteoporose induzida por glicocorticoides
OPN	Osteopontina
pQCT	Tomografia quantitativa computadorizada periférica
PTH	Hormônio paratireodiano
QCT	Tomografia quantitativa computadorizada
QSUS	Ultrassonografia quantitativa

RANK	Receptor activator of nuclear factor-kappa B
RANKL	Ligand of receptor activator of nuclear factor-kappa B
PAN	Radiografia panorâmica
SBEM	Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia
TNF	Tumor necrosis factor
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
USP	Universidade de São Paulo
VDR	Vitamin d-receptor
UVB	Radiação ultravioleta B
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µm	Micrômetro
mol/L	Molar por litro
ng/mL	Nanograma por mililitro
>	Maior
mL/min	Mililitro por minuto
pg/mL	Picograma por mililitro
rpm	Rotações por minuto
µL	Microlitro
µL/min	Microlitro por minuto
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 29
2 REVISÃO DE LITERATURA 33
2.1 Tecido ósseo – Base biológica 33
2.1.1 Composição 34
2.1.2 Remodelação óssea 36
2.2 Mecanismo de regulação: PTH, Cálcio e Vitamina D 41
2.3 Osteoporose 47
2.3.1 Osteoporose induzida por glicocorticoides 52
2.4 Diagnóstico imaginológico 57
2.4.1 A saliva como ferramenta diagnóstica 66
2.4.1.1 Expressão salivar de biomarcadores associados ao metabolismo ósseo 67
3 OBJETIVOS 71
4 MATERIAL E MÉTODOS 73
4.1 Atendimento às normas de bioética 73
4.2 Delineamento do estudo 73
4.3 População do estudo e seleção da amostra 73
4.3.1 Critérios de inclusão 74
4.3.2 Critérios de exclusão 74
4.4 Dados demográficos 75
4.5 Aquisição das imagens radiográficas (PAN) 75
4.5.1 Avaliação imaginológica 76
4.5.2 Avaliação da densidade mineral óssea e massa corporal 77
4.6 Amostras salivares e séricas 79
4.6.1 Análise da expressão salivar e sérica de biomarcadores do *turnover* ósseo 80
4.6.2 Delineamento do imunoensaio 81
4.6.2.1 Preparo dos reagentes para imunoensaio 83
4.7 Análise estatística 86

5 RESULTADOS 89
5.1 Pacientes 89
5.2 Densidade mineral óssea 91
5.3 Índice mandibular cortical (IMCo) 101
5.4 Biomarcadores ósseos 105
6 DISCUSSÃO 111
7 CONCLUSÕES 125
REFERÊNCIAS 127
ANEXOS 143

1 INTRODUÇÃO

Mundialmente considerada como um relevante problema de saúde pública, a osteoporose consiste em uma séria complicação osteometabólica crônico-degenerativa, assintomática, caracterizada pela diminuição da densidade mineral óssea (DMO), na qual observa-se a deterioração microarquitetural do osso trabecular, com consequentes mudanças incapacitantes nas propriedades físicas do esqueleto humano (Kanis, 2007; Kanis et al., 2012).

A significância clínica da osteoporose resulta em maior fragilidade óssea e, consequentemente, suscetibilidade à fratura, sendo seu estudo especialmente motivado frente às substanciais repercussões em relação à morbidade e mortalidade. Esse desequilíbrio das estruturas esqueléticas afeta, principalmente: coluna, colo femoral, segmento proximal do osso rádio e segmento distal do antebraço. Não obstante, os efeitos da doença são sistêmicos. Ao que tange o acometimento oral, esse processo induz, lenta e gradativamente, à reabsorção do osso alveolar e, subsequentemente, à perda dental, tal como provém um tecido ósseo de baixa qualidade, interferindo ou inviabilizando reabilitações com próteses convencionais e/ou implantes dentários, minimizando a qualidade de vida do paciente portador da doença osteoporótica (Kanis et al., 2012; Makker et al., 2012; Pavičin et al., 2017).

A suscetibilidade ao desenvolvimento da osteoporose, tal como seu diagnóstico precoce, ainda se perpetuam como um grande desafio às equipes multidisciplinares de saúde. A doença apresenta etiologias distintas, englobando diversos fatores dependentes da causa/fator de risco associado. É classificada em: alteração *primária* ou *secundária* (Raisz, 2005; Sözen et al., 2017).

A osteoporose primária consiste em uma doença associada à senilidade. Afeta, majoritariamente, a população feminina em idade pós-menopausa; entretanto, homens idosos são, também, acometidos. A patogênese da deterioração óssea e fragilidade esquelética está associada ao declínio natural da síntese e dos níveis de esteroides gonadais, assim como ao envelhecimento tantodo osso trabecular, como

cortical. Fatores genéticos e comportamentais são, também, de fundamental importância etiológica. Corresponde à tipologia mais frequente, sendo um dos principais focos da medicina preventiva (Raisz, 2005; Painter et al, 2006; Sözen et al, 2017).

A **osteoporose secundária** consiste na diminuição da densidade mineral óssea, onde significativas alterações microarquiteturais ósseas resultam do uso crônico de determinados fármacos que atuam no metabolismo do cálcio (osteoporose medicamentosa), ou em virtude de afecções pré-existentes. Dentre as doenças que potencialmente podem induzir desenvolvimento da osteoporose secundária, ressalta-se às de origem: endócrina, autoimune, renal, hematológica, gastrointestinal, neoplásica e nutricional. Tanto mulheres em fase pré- e pós-menopausa, assim como homens, podem ser acometidos (Painter et al., 2006; Carter, 2018).

O subtipo mais incidente de osteoporose secundária corresponde à **osteoporose induzida por glicocorticoides** (OPIG), representando, aproximadamente, 25% de todas as causas de osteoporose (Van Staa et al., 2003; Mazziotti et al., 2010; Compston, 2018). A corticoterapia prolongada (> 3 meses) constitui a principal opção terapêutica empregada em uma gama variada de doenças, sobretudo em doenças autoimunes e inflamatórias. Todavia, apesar de seus benefícios clínicos, a administração crônica de corticoides sintéticos *per se* não deve ser subestimada, sendo notadamente associada a diversos efeitos colaterais substanciais, tais como: alterações musculoesqueléticas (osteoporose, osteonecrose, miopatias, sarcopenia), além de perturbações metabólicas, como intolerância à glicose, diabetes mellitus, dislipidemia, obesidade. Tais alterações são dose-dependente e o desenvolvimento de osteoporose induzida por glicocorticoides caracteriza-se como um fator determinante ao risco de fraturas (Cooper et al., 2016; Carter, 2018).

O diagnóstico da osteoporose – seja esta primária ou secundária – baseia-se na análise quantitativa da densidade mineral óssea (DMO), realizada por exames imaginológicos, dentre os quais, a densitometria óssea por absorciometria por dupla emissão de raios X (DXA) corresponde ao método mais preciso na avaliação diag-

nóstica e terapêutica da doença, e predição ao risco de fratura óssea (Kanis et al., 2012). A detecção e auxílio à diagnose podem ser realizados por outras modalidades de imagem, como ultrassonometria quantitativa (QUS), tomografia quantitativa computadorizada (QCT), tomografia quantitativa computadorizada periférica (pQCT) (Compston, 2018). Não obstante, caracterizam-se como metodologias de alto custo, significativa incidência à radiação ionizante e de acesso limitado a maior parte da população brasileira (Watanabe, 2009).

Uma das mais importantes ferramentas auxiliares ao diagnóstico de doenças que acometem o complexo estomatognático, consiste na radiografia panorâmica de mandíbula (PAN). Rotineiramente utilizado pelos cirurgiões-dentistas, representa, também, um exame auxiliar no rastreamento da doença osteoporótica. Exibe características notórias, tais como seu custo reduzido, quando comparado a demais exames imaginológicos; baixa emissão de radiação ionizante, representando um método seguro; e de fácil acesso à maioria dos pacientes (Taguchi et al., 2003; Watanabe, 2009; Valerio et al., 2013; Pavicin et al., 2014).

Afecções sistêmicas de naturezas diversas são, primariamente, detectadas em análises sanguíneas, a partir da verificação de alterações em concentrações de componentes celulares, biomarcadores, íons, hormônios, etc. A detecção sérica de biomarcadores demonstra exímia relevância ao diagnóstico e terapêutica, inclusive em desordens ósseas. No entanto, trata-se de um método invasivo e consideravelmente desconfortável. Para tanto, torna-se necessário a implementação de técnicas igualmente eficazes ao auxílio diagnóstico; porém, menos invasivas, que possam ser indicadoras da presença ou atividade de doença. Nas últimas décadas, fluidos orais têm sido significativamente utilizados como ferramenta diagnóstica tanto para doenças orais, como sistêmicas (Wong, 2006; Lee; Wong, 2009; Martí-Alamo et al., 2012; Miricescu et al., 2014).

Com o intuito de implementar abordagens menos invasivas no rastreio da osteoporose secundária (induzida por glicocorticoides), o presente estudo propõe analisar o impacto da corticoterapia prolongada pela avaliação bioquímica salivar comparativa de biomarcadores ósseos, associada ao estudo radiomorfométrico de radiografias panorâmicas de mandíbula.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão de literatura abordará a constituição biológica e características gerais do tecido ósseo. O conhecimento básico destes fatores será relevante para subsequente apresentação e compreensão da osteoporose, seu impacto sobre o metabolismo ósseo, etiopatogenia, direcionando os aspectos fisiopatológicos à osteoporose induzida por corticoides, condição avaliada nesta investigação.

2.1 Tecido Ósseo - Base Biológica

O osso consiste em um órgão formado por um tecido especializado de natureza conjuntiva, altamente vascularizado e resistente, caracterizado por amplo dinamismo biológico, o qual apresenta exímia capacidade adaptativa (constante habilidade de reparação e remodelação), frente às diversas demandas funcionais, como ocorre, por exemplo, em fraturas, sendo também, sensível a influências metabólicas, nutricionais e endócrinas (Guyton; Hall, 2017).

Constituinte principal do esqueleto, o tecido ósseo exibe múltiplas funções – sobretudo, vitais – das quais, destacam-se: suporte e proteção aos órgãos; alojamento da medula óssea; apoio aos músculos esqueléticos, possibilitando a movimentação do organismo, além de atuar como um sistema de alavancas que amplia as forças geradas na contração muscular; armazenamento de lipídios (medula amarela), íons cálcio, fosfato, entre outros; e pela formação, desenvolvimento e maturação de células sanguíneas (hematopoiese) (figura 2.1) (Katchburian; Arana, 2012; Guyton; Hall, 2017).

Figura 2.1 – Funções do tecido ósseo

Fonte: A autora

2.1.1 Composição

O tecido ósseo é composto por uma matriz extracelular (matriz óssea), formada por componentes orgânico (10-30%) e inorgânico (70-90%). A matriz orgânica é constituída por fibras colágenas do tipo I (~90%), por glicoproteínas (osteonectina, osteopontina, trombospondina e fibronectina), proteínas com ácido gama-carboxiglutâmico GLA (osteocalcina e gla-proteína da matriz), enzimas (fosfatase alcalina, colagenase, proteinases cisteínas e ativador de plasminogênio), fatores de crescimento (*fibroblast growth factors* (FGF), *insulin-like growth factors* (IGF), *transforming growth factors beta* (TGF-β) e proteínas ósseas morfogenéticas (BMP).

A fração inorgânica (matriz mineral) é composta, predominantemente, por íons cálcio e fósforo. Em menores quantidades, estão presentes: bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. Os íons cálcio e fosfato apresentam-se predominantemente agrupados; e, não, em sua forma livre, estando disponíveis na forma de fosfato de cálcio cristalino que, a partir de um processo de cristalização, tornam-se cristais de hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). Estão dispostos ao longo das fibras colágenas e entremeados por substância fundamental amorfa. A associação da hidroxiapatita com as fibras colágenas e glicoproteínas confere a dureza e resistência ao tecido ósseo (Junqueira; Carneiro, 2013; Carvalho et al., 2018).

O tecido ósseo é caracterizado por intenso e constante dinamismo que, apesar de metabolicamente dispendioso, é constantemente renovado por intermédio de um processo de reabsorção óssea e, subsequente e coordenadamente, reposto por um processo de remodelação e formação óssea. Sua formação e manutenção são orquestradas por células especializadas:

- **Osteócitos** - grupo celular mais abundante, corresponde às células quiescentes derivadas dos osteoblastos. De formato achatado, situam-se em cavidades ou lacunas no interior da matriz óssea, sendo responsáveis pela manutenção de sua integridade. São capazes de detectar alterações físico-químicas regionais, induzindo o recrutamento de osteoclastos e osteoblastos para as funções, respectivamente, de síntese e reabsorção de matriz óssea, assim como a difusão de nutrientes;

- **Osteoblastos (OB)** - responsáveis pela síntese do componente orgânico da matriz. Localizam-se na superfície óssea, apresentando morfologia cúbica a colunar. Uma vez concluída a síntese da matriz, esta dispõe-se em torno de cada osteoblasto, aprisionando-o, sendo denominado, então, osteócito. A matriz óssea recém-formada não calcificada, circunjacente aos osteoblastos, é chamada de osteoide;

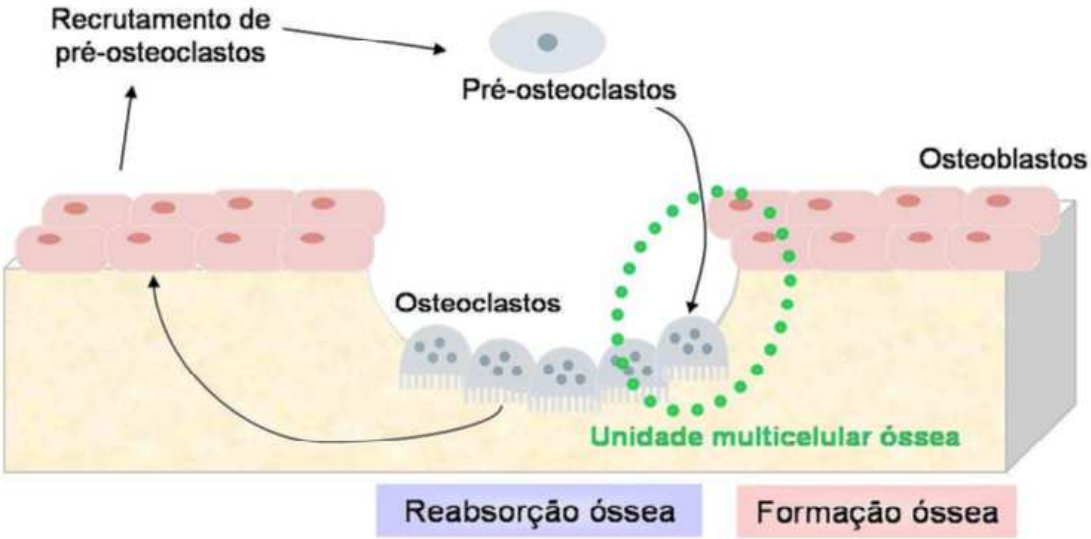
- **Osteoclastos (OC)** – são células gigantes, multinucleadas, responsáveis pelo processo de reabsorção óssea. Localizam-se na superfície óssea e, por intermédio da secreção de enzimas ácidas e hidrolíticas e graças às suas pro-

priedades fagocitárias, removem os sais minerais da matriz, liberando fragmentos minerais ósseos e colágeno (Junqueira; Carneiro, 2017).

2.1.2 Remodelação óssea

A remodelação óssea é um processo constante (Figura. 2.2), mediado por uma ampla variedade de fatores locais e circulantes (hormônios, fatores de crescimento, citocinas, etc.) que atuam nos osteoblastos, e ordenado pela ação contínua da unidade multicelular óssea (UMO), a qual é gerenciada por ambos tipos celulares (osteoblastos e osteoclastos), resultando tanto em reabsorção e neoformação óssea (Caetano-Lopes et al., 2009).

Figura 2.2 – Equilíbrio dinâmico em uma unidade multicelular óssea (UMO), na qual o osso é reabsorvido por osteoclastos e, subsequentemente, formado por osteoblastos (adaptado de Caetano-Lopes et al., 2009)



O ciclo de reabsorção e formação óssea é um processo ordenado e mediado, primariamente, por sinais de origem osteoblástica. A reabsorção óssea é controlada pela atividade acoplada do osteoblasto e osteoclasto, dependente da diferenciação e função dos mesmos e é controlada em nível molecular (Robling et al., 2006; Novack; Teitelbaum, 2008). A partir da intermediação de fatores locais e sistêmicos, osteoblastos sinalizam a diferenciação e maturação dos precursores osteoclásticos, assim como o recrutamento de osteoclastos já maduros, iniciando o processo de reabsorção em uma pequena unidade multicelular óssea (UMO). Após um período de 2-3 semanas, osteoclastos funcionais entram em apoptose, e osteoblastos direcionam-se à lacuna de reabsorção óssea (lacuna de Howship), iniciando a síntese e depósito de nova matriz óssea (Matsuo; Irie, 2008).

Concluída a neoformação óssea, alguns osteoblastos se aprisionam no osso recém-formado, e tornam-se, então, osteócitos. Estas células conectam-se entre si e com a superfície óssea, por intermédio de uma rede de canais, pelos quais transduzem sinais mecânicos, necessários para a remodelação óssea, frente às mudanças de pressão e carga aplicada (Katchburian; Arana, 2012; Junqueira; Carneiro, 2013).

A diferenciação dos osteoclastos (Figura 2.3) ocorre a partir de células precursoras da linhagem mieloide (monócitos - macrófagos), e é dependente da conjugação de dois fatores:

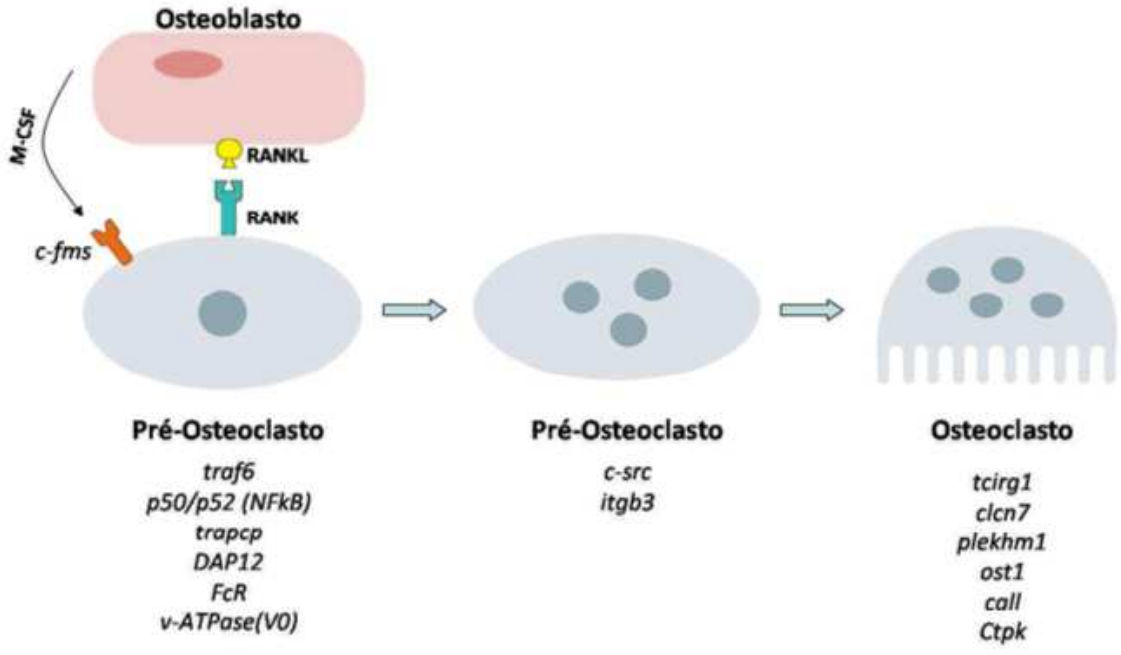
(i) o *Macrophage-Colony Stimulating Factor* (M-CSF);

(ii) da interação de uma proteína transmembrana, denominada *Receptor Activator of nuclear factor-kB* (RANK) ao seu ligante, *Ligand of receptor activator of NFκB* (RANKL).

O fator M-CSF é essencial nos primeiros passos da osteoclastogênese, aumentando a capacidade de sobrevivência dos precursores osteoclásticos. O RANKL, também conhecido como TNFSF11, é uma proteína transmembrana e faz parte da superfamília dos ligantes de fator de necrose tumoral, TNF (*tumor necrosis*

factor). É produzido por células de linhagem osteoblástica e expresso por células do sistema imunitário (linfócitos T ativados), tanto na sua forma de receptor membranar, como molécula solúvel (Petit et al., 2006). RANKL estimula seu receptor, RANK – o qual está localizado em osteoclastos – levando à diferenciação e aumento da sobrevida dos osteoclastos. Adicionalmente, as células do sistema imunitário sintetizam citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1), IL-6 e IL-17, que potencializam a osteoclastogênese e/ou a ativação do osteoclasto, de forma indireta, aumentando a expressão de RANKL pelos osteoblastos (Schett et al., 2008; Caetano-Lopes et al., 2009).

Figura 2.3 – Diferenciação osteoclástica, a partir da fusão de células da linhagem mieloide, na presença de dois estímulos essenciais, RANKL e M-CSF. O resultado final do processo de osteoclastogênese é uma célula multinucleada com capacidade de reabsorção do osso e que expressa um conjunto específico de genes (adaptado de Del Fattore et al., 2008)



O fator RANKL consiste em um mediador crucial no metabolismo ósseo, sobretudo na destruição óssea patológica oriunda de metástases ósseas, mieloma múltiplo e osteoporose, por intermédio da estimulação da diferenciação, ativação e sobrevida de células osteoclásticas (Boyce; Xing, 2008). A expressão de RANK e/ou RANKL em algumas neoplasias tem sido associada à maior capacidade de invasão tumoral e ao fenótipo metastático (Dougall, 2012; Dougall et al., 2014).

A fusão dos precursores de osteoclastos é desencadeada quando o RANKL se anexa ao RANK, ativando uma proteína transmembranar (*Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein,* DC-STAMP) e uma bomba de prótons dependente de ATP (ATP6V0D2). Os precursores osteoclásticos migram, atraídos por estímulos quimiotáticos, pela corrente sanguínea até ao osso. Aderem à superfície e os monócitos fundem-se, dando origem a células gigantes multinucleadas (pré-osteoclastos), que sofrem uma série de modificações morfológicas, culminando na formação de uma extremidade irregular (*borda ondulada*), característica dos osteoclastos maduros. Simultaneamente às alterações morfológicas, a interação RANK/RANKL na superfície das células precursoras induz, em conjunto com M-CSF, a expressão de genes que tipificam a linhagem osteoclástica: TRAP (*tartrate-resistant acid phosphatase*), CATK (catepsina K), CTR (receptor da calcitonina), CA2 (anidrase carbónica 2), integrinas da classe β_3, entre (Del Fattore et al., 2008).

A borda ondulada aumenta a área de reabsorção do osteoclasto e as integrinas presentes fixam o osteoclasto pela ligação à osteopontina (OPN), uma glicoproteína fosforilada da matriz óssea. Desta forma, o osteoclasto cria um microambiente específico, selado pela borda ondulada. Bombas de prótons dependentes de ATP transportam para a lacuna íons H+, acidificando o meio. Concomitantemente, os osteoclastos secretam, na lacuna de Howship, TRAP e CATK que são ativadas no meio ácido e que degradam, respectivamente, a porção inorgânica e orgânica do osso (Takayanagi, 2007; Caetano-Lopes et al., 2009). Contudo, a fusão e polarização de osteoclastos pode ser inibida pelo receptor solúvel do RANKL, a osteoprotegerina (OPG), também conhecida como TNFRSF11B (Hofbauer, 2006).

A OPG, proteína solúvel sintetizada pelos osteoblastos e células do estroma medular, é um regulador negativo da osteoclastogênese. Atua como um receptor competitivo, ligando-se ao RANKL, inibindo a interação justácrina RANKL/RANK nas células precursoras, diminuindo, assim, a ação dos osteoclastos (Lacey et al., 1998; Hofbauer., 2001; Bezerra et al., 2005; Chen, 2017) e, desta forma, apresenta a abilidade de impedir a destruição do tecido ósseo.

Em 2016, Luo et al. Identificaram um novo receptor competidor para RANKL: *leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 4* (LGR4). À semelhança do RANK, LGR4 expressa-se em osteoclastos; não obstante, a interação LGR4/RANKL regula negativamente a diferenciação de células osteoclásticas, devido à ligação competitiva contra a proteína RANK. Desta forma, ambos OPG e LGR4 constituem inibidores endógenos da sinalização RANK, regulando negativamente a diferenciação osteoclástica e, por conseguinte, a reabsorção óssea.

A osteopontina (OPN), inicialmente descrita por Senger et al. (1979), é uma glicoproteína fosforilada ligadora de cálcio, sendo primariamente identificada como a principal sialoproteína no tecido ósseo. Possui um sítio protease-sensível que separa dois domínios capazes de se unir às integrinas (avb1, avb3, avb5, avb6, a4b1, a5b1, a8b1, and a9b1) da superfície celular, e a um ligante de CD44 (família de glicoproteínas transmembrana envolvidas em processos biológicos como adesão celular, migração celular e metástase). Estes receptores, direta ou indiretamente, ativam vias de sinalização celular, permitindo a mediação da OPN nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular, a qual atuará na regulação de diversos processos fisiológicos e patológicos, como mineralização, remodelação tecidual, regulação da resposta imune (a partir de sua participação no recrutamento de monócitos/macrófagos), e como uma citocina pró-inflamatória, tendo uma ação suplementar, associada a diversas doenças inflamatórias e metabólicas, como diabetes e obesidade (Senger et al., 1979; Kahles et al., 2014).

A OPN é expressa constitutivamente em vários tipos celulares e tecidos, como em pré-osteoblastos, osteoblastos, osteócitos, condrócitos, fibroblastos, células dendríticas, macrófagos e células T, hepatócitos, células musculares, assim como nos rins, dentina, placenta, glândulas mamárias, estando, adicionalmente, presente nos fluidos do corpo (Sodhi et al., 2001; Tokairin et al., 2008; Zanotti et al., 2010; Kahles et al., 2014; Carvalho et al., 2018).

A remodelação tem como objetivos não só estabelecer o pico de massa óssea (que se concretiza entre a segunda e terceira décadas de vida) como, também, na idade adulta, remover o osso danificado (ex.: fraturas) que, posteriormente, será substituído por nova matriz celular. Esta substituição requer que o processo de remodelação esteja em equilíbrio dinâmico, ou seja, que o volume de osso removido seja substituído por igual volume de osso formado. Quando a reabsorção óssea predomina e não é compensada de forma eficaz pela formação de matriz, o osso torna-se osteoporótico, com baixa densidade mineral óssea (DMO), menos resistente, se tornando susceptível à ocorrência de fraturas (Weaver et al., 2016).

2.2 Mecanismo de regulação: PTH, Cálcio E Vitamina D

O processo de remodelação, essencial para a manutenção da integridade do osso, é regulado por inúmeros fatores locais e sistêmicos, dependente, preponderantemente, de componentes de origem endócrina. Os principais reguladores sistêmicos deste processo correspondem a três hormônios responsáveis pela homeostase do cálcio: o PTH (hormônio paratireoidiano ou paratormônio), calcitriol (forma ativa da vitamina D) e calcitonina são (Tabela 2.1). Adicionalmente, outros hormônios, designadamente, o hormônio do crescimento, cortisol e hormônios sexuais, além de fatores de crescimento e proteínas morfogenéticas ósseas, também desempenham ações sobre o metabolismo ósseo (Fukumoto; Martin, 2009).

Tabela 2.1 – Órgãos, hormônios e íons intervenientes no metabolismo cálcio-fosfato

Metabolismo cálcio-fosfato		
Órgãos-alvo	**Hormônios**	**Íons**
Osso Rim Intestino	PTH Calcitriol Calcitonina	Fosfato Cálcio

Fonte: Guyton, 2006; Norman, 2008 ; Fukumoto e Martin, 2009; Nakashima et al., 2011; Aires, 2012.

O hormônio paratireodiano (PTH), também conhecido como paratormônio, é um polipeptídeo constituído por 84 aminoácidos, sintetizado e secretado pelas glândulas paratireoides, a partir de um precursor, o pré-pró-paratormônio. É um dos responsáveis pelo controle da calcemia, e o mais importante na regulação das alterações agudas das concentrações extracelulares de cálcio. Em suma, é um hormônio hipercalcemiante e hipofosforemiante. Tem sua secreção estimulada a partir da diminuição do cálcio plasmático (hipocalcemia), aumento da concentração de fosfato e/ou pela deficiência de vitamina D. No que concerne sua participação no metabolismo ósseo, o PTH tem um efeito estimulador da osteoclastogênese, intensificando a reabsorção óssea e, consequentemente, induzindo o quadro de hipercalcemia. O PTH estimula o aumento da reabsorção renal de cálcio, e diminui a reabsorção de fósforo. Adicionalmente, estimula a síntese de calcitriol (forma ativa da vitamina D), a qual induz aumento do transporte transepitelial de cálcio no intestino, mobilizando-o, a partir dos ossos para a circulação. Este hormônio possui receptores de membrana nos néfrons, osteócitos e osteoblastos; no entanto, não os possui no intestino e em osteoclastos, onde age por intermédio da vitamina D (Nakashima et al., 2011).

A calcitonina consiste em um hormônio polipeptídeo (32 aminoácidos), sintetizado na tireoide, estimulado a partir de um quadro de hipercalcemia. Possui uma ação inibitória da mobilização (saída) de sais minerais, ou seja, inibe a atividade osteoclástica. Reduz o processo de reabsorção óssea, provocando uma

diminuição dos níveis séricos de cálcio. Adicionalmente, atua nos rins, reduzindo a reabsorção de cálcio e fosfato, além de diminuir a absorção de cálcio nos intestinos. Conclui-se, assim, que a calcitonina corresponde a um hormônio hipocalcemiante e hipofosfatemiante (Guyton; Hall, 2017).

O cálcio é fundamentalmente importante para todos os sistemas biológicos, sendo sua disponibilidade dietética um determinante crítico em sua homeostase. Aproximadamente 99% do cálcio corporal encontra-se no esqueleto; o restante distribui-se na composição dos dentes, fluidos corporais extra e intracelulares. Cerca de 50% do cálcio plasmático está na forma ionizada (Ca++) biologicamente ativa, 10% do cálcio na forma não iônica (ex.: bicarbonato de cálcio) e 40% ligado a proteínas carreadoras, como a albumina. O processo de absorção e excreção do cálcio ocorre em equilíbrio, no qual a mesma quantidade absorvida, é eliminada (sendo esta, predominantemente, pelas fezes). Sua absorção ocorre no trato gastrointestinal (sobretudo no duodeno e jejuno proximal), por uma combinação de ações de transporte ativo e difusão passiva, sob influência da vitamina D. A presença desse mineral, no plasma ou em reserva, está diretamente relacionada à condução de estímulos nervosos; contração e relaxamento muscular; coagulação sanguínea; controle de hormônios, como a vitamina D_3, paratormônio e calcitonina; além de prover a quantidade de cálcio necessária para o desenvolvimento esquelético (Aires, 2012).

Os níveis séricos de cálcio ionizado devem ser mantidos dentro de uma estreita faixa de variação, e qualquer tendência à queda é percebida pelas paratireoides, provocando a liberação imediata de PTH e o desencadeamento de uma cascata de reações, com o objetivo de elevar a calcemia. Nos rins, o PTH atua aumentando a síntese da molécula ativa da vitamina D, $1,25(OH)_2D$, pelo estímulo da 1-α-hidroxilase, reduzindo a excreção urinária de cálcio e favorecendo a eliminação do fósforo. O efeito fosfatúrico é importante, já que o fósforo leva à formação de complexos cálcio-fósforo, diminuindo a disponibilidade de cálcio livre (Norman, 2008).

A denominação “vitamina D” consiste em um conjunto de moléculas esteroides derivadas do 7-deidrocolesterol (7-DHC) presentes na epiderme que, por

intermédio de reações fotolíticas e um eixo metabólico enzimático, adquire características químico-estruturais distintas e, desta forma, torna-se metabolicamente ativo, sendo, por fim, denominado 1,25-dihidroxicolecalciferol [1,25$(OH)_2$D ou calcitriol]. Essa cascata de reações é dependente de sua proteína transportadora cognata, *vitamin d-binding protein* (DBP ou transcalciferina), seu receptor nuclear (VDR, *vitamin d-receptor*) e de enzimas do complexo citocromo P450, sendo estas responsáveis pela ativação e inativação das moléculas esteroides (Bouillon et al., 1995; Norman, 2008).

O 1,25-dihidroxicolecalciferol corresponde a um componente-chave na regulação do metabolismo ósseo e na homeostasia do cálcio e fosfato (aumentando sua absorção), por meio de um *feedback* negativo com o paratormônio (PTH). Os amplos efeitos biológicos da 1,25$(OH)_2$D são mediados por seu receptor nuclear (VDR ou NR1I1), membro da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição, expresso em quase todos os tecidos do organismo humano, tendo mais de 900 genes alvos potenciais (Wang et al., 2005). Adicionalmente a seu clássico papel regulador da fisiologia osteomineral, ressalta-se a ação, direta ou indireta, da vitamina D na modulação de diversas funções essenciais à manutenção da homeostase sistêmica, especificamente por meio da competição do domínio de ligação do receptor nuclear (VDR).

Existe 2 tipos de receptor de VDR - os quais distinguem-se entre si, de acordo com sua localização celular: VDR membranar (mVDR) e VDR nuclear (nVDR). O primeiro participa de processos celulares relacionados à sinalização, diferenciação e apoptose; manutenção da função neuromuscular; modulação da autoimunidade; síntese de interleucinas inflamatórias; regulação musculoesquelética; controle da pressão arterial; e no metabolismo de adipócitos e da insulina. Em contrapartida, o nVDR atua diretamente no controle de expressão gênica que repercute na síntese de proteínas-alvo, regulando funções biológicas tecido-dependente, como na homeostasia mineral (Sintov et al., 2014; Pike et al., 2017).

A vitamina D pode ser obtida por meio de duas formas: sintetizada natural e endogenamente (80-90%), cujo processo de conversão se inicia na pele, a partir de

uma reação fotoquímica, em resposta à exposição à radiação ultravioleta (UVB) ou a partir da dieta (10-20%) de fontes de origem animal (vitamina D_3 ou colecalciferol – presente principalmente em peixes de água fria e profunda, como atum e salmão) ou de origem vegetal (vitamina D_2 ou ergosterol, encontrado em fungos comestíveis). A moléculas das vitaminas D_2 e D_3 diferem entre si não só pela origem, mas por D_2 apresentar um carbono a mais (são 28 carbonos na estrutura), um grupo metil extra e uma dupla ligação entre os carbonos 22 e 23, sendo o colecalciferol considerado mais potente, em termos biológicos, do que o ergosterol na conversão à 25(OH)D (Holick, 2008; Kochupillai, 2008).

Quando fornecida pela dieta, o colecalciferol e o ergoesterol são transportados à corrente sanguínea, vinculados à uma glicoproteína carreadora, *vitamin d-binding protein* (DBP, ou transcalciferina). As moléculas são absorvidas no intestino delgado, com a participação dos sais biliares, na forma de quilomícrons (lipoproteínas formadas nas células do epitélio intestinal, a partir das gorduras da dieta). Enquanto disponível na circulação, a vitamina D pode ser sequestrada por tecidos periféricos, como tecido adiposo e muscular (Holick, 2008).

A síntese endógena da vitamina D se inicia a partir de uma molécula precursora (7-deidrocolesterol ou 7-DHC), a qual está armazenada na camada bilipídica das membranas celulares da epiderme (camadas espinhosa e basal), sendo ativada a partir da exposição à radiação solar direta (UVB), nos comprimentos de onda entre 290 e 315 µm. A cascata de ativação da vitamina D pode ser substancialmente afetada por alguns fatores: estação de inverno; países de clima frio; indivíduos idosos (os quais apresentam a pele mais fina e, consequentemente, menor reserva de 7DHC); concentração de melanina presente na pele (o pigmento compete pelo fóton da radiação UVB, diminuído a disponibilidade deste para a fotólise do 7-DHC). Desta forma, indivíduos negros requerem exposição solar mais prolongada (Webb, 1988; Looker et al., 2002)

O eixo metabólico enzimático prossegue, a partir da absorção do fóton UVB pelo 7-deidrocolesterol, gerando a pré-vitamina D_3 que, por ser termoinstável, sofre uma isomerização induzida pelo calor, assumindo uma nova conformação, a vitamina D3 (colecalciferol). É, então, excretada e liberada à corrente sanguínea,

acoplada à DBP. Em seguida, ao atingir o fígado, tanto D_2 e D_3 sofrem uma hidroxilação no carbono 25, mediada pela enzima 25-hidroxilase (ou CYP2R1 – enzima microssomal da superfamília do citocromo P450) e regulada pela concentração de cálcio e pelo paratormônio (PTH), dando origem ao 25-hidroxicolecalciferol ou calcidiol [25(OH)D_3 e 25(OH)D_2]. Subsequentemente, nos rins, sofre uma segunda hidroxilação no carbono 1, pela 1-α-hidroxilase renal, sendo finalmente convertida em sua forma metabolicamente ativa: 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25$(OH)_2$D) ou calcitriol. A 1,25$(OH)_2$D é o fator primordial na regulação da homeostase do cálcio e do fósforo (Guyton; Hall, 2017).

No osso, a 1,25$(OH)_2$D atua fisiologicamente de forma permissiva na mineralização da matriz proteica óssea. Frente a níveis reduzidos de cálcio na dieta, sua ação passa a ser indutora da reabsorção. Atua em sinergismo com o PTH, mobilizando cálcio e fósforo, mediante a indução da diferenciação de células precursoras em osteoclastos. Adicionalmente, a 1,25$(OH)_2$D atua nos osteoblastos maduros, aumentando a expressão da fosfatase alcalina, da osteocalcina e da osteopontina. No intestino, a 1,25$(OH)_2$D favorece a absorção de cálcio no duodeno, e de fósforo no jejuno e íleo. A normalização da calcemia e a própria vitamina D, agindo em seus receptores nas paratireoides, inibem a secreção de PTH (Norman, 2008).

A concentração sérica da 25(OH)2D constitui o indicador mais confiável para a avaliação do status de sua absorção proveniente da dieta e síntese cutânea. Os valores de 25(OH)D podem ser expressos em nmol/L ou ng/mL. Segundo a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM), a faixa de normalidade dos níveis séricos da 25(OH)D é considerada a partir de valores de referência de >20 ng/ml para a população saudável, sendo esta necessária para manter o PTH em níveis adequados e não permitir o aparecimento de distúrbios clínicos e metabólicos relacionados à hipovitaminose (Ferreira et al., 2017)

Em decorrência às mudanças demográficas mundiais – sobretudo com o aumento da expectativa de vida, políticas de saúde voltadas à prevenção do desenvolvimento de câncer de pele e, consequentemente redução à exposição solar – a hipovitaminose D se tornou altamente prevalente (Mithal et al., 2009). A deficiên-

cia de vitamina D afeta diretamente a absorção de íons cálcio, causa uma elevação da síntese de PTH e, portanto, aumento do processo de reabsorção óssea. Desta forma, notadamente repercute no metabolismo ósseo, estando relacionada à fisiopatogênese de diversas doenças. Em crianças, a deficiência de calcitriol leva ao retardo do crescimento e ao raquitismo. Já em adutos, a carência leva à osteomalácia, ao hiperparatiroidismo secundário e, consequentemente, ao aumento da reabsorção óssea, favorecendo a perda de massa óssea, o desenvolvimento de osteoporose e consequentes fraturas ósseas (Maeda et al., 2014).

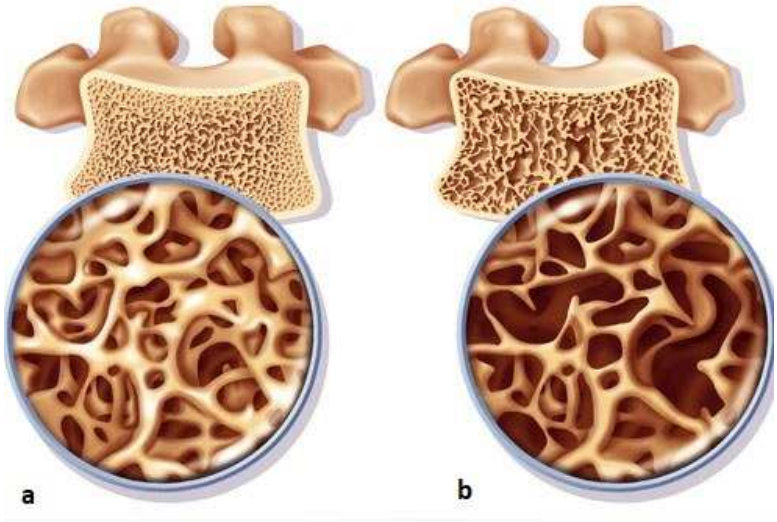
2.3 Osteoporose

Inicialmente descrita por Albright et al. (1941), a osteoporose consiste em uma desordem osteometabólica crônico-degenerativa, de etiologia multifatorial, assintomática, caracterizada pela redução da densidade mineral óssea (DMO), na qual observa-se a deterioração da microarquitetura óssea, com consequentes alterações nas propriedades físicas e quantitativas do esqueleto humano, tornando-o altamente frágil e susceptível ao desenvolvimento de fraturas (Kanis, 2007). Estruturalmente, evidencia-se a redução, em número e tamanho, do osso trabecular, adelgaçamento do porção cortical e redução de osso normalmente mineralizado (Watanabe, 2009).

O esqueleto humano é composto por dois tipos de tecido ósseo: o osso cortical e o osso trabecular. O osso cortical consiste num tecido compacto, denso, de baixa porosidade, que compõe cerca de 80% do esqueleto. Constitui a parte externa de todas estruturas esqueléticas, sendo predominante na diáfise dos ossos longos e do esqueleto apendicular. Sua principal função é fornecer força mecânica e proteção, embora possa participar de respostas metabólicas, frente a um déficit mineral severo e/ou prolongado. Já o osso trabecular (esponjoso) possui alta porosidade e é encontrado no esqueleto axial, nas epífises de ossos longos, corpos vertebrais, demais ossos chatos, pelve e mandíbula. Metabolicamente é mais ativo

que o osso cortical, apresentando um número maior de células, fazendo com que a taxa de remodelação óssea seja superior. Num estado de deficiência mineral, fornece suprimento inicial, sendo perdido mais rapidamente. Este fato faz com que o osso trabecular seja crucial para detecção da perda óssea, sendo, por esta razão, o sitio anatômico alvo para o controle e monitoração da osteoporose (Hagenfeldt, 2003; Guyton; Hall, 2017; Weaver et al., 2016).

Figura 2.4 – Diferenciação do padrão trabecular na osteoporose: (a) Osso sadio apresentando microarquitetura trabecular preservada; (b) Redução da densidade mineral óssea (DMO), resultante da osteoporose.



Fonte: http://www.cn24tv.it/public/images/201205/osteoporosi.jpg

A osteoporose resulta de um desequilíbrio na taxa de reabsorção e formação no ciclo de remodelação óssea, o que provoca a diminuição da matriz óssea. O risco de fratura osteoporótica aumenta progressiva e continuamente com o declínio da densidade mineral óssea (DMO). O impacto da osteoporose reside em esta conduzir à ocorrência de fraturas, e, adicionalmente, a diversas complicações clínicas, como: dor crônica, deformidade, perda da independência, depressão e aumento da mortalidade. Seu curso clínico é silencioso, impedindo, em muitas vezes, o diagnóstico precoce, sendo este detectado, não raramente, somente após o episódio da fratura (Kanis et al., 2012). Por conseguinte, a prevenção e o diagnóstico precoces tornam-se de crucial importância na manutenção da saúde, qualidade de vida e independência desse grupo de pacientes.

Constitui um sério problema de saúde pública, sendo uma das maiores causas de morbidade e, inclusive, mortalidade, especialmente em mulheres pós-menopausa e em homens idosos. Estima-se que cerca de 50% das mulheres e 20% dos homens com idade igual ou superior a 50 anos sofrerão uma fratura osteoporótica, ao longo da vida. Mundialmente, cerca de 200 milhões de pessoas sofram com a doença e, aproximadamente, 8.9 milhões de casos de fraturas patológicas ocorram anualmente. Apesar de menos incidente em homens, estima-se que entre 1/5 a 1/3 das fraturas osteoporóticas ocorram em indivíduos do sexo masculino (Kanis et al, 2012; Pisani et al., 2016).

A fratura osteoporótica corresponde a um fator de exímia relevância, sendo responsável pelo declínio da qualidade de vida e taxa de sobrevida destes pacientes. A perda de capacidade motora e autonomia é substancial (50% dos casos), levando à dependência de cuidados integrais, gerando custos dispendiosos ao poder público. De acordo com um estudo realizado por Leibson et al. (2002), fraturas femorais foram fatores responsáveis por 20-24% de mortalidade, em um período de 1 ano. No Brasil, 23,6% dos pacientes internados em hospitais públicos vão a óbito, nos 3 meses subsequentes à fratura femoral (Pereira et al, 2012).

Os sítios anatômicos mais comumente afetados pela doença são: corpos vertebrais, colo femoral, segmento proximal do osso rádio e segmento distal do antebraço, áreas predominantemente formadas por osso trabecular (Hagenfeldt, 2003; Kanis et al., 2012). Não obstante, os efeitos da doença são sistêmicos. Ao que tange o acometimento oral, esse processo induz, lenta e gradativamente, à reabsorção do osso alveolar e, subsequentemente, à perda dental, tal como provém um tecido ósseo de baixa qualidade, interferindo ou inviabilizando reabilitações com próteses convencionais e/ou implantes dentários, minimizando a qualidade de vida do paciente portador da doença osteoporótica (Makker et al., 2012; Beppu et al., 2013; Pavičin et al., 2017).

Entre os fatores de risco que influenciam o desenvolvimento da osteoporose, destacam-se: idade; sexo (mulheres brancas); índice de massa corporal; estilo de vida; história familiar; tabagismo e alcoolismo (inibidores da multiplicação de osteoblastos); cafeína (aumenta excreção de cálcio); sedentarismo; má nutrição;

dieta rica em fibra, proteínas e sódio (diminuem a absorção de cálcio); nuliparidade; amenorreia por exercícios; menopausa precoce e endocrinopatias. Embora a osteoporose idiopática seja a forma mais comum, diversas desordens sistêmicas e o uso crônico de certos medicamentos aumentam, substancialmente, o risco de perda óssea e a fragilidade esquelética (Harper; Weber, 1998). Por conseguinte, de acordo com sua etiopatogenia, a osteoporose pode ser classificada em: primária e secundária.

A primária, tipologia mais frequente, consiste em uma doença associada à senilidade. Afeta, majoritariamente, a população feminina em idade pós-menopausa; entretanto, homens idosos são, também, acometidos. A patogênese da deterioração óssea e fragilidade esquelética está associada ao declínio natural da síntese e dos níveis de esteroides gonadais, assim como ao envelhecimento tanto do osso trabecular, como cortical. Fatores genéticos e comportamentais são, também, de fundamental importância etiológica (Raisz, 2005; Painter et al, 2006; Pisani et al., 2016; Sözen et al, 2017).

A osteoporose secundária corresponde à redução da densidade mineral óssea (DMO), onde significativas alterações microarquiteturais ósseas resultam do uso crônico de determinados fármacos que atuam no metabolismo do cálcio (osteoporose medicamentosa), ou em virtude a uma doença pré-existente. Dentre as desordens que potencialmente podem induzir desenvolvimento da osteoporose secundária, ressalta-se às de origens: endócrinas, autoimunes, renais, hematológicas, gastrointestinais, neoplásicas e nutricionais (Quadro 2.2). (Painter et al., 2006; Carter, 2018).

Quadro 2.1 - Desordens associadas ao desenvolvimento de osteoporose secundária

Doenças endócrinas	**Doenças gastrointestinais, hepáticas, nutricionais**	**Doenças hematológicas, neurológicas**	**Doenças renais**	**Doenças auto-imunes, genéticas, outras**
• Hipertireoidismo • Hiperparatireoidismo • Hipogodanismo • Hipercortisolismo • Diabetes mellitus • Deficiência hormônio crescimento • Acromegalia • Hiperprolactinemia	• Doença celíaca • Anorexia nervosa • Doença inflamatória intestinal • Cirurgia de *bypass* gástrico • Gastrectomias • Hemacromatose • Doenças hepáticas • Hipovitaminose D • Deficiência de cálcio • Ingestão abusiva de álcool • Nutrição parenteral	• Mieloma múltiplo • Mastocitose sistêmica • Talassemia maior • Gamopatia monoclonal • Leucemias, linfomas • Hemofilia • Epilepsia • Esclerose múltipla • Acidente vascular encefálico	• Nefropatias crônicas • Hipercalciúria idiopática • Acidose renal tubular	• Artrite reumatoide • Lúpus eritematoso sistêmico • Espondilite anquilosante • Doença pulmonar obstrutiva crônica • Doença metastática • Transplante de órgãos • Fibrose cística • Doença cardíaca congestiva • Osteogênese imperfeita • Síndrome da imunodeficiência adquirida

Fonte: Painter et al., 2006; Mazziotti et al., 2010; Cooper et al., 2016 ; Rizzoli; Biver, 2015 ; Carter, 2018; Compston, 2018

A osteoporose secundária acomete tanto mulheres em fase pré- e pós-menopausa, como homens. Está associada a uma ampla variedade de condições mórbidas primárias e ao uso crônico de diversas medicações (Quadro 2.3), as quais acarretam, em sua evolução, distúrbios na absorção intestinal de cálcio, diminuição precoce nos níveis de estrógeno (hipoestrogenismo), perda de massa muscular, diminuição da atividade do sistema enzimático citocromo P450, baixa absorção e metabolização da vitamina D, e ação direta em células ósseas (Painter et al., 2006).

Quadro 2.2 - Fármacos associados ao desenvolvimento de osteoporose secundária

Hormônios e drogas com ação no sistema endócrino	**Drogas com ação no sistema nervoso central**	**Drogas com ação no sistema imune**	**Drogas com ação no trato gastrointestinal, anticoagulantes, diuréticos**
• Glicocorticoides • Hormônios tireoidianos • Tiazolidinedionas • Agentes indutores de hipogonadismo (inibidores de aromatase, acetato de medroxiprogesterona, agonistas do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH)	• Antidepressivos • Anticonvulsivantes • Antipsicóticos	• Inibidores de calcineurina • Agentes imunossupres-sores	• Heparina • Inibidores da bomba de prótons • Diuréticos tiazídicos

Fonte: Painter et al., 2006; Mazziotti et al., 2010; Cooper et al, 2016 ; Rizzoli; Biver, 2015 ; Carter, 2018; Compston, 2018

Dentre as diversas causas cuja fisiopatologia apresenta, direta ou indiretamente, repercussões no metabolismo ósseo e, consequentemente ao desenvolvimento da osteoporose secundária, a osteoporose induzida por glicocorticoides (OPIG) representa o subtipo mais incidente, representando cerca de 25% de todas as causas de osteoporose (Mazziotti et al., 2010; Compston, 2018).

2.3.1 Osteoporose induzida por glicocorticoides (OPIG)

Os glicocorticoides (GC) representam uma classe de hormônios esteroides que interagem com respectivos receptores de glicocorticoides (GRs, *glucocorticoid receptors)*, presentes em quase todas as células de organismos vertebrados (Kadmiel; Cidlowski, 2013). São caracterizados por suas potentes propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras, cujos benefícios terapêuticos justificam seu uso em uma ampla gama de doenças (Buttgereit et al.,1999). Entretanto, a cronicidade de seu uso está associada ao desenvolvimento de diversos efeitos colaterais, tendo sido, inicialmente, reportados por Cushing (1932). Dentre estes, ressalta-se uma

série de alterações que resultam em desordens musculoesqueléticas (osteoporose medicamentosa, osteonecrose, miopatias, sarcopenia), além de perturbações metabólicas, como intolerância à glicose, diabetes mellitus, dislipidemia (como na Síndrome de Cushing), obesidade e catarata (Cooper et al., 2016; Carter, 2018). Em crianças, GC afetam a resistência e crescimento musculo-esqueléticos, assim como a densidade mineral óssea total, na fase adulta (Hansen et al., 2014).

A OPIG é caracterizada pela redução da formação óssea, e rápida e acentuada perda óssea, sendo esta detectada precocemente, a partir de 3 a 6 meses, após o início da corticoterapia oral. Microestruturalmente, nota-se um aumento da porosidade tanto do osso trabecular, como do cortical (Vedi et al., 2005). Tais repercussões no tecido ósseo são resultantes de altas doses medicamentosas, assim como regime prolongado, e à maior atividade da doença, na fase inicial do tratamento, onde evidencia-se a inibição da formação óssea, acompanhada do aumento transiente da reabsorção do tecido ósseo (Rizzoli; Biver, 2015). O conjunto dessas alterações são, portanto, dose- e tempo-dependentes, e o desenvolvimento de osteoporose induzida por glicocorticoides (OIG) caracteriza-se como um fator determinante ao risco de fratura, a qual pode ocorrer em cerca de 30-50% desses pacientes (Cooper et al., 2016).

A redução da densidade mineral óssea (DMO) em pacientes diagnosticados com OPIG é considerada bifásica, onde a perda óssea (6 a 12%) se instala rapidamente, no primeiro ano, após instituição da terapia. Subsequentemente, uma progressão mais lenta (cerca de 3%) é evidenciada anualmente, nos períodos conseguintes (LoCascio et al., 1990). Ressalta-se que o risco de fratura atinge níveis alarmantes de até 75%, dentre o primeiro trimestre, após início da corticoterapia, sendo este precedido por um declínio substancial da DMO, muitas vezes não detectados por exames de densitometria óssea (Van Staa et al, 2003).

Em um estudo retrospectivo, os mesmos pesquisadores (Van Staa et al., 2003) analisaram 244.235 indivíduos submetidos à corticoterapia prolongada, comparando-os à uma população controle. Observaram que o risco relativo de fratura do primeiro grupo foi significativamente maior na coluna (rr = 2,6) e em quadril (rr = 1,6), sendo, também, correlacionado diretamente à dose utilizada, onde

a administração diária de baixas doses (≤5 mg) de prednisona aumentou em 20% o risco da ocorrência de fraturas, progredindo a 60%, quando administradas em doses ≥20 mg/dia.

Um regime intermitente de altas doses de glicocorticoides orais, assim como por via inalatória (pacientes asmáticos, cirurgias de levantamento de seio maxilar), também demonstra repercussões no metabolismo ósseo, sendo reportado quadros de hipercalciúria, aumento nos níveis séricos de PTH e de 1,25-dihidroxicolecalciferol, e aumento do risco de ocorrência de fraturas vertebrais. Não obstante, risco este menor, quando comparado a terapias de curso prolongado (>3 meses) (McEvoy et al., 1998; van Staa et al., 2001; De Vries et al., 2007).

Embora a descontinuidade da corticoterapia reduza os riscos à integridade e resistência do tecido ósseo, alterações da densidade mineral óssea são evidenciadas por um período ≥ 1 ano, após a administração da última dose medicamentosa (Vestergaard et al., 2008).

Os GC exercem efeitos diretos e indiretos sobre o metabolismo ósseo, interferindo com sua homeostase, levando a uma rápida perda mineral. Os efeitos diretos estão relacionados à ação desta droga sobre as células ósseas e suas funções correspondentes. Na presença de GC, há uma depleção da osteoblastogênese, decorrente da inibição de precursores osteoblásticos, assim como aumento dos índices de apoptose em osteoblastos maduros e osteócitos. Glicocorticoides atuam na via de sinalização Wnt/β-catenina, responsável pela diferenciação de células mesenquimais pluripotentes, direcionando-as para linhagens adipocíticas, ao invés de osteoblásticas (Ohnaka et al., 2005). Os fármacos também atuam diretamente na osteoclastogênese, aumentando a expressão do M-CSF (*macrophage colony stimulating factor)* e de RANKL, reduzindo as taxas apoptóticas de osteoclastos, além de suprimirem a expressão de osteoprotegerina (OPG) por osteoblastos, resultando no aumento da atividade osteoclástica (Swanson et al., 2006; Weinstein, 2011).

Outros mecanismos podem contribuir, indiretamente, com a perda óssea induzida por glicocorticoides, como: inibição da secreção hipofisária das gonadotrofinas, secreção ovariana e testicular de estrógenos e testosterona e a secreção adrenal de androstenidiona e dehidroepiandrosterona, representado por um quadro de hipogonadismo e consequente perda óssea; diminuição do transporte intestinal transcelular de cálcio, ocasionando o aumento da excreção renal e intestinal deste íon; inibição da fosfatase alcalina, descarboxilação do citrato e aumento da sensibilidade tubular renal ao PTH; síntese reduzida do hormônio de crescimento (GH) e expressão reduzida de IGF-1 (*insulin-like growth factor)* e IGF-BP *(binding protein)* por células ósseas, importantes para a manutenção da matriz óssea; diminuição da produção de prostaglandina E2 no osso, sendo esta responsável por estimular a síntese de proteínas colágenas e não colágenas (Mazziotti et al., 2016; Sato et al., 2017).

Ressalta-se que fatores intrínsecos próprios da doença de base pela qual torna-se necessário a corticoterapia (desordens de origem inflamatória e autoimune), também podem contribuir para a redução da densidade mineral óssea, frente ao aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias e pré-reabsortivas, como interleucinas (IL-1 e IL-6) e fatores de necrose tumoral, conduzindo à cronicidade da inflamação local ou sistêmica, e ativação da osteoclastogênese (Kroger et al., 1994; Sato et al., 2017).

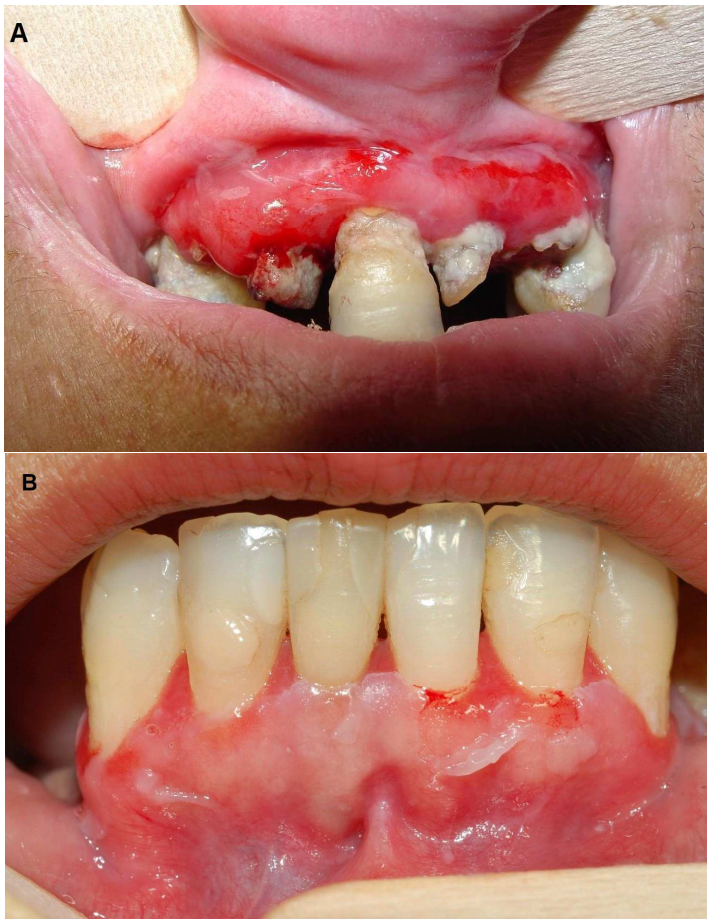
Dentre o vasto grupo de doenças cuja terapêutica de eleição envolve a corticoterapia de curso prolongado, evidencia-se o pênfigo vulgar (PV). Tal condição é de exímio interesse aos profissionais da Odontologia, visto o acometimento local de sítios intraorais e ponderosas repercussões sistêmicas.

Pênfigo é a designação de um conjunto de doenças relativamente raras, imunologicamente mediadas, de curso crônico e prognóstico sombrio, caracterizado pela formação de lesões vesico-bolhosas, localizadas na pele e em membranas mucosas (oral, esofágica, nasal, ocular, genital). Pode ser classificado em 3 formas principais: pênfigo vulgar, foliáceo e paraneoplásico. Entretanto, outras variantes coexistam: pênfigo vegetante, eritematoso, “fogo selvagem”, herpetiforme e induzido

por fármacos. Os subtipos vulgar e foliáceo representam os mais incidentes; no entanto, o segundo restringe-se, majoritariamente, à pele (Kasperkiewicz et al., 2017).

As lesões orais são comuns em pacientes diagnosticados com pênfigo vulgar (90% dos casos); porém, frente ao constante trauma oclusal decorrente da fala e mastigação, a presença de lesões vesico-bolhosas íntegras é mais incomum. Desta forma, a apresentação clínica intraoral se dá por lesões erosivas e/ou ulcerativas, de morfologia irregular, tamanhos variáveis e substancialmente sintomáticas, distribuídas em mucosa jugal, mucosa labial, palato, ventre lingual e gengiva (livre e inserida – gengivite descamativa) (Figura 2.4). Não raramente, as lesões orais precedem o curso sistêmico. Desta forma, enaltece-se a fundamental responsabilidade do cirurgião-dentista, em atuação concomitante ao dermatologista, pela instituição de seu diagnóstico (Black et al., 2005; Neville et al., 2009), tal como o manejo e controle, por meio de tratamento periodontal regular.

Figura 2.5 – Acometimento oral por pênfigo vulgar: (a) Lesões vesico-bolhosas e ulcerativas, altamente sintomáticas, refletindo em baixa qualidade da higiene oral; (b) Gengivite descamativa



Fonte: A autora

O pênfigo vulgar é caracterizado pela presença de autoanticorpos circulantes (IgG) que atuam contra proteínas responsáveis pela adesão intercelular, denominadas desmogleínas 1 ou 3 (Dsg1, Dsg3, pertencentes à família das caderinas), as quais estão localizadas nos desmossomos – estrutura responsável pela aderência celular às estruturas adjacentes, conferindo força estrutural a epitélio (Scully; Challacombe, 2002). A interação autoanticorpo-desmogleína induz dano aos desmossomos e perda do contato intercelular de queratinócitos (acantólise), resultando na formação de lesões vesico-bolhosas de tamanhos variáveis na pele e/ou mucosas, e consequente ulcerações substancialmente sintomáticas e susceptíveis a infecções secundárias (Scully et al., 1999; Kitajima, 2014).

A etiopatogênese do PV ainda é discutida, mas evidencia-se a participação do processo inflamatório e alguns de seus constituintes, como citocinas pró-inflamatórias, células B e T autorreativas, além da expressão diversificada de alelos HLA (*Human leukocyte antigen) (*Veldman; Feliciani, 2008; Kasperkiewicz et al., 2017). O tratamento padrão do pênfigo vulgar consiste na corticoterapia sistêmica oral, associada ou não a imunossupressores. A uso dos glicocorticoides na abordagem terapêutica do pênfigo vulgar fora instituído a partir da década de 1950, o qual, até então, exibia uma taxa de mortalidade de até 70%, frente ao quadro severo de desidratação e infecções sistêmicas secundárias (Harman et al., 2003). No entanto, apesar da melhora do quadro sistêmico e qualidade de vida desses pacientes, os efeitos colaterais desencadeados pela administração prolongada de tais fármacos, se mostram substancialmente presentes. Destes, salienta-se o acometimento do metabolismo ósseo e desenvolvimento de osteoporose induzida por glicocorticoides (Grando, 2012; Ghodsi et al., 2014; Hsu; Nanes, 2017).

2.4 Diagnóstico imaginológico

Frente ao risco de desenvolvimento da doença osteoporótica, a investigação precoce de alterações esqueléticas e previsão do risco de fraturas se fazem imperativamente necessárias. Adicionalmente à história clínica e exames físico e laboratorial, o mapeamento investigativo é realizado por meio de modalidades

imaginológicas, cujos objetivos principais destinam-se à avaliação da densidade mineral óssea (DMO). A DMO corresponde à concentração média de massa óssea por unidade de volume (densidade volumétrica), ou por unidade de área (densidade de área), identificadas em imagens de duas ou três dimensões, ou em um segmento específico do tecido ósseo (Lang et al., 2002; Watanabe, 2009).

Durante os últimos 20 anos, algumas técnicas de imagem têm sido desenvolvidas para quantificar, de maneira mais sensível, tal tecido. Destas, podemos classificar 2 categorias: técnicas ionizantes (a densitometria óssea por meio da absorciometria de energia única, absorciometria de fótons duplos (DPA), absorciometria de energia dupla de raios X (DXA), a tomografia computadorizada quantitativa (QCT), absorciometria radiográfica e o ultrassom quantitativo (QUS) (Conversano et al., 2015).

Os parâmetros comparativos avaliados pelos diversos métodos de imagem englobam a acurácia ou exatidão; precisão ou reprodutibilidade; a sensibilidade e especificidade diagnostica; relação custo/benefício; segurança relacionada à dose de radiação; comodidade ou praticidade; e, por fim, a rapidez do método empregado. Dentre as técnicas de imagem disponíveis, a densitometria óssea (DXA) consiste, atualmente, no método mais frequentemente utilizado. Sendo considerado o padrão-ouro para o diagnóstico e seguimento da osteoporose - além de prover informações prognósticas pertinentes ao desenvolvimento de fraturas, esta técnica bidimensional (2D) possibilita a rápida realização (em média, 15 minutos) da quantificação da DMO em qualquer sítio esquelético. No entanto, os sítios anatômicos de escolha correspondem àqueles cujo quantidade de osso trabecular é mais incidente, e consequentemente, mais acometidos pela osteoporose, como a coluna lombar (segmentos vertebrais L1-L4), fêmur proximal, o rádio distal e/ou corpo total. Dentre suas vantagens, pontua-se: técnica não invasiva; tempo reduzido de exposição à radiação; precisão; segurança e custo - quanto comparado à QCT e as QUS (Lang et al., 2002).

O princípio de funcionamento da DXA baseia-se na medição da atenuação de um feixe de radiação gerado por uma fonte de raios X com dois níveis de energia (fótons de alta e baixa energia), através do corpo do paciente. As características de

atenuação diferem no osso e nos tecidos moles em função da energia do feixe de raios X. A diferença da atenuação entre o osso e o tecido mole é maior no feixe de baixa energia (70 elétrons-volt - keV), do que no de alta energia (140 keV). Um contorno de atenuação é então formado, permitindo a quantificação do mineral e da massa de tecidos moles (Anijar, 2000; Adams, 2010).

A DXA determina as medições da DMO por área projetada, sendo seus resultados expressos em valores absolutos ou em g/cm^2, em valores relativos ou desvios-padrão (DP) e porcentagem. Tais valores relativos utilizados para avaliação preditiva do risco de fraturas, assim como de grupos de risco, são expressos pelos índices (*score)* T e Z, onde:

- **T-*score*** = perda de massa óssea em relação à média da DMO de adultos jovens no pico de massa óssea do mesmo sexo, raça e peso corporal;

- **Z-*score*** = perda de massa óssea em relação à média da DMO de controles normais da mesma idade, sexo, raça e peso corporal.

Baseando-se nos valores de T-*score* da densidade mineral óssea, Kanis et al. (1994) elaboraram uma classificação densitométrica de perda de massa óssea, preconizada pela OMS, na qual considera-se:

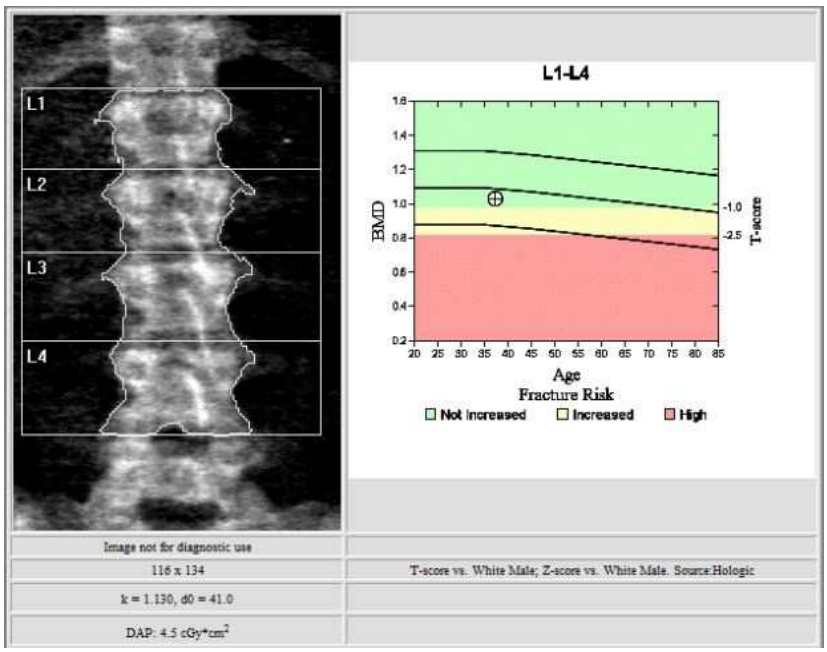
- **Normal**: valor da DMO não está mais do que 1 desvio-padrão (DP) abaixo do valor médio da população adulta jovem (pico de massa óssea);

- **Baixa massa óssea** (osteopenia): o valor da DMO está entre 1 e não mais do que 2,5 desvios-padrão abaixo do valor médio da população adulta;

- **Osteoporose**: DMO é maior do que 2,5 desvios-padrão abaixo do valor médio da população jovem;

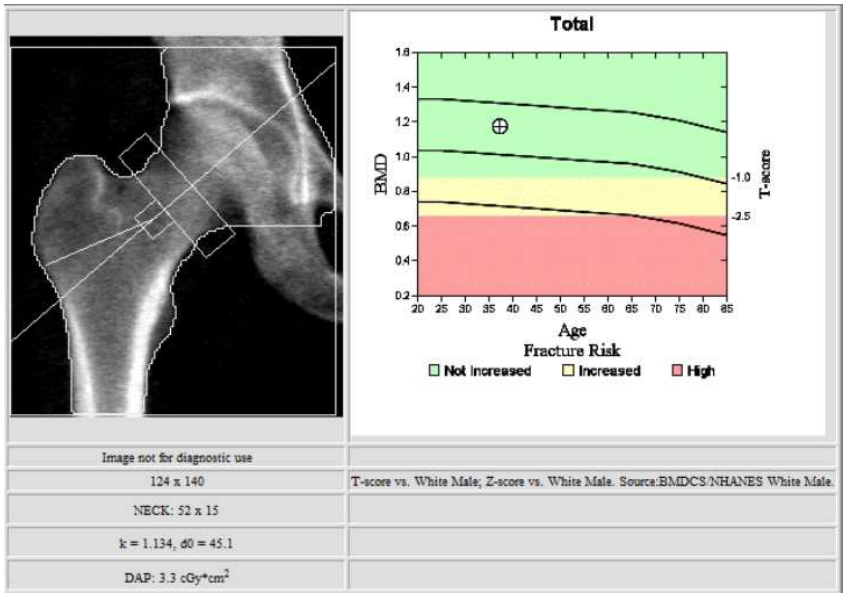
- **Osteoporose severa:** DMO é maior do que 2,5 desvios-padrão abaixo do valor médio da população jovem, na presença de uma ou mais fraturas por fragilidade óssea.

Figura. 2.6 – Imagem densitométrica da DMO em coluna lombar



Fonte: a autora

Figura 2.7 – Medição da DMO em cabeça femoral



Fonte: a autora

Ghodsi et al. (2014) analisaram o impacto da fisiopatologia do pênfigo vulgar à possível prevalência de osteoporose, antes do início da corticoterapia. A associação entre a duração e severidade da enfermidade e DMO foi avaliada em 50 pacientes. Destes, 26 (52%) apresentaram baixa DMO (osteopenia), e 7 (14%) pacientes foram diagnosticados com osteoporose, antes de iniciarem o tratamento correspondente. Embora detectadas durante estágios de grave acometimento da doença, duração e severidade não mostraram associação ao desenvolvimento de osteopenia ou osteoporose. O relevante número de pacientes diagnosticados com osteoporose, antes mesmo da instituição da corticoteraia, reforça a necessidade de abordagens precoces com o intuito de prevenção de futuras fraturas.

O risco absoluto de desenvolvimento de fraturas é individual e substancialmente influenciado por características diversas, tais como idade, etnia, sexo e doença de base pela qual a corticoterapia se faz necessária. De acordo com o *American College of Rheumatology*, medidas preventivas e o monitoramento destes pacientes devem ser iniciados precocemente, categorizando-os de acordo com o(s) risco(s) englobados. A análise inicial do risco de fratura deve ser realizada dentre os 6 primeiros meses (ou mais cedo), após início da instituição da corticoterapia, na qual engloba-se detalhes referentes à medicação utilizada (dose, duração, via admnistrada); DMO; fragilidade; risco de quedas; histórico de fraturas; má ou desnutrição; baixo índice de massa corpórea; hipogonadismo; tireoideopatias; histórico familiar de fraturas femorais; deformidades ósseas; avaliação de concentrações plasmáticas de biomarcadores relacionados ao metabolismo ósseo, como cácio, fósforo, vitamina D (25OH). A reavaliação deve ser implementada a cada 12 meses, durante o tratamento. Dentre as recomendações, deve-se seguir orientações médicas e nutricionais, a fim de otimizar a ingestão de cálcio e vitamina D, assim como instituir mudanças no estilo de vida, especialmente consistentes com a boa saúde óssea (cessação do tabagismo, exercícios físicos regulares, correta exposição solar, etc) (Buckley et al., 2017).

Para adultos acima de 40 anos, deve-se instituir a utilização da ferramenta FRAX® (Fracture Risk Assessement Tool), a qual consiste em um algoritmo computacional que calcula a probabilidade em 10 anos de uma fratura osteoporótica. Tal probabilidade é calculada a partir dos fatores clínicos de risco previamente

citados. A DMO do colo femoral pode ser, opcionalmente, inserida para melhorar a predição do risco de fratura. A probabilidade de fratura é calculada considerando tanto o risco de fratura quanto o risco de morte. No entanto, a ferramenta limita-se à faixa etária (≥ 40 anos); em crianças e adultos jovens, a análise basear-se-á pelas referências da DMO (Rizzoli; Biver, 2015).

No que concerne aos pacientes submetidos à corticoterapia, um fator de expressiva relevância reside no fato de que fraturas podem ocorrer, mesmo na ausência de valores anormais da DMO. Esse fator independente relacionado à corticoterapia resulta de uma série de alterações na qualidade óssea que não são detectadas nas técnicas densitométricas (Compston, 2018). Relevantemente, a dificuldade ao acesso de exames rotineiros – sejam estes laboratoriais ou de imagem – ainda representa uma vívida realidade no sistema público de saúde brasileiro. Frente à demanda exorbitante e uma limitada oferta de centros especializados, muitos pacientes são impossibilitados de realizar o mapeamento de sua saúde óssea, de acordo com a regularidade preconizada. Desta forma, torna-se pertinente o desenvolvimento e implementação de métodos capazes de auxiliar na identificação dos grupos de maior risco e, assim, medidas preventivas e/ou curativas sejam iniciadas, reduzindo a incidência de maiores comorbidades.

Uma das mais importantes ferramentas auxiliares ao diagnóstico de patologias que acometem o complexo estomatognático, consiste na radiografia panorâmica de mandíbula (PAN). Dentre suas vantagens, cita-se: custo reduzido; baixa emissão de radiação ionizante; e de fácil acesso à maioria dos pacientes. Rotineiramente utilizada por cirurgiões-dentistas, ela pode fornecer dados substanciais quanto à morfologia óssea e, quando adequadamente interpretada, fornece indicadores de baixa massa óssea, contribuindo, desta forma, para o mapeamento ou predição da osteoporose (Taguchi et al., 2003; Pavicin et al., 2014). Alterações radiográficas maxilares revelaram relativa radioluscência generalizada tanto em maxila, como em mandíbula; acentuação da porção cortical, do seio maxilar, linha oblíqua e fossa nasal (Watanabe, 2009).

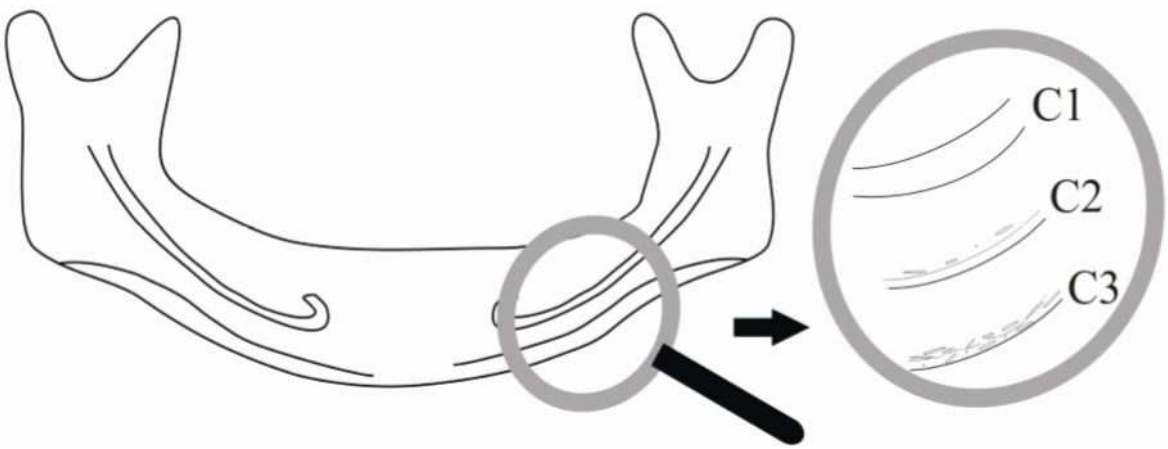
A análise radiográfica de alterações qualitativas ou quantitativas da arquitetura óssea pode ser realizada, a partir de índices radiomorfométricos, possibilitando a detecção de um quadro correspondente ou sugestivo de baixa densidade óssea. Por apresentar melhor visualização e nitidez radiográfica, opta-se pela avaliação de medidas do osso cortical mandibular, quando comparado à fração trabecular.

Klemetti et al. (1994) realizaram uma análise qualitativa da DMO do colo femoral e coluna de 355 mulheres na pós-menopausa, comparando-a a radiografias panorâmicas. Baseando-se na qualidade da margem endosteal da cortical mandibular, na fração abaixo ao forame mentual, os autores instituíram uma metodologia radiomorfométrica denominada "índice mandibular cortical" (IMCo), classificando-a em:

- **C1 (normal)** – a margem endosteal apresenta-se nítida e lisa, bilateralmente;
- **C2** – presença de defeitos semilunares (lacunas de reabsorção) na margem endosteal, ou presença de resíduos corticais formados por 1 a 3 camadas, uni ou bilateralmente;
- **C3** – a margem endosteal apresenta porosidades e a espessura da cortical encontra-se reduzida.

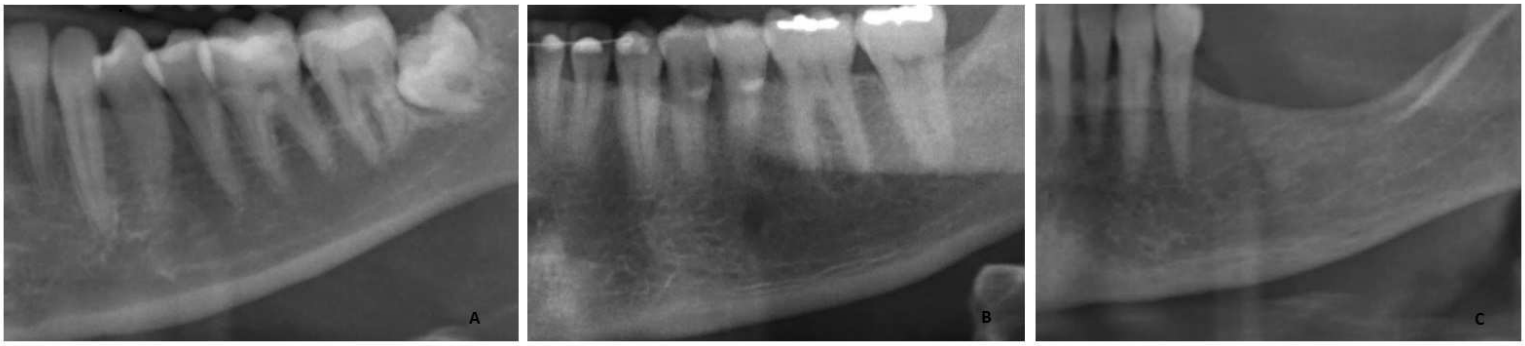
.

Figura 2.8 – Classificação da cortical inferior mandibular, de acordo com Klemetti et al. (1994)



Fonte: Adaptado de Klemetti et al., 1994)

Figura 2.9 – Indice cortical mandibular (IMCo): (a) C1; (b) C2; (c) C3, de acordo com a classificação de Klemetti et al (1994)



Fonte: A autora

Taguchi et al. (1995) analisaram 64 mulheres menopausadas, por meio de radiografias panorâmicas e de radiografias laterais de coluna. Os autores estabeleceram correlação entre o número de dentes presentes, o índice mandibular cortical (IMCo), a reabsorção alveolar, o índice mentual e a presença de fratura de vértebra torácica. Concluíram que, quanto maior a idade e menor o número de dentes, maior a probabilidade de fratura torácica.

Em um estudo de 1999, os mesmos autores (Taguchi et al., 1999) avaliaram os índices mandibular cortical e mentual, além da altura de rebordo alveolar em radiografias panorâmicas de 90 mulheres, comparando-os à DMO da terceira vértebra lombar, obtida por tomografia computadorizada quantitativa. Por meio de análise de regressão múltipla, verificaram que pacientes com baixa DMO apresentavam corticais ósseas mandibulares significativamente mais finas e menor número de dentes.

Com o intuito de verificar a eficácia da técnica radiomorfométrica entre 27 dentistas clínicos-gerais, e o grau de concordância intraobservadores, Nakamoto et al. (2003) empregaram a análise do IMCo em 100 radiografias panorâmicas de mulheres menopausadas com baixa DMO. Foram identificadas correlações entre os dados das radiografias e DMO da coluna lombar e colo femoral. A concordância intra-observador foi considerada de moderada a quase perfeita, em 70% dos observadores. Os autores concluíram que a radiografia panorâmica pode ser

utilizada como uma ferramenta complementar ao diagnóstico de mulheres que apresentam baixa DMO, tendo o cirurgião-dentista um papel crucial na detecção dessas alterações e, consequentemente, encaminhá-las para seguimento densitométrico padrão.

Singh et al. (2013) investigaram a correlação entre saúde periodontal e baixa densidade mineral óssea em mulheres em idade pós-menopausa. Parâmetros clínicos periodontais (profundidade de bolsa, índice de placa bacteriana, sangramento à sondagem e perda de inserção clínica de todos os dentes; e altura da crista alveolar de todos os molares, por meio de radiografias interproximais) foram avaliados, conjuntamente à DXA de 78 pacientes. Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas nos quesitos “perda de inserção clínica”, “profundidade de bolsa” e “altura de crista alveolar” entre o grupos osteoporótico *versus* osteopênico, e entre o osteoporótico *versus* grupo controle. Os pesquisadores concluíram que DMO representa um importante fator de risco ao desenvolvimento de doença periodontal, nesta classe de pacientes.

Gomes et al. (2014) implementaram a análise radiomorfométrica do IMCo em cortes seriados de tomografias computadorizadas de feixe cônico (TCFC), comparando-os a reconstruções panorâmicas tomográficas de 44 pacientes com mais de 45 anos de idade. Apesar da concordância intraobservadores mostrar-se excelente, fora mais elevada frente à análise dos cortes tomográficos seriados, quando comparada à segunda avaliação. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as duas modalidades, reportando a aplicabilidade de ambas, na investigação de baixa DMO na população estudada.

Frente à crescente demanda de tomografias computadorizadas de feixe cônico (TCFC), sobretudo com o intuito de reabilitações orais com implantes dentários, na última década, Salgado et al. (2015) realizaram uma revisão sistemática para avaliar a empregabilidade da análise radiomorfométrica em tomografias computadorizadas de feixe cônico, como metodologia alternativa no rastreio da doença osteoporótica primária. Os autores concluíram que, apesar da consistência da análise deste tipo de exame imaginológico, persiste-se muita

variabilidade entre os estudos, não a enquadrando como um método aplicável na investigação de osteoporose.

Em um estudo longitudinal prospectivo de 10 anos, Jonasson et at. (2018) compararam a associação de 2 índices radiográficos (IMCo e espessura cortical mandibular) a 3 índices clínicos (ferramentas FRAX®, OSIRIS e OST) como fatores preditivos à ocorrência de fraturas osteoporóticas, em 411 mulheres menopausadas. Por não haver dados referentes à DMO do grupo estudado, o estudo demonstrou limitações. Não fora encontrado diferenças estatisticamente significantes entre a espessura da cortical mandibular entre grupos que evoluíram com fratura osteoporótica, frente às que apresentaram integridade óssea. Mulheres que apresentaram fraturas exibiram, em média, a espessura da cortical mandibular de 0.08mm mais delgada. mostraram-se ferramentas preditivas de fraturas. O risco-relativo para fraturas futuras foi estatisticamente significante quando avaliado pela ferramenta FRAX® >15%, 4.1 (95% CI: 2.4-7.2), e para IMCo, 1.7 (95% CI: 1.1-2.8), predizendo o risco de fraturas; ao contrário dos demais índices avaliados.

2.4.1 A saliva como ferramenta diagnóstica

A saliva consiste em um dos fluidos corporais mais complexos, sendo responsável por uma ampla gama de funções biológicas. No trato digestivo, ela desempenha papéis importantes em termos de proteção (cavidade oral e esôfago), lubrificação, digestão (por meio de enzimas), mastigação, fala, deglutição, proteção e atividade anti-microbiana. É constituída majoritariamente por água (cerca de 99%), por uma fração inorgânica composta por uma variedade de eletrólitos (sódio, potássio, cálcio, cloreto, magnésio, bicarbonato e fosfato), e uma fração orgânica representada por mais de 400 tipos de proteínas (enzimas, imunoglobulinas e outros fatores antimicrobianos, além de glicoproteínas) (Almeida et al., 2008).

A saliva corresponde a uma secreção exócrina sintetizada pelos três pares de glândulas salivares maiores (parótidas, submandibulares e sublinguais), e das glândulas salivares menores – estas, amplamente distribuídas pela mucosa oral e

superfície lingual. Adicionalmente a este complexo salivar, encontramos constituintes do fluido crevicular, produtos de atividade bacteriana, células descamativas do epitélio oral, componentes derivados do sangue e vias aéreas superiores, além de depósitos alimentares (Lima et al., 2010).

Assim como demais fluidos corporais (como, por exemplo, constituintes químicos e celulares do sangue, urina, líquor ou fezes), a secreção salivar tem sido ascendentemente utilizada como ferramenta diagnóstica, podendo refletir o espectro do estado de saúde ou de diversas doenças/patógenos de um indivíduo, por meio da detecção de biomarcadores - proteínas associadas a fenótipos de patologias específicas ou a alterações metabólicas.

Frente às tradicionais técnicas de coletas sanguíneas, diversas vantagens sobressaem-se a favor da análise salivar: técnica não invasiva e indolor, reduzindo o desconforto à maioria dos indivíduos que padecem de biópsias e repetidas análises sanguíneas; facilidade de técnica operacional de coleta, manuseio, transporte e armazenamento, desta forma, reduzindo custos totais; diferentemente do sangue, a saliva não coagula e requer menos manipulação (Yoshizawa et al., 2013).

2.4.1.1 Expressão salivar de biomarcadores associados ao metabolismo ósseo

"…biomarcador é um termo coalescente que abrange o uso e desenvolvimento de ferramentas e tecnologias, monitorização e descoberta de drogas, desenvolvimento e compreensão de previsão, causas, progressão, regressão, resultado, diagnóstico e tratamento da doença." (Naylor, 2003) É uma característica devidamente medida e avaliada como futuro indicador de processos, sendo eles normais ou patológicos. (Mishra; Verma, 2010)

Nas 2 últimas décadas, uma série substancial de estudos elucidou o emprego de biomarcadores ósseos analisados por testes séricos, e o impacto oral e/ou saúde periodontal, resultantes do desequilíbrio do metabolismo esquelético frente à osteoporose primária, sobretudo em mulheres menopausadas. Não obstante, as

investigações salivares correspondentes à osteoporose induzida por glicocorticoides - cuja fisiopatologia é regulada por múltiplos mecanismos, diferindo-se da tipologia primária - não é encontrada na literatura científica atual (Agha-Hosseini et al., 2009; Meurman et al., 2009; Singh et al., 2013; Kaczor-Urbanowicz et al., 2017; Pavičin et al., 2017).

Taguchi et al. (2003) investigaram a relação entre índices radiomorfométricos mandibulares, DMO e biomarcadores do *turnover* ósseo, em 82 mulheres japonesas menopausadas. Radiografias panorâmicas de mandíbula foram avaliadas para aplicação de técnica radiomorfométrica (IMCo e espessura da cortical mandibular bilateralmente, subjacente ao forame mentual). Confirmação densitométrica fora realizada por avaliação de DXA da coluna lombar (L2-L4) em todas participantes. Setenta e seis pacientes foram submetidas à análise sérica de fosfatase alcalina (ALP) e telopeptídeo tipo 1 (NTx) urinário. Das 82 participantes, 34 apresentaram DMO normal, 31 foram diagnosticadas com baixa massa óssea e 17, com osteoporose. O grupo osteoporótico apresentou espessura cortical mandibular significativamente menor (média ± SE, 3.11 ± 0.25 mm), face às mulheres com baixa massa óssea (4.00 ± 0.15, $p = 0.003$) e ao grupo saudável (4.30 ± 0.16, $p < 0.001$); porém, não associada aos níveis de NTx, nem ALP. Já o IMCo mostrara-se significativamente associado a níveis reduzidos de NTx ($p < 0.001$) e ALP ($p < 0.05$), sendo este índice radiomorfométrico evidenciado como um relevante indicador diagnóstico em 80% dos casos diagnosticados com osteoporose.

Em um estudo longitudinal com 4.136 pessoas, Jørgensen et al. (2009) verificaram a relação entre o sistema OPG/RANKL e alterações de DMO em uma população mista de homens e mulheres, sendo estas estratificadas quanto ao *status* pré-menopausa (n = 226) e pós-menopausa (n = 1.908), tal como correspondente terapia de reposição hormonal (HRT, n = 412), ou não (n = 1.496). Medições séricas de osteoprotegerina (OPG), RANK e RANK-L foram realizadas por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), e, adicionalmente, análises séricas de PTH e calcitriol (25(OH)D_3 foram submetidas à imunometria (ECLIA). O análise densitométrica ocorreu a partir da técnica de absorciometria de energia única de antebraço. DMO apresentou-se negativamente associada à expressão de OPG ($p = 0.01$ e 0.007, respectivamente). Em mulheres menopausadas não submetidas à

terapia de reposição hormonal, a perda óssea mostrou-se positivamente associada níveis elevados de OPG ($p = 0.005$); correlação esta não encontrada nos demais grupos ($p \geq 0.28$).

Makker et al. (2012) conduziram um estudo comparativo entre 124 mulheres em idade pré-menopausa e 247 mulheres menopausadas, com o objetivo de avaliar a relação entre a expressão sérica de biomarcadores ósseos, DMO mandibular e DMO sistêmica. Os pesquisadores analisaram a DXA do corpo mandibular, distal do osso radio, total de quadril, cabeça femoral e lateral de coluna, análise sérica de biomarcadores relacionados ao *turnover* ósseo (cálcio total, fósforo inorgânico, fosfatase alcalina total, 25(OH)D, PTH, osteocalcina, fosfatase alcalina óssea e TRAP-5) e urinária (creatinina, cálcio total, piridinolina e deoxipiridinolina). A partir de análises de regressão uni e multivariadas, os resultados mostram associação positiva entre DMO radial e fósforo inorgânico sérico como preditores de baixa DMO mandibular; já DMO femoral, cálcio ionizado sérico, fosfatase alcalina óssea, osteocalcina e piridinolina urinária apresentaram correlação estatisticamente significante com DMO mandibular. Associação entre DMO mandibular e quantidade de dentes presentes fora observada em 100% de ambos os grupos, enfatizando o uso dos referidos biomarcadores como ferramenta ao mapeamento da DMO mandibular em mulheres que requeiram intervenções cirúrgicas dentárias, tal como na investigação precoce de mulheres passíveis ao desenvolvimento de osteoporose primária.

Em um estudo caso-controle, Agua-Hosseini et al. (2013) investigaram a associação entre a densidade mineral óssea, a expressão salivar de testosterona e o fluxo salivar, em 60 mulheres menopausadas com sintoma de xerostomia. Fora realizado análise por meio do imuno ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), cujos resultados revelaram associação entre o baixo fluxo salivar (odds ratio [OR] = 22.8, 95% intervalo de confiança [IC]: 5.4, 96.8), a baixa densidade mineral óssea femoral (OR = 6.0, IC: 1.8, 20.0), alta expressão de testosterona em saliva estimulada (OR = 5.2, IC: 2.0, 18.9), e em saliva não estimulada (OR = 3.8, 95% IC: 1.6, 12.3), assim como elevados índices séricos de testosterona (OR = 2.7, IC: 1.1, 7.2) ao aumento do risco da sensação de xerostomia, em mulheres menopausadas. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo avaliado e o saudável, quanto ao índice de massa corpórea e idade. A análise do fluxo de saliva

estimulada no grupo avaliado mostrou-se reduzido (0.23 ± 0.01), quando comparado aos controles (0.35 ± 0.01; $P < 0.05$); porém, quanto à saliva estimulada, a avaliação intragrupos revelou-se similar entre indivíduos estudados (0.35 ± 0.02) e controles (0.37 ± 0.02). Verificou-se concentração média de testosterona significativamente maior em amostras séricas ($P < 0.036$), saliva estimulada ($P < 0.025$), e saliva não estimulada ($P < 0.006$) em mulheres que reportaram xerostomia, do que no grupo controle.

Chmielnicka et al. (2014) avaliaram o impacto da corticoterapia em um dos mecanismos da fisiopatologia da osteoporose medicamentosa, em pacientes diagnosticados com pênfigo (sendo 24 do subtipo vulgar, e 5 diagnosticados com pênfigo foliáceo). Análise sérica de osteoprotegerina (OPG), RANK-L e osteocalcina fora realizada em 29 pacientes (17 mulheres e 12 homens), entre 23 e 75 anos, tal como em pacientes saudáveis, pareados em termos de sexo e idade. Pacientes com pênfigo apresentaram concentração média de OPG 16.46% maior, quando comparado ao grupo controle, assim como concentração sérica média de RANKL 26.88%, frente ao mesmo grupo. Já osteocalcina, um biomarcador relacionado à formação óssea, revelou-se 18.03% inferior, no grupo de pacientes homens ($p < 0.004$), confirmando um desequilíbrio da atividade osteoblástica e intensificação de perda óssea em pacientes diagnosticados com pênfigo, sob uso crônico de corticoterapia.

Em um estudo transversal, Jabber et al. (2015) investigaram a validade da IL-6, uma citocina pró-inflamatória, como biomarcador salivar no diagnóstico da osteoporose primária. Setenta e cinco mulheres em idade pós-menopausa foram submetidas à análise densitométrica (DXA) para avaliação de sua saúde esquelética, assim como à mensuração salivar de IL-6, realizada pela técnica de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Do total de participantes, 25 pacientes apresentaram laudo densitométrico normal; 25 apresentaram baixa massa óssea (osteopenia) e 25 foram diagnosticadas com osteoporose. Os níveis médios salivares de IL-6 mostraram-se significativamente diferentes entre os grupos saudável, osteopênico e osteoporótico (11.66 ± 4.44 vs 14.51 ± 6.5 vs 23.9 ±5.52 pg/ml; $p<0.001$). A presença salivar de IL-6 revelou-se como um parâmetro válido na predição de osteoporose primária (ROC área = 0.91, $p<0.001$).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente estudo propõe analisar o impacto da corticoterapia prolongada, pela avaliação bioquímica salivar de biomarcadores ósseos, associada ao estudo densitométrico e radiomorfométrico de radiografias panorâmicas (PAN) de mandíbula, em pacientes que apresentam risco ao desenvolvimento de osteoporose induzida por glicocorticoides.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as alterações densitométricas e o impacto na massa corporal (IMC) de pacientes submetidos ao regime crônico de corticoterapia, em dois tempos distintos (T_0 e T_1);

- Verificar a aplicabilidade do índice radiomorfométrico mandibular cortical (IMCo) em radiografias panorâmicas da população supracitada, em dois tempos distintos (T_0 e T_1);

- Analisar a correlação entre o índice radiomorfométrico (IMCo) e as variáveis densitométricas, nos dois tempos preconizados pelo estudo;

- Avaliar a presença de biomarcadores relacionados ao *turnover* ósseo na saliva e sangue de pacientes submetidos à corticoterapia prolongada, comparando-os ao fluido salivar de indivíduos saudáveis, no segundo tempo (T_1), por meio da tecnologia de imunoensaio *Luminex®*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Atendimento às normas de bioética

Este estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, obtendo o número de parecer consubstanciado: 1.730.951 (Anexo A).

Os indivíduos foram convidados a participar da pesquisa, e informados sobre os objetivos, riscos e benefícios do estudo. O aceite de sua participação fora deferido e formalizado por meio de assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B).

4.2 Delineamento do estudo

A presente investigação está subdividida em:

1. um estudo imaginológico longitudinal prospectivo, realizado em T_0 e T_1, dos pacientes da pesquisa (n=25);
2. um estudo transversal, do tipo caso-controle, a partir da análise comparativa da expressão salivar de biomarcadores ósseos entre os participantes da pesquisa (n=25) e seus correspondentes controles saudáveis (n=25), em T_1;
3. um estudo transversal, a partir da análise comparativa de biomarcadores ósseos expressos na saliva e sangue dos próprios participantes da pesquisa, em T_1.

4.3 População do estudo e seleção da amostra

O estudo consistiu na análise prospectiva de pacientes regularmente matriculados no Ambulatório de Estomatologia do Departamento de Dermatologia do

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), com diagnóstico de pênfigo vulgar (PV), no período de fevereiro de 2016 a julho de 2018.

Foram selecionados, consecutivamente, 25 pacientes matriculados no referido serviço, de acordo com os aspectos clínicos, confirmação histopatológica, e obedecimento aos critérios de elegibilidade e exclusão. Paralelamente, foram incluídos 25 participantes de pesquisa saudáveis, pareados por idade e sexo (grupo controle).

4.3.1 Critérios de inclusão

- Confirmação diagnóstica de pênfigo vulgar por correlação clínica, histopatológica e imunofluorescência direta;
- Uso contínuo de corticoterapia via oral (Prednisona), por período ≥ 3 meses e em doses ≥ 5 mg/dia;
- Pacientes de ambos os sexos;
- Idade entre 18 e 55 anos.
- Seguimento regular no Ambulatório de Estomatologia (HC-FMUSP);
- Realização de exames imaginológicos (PAN e DXA) nos 2 tempos preconizados pela pesquisa.

4.3.2 Critérios de exclusão

- Presença de comorbidades associadas ao desenvolvimento de OPIG (Quadro 2.2);
- Uso crônico de medicamentos associados ao desenvolvimento de OPIG (Quadro 2.3);
- Exame radiográfico (PAN) apresentando falta de nitidez e/ou mau posicionamento;

- Infecções sistêmicas ou alterações patológicas que possam interferir na análise radiográfica mandibular;
- Menopausa precoce (<45 anos);
- Alcoolismo e etilismo.

4.4 Dados demográficos

Dados clínicos foram colhidos por meio de prontuário clínico eletrônico, e cada paciente respondeu a um questionário contemplando as seguintes informações: idade; sexo; etnia; história clínica atual e pregressa dos últimos 5 anos; presença de comorbidade(s); uso de medicações nos últimos 5 anos; histórico de fraturas; histórico de saúde familiar; prática de atividades físicas (consideradas somente às por recreação, esporte, exercício ou lazer, por pelo menos, 20 minutos contínuos diários).

4.5 Aquisição das imagens radiográficas (PAN)

As radiografias panorâmicas (PAN) digitais foram realizadas no equipamento Orthophos® XG5 (Sirona Dental Systems GmbH, Bensheim, Alemanha), utilizando o protocolo de aquisição de 69 kVp, 15 mA e tempo de emissão a 14,1 s. Os exames foram executados no Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InRad – HCFMUSP).

Em pé, o rosto do paciente foi posicionado de forma que o plano sagital mediano se encontrasse perpendicular ao plano horizontal, e o plano de Frankfurt – formado pela linha imaginária entre o meato acústico e o forame infraorbitário – paralelo ao plano horizontal. Fora instruído para que, durante a execução da tomada radiográfica, o paciente posicionasse a língua em contato com o palato duro, e se mantivesse imóvel.

4.5.1 Avaliação imaginológica

A qualidade das radiografias panorâmicas foi avaliada por um cirurgião-dentista radiologista experiente, enquadrando-as conforme os critérios de inclusão ou exclusão. A partir daí, três examinadores calibrados aplicaram a metodologia proposta nas imagens, individual e aleatoriamente, em dois tempos diferentes, sendo:

- **T_0** = Até 1 mês após início da corticoterapia (Prednisona), sendo considerado doses > 5 mg/dia (Van Staa et al., 2003);

- **T_1** = Doze meses após a data inicial da corticoterapia, independente à dose atual.

A análise radiomorfométrica implementada correspondeu ao índice mandibular cortical (IMCo) (Klemetti et al., 1994), representada pela classificação:

- **C1** (normal) – a margem endosteal, subjacente ao forame mentual, apresenta-se nítida e lisa, bilateralmente (Figura. 4.1);

- **C2** – presença de defeitos semilunares (lacunas de reabsorção) na margem endosteal, ou presença de erosões corticais formadas por 1 a 3 camadas, uni ou bilateralmente (Figura 4.2);

- **C3** – a margem endosteal apresenta porosidades e a espessura da cortical encontra-se reduzida (Figura 4.3)

Na constatação de disparidade bilateral, foi considerado a classificação mais elevada.

Figura 4.1 – Indice cortical mandibular (IMCo) C1: cortical normal

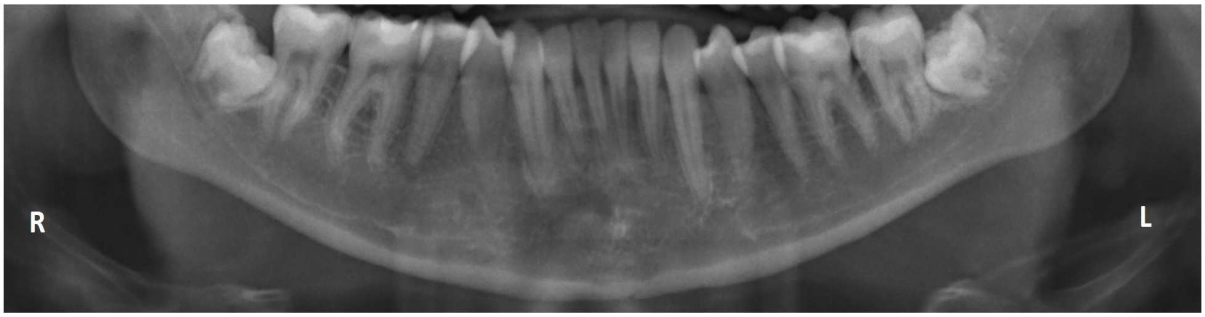
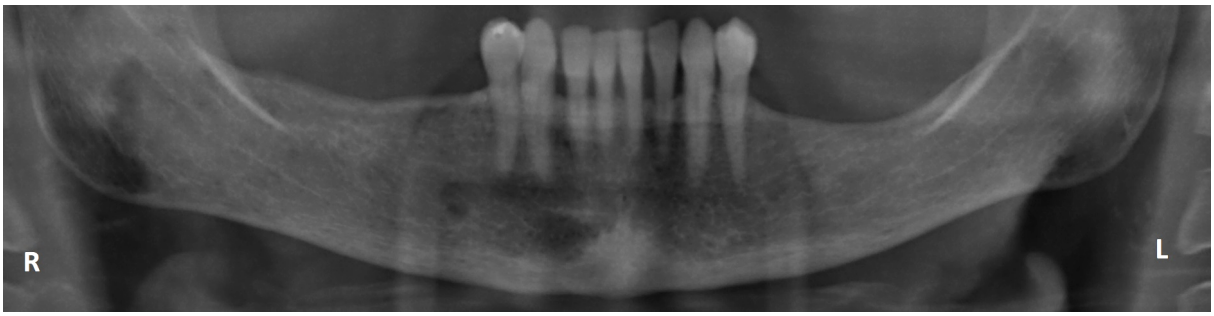


Figura 4.2 – Indice cortical mandibular (IMCo) C2: ligeira a moderada erosão

Figura 4.3 – Indice cortical mandibular (IMCo) C3: afilamento da cortical e porosidade severa



Fonte: A autora

4.5.2 Avaliação da densidade mineral óssea e massa corporal

A mensuração da DMO foi realizada por meio de aparelho de absorciometria de feixe duplo (DXA – Discovery A, QDR for Windows XP, Hologic, USA) no colo do fêmur (CF), fêmur total (FT), e na coluna (CL – local compreendido entre a primeira e quarta vértebra, L1-L4), nos dois tempos preconizados pelo estudo (T_0 e T_1). Todas as avaliações da composição corporal pela técnica densitométrica (DXA) foram

realizadas por técnico radiológico e laudadas por médico radiologista do serviço, no Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (INRAD-HCFMUSP). A DMO foi obtida e analisada de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Densitometria Clínica (Tabela 4.1), sendo o coeficiente de variação do aparelho (%CV) de 0,8 para CL e FT.

Tabela 4.1 – Classificação de osteoporose, a partir da DMO (Organização Mundial da Saúde, OMS)

Categoria	**T-score**
Normal	DMO ≥ -1
Baixa massa óssea (osteopenia)	DMO < -1,0 e > -2,5
Osteoporose	DMO ≤ -2,5
Osteoporose severa	DMO ≤ -2,5 + histórico de fratura por fragilidade

Fonte: Kanis et al. (2012)

O escaneamento foi determinado com base na estatura e peso corporal de cada participante, permitindo, adicionalmente, a obtenção de valores do índice de massa corporal (IMC), calculado pela divisão do peso (kg) pela altura (m), elevada ao quadrado (kg/m²) (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Classificação internacional da obesidade, segundo o índice de massa corporal (IMC)

Classificação	**IMC**
Magro ou baixo peso	< 18,5
Normal ou eutrófico	18,6 – 24,9
Sobrepeso ou pré-obeso	25,0 – 29,9
Obesidade grau I	30,0 – 34,9
Obesidade grau II	35,0 – 39,9
Obesidade grau III	≥ 40.0

Fonte: Diretrizes brasileiras de obesidade (Associação Brasileira para o estudo da obesidade e da Síndrome metabólica – ABESO, 2016)

4.6 Amosras salivares e séricas

A obtenção das amostras biológicas ocorreu, individualmente, no Departamento de Dermatologia (HC-FMUSP), em data concernente à realização de exames gerais regulares (hemograma), respeitando o cronograma estipulado (T_1 = 12 meses após o início da corticoterapia), e no período compreendido entre às 07h e 10 horas da manhã. Os pacientes foram orientados a se apresentarem em jejum (com exceção de água, em quantidades não excessivas) de 8 horas, tal como a não praticar exercícios físicos, não fumar, nem escovar os dentes por, ao menos, 2 horas antes à coleta. Aos pacientes que apresentassem lesões ativas intraorais, foi reagendada a coleta, em momento que o quadro clínico estivesse controlado.

Sentado em local privativo, arejado e iluminado, o participante foi instruído pelo pesquisador a bochechar água mineral por 30 segundos, a fim de remover resíduos alimentares e células descamativas provenientes das mucosas orais. Subsequentemente, fora solicitado para que toda a saliva produzida, sem estimulação (técnica passiva) e sem deglutição, fosse vertida em um tubo estéril, sendo mantida no gelo, até ser conduzida ao laboratório. A coleta decorreu durante um período compreendido de 5 minutos, com o intuito de garantir um volume mínimo de 3 mL. Em seguida, uma enfermeira treinada realizou a obtenção das amostras séricas, as quais foram realizadas conjuntamente ao exame regular (hemograma) solicitado pelo médico dermatologista responsável. Após ser orientado sobre o procedimento, foi realizada antissepsia no local com solução alcóolica a 70% e, após a superfície apresentar-se completamente seca, foram coletados 3 mL de sangue de cada paciente, a partir de punção venosa periférica direta (braquial) com dispositivo intravenoso, sendo o material transferido e armazenado em um tubo a vácuo e sem adição de agentes anticoagulantes. Após aguardados 30 minutos, em temperatura ambiente, para processo de coagulação da amostra, estas, juntamente às salivares, foram transportadas refrigeradas até o laboratório.

Uma solução de coquetel inibidor de protease (*Protease inhibitor coktail, P8340, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA*) foi adicionada às amostras salivares, em concentração de 1% (v/v). Imediatamente, todas as amostras foram submetidas à

centrifugação refrigerada a 3000 rpm, por 15 minutos, a 4º C. Em seguida, as amostras foram transferidas em micro tubos de 1,5 mL de polietileno (Eppendorf®), a partir da aspiração, por pipetagem, da porção subjacente ao sobrenadante, sem tocar o precipitado do fundo centrifugado. Fora preparado 113 µl de diluente calibrador RD6-52 (RD, Systems – USA) – fornecido pelo fabricante - e adicionados a 113 µl de cada amostra salivar e sérica. Este coquetel conjugado foi disposto em micro tubos de polietileno (Eppendorf®) e estes foram, então, congelados (-20ºC), para análise posterior conjugada (realizada em até 2 meses), evitando-se, assim, múltiplos ciclos de degelo (>2).

4.6.1 Análise da expressão salivar e sérica dos biomarcadores do *turnover* ósseo

A detecção dos níveis dos biomarcadores relacionados ao metabolismo ósseo (tabela 4.3) foi quantificada a partir das alíquotas de cada amostra salivar e sérica, por meio do imunoensaio multiplex (Human Magnetic Luminex® Screening Assay, R&D systems, Minneapolis, USA), seguindo as instruções do fabricante.

Esta técnica permite a detecção e quantificação simultânea de múltiplos analitos, em uma mesma amostra, a partir de uma pequena quantidade disponível (~50 µl), utilizando microesferas magnéticas (*beads*) coradas com dois fluoróforos, os quais acomplam-se a anticorpos distintos. Sua leitura ocorre a partir da detecção de sinal de fluorescência de 3 cores.

Tabela 4.3 – Biomarcadores relacionados ao metabolismo ósseo avaliados

Biomarcador	**Valor máximo da curva (pg/mL)**
COL1A1	3,170
Osteoprotegerin	19,770
Vitamin D BP	1,617,080
Osteopontin	438,290
TRANCE/RANK L	2,890

Fonte: A autora

A tecnologia *multiplex* se fundamenta no ensaio imunofluorimétrico "sanduíche" de dois sítios, onde anticorpos de captura (localizados na superfície dos beads) estão acoplados às microesferas por ligações covalentes não reversíveis. Um anticorpo de detecção biotinilado é adicionado e, em seguida, o analito de interesse se liga ao anticorpo de captura. Adicionalmente, um terceiro marcador fluorescente conjugado (estreptavidina-ficoeritrina, PE) é incorporado, ligando-se ao anticorpo de detecção, permitindo, então, a detecção da intensidade de fluorescência por dois feixes de lasers diferentes, em um citômetro de fluxo, que incidem sobre as microesferas: um *laser* verde, que emite um sinal luminoso com comprimento de onde de 532 nm, excita o detector e evidencia sua reação de ligação ao analito, correspondendo sua concentração na amostra; e um *laser* vermelho, de comprimento de onda da ordem de 635 nm, o qual excita os corantes internos da microesfera, identificando-a. Os sinais luminosos emitidos são convertidos para digitais, processados por um software e, então, expressos em MFI (*Multiple Fluorescence Intensity*) (Elshal; McCoy, 2006).

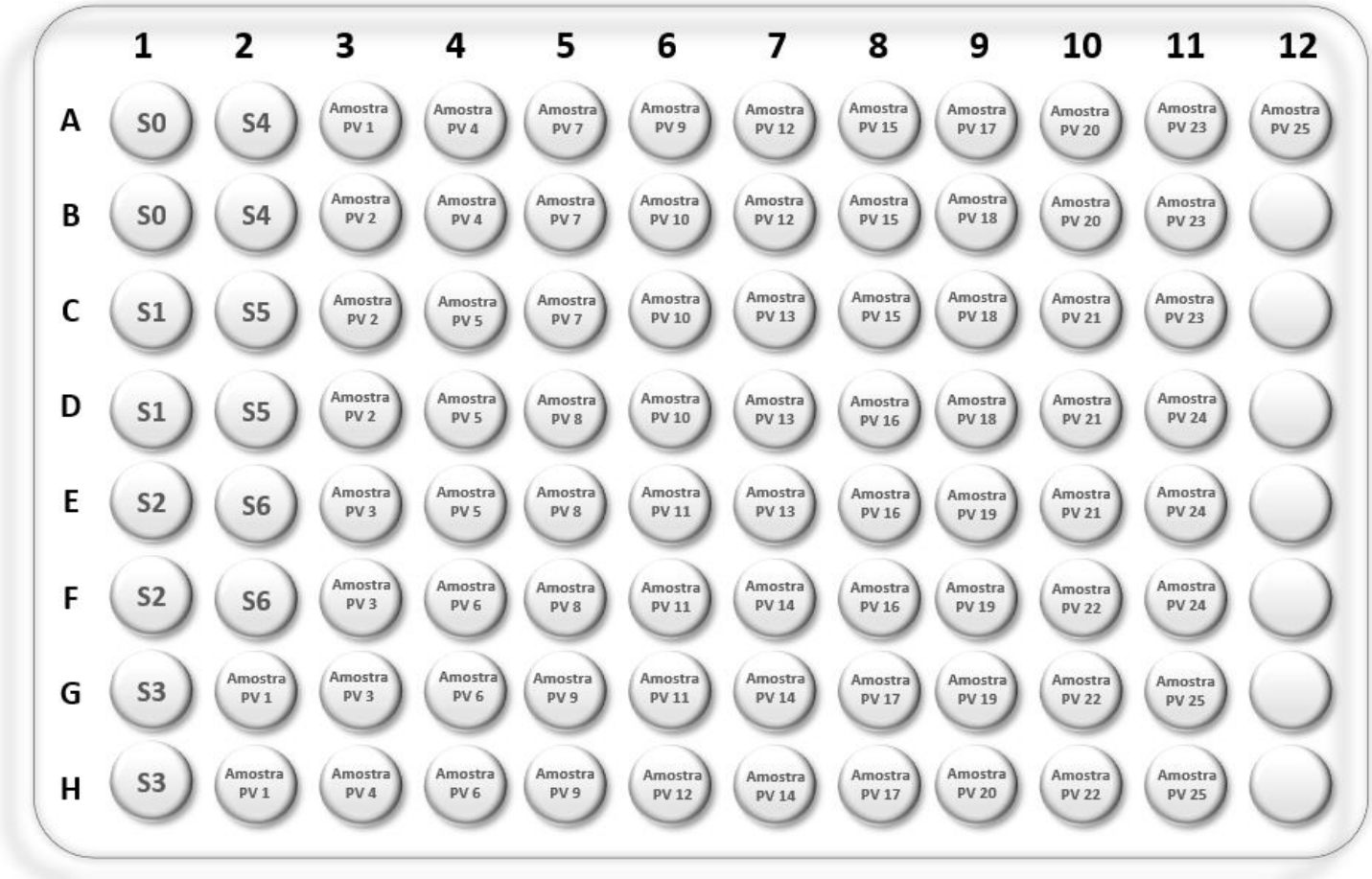
4.6.2 Delineamento do imunoensaio

Este imunoensaio foi realizado em triplicatas, e seguindo as diretrizes do fabricante (Human Magnetic Luminex® Screening Assay, R&D systems, Minneapolis, USA). Uma placa de 96 poços foi pré-desenhada, e realizada a constituição, em duplicatas, das curvas com os valores de densidade ótica e

estabilização dos padrões (*standards* – S1, S2, etc*)*, a partir das concentrações de cada antígeno a ser dosado e adição do agente calibrador, servindo, desta forma, como padrão de comparação para dedução dos antígenos nas soluções-teste - estas, em triplicatas - correspondendo ao painel de biomarcadores estudados ("amostra PV"), conforme esquematizado na figura 4.4. Todas as amostras foram analisadas seguindo o fator de diluição 2X.

Para aquisição dos dados utilizou-se o software *Luminex XPonent for LX100/LX200*, versão 3.1.871.0 (Luminex Corporation, 2008 - Austin, Texas – USA) do aparelho Luminex (Merk, Millipore), previamente preparado, calibrado e estabilizado, localizado no laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Farmacogenômica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

Figura 4.4 – Pré-desenho da placa de 96 poços para dosagem de biomarcadores ósseos



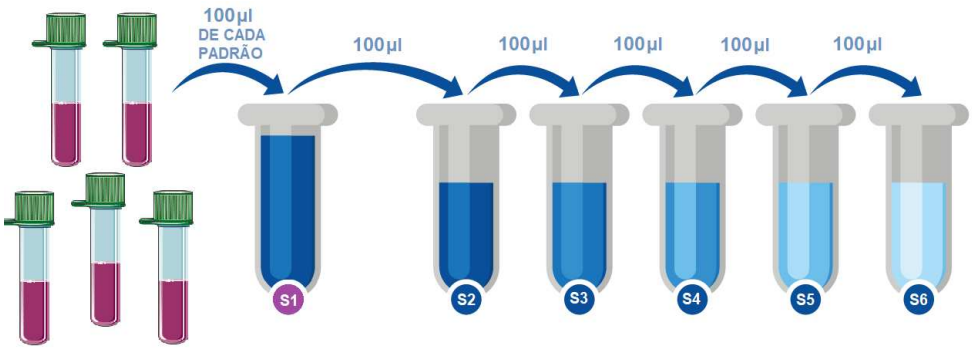
Fonte: A autora

4.6.2.1 Preparo dos reagentes e ensaio

Previamente à realização do imunoensaio, todos os reagentes foram mantidos em temperatura ambiente (20-25ºC). Foi realizado o preparo da solução tampão de ensaio, a partir da homogeneização e completa dissolução de seus cristais, em agitador do tipo vortex. Posteriormente, foram diluídos 30 mL de tampão de ensaio em 270 mL de água deionizada (água MIlli-Q).

A seguir, fora realizado a preparação da curva padrão, a partir da reconstituição dos 5 padrões (R,N,K,I,J), devidamente etiquetados em micro tubos de polietileno, na concentração de 100 µl cada um, seguido da adição de 200 µl do diluente calibrador RD6-52 nos padrões S2 a S6 (S1 fora mantido para realização de diluição seriada), conforme demonstrado na figura 4.5.

Figura 4.5 – Esquema das diluições em série para o preparo da curva padrão



Fonte: A autora

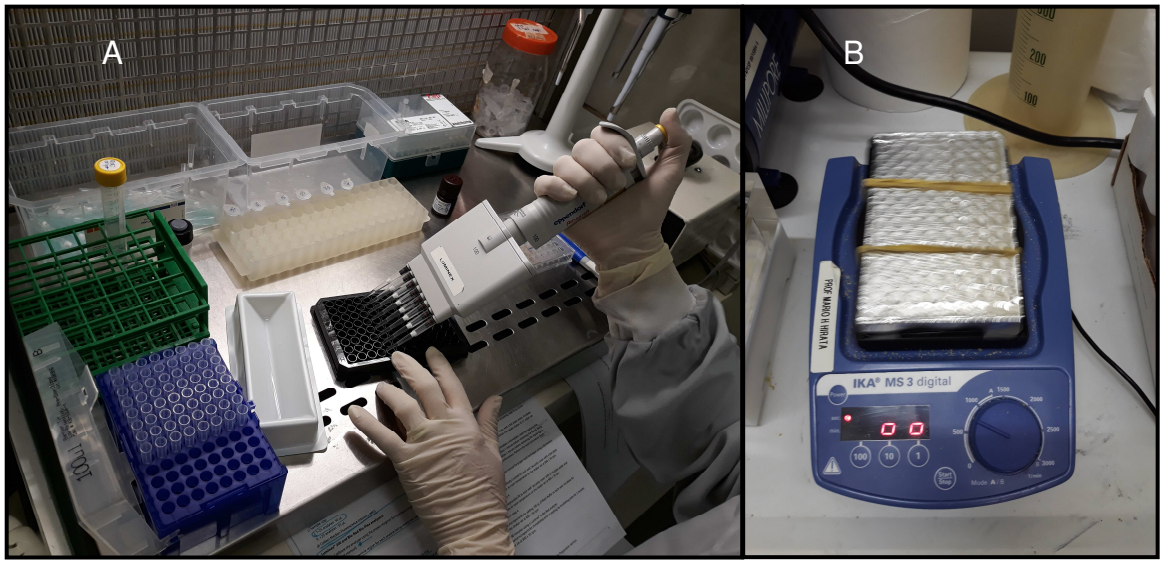
Posteriomente, conduziu-se o preparo do coquetel de micropartículas (*beads*), a partir da centrifugação inicial de cada frasco de *beads* de anticorpo, por 30 segundos, a 12000 rpm, seguido de agitação em vortex, por 1 minuto, para adequada homogeneização. Em um micro tubo, foi adicionado 2,5 mL de diluente calibrador RD6-52 a 250 µl de micropartículas. Novamente, procedeu-se com centrifugação, durante 1 minuto, a 12000 rpm.

Logo após, realizou-se o preparo de diuição do coquetel de anticorpos (*Biotin antibody cocktail*), onde cada frasco de anticorpo foi sonificado por 30 segundos, a 12.000 rpm, em temperatura ambiente. Em um micro tubo separado e devidamente rotulado, fora acrescentado 2,5 mL de diluente calibrador RD6-52 a 250 µl do coquetel de anticorpos. O conteúdo foi homogeneizado por agitação em vórtex.

A etapa seguinte correspondeu à preparação do conjugado de estreptavidina ficoeritrina (PE), onde este foi previamente centrifugado por 30 segundos, a 12.000 rpm. Em um frasco previamente separado e protegido da incidência de luz, fora realizada a diluição da solução pela adição de 110 µl de estreptovidina-PE e de 265 µl de tampão de ensaio, e homogeneização em agitador.

Em seguida, prosseguiu-se com a ressuspensão do coquetel de micropartículas diluído, em agitador do tipo vortex. Com o uso de uma pipeta multicanal, fora adicionado 50 µl do coquetel de micropartículas e 50 µl dos padrões em cada poço apropriado da placa estéril de microtitulação de 96 poços (Olen, Italy), seguido da adição de 50 µl das amostras, já descongeladas (figura 4.6 - A). As placas foram seladas e recobertas por papel alumínio, e incubadas em uma mesa agitadora de placas, por 2 horas (figura 4.6 - B).

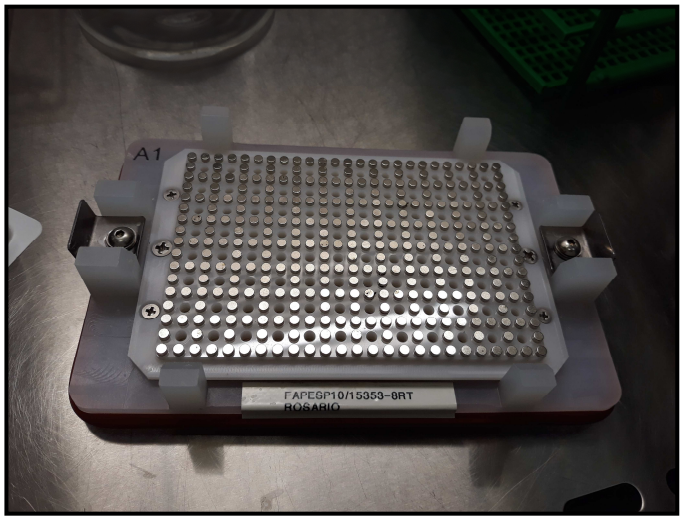
Figura 4.6 – (A) Preparo dos reagentes para o imunoensaio; (b) incubação da placa sob agitação.



Fonte: A autora

Após 2 horas de incubação, a placa foi acomodada sobre uma placa magnética (Figura 4.7). Após 1 minuto, cuidadosamente verteu-se a solução e realizou-se a lavagem com 100 µl de tampão de ensaio. A placa foi, então, selada e recoberta com papel alumínio, e prossseguiu-se ao processo de agitação, por 30 segundos, na mesa agitadora. Reposicionada sobre a placa magnética, o processo de lavagem foi repetido mais 2 vezes.

Figura 4.7 – Placa magnética



Fonte: A autora

Em seguida, fora realizado a incorporação do anticorpo, a partir da adição de 50 µl do coquetel correspondente. Novamente, a placa foi vedada com papel alumínio, e a incubação do anticorpo ocorreu sob agitação, na mesa agitadora, durante 1 hora, em temperatura ambiente (20-25ºC).

Fora repetido os 3 ciclos de lavagens com 100 µl de tampão de ensaio. Subsequentemente, procedeu-se a incorporação do conjugado de estreptavidina-PE, pela adição de 50 µl em cada poço. A placa, selada, foi reposicionada na mesa agitadora, e sua incubação seguiu por 30 minutos. Decorrido o tempo de incubação, novamente, repetiu-se os 3 ciclos de lavagens com 100 µl de tampão de ensaio. Posteriormente, a placa seguiu incubada com 100 µl de tampão de ensaio, sob agitação, por 2 minutos.

Finalizados os procedimentos para preparo das amostras nos respectivos poços das placas, estas foram avaliadas por meio do imunoensaio multiplex para tecnologia Luminex, lidas em aparelho Luminex (Merk, Millipore), ajustado de acordo com as instruções do manual do fabricante. Para leitura e analise dos dados, utilizou-se ajuste de curva de cinco parâmetros (escala logarítmica) do software Milliplex Analyst versão 5.1.0.0 (copyright 2005, 2010 Vigene Tech Inc.).

4.7 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram tabulados no programa Excel 2013 (Microsoft® Corporation, Redmont, WA, EUA), e analisados por meio do programa estatístico GraphPad Prism versão 7.03 (GraphPad Software, Inc, EUA). Em todos os testes estatísticos foi adotado o intervalo de confiança de 95% ($p<0,05$). Os resultados foram analisados de acordo com sua frequência, e averiguado o padrão de distribuição normal pelo método de D'agostino - Pearson.

A concordância interobservador para a análise do índice mandibular cortical foi realizada pelo teste kappa (κ) (Hollander; Wolfe, 1978), de acordo com a classificação representada na tabela 4.4:

Tabela 4.4 – Interpretação do teste Kappa

Kappa	Concordância
< 0	Baixa concordância
0.01– 0.20	Concordância leve
0.21 – 0.40	Concordância razoável
0.41 – 0.60	Concordância moderada
0.61 – 0.80	Concordância substancial
0.81 – 0.99	Concordância quase perfeita

Fonte: Vieira; Garrett (2005)

Foram verificadas as diferenças intra e inter-grupos, tal como alterações entre os períodos experimentais (T_0 e T_1). A análise de variáveis pareadas, assim como a comparação entre os tempos das variáveis quantitativas e qualitativas, foi realizada a partir da aplicação do teste não paramétrico de Willcoxon, por não aderirem à curva de normalidade. Sua correlação foi identificada pelo coeficiente de Spearman, que varia de -1 a +1, sendo que o valor 0 indica ausência de correlação, -1 indica correlação negativa perfeita, e +1 significa correlação positiva perfeita (Blalock, 1979). Das variáveis que apresentaram correlação positiva, foi realizada uma análise de regressão linear.

Para estabelecer uma correlação entre as variáveis da concentração de biomarcadores ósseos expressos no fluido salivar entre o grupo de estudo e o grupo controle, assim como para a expressão salivar e sérica no grupo de estudo, foi feita pela aplicação do método não-paramétrico de U-Mann Whitney, frente à não aderência ao teste de normalidade.

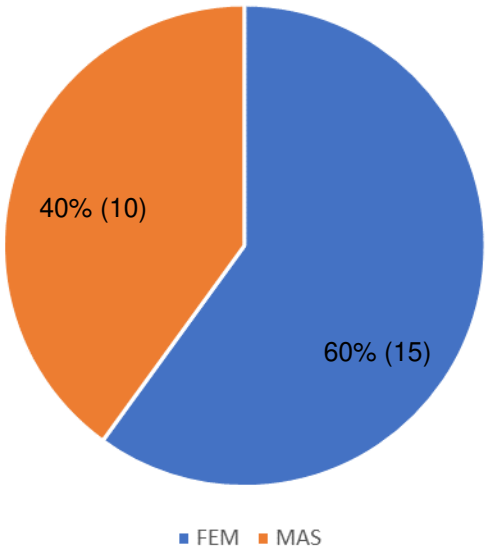
5 RESULTADOS

5.1 Pacientes

Inicialmente, 47 pacientes diagnosticados com pênfigo vulgar foram pré-selecionados e convidados a participar da pesquisa. Não obstante, 22 não atenderam aos critérios de inclusão, remanescendo, por fim, 25 pacientes que se enquadraram às demandas do estudo.

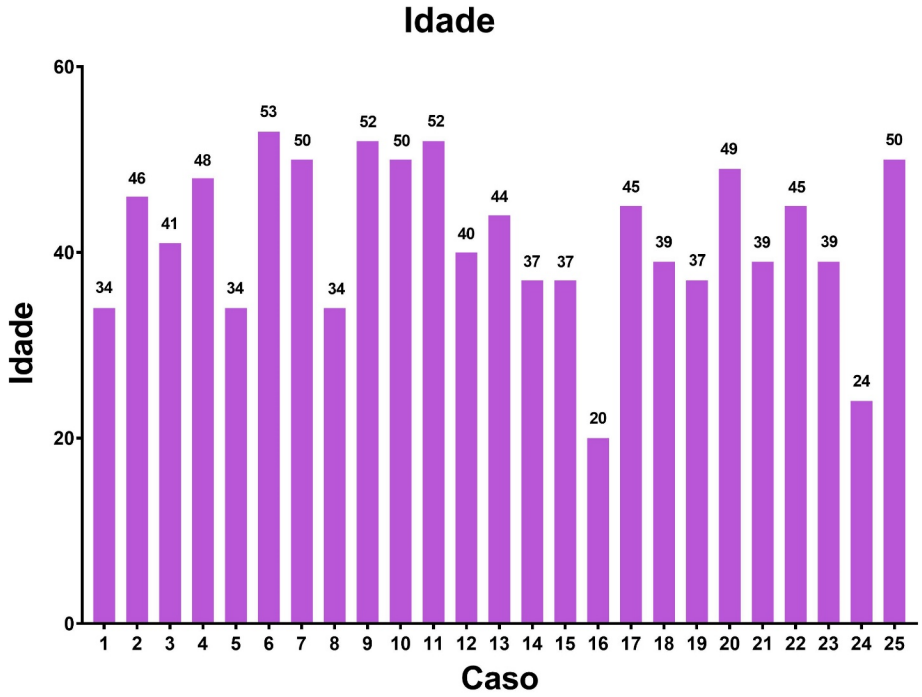
Dentre a população estudada, foi observada uma maior incidência do sexo feminino (60%), frente a 40% de indivíduos do sexo masculino, e uma distribuição de faixa etária entre 20 a 53 anos (41,56 ± 8,51). Quanto à raça/cor de pele, 76% dos pacientes correspondiam a leucodermas, 20% melanodermas e 4% feodermas.

Gráfico 5.1 – Distribuição dos participantes da pesquisa, segundo o sexo.



Fonte: A autora

Gráfico 5.2 – Distribuição das faixas etárias correspondentes aos participantes da pesquisa (n=25)



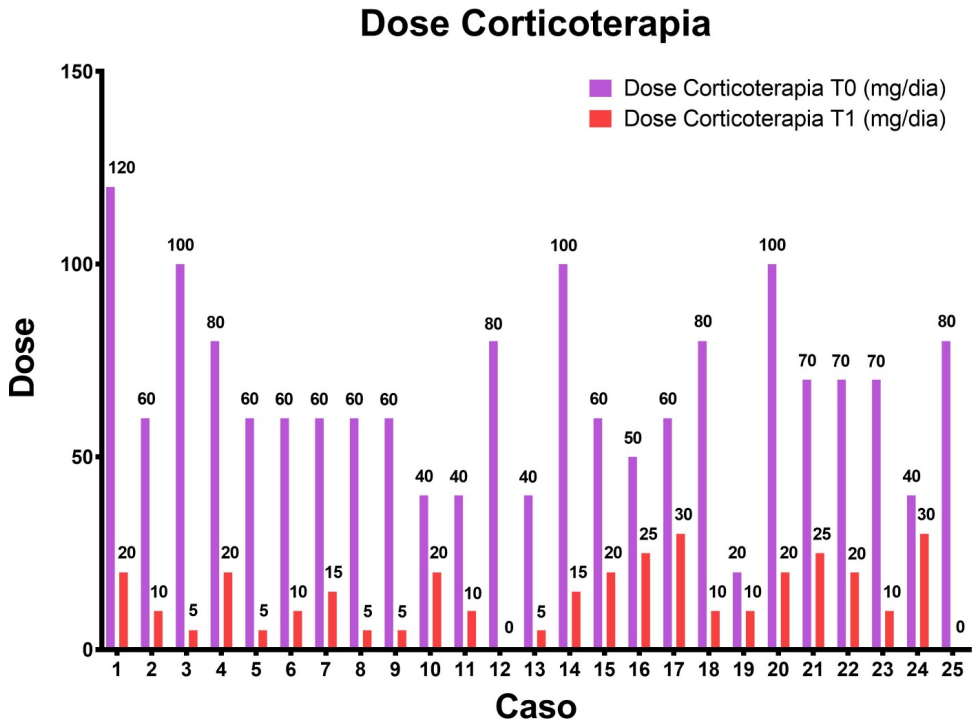
Após confirmação diagnóstica realizada por correlação clínica, histopatológica e por imunofluorescência direta e/ou indireta. Em T_0, 100% dos pacientes apresentavam acometimento mucoso oral exclusivo. Em T_1, 3 (13,6%) doentes haviam evoluído com acometimento mucocutâneo.

Todos os pacientes foram submetidos ao regime de corticoterapia, como modalidade terapêutica, sendo a Prednisona o fármaco de escolha em 100% dos casos. Em T_0, a dose média correspondeu a 66,4 ± 22,8 mg/dia. Após 1 ano de terapia (T_1), a dose média consistiu em 13,8 ± 8,8 mg/dia. Entre T_0 e T_1, cinco pacientes (22,7%) fizeram uso concomitante da medicação imunossupressora Azatioprina, em doses de 150 mg/dia (60%) e 200 mg/dia (40%).

Tabela 5.1 – Distribuição das doses diárias de Prednisona utilizadas na avaliação inicial (T_0) e após 12 meses (T_1)

Prednisona	Mín. (mg/dia)	Máx. (mg/dia)	Média (mg/dia)	Desvio Padrão
T0	20	120	66,4	22,89
T1	0	30	13,8	8,813

Gráfico 5.3 – Distribuição das doses diárias de Prednisona utilizadas no início da terapia (T_0) e após 12 meses (T_1)



5.2 Densidade mineral óssea

Antes da instituição da terapia com glucocorticoides, os pacientes apresentaram um valor médio de T-*score*, em coluna, de -0,1 ± 1,1 g/cm^2. Posteriormente, em T1, a média decaiu a -0,8 ± 1,2 g/cm^2.

Quanto à média de T-*score* em fêmur apresentada em T0, o valor consistiu em 0,3 ± 1,0 g/cm^2. Passados 12 meses (T1), tal valor reduziu a 0,0 ± 1,2 g/cm^2.

Tabela 5.2 – Distribuição dos valores de T-*score* avaliados em coluna e fêmur, em To e T1

T-*score*	Mín. (g/cm^2)	Máx. (g/cm^2)	Média (g/cm^2)	Desvio Padrão
Coluna T_0	-1,9	2,9	-0,1	1,1
Coluna T_1	-2,9	2,8	-0,8	1,2
Femur T_0	-1,1	3,4	0,3	1,0
Femur T_1	-1,8	3,0	-0,04	1,2

Os gráficos 5.4 e 5.5 apresentam, respectivamente, a distribuição, por paciente, dos valores de T-score, em coluna e femur, analisados em T_0 e T_1.

Gráfico 5.4 – Distribuição dos valores de T-score em coluna, em T_0 e T_1

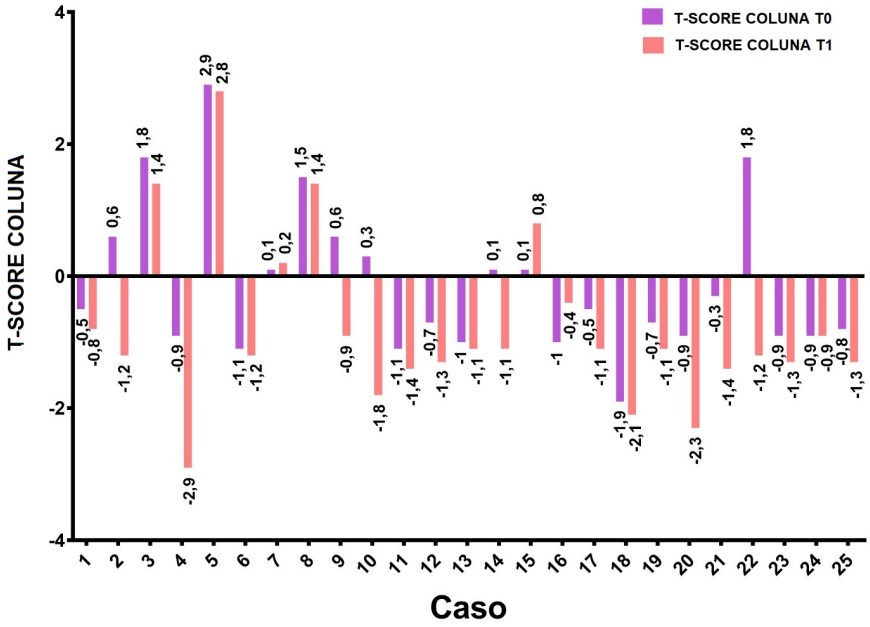
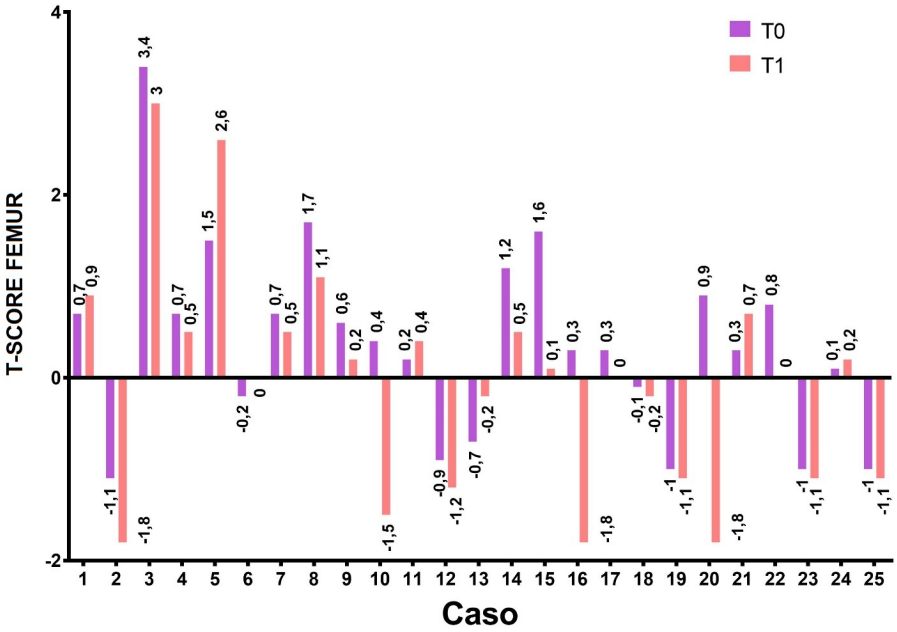


Gráfico 5.5 – Distribuição dos valores de T-score em femur, em T_0 e T_1



O resultado da análise do teste de Willcoxon para as variáveis densitométricas T-*score* coluna e fêmur, em T0 e T1, mostrou diferenças significativas entre os grupos; ademais, há diferenças nas intensidades identificadas pelo coeficiente de Spearman (r_s), no qual T-*score* femoral apresentou correlação significativa positiva moderada.

Tabela 5.3 – Resultado do teste de Wilcoxon para os pares de variáveis densitométricas T-*score*

T-score	Coef. Spearman (r_s)	Significância (*p*)
Coluna T1 – T0	0,5057	0,0003*
Femur T1 – T0	0,6298*	0,0240*

(*) valores de significância indicativos de diferenças entre os grupos, descartamos dessa forma a hipótese nula e adotamos a hipótese alternativa: há diferenças entre os grupos.

O coeficiente de correlação pode variar em termos de valor de -1 a +1. Quanto maior for o valor absoluto do coeficiente, mais forte é a relação entre as variáveis. Onde:

- *≥ 0.9: correlação muito forte;*
- *0.7 - 0.9: correlação forte;*
- *0.5 - 0.7: correlação moderada;*
- *0.3 - 0.5: correlação fraca;*
- *0 a 0.3: correlação muito baixa.*

Para os pares de variáveis com valores significativos, realizamos a análise de regressão linear, que resultou nas funções lineares das medições no tempo T_1 (y) em função das medições no tempo T_0 (x):

Gráfico 5.6 – Dispersão da proporção de T-score em coluna, analisada nos pacientes, em T_0 e T_1

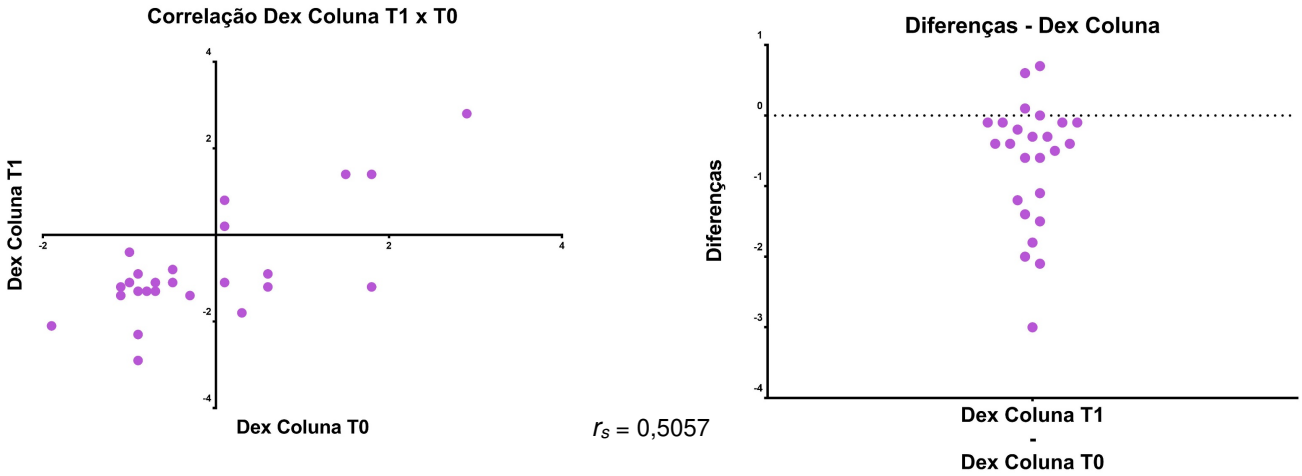
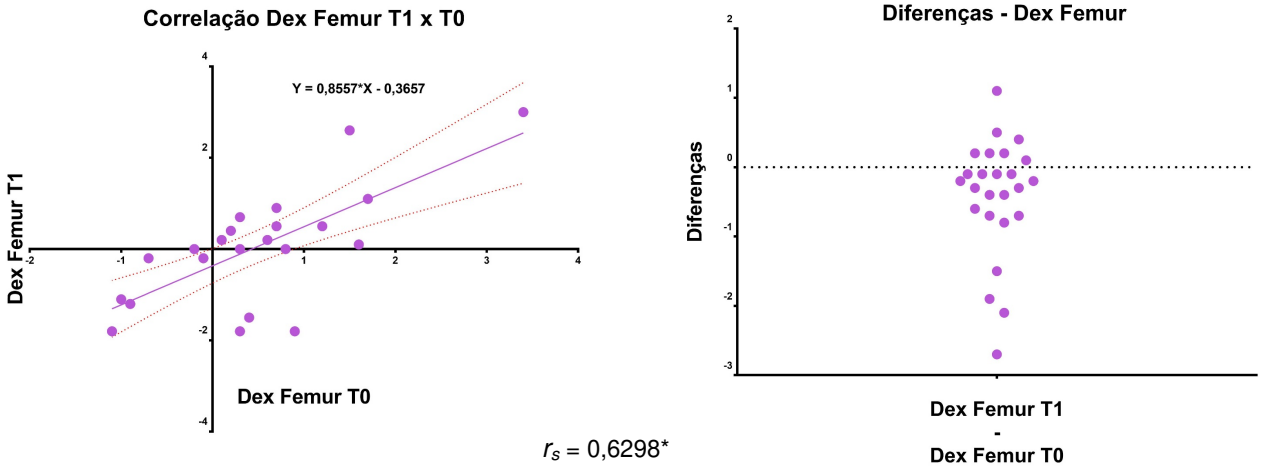


Gráfico 5.7 – Gráficos de dispersão da proporção de T-score femoral, analisada nos pacientes, em T_0 e T_1



O valor médio da densidade mineral óssea (DMO) da coluna dos doentes, analisado antes da instituição da corticoterapia (T_0) foi de 1,105 ± 0,1473 g/cm^2, enquanto que, 12 meses mais tarde (T_1), houve uma redução para 1,004 g/cm^2 ± 0,1655 g/cm^2.

Para a DMO femoral, os participantes da pesquisa apresentaram um valor médio de 1,046 ± 0,1578 g/cm^2 no início da terapia medicamentosa. Em T1, a média fora reduzida para 0,9814 ± 0,1745 g/cm^2.

Tabela 5.4 – Distribuição dos valores de densidade mineral óssea avaliados em coluna e fêmur, em T_0 e T_1

DMO	Mín. (g/cm^2)	Máx. (g/cm^2)	Média (g/cm^2)	Desvio Padrão
Coluna T_0	0,942	1,453	1,105	0,1473
Coluna T_1	0,686	1,493	1,004	0,1655
Femur T_0	0,814	1,531	1,046	0,1578
Femur T_1	0,718	1,478	0,9814	0,1745

Gráfico 5.8 – Distribuição dos valores de DMO em coluna, em T_0 e T_1

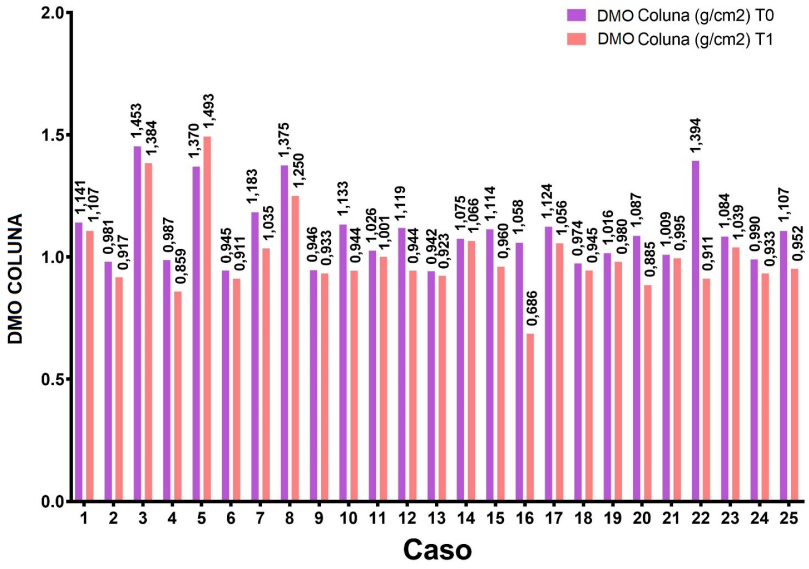
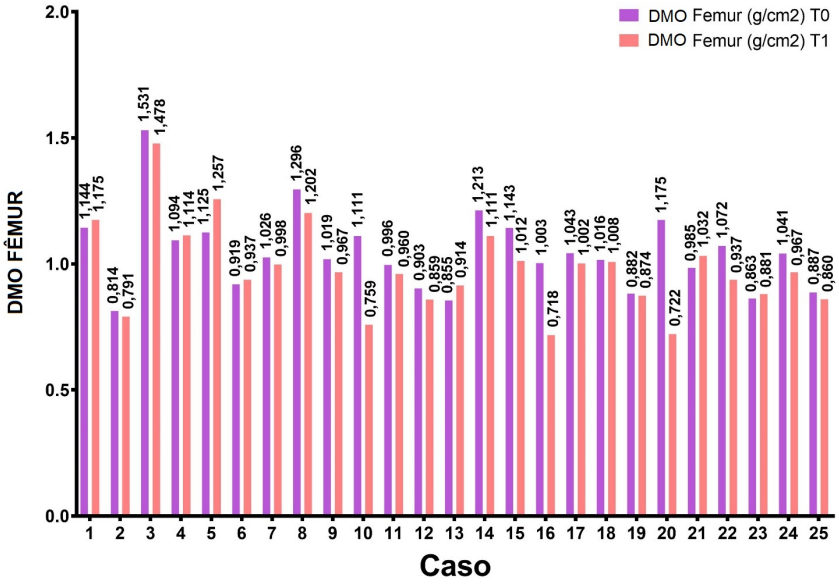


Gráfico 5.9 – Distribuição dos valores de DMO em fêmur, em T_0 e T_1



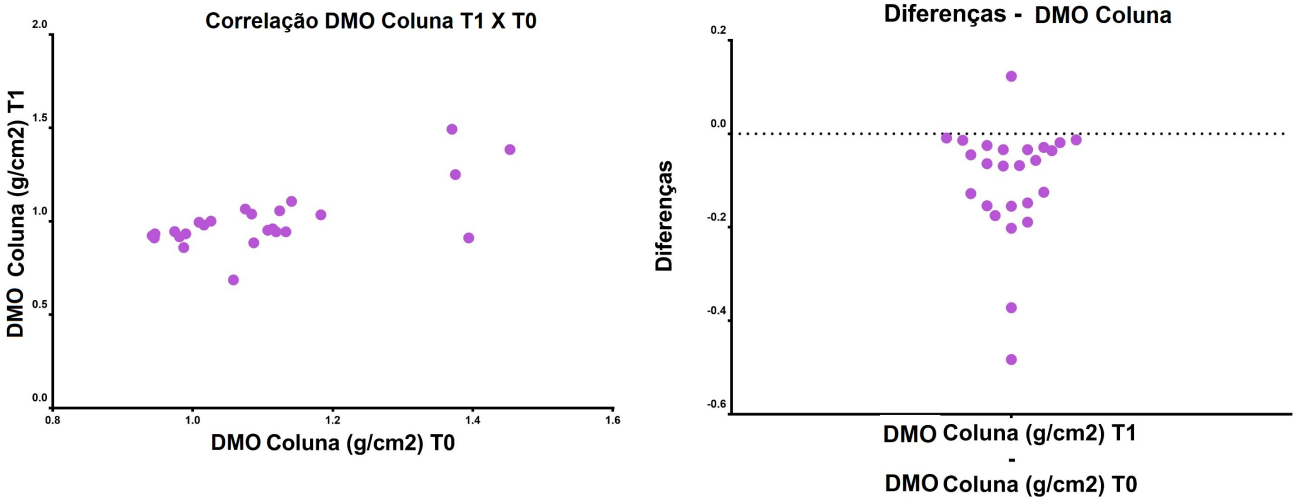
O resultado da análise do teste pareado de Wilcoxon para a variável DMO em coluna e fêmur, mostrou diferenças significativas entre os grupos em T_0 e T_1 ($p <$ 0,0001 e p = 0,0122, respectivamente). A correlação intragrupal analisada pelo coeficiente de Spearman (r_s) demonstrou significância positiva moderada (Tabela 5.4, Gráficos 5.9 e 5.10).

Tabela 5.5 – Resultado do teste pareado de Wilcoxon para os pares de variáveis de DMO, em coluna e fêmur, estudados em To e T1

DMO	Coef. Spearman (r_s)	Significância (p)
Coluna T1 – T0	0,5488	<0,0001*
Femur T1 – T0	0,5875	0,0122*

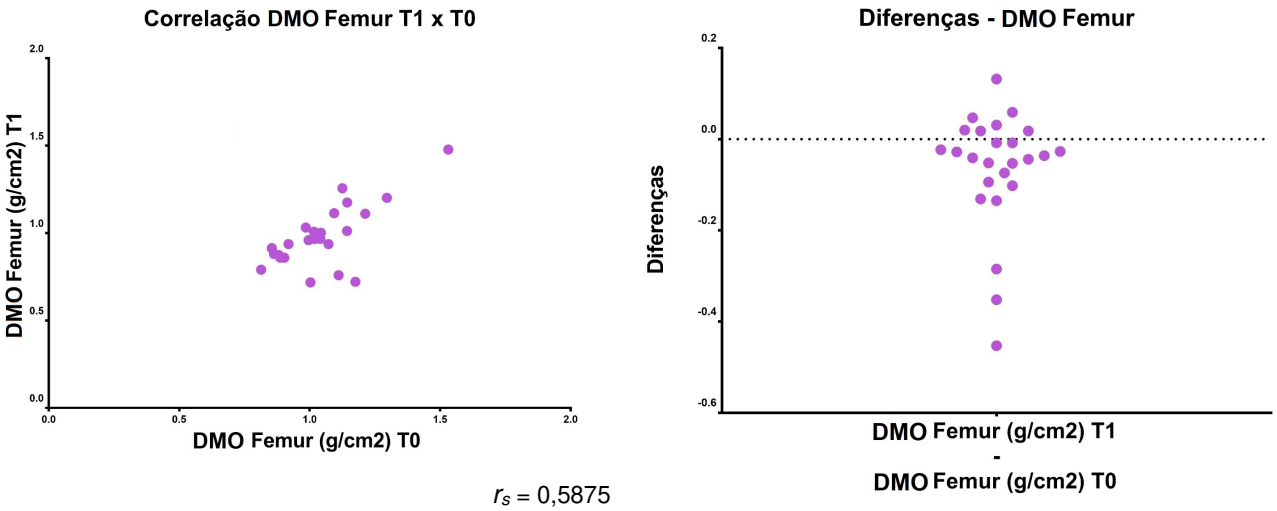
(*) valores de significância indicativos de diferenças entre os grupos, descartamos dessa forma a hipótese nula e adotamos a hipótese alternativa: há diferenças entre os grupos

Gráfico 5.10 – Gráficos de dispersão da proporção de densidade mineral óssea (DMO) da coluna, analisada em T_0 e T_1



r_s = 0,5488

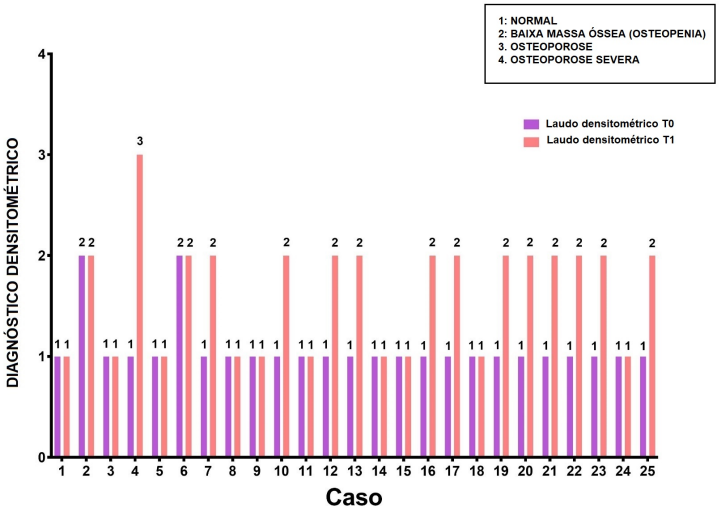
Gráfico 5.11 – Gráficos de dispersão da proporção de densidade mineral óssea (DMO) em fêmur, analisada em T_0 e T_1



r_s = 0,5875

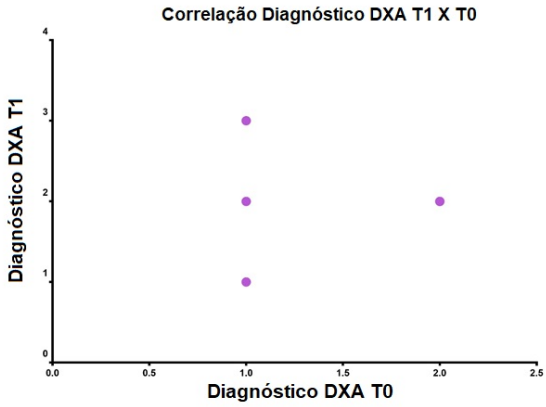
De acordo com o diagnóstico pertinente à densidade mineral óssea avaliada a partir da DXA, 92% dos 25 pacientes apresentaram um quadro de normalidade. Um ano após instituição da corticoterapia, 40% dos 25 participantes mantiveram o quadro de saúde esquelética normalizado, sendo frente a 56% que evoluíram com baixa densidade mineral óssea (osteopenia). Destes, 78,5% eram mulheres, com idade média de 43,6 anos e 21,4% eram homens, cuja média de idade era de 42,3 anos. Ademais, 4% dos participantes da pesquisa foram diagnosticados com doença osteoporótica, sendo 100% do sexo masculino, apresentando uma média de idade de 48 anos.

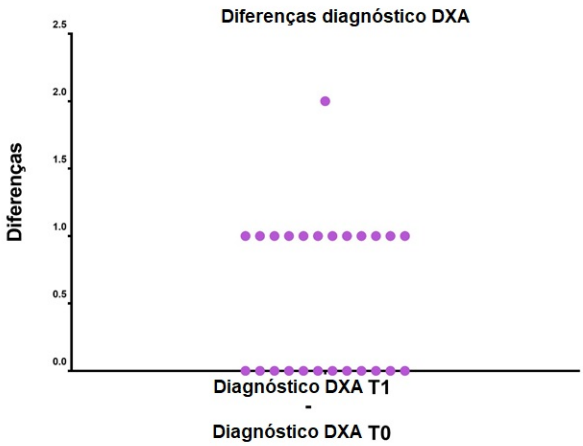
Gráfico 5.12 – Distribuição do diagnóstico densitométrico avaliado em T_0 e T_1



A partir da avaliação do teste t de Willcoxon, a análise concernente ao impacto da corticoterapia e seu reflexo na qualidade da DMO, entre os dois tempos (T_0 e T_1), apresentou significativa relevância estatística (p=0,0002); no entanto, não houve diferenças na intensidade identificada pelo coeficiente de Spearman, resultando em correlação muito baixa (r_s = 0,2109).

Gráfico 5.13 – Gráficos de dispersão do diagnóstico densitométrico, analisado em T_0 e T_1





O índice de massa corporal, calculado pela divisão do peso (kg) pela altura (m), elevada ao quadrado (kg/m²), foi aferido em todos os pacientes antes da implementação terapêutica, cuja média correspondeu a 28,17 ± 4,8. Um ano após o regime de corticoterapia (T_1), a média ascendeu a 29,32 ± 5,1 (Tabela 5.5).

Gráfico 5.14 – Distribuição do índice de massa corporal, avaliado em T_0 e T_1

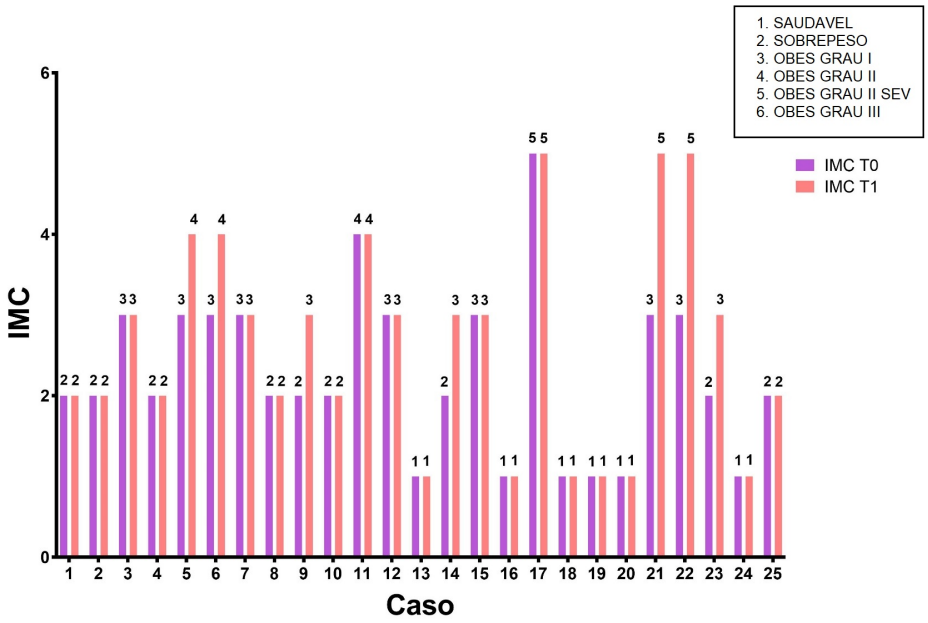


Tabela 5.6 – Distribuição dos índices de massa corporal (IMC) avaliados em T0 e T1

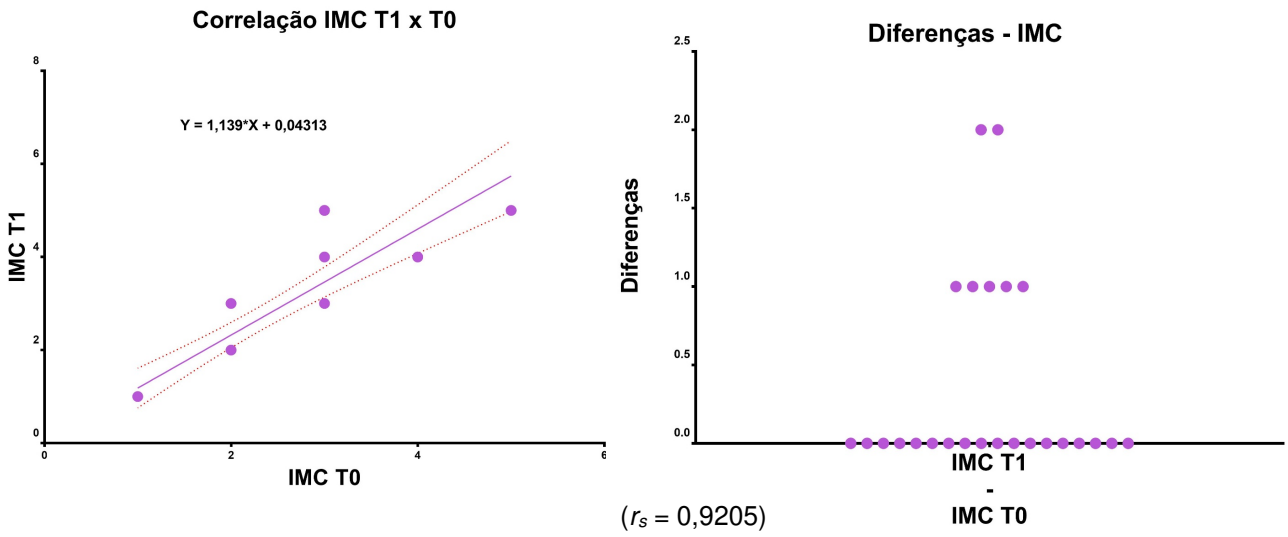
IMC	Mín. (kg/m²)	Máx. (kg/m²)	Média (kg/m²)	Desvio Padrão
T_0	18,66	36,41	28,17	4,891
T_1	20	36,48	29,32	5,182

Foram observadas diferenças significativas na variável IMC, analisada nos dois tempos (T_0 e T_1) preconizados pelo estudo (p=0,0156). O coeficiente de Spearman revelou diferença significativa em sua intensidade, o qual resultou em correlação positiva muito elevada (r_s = 0,9205).

Tabela 5.7 – Resultado do teste pareado de Wilcoxon para o par de variável IMC, estudado em T0 e T1

IMC	Coef. Spearman (r_s)	Significância (p)
T1 – T0	0,9205*	0,0156*

Gráfico 5.15 – Gráficos de dispersão do índice de massa corporal (IMC), analisado em T_0 e T_1

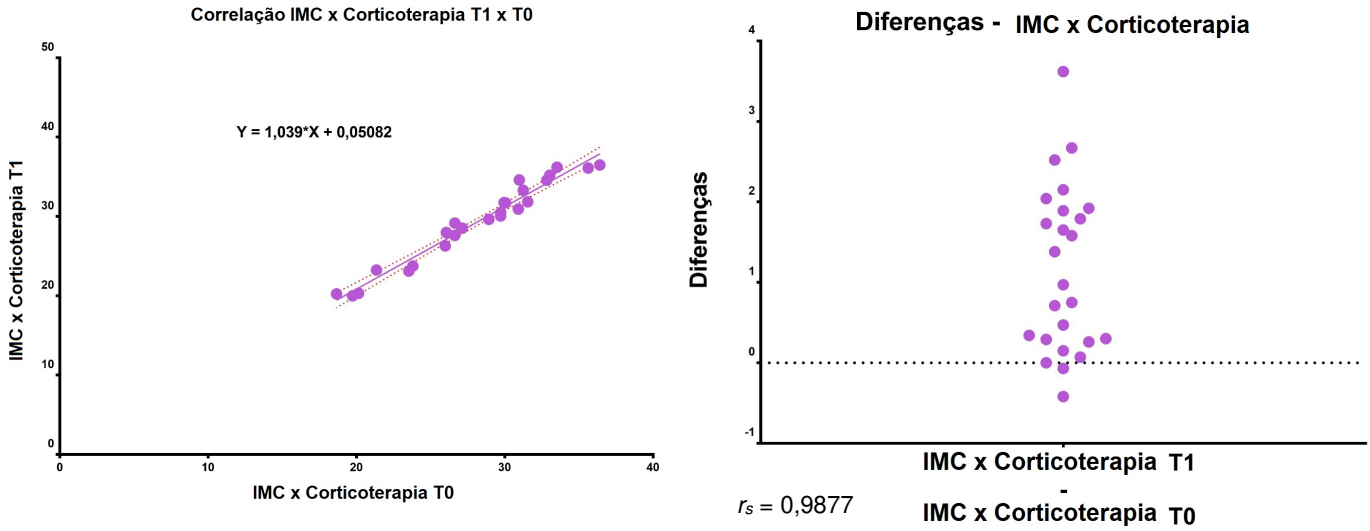


Fora realizado a análise de correlação entre o impacto da corticoterapia e seu reflexo no índice de massa corpórea, o qual apresentou diferença na intensidade identificada pelo coeficiente de Spearman, resultando em correlação muito forte entre as variáveis (r_s = 0,9877).

Tabela 5.8 – Resultado do teste pareado de Wilcoxon para o par de variável IMC x Corticoterapia, estudado em To e T1

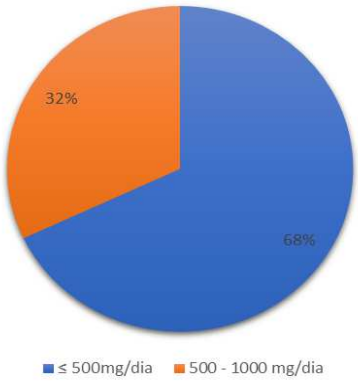
IMC x Corticoterapia	Coef. Spearman (r_s)	Significância (*p*)
T1 – T0	0,9877*	<0,0001*

Gráfico 5.16 – Gráficos de dispersão do índice de massa corporal (IMC) x Corticoterapia analisado em T_0 e T_1



Após 1 ano de regime de corticoterapia, fora avaliado a quantidade do consumo de cálcio proveniente da dieta nos participantes do estudo. Foram divididos 3 grupos, sendo o primeiro a ingestão diária de até 500mg/dia; o segundo, de 500 – 1000 mg/dia; e, por último, o consumo acima de 1000 mg/dia. Em T_1, 32% dos pacientes consumiam até 500 mg/dia, e 68% ingeriam entre 500 – 1000 mg/dia.

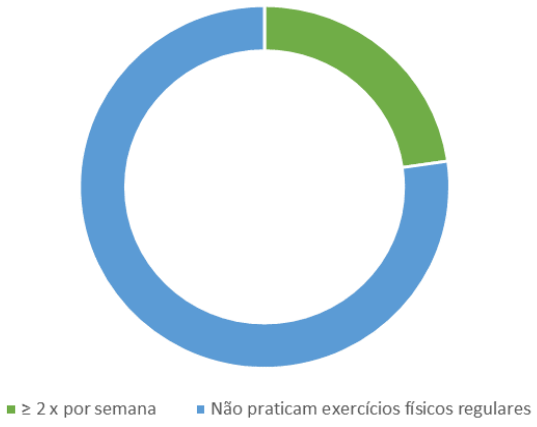
Gráfico 5.17 – Distribuição do consumo alimentar diário de cálcio, em T_1



Cem por cento (100%) dos pacientes confirmaram fazer complementação diária com carbonato de cálcio 500 mg, prescrito pelo dermatologista responsável, desde o início da corticoterapia. O mesmo correspondeu à suplementação vitamínica com colecalciferol 1.000 UI/dia, onde 100% dos pacientes relataram ingerir diariamente, segundo as recomendações médicas.

Quanto à realização de exercícios físicos, somente vinte por cento (20%) dos participantes da pesquisa relataram regularidade na prática de exercícios físicos, desde o início do tratamento até a avaliação realizada, em T_1.

Gráfico 5.18 – Distribuição da prática de exercícios físicos entre os participantes da pesquisas, em T_1



5.3 Índice mandibular cortical (IMCo)

A avaliação de concordância inter-observador para o índice mandibular cortical correspondeu ao valor de Kappa = 0,978 ($p<0,001$), com apenas 1 discordância entre as medidas examinadas, refletindo em concordância quase perfeita.

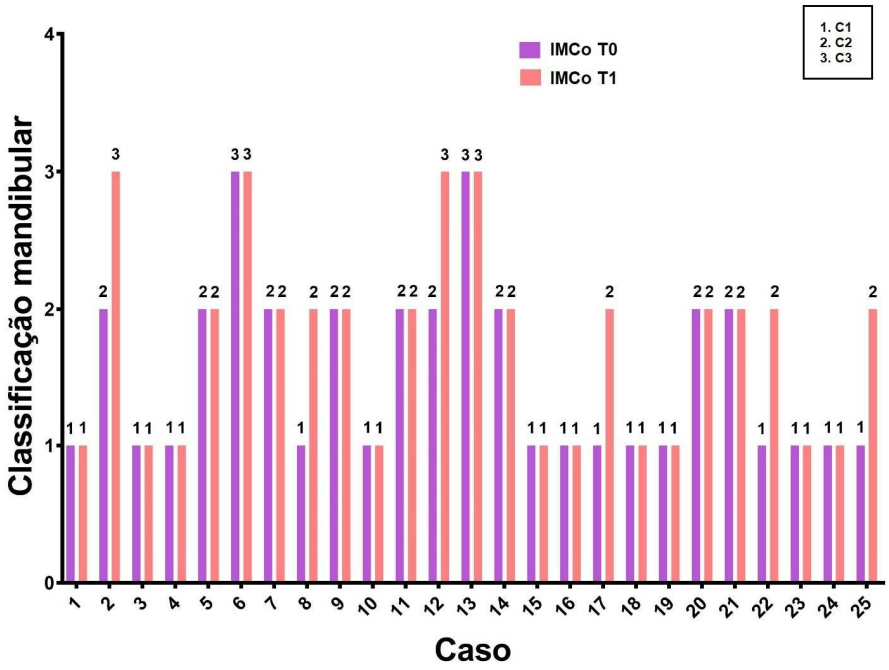
A avaliação do índice mandibular cortical (IMCo) foi aferida, a partir de radiografias panorâmicas, em T_0 e T_1, de acordo com a classificação de Klemetti et al. (1994). Antes da instituição da corticoterapia, 56% dos pacientes apresentaram a cortical mandibular correspondente a C1, compreendendo 42,8% indivíduos do sexo feminino com idade média em 39,3 anos, e 57,1% do sexo masculino, cuja média de idade correspondeu a 38,3 anos. Trinta e seis por cento dos indivíduos foram classificados em C2, dentre os quais, 77,7% eram mulheres, e 22,2% homens, cujas médias de idade eram de 46 e 38,5 anos, respectivamente. Já 8% dos pacientes apresentavam alterações avançadas, compatíveis com C3, sendo 100% mulheres, com idade média de 48,5 anos.

Um ano após submissão ao regime medicamentoso, o número de pacientes cujo IMCo era correspondente a C1 foi reduzido a 40%, sendo 40% mulheres, com média de idade de 36,5 anos; e 60% homens, cuja média de idade era de 37,1 anos. Houve um aumento para 44% daqueles avaliados em C2, dos quais 72,2% eram mulheres, com média de idade de 45,7 anos, e 27,2% de homens, com média de idade de 37,1 anos. Ainda em T1, 16% dos pacientes foram avaliados em C3, sendo 75% mulheres, e 25% homens, apresentando a média de idade em 47,6 e 40 anos, respectivamente.

Tabela 5.9 – Classificação da amostra quanto ao índice mandibular cortical e distribuição de sexo, em To e T1

IMCo T_0	**T_0** (%, n)	**Mulheres T_0** (%, n)	**Homens T_0** (%, n)	**IMCo**	**T1** (%, n)	**Mulheres T_1** (%, n)	**Homens T_1** (%, n)
C1	56 (14)	42,8 (6)	57,1 (8)	**C1**	40 (10)	60 (6)	40 (4)
C2	36 (9)	77,7 (7)	22,2 (2)	**C2**	44 (11)	72,2 (8)	27,2 (3)
C3	8 (2)	100 (2)	-	**C3**	16 (4)	75 (3)	25 (1)

Gráfico 5.19 – Distribuição do índice de mandibular cortical, avaliado em T_0 e T_1



Houve diferença em IMCo, quando avaliada nos dois tempos distintos do estudo, verificada na intensidade identificada pelo coeficiente de Spearman, resultando em correlação forte entre as variáveis (r_s = 0,7952).

Gráfico 5.20 – Gráficos de dispersão do índice mandibular cortical (IMCo), analisado em T_0 e T_1

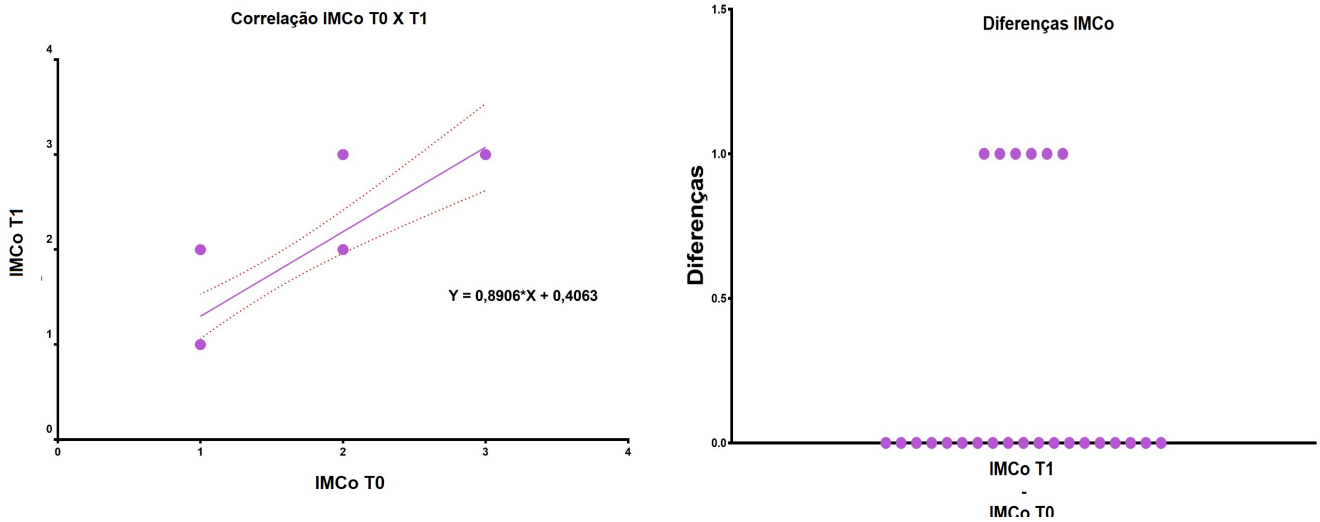


Tabela 5.10 – Resultado do teste pareado de Wilcoxon para o índice mandibular cortical, avaliado em T_0 e T_1

IMCo	Coef. Spearman (r_s)	Significância (*p*)
T1 – T0	0,7952*	<0,0001*

(*) valores de significância indicativos de diferenças entre os grupos,

Foi verificada a correlação entre as variáveis idade, sexo, T-*score* e o índice mandibular cortical, nos 2 tempos instituídos pela pesquisa, pelo coeficiente de Spearman (r_s). Em T_0, observou-se valores de significância e correlação positiva entre "sexo x IMCo", assim como "IMCo X Classificação densitométrica". Em T1, "Idade x IMCo" também apresentou significância e correlação. No entanto, apesar dos valores de significância para as correlações, os valores do coeficiente de Spearman mostram, em módulo, correlações moderadas ($0,4 < r \leq 0,69$). Demais correlações entre as variáveis foram baixas ou fracas, conforme demonstrado na tabela 5.9.

Tabela 5.11 – Resultado da correlação entre IMCo e demais variáveis, em T_0 e T_1

Variáveis	Coef. Spearman (95% IC)	Significância (p)
IMCo T0 x Idade	0,3946 (-0,01302 a 0,6897)	0,0510
IMCo T1 x Idade	0,4262 (0,02505 a 0,7092)	0,0336*
IMCo T0 x Sexo	0,4107 (-0,6997 a -0,006188)	0,0414*
IMCo T1 x Sexo	-0,3135 (-0,6379 a 0,1054)	0,1270
IMCo T0 x Laudo DXA T0	0,4055 (4,841e-005 a 0,6965)	0,0443*
IMCo T1 x Laudo DXA T1	0,2046 (-0,2191 a 0,5634)	0,3266
IMCo T0 x IMC T0	0,1796 (-0,2437 a 0,5453)	0,3905
IMCo T1 x IMC T1	0,3429 (-0,07276 a 0,657)	0,0934

(*) valores de significância indicativos de diferenças entre os grupos
IC – intervalo de confiança

Gráfico 5.21 – Dispersão do índice mandibular cortical (IMCo) e correlação entre idade e sexo

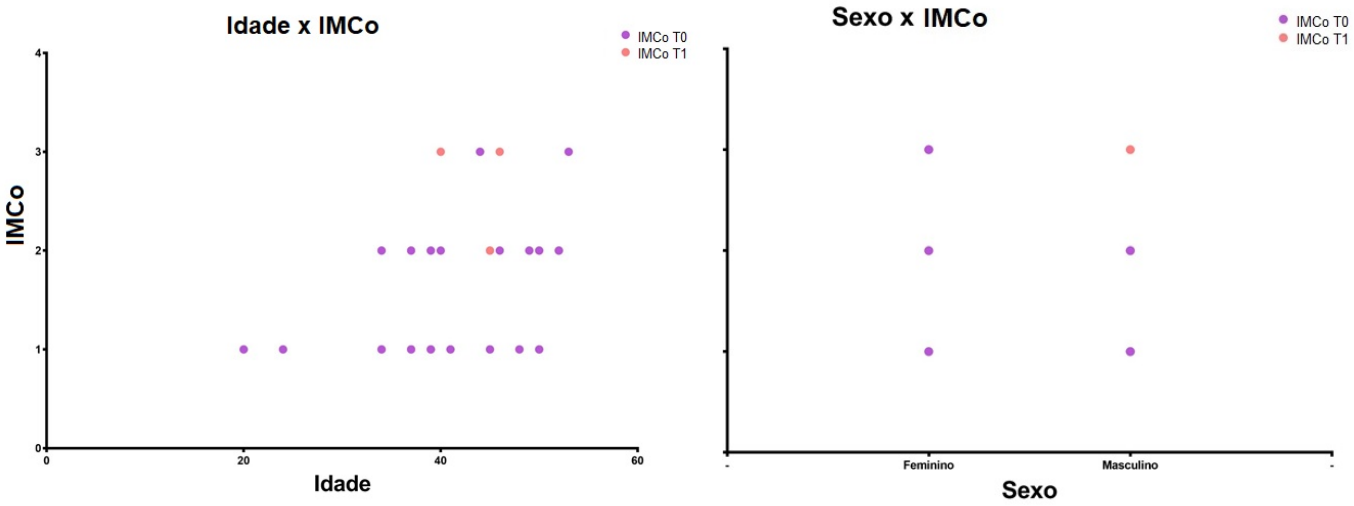
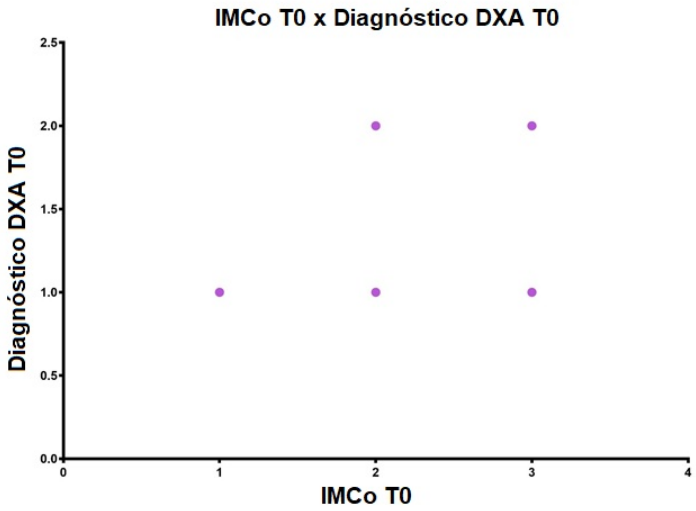


Gráfico 5.22 – Dispersão do índice mandibular cortical (IMCo) e correlação entre diagnóstico densitométrico, em T_0



Foi avaliado a quantidade de dentes ausentes em todos os pacientes diagnosticados com acometimento oral de pênfigo vulgar, participantes do estudo. Em T_0, observou-se uma média de 10,96 ± 10,27 dentes perdidos. Um ano após o regime medicamentoso, o valor médio compreendeu 11,81 ± 11,34 dentes perdidos.

Tabela 5.12 – Distribuição de ausências dentárias avaliadas em To e T1

Ausência dentária	Mín.	Máx.	Média	Desvio Padrão
T_0	0	32	10,96	10,27
T_1	0	32	11,81	11,34

Pacientes diagnosticados de acordo com classificação densitométrica normal apresentaram uma média de 9,3 dentes perdidos. Em indivíduos com baixa massa óssea (osteopenia), observou um aumento para 11,4 dentes perdidos. Aqueles diagnosticados com osteoporose, apresentaram uma média de 5 dentes perdidos.

5.4 Biomarcadores ósseos

Os níveis de cada biomarcador ósseo estudado no presente trabalho foram igualmente avaliados, por sua expressão salivar, entre o grupo estudado e em indivíduos saudáveis.

Por não aderir à curva de normalidade, a análise da correlação da expressão salivar entre o grupo de estudo e o grupo controle saudável, assim como da expressão sérica no grupo de estudo, foi realizada a partir da aplicação do teste não-paramétrico de U-Mann Whitney, frente à análise de amostras independentes.

Tabela 5.13 – Distribuição dos níveis salivares dos biomarcadores (valor mínimo, máximo, média ± desvio-padrão) presentes nas amostras dos dois grupos avaliados

Expressão salivar	Mín. (pg/mL)	Máx. (pg/mL)	Média (pg/mL)	Desvio Padrão
Paciente - Col1A1 (BR18)	14,35	3415	569,6	712,4
Controle - Col1A1 (BR18) pg/mL	27,48	1213	469,3	357,2
Paciente - Osteoprotegerina (BR27) pg/mL	46,92	1208	240,6	252
Controle - Osteoprotegerina (BR27) pg/mL	11,45	445	87,4	109,8
Paciente - Vitamina D BP (BR38) pg/mL	7453	3988518	278377	802865
Controle - Vitamina D BP (BR38) pg/mL	5201	355381	55079	88151
Paciente - TRANCE/RANK L (BR48) pg/mL	9,01	33,63	14,18	5,59
Controle - TRANCE/RANK L (BR48) pg/mL	2,97	28,1	7,96	5,60
Paciente - Osteopontina (BR54) pg/mL	819	13429	3631	2836
Controle - Osteopontina (BR54) pg/mL	1960	22043	6295	6437

Tabela 5.14 - Resultado do teste U-Mann Whitney para avaliação da expressão salivar entre o grupo de estudo e grupo controle

Expressão salivar (Grupo estudo x Controle)	Mann-Whitney U	Significância (p)
Col1A1	305	0,8891
Osteoprotegerina	102	<0,0001*
Vitamina D BP	199	0,0274*
TRANCE/RANK L	61	<0,0001*
Osteopontina	240	0,1622

(*) valores de significância indicativos de diferenças entre os grupos

Após análise comparativa inter-grupos da expressão salivar dos biomarcadores ósseos, foi observada diferença estatística para os marcadores Osteoprotegerina (p <0,0001), Vitamina D BP (p = 0,0274) e TRANCE/RANK L (p <0,0001).

Gráfico 5.23 – Dispersão das concentrações salivares de Col1A1 e Osteoprotegerina avaliadas entre os dois grupos estudados

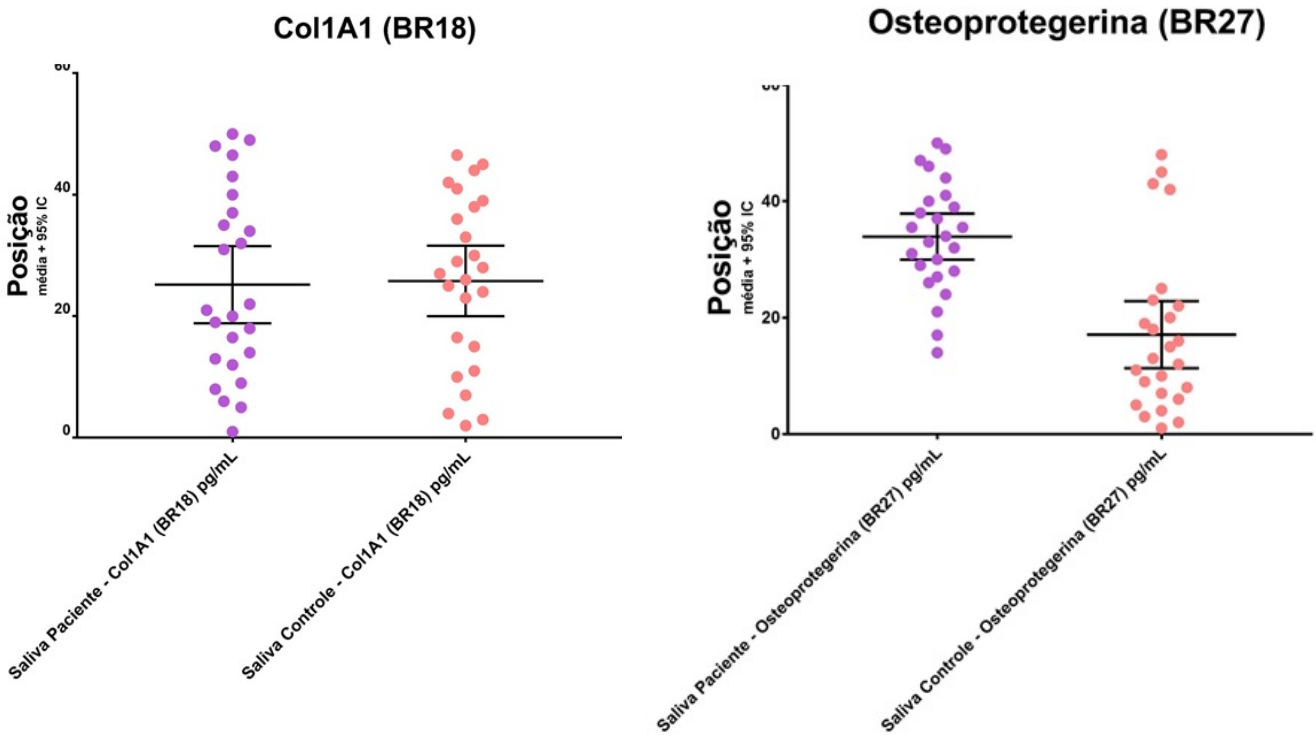


Gráfico 5.24 – Dispersão das concentrações salivares de Vitamina D e RANK-L avaliadas entre os dois grupos estudados

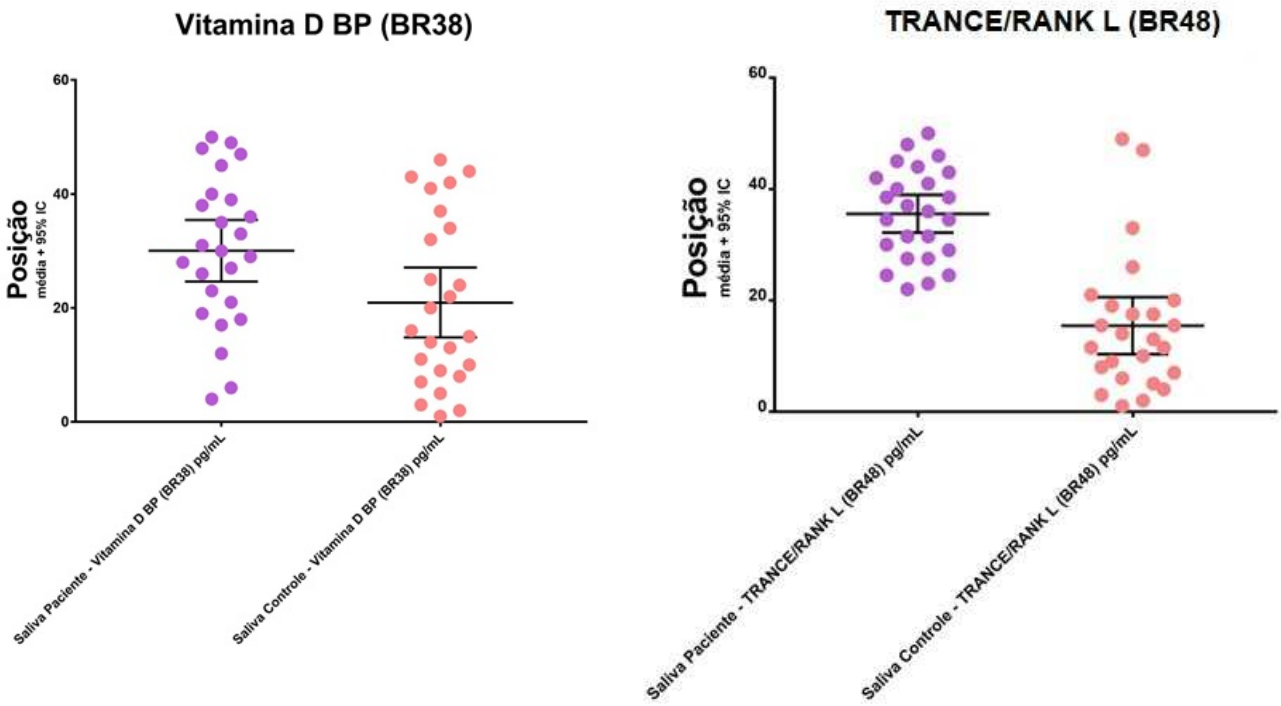
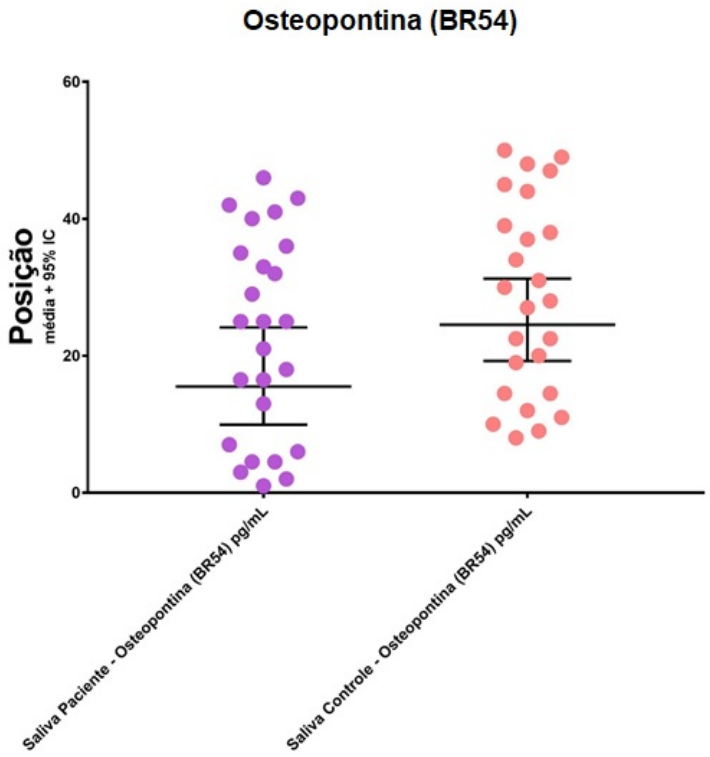


Gráfico 5.25 – Dispersão da concentração salivar de Osteopontina avaliada entre os dois grupos estudados



Adicionalmente, os níveis dos cinco biomarcadores relacionados ao *turnover* ósseo foram avaliados, por sua expressão sérica, no grupo dos participantes da pesquisa (análise intragrupal - doentes), sendo investigado sua correlação à expressão salivar.

Tabela 5.15 – Distribuição dos níveis séricos dos biomarcadores (valor mínimo, máximo, média ± desvio-padrão) presentes nas amostras do grupo de estudo

Expressão sérica (grupo de estudo)	Mín. (pg/mL)	Máx. (pg/mL)	Média (pg/mL)	Desvio Padrão
Col1A1 (BR18)	2971	11605	6700	2485
Osteoprotegerina (BR27)	389	1626	807,1	397
Vitamina D BP (BR38)	1035231	6895425	2817640	1574785
TRANCE/RANK L (BR48)	4,81	27,68	13,62	5,04
Osteopontina (BR54)	3852	85621	29595	23707

Tabela 5.16 - Resultado do teste U-Mann Whitney para correlação entre a expressão salivar e sérica dos biomarcadores no grupo de estudo

Expressão salivar (Grupo estudo x Controle)	Mann-Whitney U	Significância (p)
Col1A1	1	<0,0001*
Osteoprotegerina	24	<0,0001*
Vitamina D BP	14	<0,0001*
TRANCE/RANK L	197	0,9421
Osteopontina	13	<0,0001*

(*) valores de significância indicativos de diferenças entre os grupos

Após análise comparativa intra-grupo da expressão salivar e sérica dos biomarcadores ósseos, foi observada diferença estatística significativa em todos os marcadores, com exceção ao TRANCE/RANK L (*p* <0,9421).

Gráfico 5.26 – Dispersão da concentração salivar e sérica de Colágeno I e Osteoprotegerina avaliada no grupo de estudo

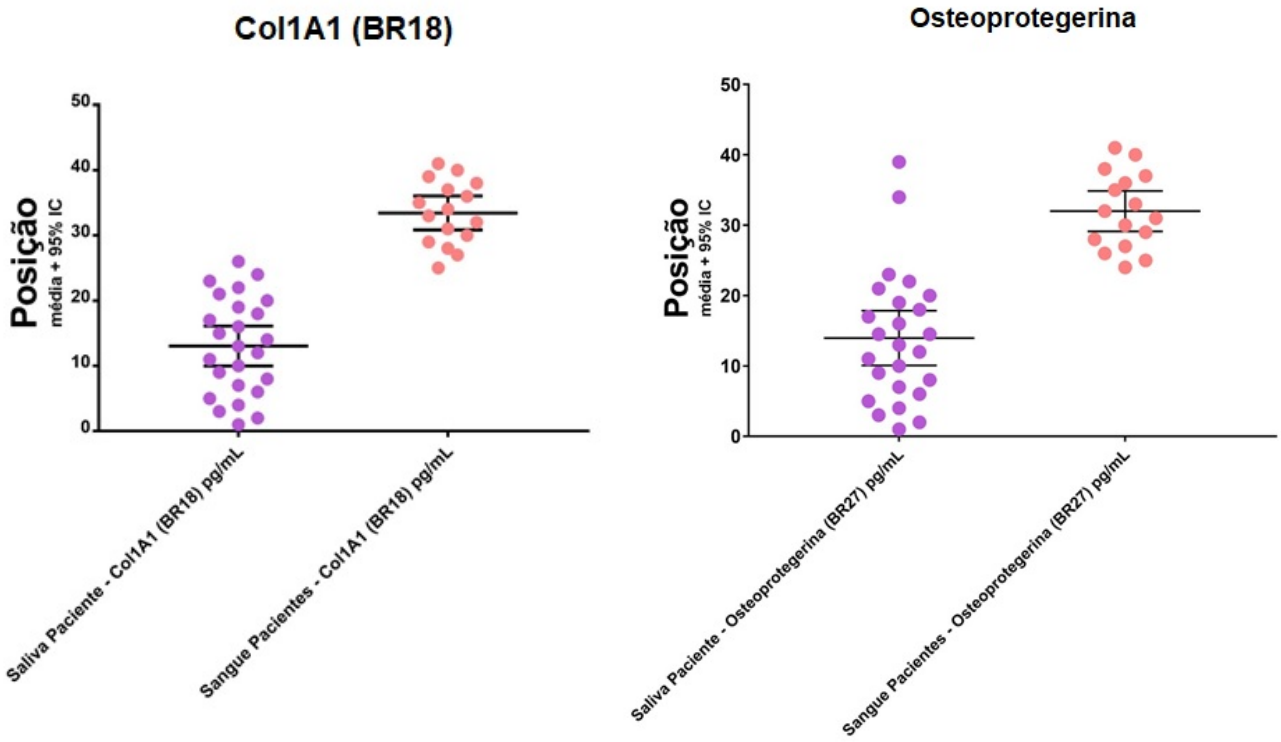


Gráfico 5.27 – Dispersão da concentração salivar e sérica de Vitamina D e RANK-L avaliada no grupo de estudo

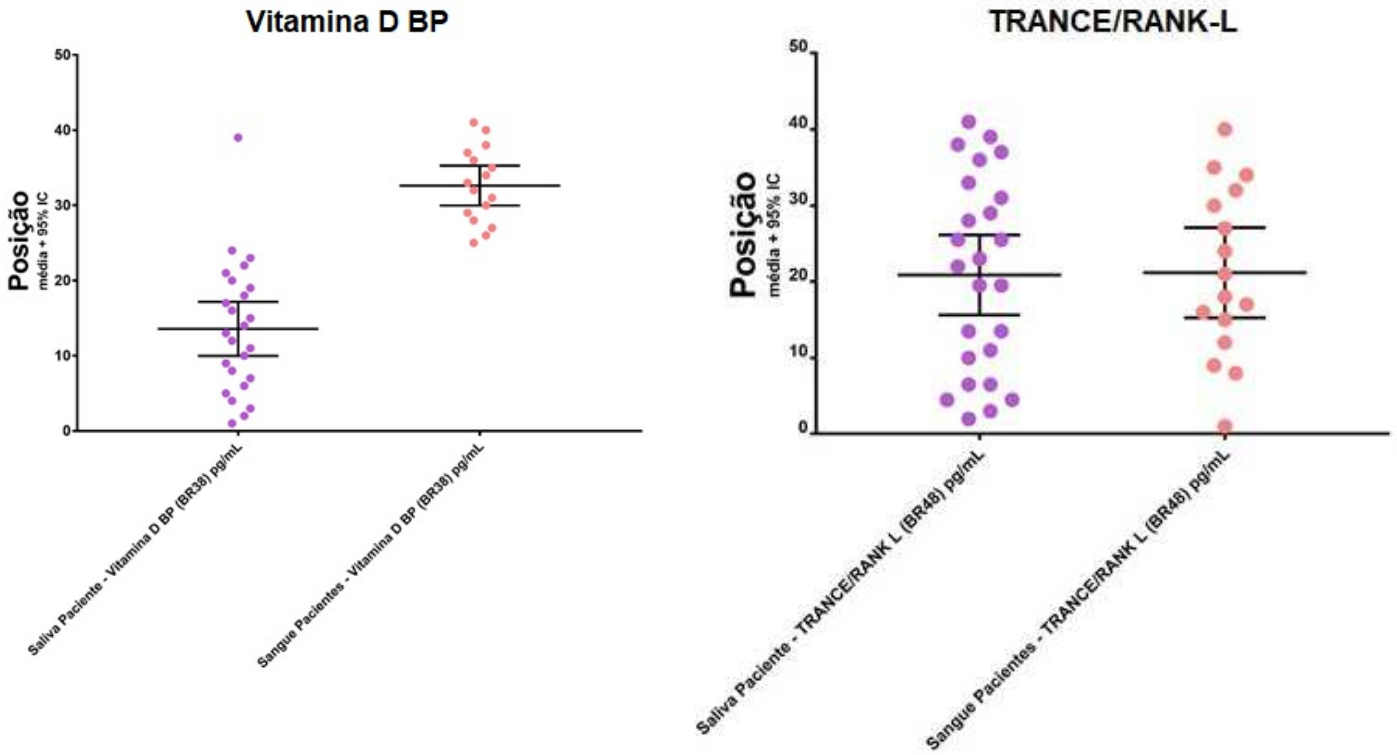
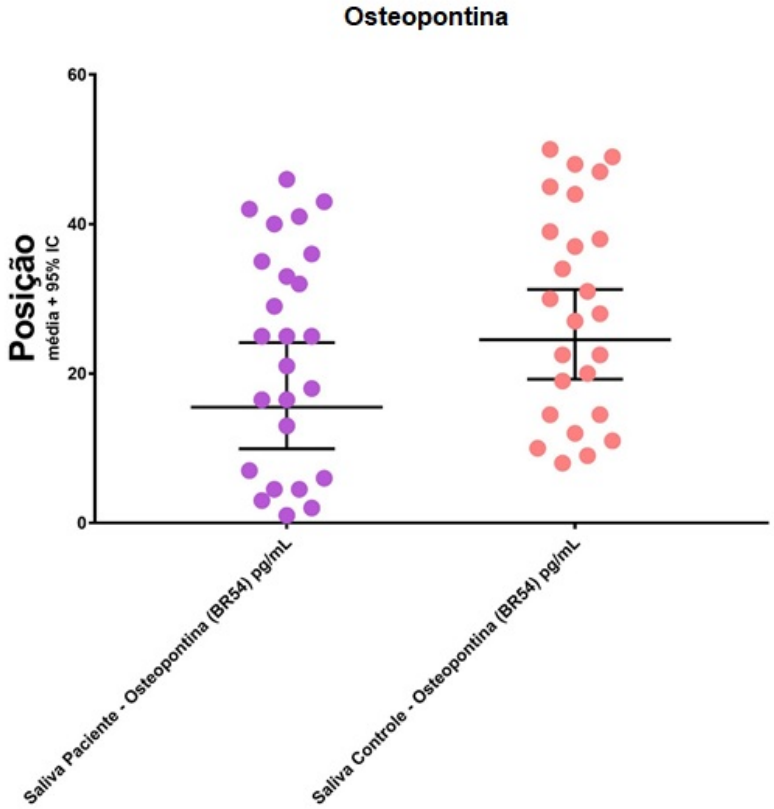


Gráfico 5.28 – Dispersão da concentração salivar e sérica de Osteopontina avaliada no grupo de estudo



6 DISCUSSÃO

Análises imaginológicas

O presente estudo avaliou o impacto da corticoterapia prolongada sobre a arquitetura óssea em pacientes suscetíveis ao desenvolvimento de osteoporose medicamentosa (osteoporose induzida por glicocorticoides, OPIG). Em diferentes panoramas e em dois tempos distintos, pôde-se verificar os efeitos deletérios deste regime medicamentoso, detectados a partir do exame considerado padrão-ouro - densitometria óssea por absorciometria por dupla emissão de raio X (DXA) - e por técnicas ainda não preconizadas para a OPIG, como a análise salivar de biomarcadores que refletem o metabolismo ósseo, e pelo estudo de um índice radiomorfométrico qualitativo em radiografias panorâmicas de mandíbula, mostrando-se favoráveis à complementação diagnóstica desta desordem.

Buscou-se instituir um modelo de pesquisa que envolvesse pacientes de risco ao desenvolvimento da OPIG, sendo uma das maiores dificuldades à de estabelecer indivíduos que se enquadrassem exclusivamente aos parâmetros determinados no estudo. Frente à gama diversa de doenças que pode induzir alterações diretas e/ou indiretas no metabolismo ósseo e, consequentemente, osteoporose secundária (Grando, 2011; Ghodsi et al., 2014; Hsu; Nanes, 2017), optamos por avaliar e utilizar, como modelo concernente à OPIG, um grupo específico de doença autoimune, cuja manifestação oral torna-se de exímia relevância aos profissionais da Odontologia: o pênfigo vulgar. Muitos dos pacientes pré-selecionados apresentavam comorbidades concomitantes à doença (Diabetes mellitus, distúrbios hormonais, depressão, etc), tal como faziam uso de medicações diversas (antihipertensivos, diuréticos, antidepressivos, etc.), dificultando a quantidade e homogeneização da amostra. A partir da seleção e instituição dos critérios inclusivos, foi definido uma amostra de 25 doentes.

No decorrer das duas últimas décadas, diversos estudos buscaram avaliar ferramentas auxiliares à diagnose da osteoporose primária, assim como sua relação

causa-efeito (Taguchi et al., 2003; Raisz, 2005; Painter et al, 2006; Watanabe, 2009; Kanis et al., 2012; Valerio et al., 2013; Pavicin et al., 2014; Pisani et al., 2016; Sözen et al, 2017). No entanto, ao que tange à tipologia secundária, e mais especificamente, ao subtipo preconizado neste estudo (OPIG), não encontramos pesquisas concernentes à metodologia realizada disponíveis na literatura científica, provavelmete tornando este estudo um dos poucos ou o primeiro a conduzí-lo.

Na presente investigação, observamos diferenças estatisticamente significantes em relação aos dados densitométricos de pacientes submetidos à corticoterapia prolongada. Previamente à instituição da terapia medicamentosa, fora evidenciado os valores médios de T-*score* vertebral -0,1 ± 1,1 g/cm^2, e T-*score* femoral de 0,3 ± 1,0 g/cm^2. Após 1 ano de uso crônico, foi verificado uma redução estatisticamente significante para -0,8 ± 1,2 g/cm^2 e 0,0 ± 1,2 g/cm^2, respectivamente (p=0,0003 – T-score vertebral; p=0,0240 – T-*score* femoral), apesar da correlação intragrupal positiva classificada como moderada entre T-score vertebral (r_s = 0,5057) e T-*score* femoral (r_s = 0,6298).

Redução semelhante e estatisticamente relevante foi observada na densidade mineral óssea na coluna, onde o valor médio da DMO vertebral prévio à instituição medicamentosa (T_0) compreendeu 1,105 ± 0,1473 g/cm^2; enquanto que, em T_1, houve uma redução para 1,004 ± 0,1655 g/cm^2 (p<0,0001). Para a DMO femoral, os participantes da pesquisa apresentaram um valor médio de 1,046 ± 0,1578 g/cm^2 , no início da terapia. Em T_1, a média fora reduzida para 0,9814 ± 0,1745 g/cm^2 (p=0,0122). A correlação intragrupal mostrou-se positiva e classificada como moderada (r_s = 0,5488; r_s = 0,5875), com o valor de significância compreendendo p < 0,0001 e p = 0,0122, respectivamente. A redução dos valores da densidade mineral óssea destes pacientes submetidos à corticoterapia vai ao encontro aos achados de LoCascio et al. (1990) e Van Staa et al. (2003), que afirmaram o declínio substancial da DMO, induzido pela cronicidade dessa classe medicamentosa.

Os parâmetros densitométricos avaliados nesta investigação revelaram que, um ano após instituição prolongada da corticoterapia, somente 40% dos participantes mantiveram o quadro de saúde esquelética considerado normal, de

acordo com as diretrizes preconizadas pela OMS (Kanis et al, 2012), enquanto que mais da metade (56%) apresentou redução da densidade mineral óssea (osteopenia) - dentre estes, 78,5% mulheres, com idade média de 43,6 anos e 21,4% homens, cuja média de idade correspondeu a 42,3 anos. Adicionalmente, 4% dos participantes da pesquisa foram diagnosticados com doença osteoporótica, sendo 100% do sexo masculino, apresentando uma média de idade de 48 anos.

A avaliação do impacto da corticoterapia e o risco de desenvolvimento de osteoporose secundária resultou em significativa relevância estatística (p=0,0002); no entanto, sua relação, determinada pelo coeficiente de Spearman, revelou-se baixa (r_s = 0,2109). Uma das justificativas para a baixa incidência de osteoporose induzida por glicocorticoides nesta amostra possivelmente seja resultante da implementação de medidas preventivas, adotadas desde o início do tratamento, como a suplementação diária com colecalciferol 1.000UI e carbonato de cálcio, onde 100% dos pacientes reportaram regularidade criteriosa em sua ingestão, a partir de dados coletados em T_1, exclusivamente. Os estudos pertinentes aos efeitos do cálcio e/ou suplementação com vitamina D em pacientes sob o regime de corticoesteroides apontaram resultados conflitantes em amostras de doenças diferentes à da presente investigação (Buckley et al., 1996; Adachi et al., 1996), dificultando as comparações. No entanto, tais suplementações foram incluídas na maioria dos ensaios concernentes à terapia óssea preventiva sendo, portanto, indicados como coadjuvantes na prevenção dos efeitos deletérios provenientes da medicação esteroidal (Compston, 2018).

Até a conclusão da presente investigação, nenhum dos pacientes apresentou fratura óssea, ou reportou histórico prévio de fraturas. No entanto, não foi possível calcular o risco de fraturas, a partir da aplicação da ferramenta FRAX® (Fracture Risk Assessement Tool), devido à abrangência de idade dos participantes da pesquisa - a qual variou entre 20 e 53 anos de idade (média 41,56 ± 8,51). A ferramenta FRAX® consiste em um algoritmo computacional disponível gratuitamente na Internet, que calcula a probabilidade, em 10 anos, do risco de fratura osteoporótica, baseando-se em uma série de estudos internacionais prospectivos do tipo coorte. A probabilidade de fratura é calculada a partir da obtenção de dados clínicos (idade, sexo, peso, altura, índice de massa corporal), em um questionário, associada a informações

pertinentes a fatores clínicos de risco, como histórico prévio de fraturas do paciente e de seus progenitores, corticoterapia (doses ≥ 5 mg/dia de prednisona ou equivalente, por período ≥ 3 meses), tabagismo, consumo excessivo de álcool (≥ 3 doses diárias), artrite reumatoide e demais causas de osteoporose secundária (Compston, 2015). A ferramenta é utilizada, majoritariamente, no manejo de mulheres menopausadas e homens com idade ≥ 50 anos de idade. Para indivíduos mais jovens, as evidências ainda são escassas. A partir de diretrizes pronunciadas em estudos internacionais, orienta-se que as decisões de intervenção e tratamento preventivo à fratura, nesta população, sejam baseadas em julgamento clínico individual (Lekamwasam et al., 2012; Compston, 2018).

A ausência de fraturas osteoporóticas nos pacientes da presente investigação condiz com os achados relatados na maior parte da literatura, os quais revelam uma baixa incidência de fraturas em mulheres em idade pré-menopausa, avaliadas em ensaios clínicos randomizados de OPIG, onde esta população apresentou valores mais expressivos da DMO, quando comparadas às mulheres menopausadas (Saag et al., 1998; Cohen et al., 1999; Wallach et al., 2000; Langdahl et al., 2009; Rizzoli; Biver, 2015). Não obstante, a incidência possa abranger índices de até 75% (Van Staa et al., 2003). Tais observações reforçam a primordialidade de cuidados e implementações preventivas nesta população, visto que fraturas podem ocorrer, mesmo na presença de valores normais de DMO, resultantes da série de alterações na qualidade da arquitetura óssea, nem sempre detectadas em técnicas densitométricas (Hansen et al., 2014; Compston, 2018).

O manejo de pacientes em uso crônico de glicocorticoides ainda reflete uma realidade preocupante, frente ao subtratamento preventivo proporcionado a pacientes com idades mais jovens e em indivíduos do sexo masculino - sobretudo à realizada na atenção primária. Em um estudo francês, Trijau et al. (2016) revelaram, a partir de dados nacionais, que apenas 8% destes grupos de pacientes eram submetidos a avaliações densitométricas, assim como taxas alarmantes de subprescrição de suplementos de cálcio + vitamina D para apenas 18%, e bisfosfonatos, a 12%.

A abordagem terapêutica com bisfosfonatos em pacientes diagnosticados com OPIG ainda representa um desafio à classe médica, frente à quantidade reduzida de estudos, quando comparados àqueles pertinentes à osteoporose primária. Em virtude à presença de comorbidades e ao uso de outras medicações concomitantes, os indivíduos sob regime crônico de corticoterapia podem ser mais suscetíveis a efeitos adversos secundários (ex: desordens do trato gastrointestinal superior). Ademais, evidências recentes demonstraram associação do uso crônico de glicocorticoides ao risco de desenvolvimento de osteonecrose dos ossos maxilares (Khan et al., 2017), restringindo, substancialmente, as medidas terapêuticas profiláticas à ocorrência de fratura em boa parte deste grupo populacional, uma vez que bisfosfonatos são contra-indicados em mulheres em idade fértil ou lactantes, devido à capacidade da medicação transpor a barreira placentária (Compston, 2018),

A obesidade corresponde a um dos diversos efeitos adversos resultantes do regime prolongado com corticoesteroides (Cooper et al., 2015; Carter, 2018), fortemente pronunciada nos resultados deste estudo. Antes da implementação terapêutica, a média do IMC dos pacientes correspondeu a 28,17 ± 4,8; um ano após a corticoterapia (T_1), a média ascendeu a 29,32 ± 5,1, sendo observadas diferenças significativas entre os dois tempos (T_0 e T_1) (p=0,0156). O coeficiente de Spearman revelou diferença significativa em sua intensidade, o qual resultou em correlação positiva muito elevada (r_s = 0,9205).

O impacto da corticoterapia prolongada refletiu significativamente no índice de massa corpórea dos indivíduos participantes, o qual apresentou associação muito forte entre as duas variáveis (r_s = 0,9877). Ademais, o sedentarismo, nesta população, revelou-se elevado (80%). Hsu et al. (2017) demonstraram relação positiva entre pênfigo vulgar e corticoterapia ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2, hipertensão, osteoporose e insônia. Frente aos múltiplos efeitos colaterais advindos do regime medicamentoso com corticoesteroides, como o impacto sobre o funcionamento da insulina, aumento da incidência de diabetes mellitus, gordura corporal e retenção hídrica (Cooper et al., 2015; Carter, 2018), intensifica-se a imprescindibilidade de medidas educacionais, sobretudo, nutricionais

e acompanhamento médico multidisciplinar concomitante a esses pacientes, durante a vigência do tratamento.

A literatura científica apresenta múltiplos estudos envolvendo metodologias com índices radiomorfométricos mandibulares diversos, conduzidas em modelos de osteoporose primária; no entanto, estes mostram-se inexistentes, no que concerne à osteoporose secundária, sobretudo, induzida por glicocorticoides. A partir da aferição do IMCo em radiografias panorâmicas dos participantes na presente investigação, pôde-se observar diferença estatisticamente significante ($p<0,0001$), entre os dois tempos avaliados (T_0 e T_1), e uma forte correlação entre si, aferida pelo coeficiente de Spearman (r_s=0,7952), evidenciando a aplicabilidade positiva da radiografia panorâmica de mandíbula, na investigação de alterações ósseas, em pacientes submetidos ao regime prolongado de corticoterapia. Quando comparado a demais variáveis clínicas, observou-se correlação positiva entre o IMCo e a classificação densitométrica (de acordo com à instituída pela OMS) em T_0 (p=0,0443) e, em T_1 (p=0,3266). Desta forma, as alterações ósseas detectadas na radiografia panorâmica dos pacientes deste estudo, mostraram-se associadas aos resultados dos exames densitométricos, tal como sugerindo seu papel como indicador de modificações da densidade mineral óssea.

O presente estudo demonstrou, ainda, correlação positiva entre o índice mandibular cortical e mais 2 variáveis clínicas. Em T_0, uma associação positiva fora verificada entre o IMCo e o sexo dos participantes; no entanto, considerada fraca (r_s=0,4107; p=0,0414), resultante da maior prevalência de alterações ósseas em mulheres (representando 77,7% dos diagnosticados como C2; e 100% dos C3), quanto comparada aos indivíduos do sexo masculino (57% classificados como C1 e 22,2%, dos C2).

Uma terceira associação positiva, embora, fraca, foi observada em T_1, com a variável “idade” (r_s=0,4262; p = 0,0336), onde o número de pacientes cujo IMCo era correspondente a C1 representou 40%, sendo, destes, 40% mulheres, com média de idade de 36,5 anos; e 60% homens, cuja média de idade era de 37,1 anos. Em C2, 72,2% eram mulheres, com média de idade de 45,7 anos, e 27,2% de homens, com média de idade de 37,1 anos. Ainda em T1, 16% dos pacientes foram avaliados em

C3, sendo 75% mulheres, e 25% homens, apresentando a média de idade em 47,6 e 40 anos, respectivamente. Desta forma, podemos inferir que o índice mandibular cortical demonstrou alterações progressivas, de acordo com o avanço da idade dos participantes, sobretudo em mulheres. Além da variável medicamentosa, as alterações sistêmicas pertinentes à redução da massa óssea, como declínio de hormônios sexuais resultante do período trans- e pós-menopausa, provavelmente exerceram um efeito sinérgico ao detrimento da arquitetura óssea, reforçando necessidade da implementação de cuidados multidisciplinares à classe avaliada.

A escolha pelo índice qualitativo IMCo se deu frente à sua reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade demonstradas em estudos pertinentes à investigação de alterações densitométricas, em modelos de osteoporose primária (Klemetti et al., 1993; Taguchi et al., 2003; Nakamoto et al., 2003; Taguchi et al., 2006; Pavicin et al., 2014; Rati et al., 2014; Jonasson et al., 2018). A avaliação por meio da graduação de erosão na cortical mandibular corresponde a uma metodologia categórica, simples, de baixo custo, dependente exclusivamente da análise visual da radiografia panorâmica, onde se classifica C1 como densidade óssea normal, e C3, baixa densidade óssea (Klemetti et al., 1994). Não obstante, por corresponder a uma análise subjetiva, não podemos indica-la como ferramenta substituível à DXA.

A partir de treinamento adequado, a aplicação do índice mandibular cortical pode ser reprodutível a todos os cirurgiões-dentistas, representando, portanto, uma ferramenta tangível ao rastreamento de alterações precoces de densidade mineral óssea alterada (Calciolari et al., 2015). Os demais índices, apesar de quantitativos, demonstraram correlações fracas nos resultados e/ou variabilidade (Klemetti et al., 1993; Devlin; Horner, 2002; Taguchi et al., 2004; Taguchi et al., 2006; Bodade; Mody, 2013; Jonasson et al., 2018), assim como maior complexidade de leitura, necessidade de instrumentos específicos (como, por exemplo, o paquímetro), e, consequentemente, maior tempo de análise, inviabilizando sua implementação na prática clínica cotidiana dos profissionais da Odontologia.

Pacientes diagnosticados de acordo com classificação densitométrica normal apresentaram uma média de 9,3 dentes perdidos, e fora observado um aumento no número de dentes ausentes para 11,4, em indivíduos com baixa massa óssea.

Aqueles diagnosticados com osteoporose, apresentaram uma média de 5 dentes perdidos. No entanto, não foi possível referir o impacto do regime medicamentoso e eventuais correlações entre o IMCo sobre a quantidade de ausências dentárias, por não ter sido aplicado a metodologia estatística de correlação entre as variáveis.

A densitometria óssea (DXA) consiste no exame padrão-ouro na diagnose de alterações microarquiteturais da massa óssea, assim como apresenta a vantagem da baixa emissão de radiação ionizante, quando comparada às demais modalidades imaginológicas (Lang et al., 2002; Conversano et al., 2015); não obstante, caracteriza-se como metodologia de alto custo, e de acesso limitado a maior parte da população brasileira, gerando impedimentos à instituição de medidas preventivas em estágios precoces do referido acometimento ósseo, assim como à predição de fraturas e consequente impacto na saúde pública (Kanis et al., 2012; Pisani et al., 2016).

O osso mandibular corresponde a uma estrutura altamente vascularizada, cujos índices de remodelação óssea se mostram regularmente altos, frente à intensa atividade osteoclástica e osteoblástica. Desta forma, alguns estudos buscaram utilizá-lo como sítio anatômico no mapeamento de alterações da massa óssea. Ledgerton e colaboradores (1997) afirmaram que a mensuração da densidade mineral óssea mandibular, por meio da DXA, poderia corresponder à metodologia ideal para tal finalidade, frente ao seu alto coeficiente de correlação, assim como maior sensibilidade e especificidade. Não obstante, Zlataric e Celebic (2003) refutaram tal indicação, perante fatores dificultadores, como sobreposição de estruturas anatômicas contralaterais, interferência e comprometimento na qualidade das imagens, resultantes de artefatos provenientes de próteses fixas individuais ou múltiplas, inviabilizando sua aplicação na prática clínca. Como alternativa, White e Rudolph (1999) orientaram a abordagem de análises qualitativas e/ou quantitativas, em regiões distantes à dentição, como a porção anterior do osso basal mandibular, ou o osso alveolar posterior, distalmente aos dentes presentes.

O presente estudo pôde concluir que radiografias panorâmicas de mandíbula se mostraram válidas como ferramentas auxiliares à detecção de baixa densidade óssea, em pacientes submetidos à terapia crônica com glicocorticoides. Ressalta-se que, após adequado treinamento, é necessário a implementação de mais estudos pertinentes à OPIG, com número populacional mais abrangente, frente à ausência de demais investigações e metodologias em grupos homólogos.

Biomarcadores relacionados ao *turnover* ósseo

A presente investigação avaliou a expressão dos níveis de cinco biomarcadores relacionados ao *turnover* ósseo, a partir de sua expressão salivar, entre o grupo estudado (n=25) e seus respectivos controles saudáveis, pareados por sexo e idade (n=25), um ano após instituição da terapia medicamentosa (T_1). Adicionalmente, no grupo dos participantes da pesquisa (análise intragrupal - doentes), os níveis dos cinco biomarcadores relacionados ao *turnover* ósseo foram avaliados, a partir de sua expressão sérica, sendo investigado sua correlação à expressão salivar.

Os múltiplos componentes salivares não protegem apenas a integridade dos tecidos orais, mas igualmente funcionam como biomarcadores de doenças e condições sistêmicas do indivíduo. A saliva humana contém uma ampla coleção de proteínas, cada uma com funções biológicas distintas. Técnicas de proteômica salivar já detectaram mais de 3.000 proteínas diferentes, tornando, progressivamente, a saliva em um objeto fiável de diversos estudos, sendo já utilizada como fluido diagnóstico em várias situações, como na detecção de HIV, hepatite A, B e C, monitorização de uma variedade de drogas (Cova et al., 2015).

Os marcadores de remodelação óssea são úteis para avaliar a eficácia de adesão, absorção ou falha de resposta ao tratamento medicamentoso, assim como o mapeamento de doenças sobre as taxas de reabsorção e formação óssea, por meio de alterações dinâmicas do tecidos ósseo, em um determinado intervalo de tempo.

Nesta pesquisa, a escolha inicial do painel de biomarcadores compreendia o total de 9 analitos concernentes ao metabolismo ósseo; no entanto, por indisponibilidade do painel completo para a realização do imunoensaio Multiplex, foram estipulados os cinco marcadores aqui analisados. Dentre as limitações metodológicas encontradas em quaisquer investigações, o custo elevado de kits de ensaios laboratoriais consiste em um dos maiores, o que, neste estudo, inviabilizou sua realização em demais tempos operatórios. Não obstante, tal limitação não fora um impeditivo no desenvolvimento do estudo, o qual pronunciou resultados significantes.

Cem por cento dos marcadores foram detectados no fluido salivar, tanto no grupo de estudo, como controle. Um ano após o início do regime terapêutico com corticosteroides, os pacientes apresentaram uma concentração salivar média de osteoprotegerina (OPG) de 240,6 ± 252 pg/mL; já a média avaliada no grupo controle consistiu em 87,47 ± 109,8 pg/mL. A análise comparativa entre os dois grupos revelou diferença estatisticamente relevante (p< 0,0001).

A osteoprotegerina corresponde a um receptor solúvel do RANKL, sendo um regulador negativo da osteoclastogênese, pelo bloqueio da ligação RANK/RANKL. Os glicocorticoides possuem a capacidade de suprimir a expressão de osteoprotegerina (Swanson et al., 2006; Weinstein, 2011); no entanto, o presente estudo revelou concentrações elevadas de OPG no grupo avaliado, quando comparado ao indivíduos saudáveis. Este quadro pode ser resultante de uma resposta sistêmica compensatória, frente à reabsorção óssea induzida por corticoides, sendo esta uma evidência semelhante à observada por Chmielnicka et al., (2014), cujas análises séricas de OPG mostraram-se elevadas (p<0,02), em pacientes com pênfigo vulgar, quando comparadas aos controles. Jørgensen et al. (2009), também verificaram níveis elevados de OPG, e evidenciaram sua associação positiva à perda óssea (p = 0,005); no entanto, em modelo de osteoporose primária, envolvendo mulheres menopausadas não submetidas à terapia hormonal.

O processo de remodelação óssea resulta da interação de múltiplos fatores, dos quais ressaltam-se o estímulo mecânico por pressão, e a interação de diversas citocinas e hormônios, os quais mantêm o equilíbrio entre o processo de reabsorção e neoformação óssea. A interação entre as proteínas RANK e RANKL corresponde a um dos principais protagonistas, nessa cascata biológica. A fusão entre RANKL, regulador do processo de reabsorção óssea, e RANK – expresso em osteoclastos – potencializa o processo de osteoclastogênese, a partir de alterações morfológicas em células precursoras, e pela expressão de genes que tipificam a linhagem osteoclástica (Del Fattore et al., 2002).

Esta investigação observou concentrações salivares significativamente aumentadas de RANKL, em pacientes submetidos à corticoterapia crônica, quando comparadas aos controles (p<0,0001). Em T_1, pacientes com pênfigo vulgar exibiram uma média de 14,18 ± 5,59 pg/mL, frente a 7,96 ± 5,60 pg/mL, em indivíduos saudáveis. Os valores aumentados de RANKL, expressos no fluido salivar, possivelmente resultam da cronicidade de altas doses de corticosteroides, os quais aumentam a expressão do M-CSF (*macrophage colony stimulating factor)* e de RANKL, reduzindo as taxas apoptóticas de osteoclastos, desta forma, intensificando o processo de osteoclastogênese, resultando em baixa densidade mineral óssea, nestes pacientes.

A expressão de Vitamina D revelou-se significativamente maior (p = 0,0274), nos pacientes com pênfigo vulgar (278.377 ± 802.865 pg/mL), quando comparada ao grupo controle (55.079 ± 88.151 pg/mL). A concentração reduzida, exibida em indivíduos-controle, poderia ser justificada pela hipovitaminose D altamente prevalente na população geral, frente à redução à exposição solar, sobretudo, em grandes cidades. Medidas preventivas e educacionais, tal como a suplementação vitamínica com colecalciferol 1.000 UI/dia, foram instituídas, já no início da terapia (T_0), a todos os pacientes, o que, de acordo com a análise supracitada, pode representar significativamente um efeito benéfico a esse grupo de pacientes. Não obstante, a instituição de correlação estatística se faz necessária para maiores afirmações.

Pacientes com pênfigo vulgar exibiram uma concentração salivar média de colágeno tipo I de 569,6 ± 712,4 pg/mL, frente a 469,3 ± 357,2, no grupo controle, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. No tecido ósseo, a averiguação de alterações provenientes da proteína colágeno I é realizada a partir de seus fragmentos terminais (telopeptídeos), os quais são clivados por meio de colagenases e, então liberados à circulação sanguínea. Os telopeptídeos carboxiterminal e aminoterminal do colágeno tipo I são liberados durante a degradação do colágeno tipo I, dando origem aos telopeptídeos N-Terminal do colágeno tipo I (NTX) e C-Terminal do colágeno tipo I (CTX) Essas substâncias, subprodutos do colágeno tipo I, correspondem a marcadores relacionados à reabsorção óssea, cujos valores de normalidade variam entre diversos grupos, sobretudo, em diferentes faixas etárias (Kuo; Chen, 2017). No entanto, frente à sua indisponibilidade para a referida metodologia, só fora possível avaliar a expressão da concentração da proteína, em sua integralidade.

A expressão salivar da glicoproteína osteopontina também não demonstrou diferenças significantes entre o grupo de pacientes e controles saudáveis (p = 0,1622). A osteopontina corresponde a uma proteína multifuncional relacionada à remodelação óssea, sobrevivência celular e regulação inflamatória (Kahles et al., 2014). Algumas investigações reportaram o aumento na expressão sérica de osteopontina como um fator de risco à osteoporose primária, sendo positivamente correlacionada à concentração de marcadores de reabsorção óssea, como CTX (*carboxy-terminal collagen crosslinks*); além de correlação à baixa densidade mineral óssea, e à ocorrência de fraturas vertebrais, em mulheres menopausadas (Chang et al..2010; Fodor et al. (2013).

Apesar da etiopatogênese e curso clínico diferirem entre a osteoporose induzida por glicocorticoides e sua análoga primária, ambas apresentam uma significância clínica notoriamente relevante, em razão do impacto substancial ao tecido ósseo e demais acometimentos locais e/ou sistêmicos. Tendo em vista que os benefícios terapêuticos dos glicocorticoides justificam o seu uso em diversos distúrbios, é necessário que todos os profissionais de saúde estejam atentos à necessidade de minimizar seus efeitos secundários, tal como instituir, precoce e regularmente, medidas preventivas pertinentes à manutenção da homeostase

óssea, inclusive frente ao embate dispendioso nas políticas públicas de saúde.

A análise comparativa entre a expressão salivar e sérica mostrou correlação altamente significativa em 4 dos 5 analitos ($p<0,0001$), com a exceção de RANKL ($p = 0,9421$), evidenciando o potencial da investigação de Osteoprotegerina (OPG), Vitamina D, Colágeno tipo I e Osteopontina (OP), no fluido salivar, em pacientes submetidos ao uso crônico de corticoesteroides. A detecção de quantificações proteicas no fuido salivar condiz com a possibilidade destas serem integradas a estudos para validação de biomarcadores, frente ao seu significado funcional, ao refletir o espectro do estado de saúde, discriminação de alterações advindas de doenças ou processos moleculares subjacentes ou em resposta a regimes medicamentosos.

No entanto, neste estudo, a afirmação de quaisquer evidências observadas no ensaio sérico se torna limítrofe, frente à ausência de amostras-controle comparativas – sendo eticamente justificável - as quais possibilitariam correlações potencialmente relevantes. Torna-se imprescindível a realização de mais investigações longitudinais pertinentes à osteoporose induzida por glicocorticoides, assim como amostras populacionais maiores e pertencentes a outras doenças auto-imunes, por meio de diferentes ensaios comparativos.

7 CONCLUSÕES

- Pacientes submetidos ao regime prolongado de corticoterapia apresentam alterações densitométricas significativamente relevantes, em detrimento, majoritariamente, à medicação, sendo esta um dos principais fatores na gênese de obesidade nessa população;

- O índice radiomorfométrico mandibular cortical pode ser avaliado de uma forma reprodutível, em radiografias panorâmicas, na investigação de alterações da arquitetura óssea, em pacientes suscetíveis ao desenvolvimento de osteoporose induzida por glicocorticoides;

- Os achados sugerem a utilização da saliva como uma ferramenta de diagnóstico auxiliar, perante à detecção de biomarcadores relacionados ao *turn over* ósseo.

REFERÊNCIAS[1]

Adachi JD, Bensen WG, Bianchi F, Cividino A, Pillersdorf S, Sebaldt RJ, et al. Vitamin D and calcium in the prevention of corticosteroid-induced osteoporosis: 3-year followup. J Rheumatol. 1996; (23):995-1000.

Adams JE. Radiogrammetry and radiographic Absorptiometry. Radiol Clin N Am. 2010;48:531–40.

Agha-hosseini F, Mirzaii-Dizgah I, Mansourian A, Zabihi-Akhtechi G. Serum and stimulated whole saliva parathyroid hormone in menopausal women with oral dry feeling. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009 Jun; 107(6):806–10. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.01.024.

Agha-Hosseini F, Moosavi MS, Mirzaii-Dizgah I. Salivary flow, testosterone, and femur bone mineral density in menopausal women with oral dryness feeling.Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2013 May;115(5):612-6. doi:10.1016/j.oooo.2012.11.014

Aires MM. Fisiologia. 4a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2012; 1352.

Albright F, Smith PH, Richardson AM. Postmenopausal osteoporosis. J Amer Med Assoc. 1941; 116(22):2465.

Almeida V, Grégio AM, Machado MA, de Lima AA, Azevedo LR. Saliva composition and functions: a comprehensive review. J Contemp Dent Pract. 2008; 9(3):72-80.

Anijar RM. Remodelamento ósseo. In: Szejnfeld VL. Osteoporose: Diagnóstico e Tratamento. São Paulo: Sarvier; 2000; 225-35.

Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Diretrizes Brasileiras de Obesidade. 4ª ed. São Paulo: ABESO; 2016.

Beppu K, Kido H, Watazu A, Teraoka K, Matsuura M. Peri-implant bone density in senile osteoporosis-changes from implant placement to osseointegration. Clin Implant Dent Relat Res. 2013 Apr; 15(2): 217–26. Published online 2011 May 20. doi: 10.1111/j.1708-8208.2011.00350.x

[1] De acordo com Estilo Vancouver.

Bezerra MC, Carvalho JF, Prokopowitsch AS, Pereira RMR. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 2005;*38*(2):161-70.

Black M et al. Number II. Pemphigus Vulgaris. Oral Dis. 2005; 11(3):119-30.

Blalock HM. Social Statistics. 2d ed. New York: McGraw-Hill; 1979.

Bodade PR, Mody RN. Panoramic radiography for screening postmenopausal osteoporosis in India: a pilot study. Oral Health Dent Manag. 2013; 12(2):65-72.

Bouillon R, Okamura WH, Norman AW. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. Endocr Rev. 1995; 16(2):200-57.

Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. Arch. Biochem. Biophys. 2008; 473:139–46.

Buckley LM, Leib ES, Cartularo KS, Vacek PM, Cooper SM. Calcium and vitamin D3 supplementation prevents bone loss in the spine secondary to low-dose corticosteroids in patients with rheumatoid arthridtis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Ann Intern Med. 1996;125:961-68.

Buckley LM, Guyatt G, Fink HA, Cannon M, Grossman J, Hansen KE, et al. American College of Rheumatology Guideline for the Prevention and Treatment of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis. Arthritis & Rheumatology. 2017; 69(8):1521–537. doi:10.1002/art.40137.

Buttgereit F, Brand MD, Brutmester GR. Equivalent doses and relative drug potencies for non-genomic glucocorticoid effects: a novel glucocorticoid hierarchy. Biochem. Pharmacol.1999; 58(2):363-68.

Caetano-Lopes J, Canhão H. Fonseca JE. Osteoimmunology — The hidden immune regulation of bone. Autoimmunity Reviews. 2009; 8(3): 250–55. doi:10.1016/j.autrev.2008.07.038.

Carter M. Prevention of Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: Clinical audit to evaluate the implementation of National Osteoporosis Guideline Group 2017 guidelines in a primary care setting. Journal of Clinical Densitometry. 2018. doi.org/10.1016/j.jocd.2018.03.009

Carvalho AF, Kohler CA, Brunoni AR, Miskowiak KW, Herrmann N, Lanctot KL, et al. Bias in Peripheral Depression Biomarkers. Psychotherapy and psychosomatics. 2016;85(2):81–90. Epub 2016/01/26. doi: 10.1159/000441457

Carvalho MS, Poundarik AA, Cabral JMS, da Silva CL, Vashishth D. Biomimetic matrices for rapidly forming mineralized bone tissue based on stem cell-mediated osteogenesis. Scientific Reports. 2018; 8(1): 14388. doi:10.1038/s41598-018-32794-4

Chen LM, Kuo CH, Lai TY, Lin YM, Su CC, Hsu HH, et al. RANKL increases migration of human lung cancer cells through intercellular adhesion molecule-1 up-regulation. J Cell Biochem. 2011;112(3):933–94

Chmielnicka M, Woźniacka A, Torzecka JD. The influence of corticosteroid treatment on the OPG/RANK/RANKL pathway and osteocalcin in patients with pemphigus. *Postepy Dermatol Alergol*. 2014;31(5):281-8.

Cohen S, Levy RM, Keller M, Boling E, Emkey RD, Greenwald M, et al. Risedronate therapy prevents corcicosteroid-induced bone loss : a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-grooup study. Arthritis Reum. 1999; 42:2309-18.

Compston J. FRAX – Where are we now ? Maturitas. 2015; 82(3):284-7. doi: 10.1016/j.maturitas.2015.07.024.

Compston J. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. Endocrine. 2018; 61: 7-16.

Conversano F, Franchini R, Greco A, Soloperto G, Chiriaco F, Casciaro E, et al. A novel untrasound methodology for estimating spine mineral density. Ultrasound Med Biol. 2015; 41:281–300.

Cooper MS, Seibel MJ, Zhou H. Glucocorticoids, bone and energy metabolism. *Bone*. 2016 jan; 82:64–8. doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.038

Cova MAM. Salivary Omics. In: Streckfus C. (Ed.). Advances in Salivary Diagnostics. New York Dordrecht, London: Springer; 2015: 17-31.

Cushing H. The basophilic adenomas of the pituitary body and their clinical manifestation. Bull Johns Hopkins Hosp. 1932; 50:137-95.

Del Fattore A, Cappariello A, Teti A, Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. Bone. 2008; 42(1):19-29.

Devlin H, Horner K. Mandibular radiomorphometric indices in the diagnosis of reduced skeletal bone mineral density. Osteoporos Int. 2002; 13:373–78.

De Vries F, Bracke M, Leufkens HG, Lammers JW, Cooper C, Van Staa TP. Fracture risk with intermittent high-dose oral glucocorticoid therapy. Arthritis Rheum. 2007 Jan;56(1):208-14.

Dougall WC. Molecular pathways: osteoclast- dependent and osteoclast-independent roles of the RANKL/RANK/OPG pathway in tumorigenesis and metastasis. Clin. Cancer Res. 2012; 18:326–33.

Dougall WC, Holen I, Gonzalez-Suarez E. Targeting RANKL in metastasis. Bonekey Rep. 2014; 3:519.

Elshal MF, McCoy JP. Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. Methods. 2006; 38:317–23.

Ferreira CES, Maeda SS, Batista MC, Laxaretti-Castro M, Vasconcellos L, Madeira M, et al. Posicionamento Oficial da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial e da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia Intervalos de Referência da Vitamina D – 25(OH)D; 2017 [E-book]. Disponível em: https://www.endocrino.org.br/media/uploads/PDFs/posicionamentooficial_sbpcml_sbem_- _final

Fukumoto S, Martin TJ. Bone as an endocrine organ. Trends Endocrinol Metab. 2009 jul; 20(5):230-6.

Ghodsi SZ, Shahram F, Daneshpazhooh M, Saadatfar A, Chams-Davatchi C. Osteoporosis in patients with Pemphigus Vulgaris before steroid therapy. Acta Med Iran. 2014;52(12):879-83.

Gomes CC, Barbosa, GLR, Bello RP, Bóscolo FN, de Almeida SM. A comparison of the mandibular index on panoramic and cross-sectional images from CBCT exams from osteoporosis risk group. Osteoporosis International. 2014; 25:1885–890. doi:10.1007/s00198-014-2696-3

Grando SA. Pemphigus autoimmunity: hypotheses and realities. Autoimmunity. 2012 Feb; 45(1):7-35. doi: 10.3109/08916934.2011.606444. Epub 2011 Sep 23.

Guyton AC, Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. 13ª ed. Amsterdam: Elsevier. 2017, 1176p.

Hagenfeldt K, “Osteoporosis - Prevention, Diagnosis and Treatment,” Summary and Conclusions of the SBU - The Swedish Council on Technology Assessment in Health Care; 2003, 2:4-43.

Hansen KE, Kleker B, Safdar N, Bartels CM. A systematic review and meta-analysis of glucocorticoid-induced osteoporosis in children. Semin Arthritis Rheum 2014; 44:47–54.

Harman KE, Albert S, Black MM, British Association of Dermatologists. Guidelines for the management of pemphigus vulgaris. Br J Dermatol. 2003 Nov; 149(5):926–37.

Harper KD, Weber TJ. Secondary osteoporosis. Diagnostic considerations. Endocrinol Metab Clin North Am. 1998; 27:325–48.

Hofbauer LC. Pathophysiology of RANK ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG). Annales d’Endocrinologie. 2006; 67(2):139–41. doi:10.1016/s0003-4266(06)72569-0

Holick MF. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. Nutr Rev. 2008; 66(10):182-94.

Hollander M, Wolfe DA. Nonparametric Statistical Methods. New York: John Wiley & Sons; 1978:139-46.

Hsu E, Nanes M. Advances in treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.2017 Dec;24(6):411-17. doi: 10.1097/MED.0000000000000368.

Hunter DJ, Losina E, Guermazi A, Burstein D, Lassere MN, Kraus V. A pathway and approach to biomarker validation and qualification for osteoarthritis clinical trials. Curr Drug Targets. 2010; 11(5):536-45.

Jabber WF, Zaidan TF, Gorial FI, Al-Naaimi A. Salivary Interleukin 6 is a valid biomarker for diagnosis of osteoporosis in postmenopausal women. Chem Mat Res. 2015; 7(7):65-69.

Jonasson GB, Sundh V, Hakeberg M, Ahlqwist M, Lissner L, Hange D. Evaluation of clinical and radiographic indices as predictors of osteoporotic fractures: a 10-year longitudinal study. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology. 2018; 125(5):487–94. doi:10.1016/j.oooo.2017.11.009.

Jørgensen L, Vik A, Emaus N, Brox J, Hansen JB, Mathiesen E, Vestergaard P. Bone loss in relation to serum levels of osteoprotegerin and nuclear factor-κB ligand: the Tromsø Study. Osteoporosis International, 2009; 21(6):931–38. doi:10.1007/s00198-009-1035-6.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica – texto e atlas. 12ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013, 556p. ISBN-10:85-277-2311-5.

Kaczor-Urbanowicz KE, Carreras-Presas CM, Aro K, Tu M, Garcia-godoy F, Wong DTW. Saliva diagnostics – Current views and directions. Exp Biol Med. 2017 Mar; 242(5):459–72. doi: 10.1177/1535370216681550.

Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. Trends Pharmacol. Sci. 2013; 34:518-30.

Kahles F, Findeisen HM, Bruemmer D. Osteopontin: A novel regulator at the cross roads of inflammation, obesity and diabetes. Mol Metab. 2014;3(4):384-93. Published 2014 Mar 22. doi:10.1016/j.molmet.2014.03.004

Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, Khaltaev N. The diagnosis of osteoporosis. J Bone Miner Res. 1994; 9:1137-41.

Kanis JA on behalf of the World Health Organization (WHO) Scientific Group. Assessment of osteoporosis at the primary health care level. Technical Report. WHO Collaborating Centre for Metabolic Bone Diseases, University of Sheffield, UK; 2007.

Kanis JA, Mccloskey EV, Johansson H, Cooper C, Reginster J-Y. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. 2012; 23–57. https://doi.org/10.1007/s00198-012-2074-y.

Kasperkiewicz M, Ellebrecht CT, Takahashi H, Yamagami J, Zillikens D, Payne AS, Amagai M. Pemphigus. Nat Rev Dis Primers. Nat Rev Dis Primers. 2017; 11(3):17026.doi:10.1038/nrdp.2017.26.

Katchburian E, Arana VE. Histologia e Embriologia Oral. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. 300p.

Khan AA, Morrison A, Kendler DL, Rizzoli R, Hanley DA, Felsenberg D et al. Case-Based Review of Osteonecrosis of the Jaw (ONJ) and Application of the International Recommendations for Management From the International Task Force on ONJ. J Clin Densitometry. 2017; 20(1):8–24. doi:10.1016/j.jocd.2016.09.005.

Kitajima Y. 150(th) anniversary series: Desmosomes and autoimmune disease, perspective of dynamic desmosome remodeling and its impairments in pemphigus. Cell Commun Adhes. 2014 Dec; 21(6):269–80. doi: 10.3109/15419061.2014.943397

Klemetti E, Vainio P. Effect of bone mineral density in skeleton and mandible on extraction of teeth and clinical alveolar height. J Prosthet Dent. 1993; 70(1):21-5.

Klemetti E, Komakov S, Heiskanen P, Vainio P, Lassila V. Panoramic mandibular index and bone mineral densities in postmenopausal women. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1993; 75(6):774-9.

Klemetti E, Kolmakov S, Kröger H. Pantomography in assessment of the osteoporosis risk group. European Journal of Oral Science. 1994; 102(1): 68–72. doi:10.1111/j.1600-0722.1994.tb01156.x

Kochupillai N. The physiology of vitamin D: current concepts. Indian J. Med. Res. 2008; 127(3):256-62.

Kroger H, Honkanen R, Saarikoski S, Alhava E. Decreased axial bone mineral density in perimenopausal women with rheumatoid arthritis - a population based study. Ann Rheum Dis 1994; 53:18–23.

Kuo TR, Chen CH. Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recente developments and future perspective. Biomar Res. 2017; 5:18.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell.1998 Apr 17;93(2): 165–76.

Lang TF, Guglielmi G, Van Kuijk C, De Serio A, Cammisa M, Genant HK. Measurement of bone mineral density at the spine and proximal femur by volumetric quantitative computed tomography and dual-energy X-ray Absorptiometry in elderly women with and without vertebral fractures. Bone. 2002; 30:247–50.

Langdahl BL Marin F, Shane E, Dobnig H, Zanchetta JR, Maricic M, Krohn K, See K, Warner MR. Teriparatide versus alendronate for treating glucocorticoid-induced osteoporosis: an analysis by gender and menopausal status. Osteoporos. 2009; (20):2095-2104.

Lee JM, Wong DT. Salivary diagnostics. Orthd Craniofac Res; 2009; 12:206-11.
Ledgerton D, Horner K, Devlin H. Osteoporosis research: a dental perspective. Radiography.1997;3:265–77.

Leibson CL, Tosteson A, Gabriel SE,Ransom JE,Melton LJ. Mortality, disability and nursing home use for persons with ad without hip fracture: a population-based study. J AM Geriatr Soc. 2002; 50:1644-50.

Lekamwasam S, Adachi JD, Agnusdei D, Bilezikian J, Boonen S, Borgström F et al. A framework for the development of guidelines for the management of glucocorticoid-induced osteoporosis. Osteoporos Int. 2012; 23:2257-76.

Lima DP, Diniz DG, Moimaz SA, Sumida DH, Okamoto AC.. "Saliva: reflection of the body." Int J Infect Dis. 2010; 14(3):184- 8.

Locascio V, Bonucci E, Imbimbo B, Ballanti P, Adami S, Milani S, et al. Bone loss in response to long-term glucocorticoid therapy. Bone Miner. 1990; 8:39-51.

Looker AC, Dawson-Hughes B, Calvo MS, Gunter EW, Sahyoun NR. Serum 25-hydroxyvitamin D status of adolescents and adults in two seasonal subpopulations from NHANES III. Bone 2002; 30:771-7.

Luo J, Yang Z, Ma Y, Yue Z, Lin H, Qu G, et al. LGR4 is a receptor for RANKL and negatively regulates osteoclast differentiation and bone resorption. Nat. Med. 2016; 22: 539–546.

Maeda SS, Borba VZC, Camargo MBR, Silva DMW, Borges JLCB, Bandeira F, et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. Arq Bras Endocrinol Metab. 2014; 58:5.

Makker A, Singh MM, Mishra G, Singh BP, Jain GK, Jadhav S. Relationship between bone turnover biomarkers, mandibular bone mineral density, and systemic skeletal bone mineral density in premenopausal and postmenopausal Indian women. Menopause: The Journal of The North American Menopause Society. 2012; 19(6), 642-9.

Martí-Álamo S, Mancheño-Franch A, Marzal-Gamarra C, Carlos-Fabuel L. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. J Clin Exp Dent. 2012;4(4):e237-43. Published 2012 Oct 1. doi:10.4317/jced.50865

Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. Arch Biochem Biophys. 2008; 473(2):201–209. Published online 2008 Mar 29. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.027

Mazziotti G, Formenti AM, Adler RA, Bilezikian JP, Grossman A, Sbardella E, Minisola S, Giustina A. Glucocorticoidinduced osteoporosis: pathophysiological role of GH/IGF-I and PTH/VITAMIN D axes, treatment options and guidelines. Endocrine. 2016; 54(3): 603–11.

Mazziotti G, Canalis E, Giustina A. Drug-induced Osteoporosis : Mechanisms and. AJM. 2010; 123(10):877–84. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2010.02.028.

McEvoy CE, Ensrud KE, Bender E, Genant HK, Yu W, Griffith JM, Niewoehner DE. Association between corticosteroid use and vertebral fractures in older men with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 1998 Mar; 157(3 Pt 1): 704–9. doi: 10.1164/ajrccm.157.3.9703080

Meurman JH, Tarkkila L, Tiitinen A. The menopause and oral health. Maturitas. 2009; 63(1):56–62. doi:10.1016/j.maturitas.2009.02.009

Miricescu D, Totan A, Calenic B, Mocanu B, Didilescu A, Mohora M, Spinu T, Greabu M. Salivary biomarkers: relationship between oxidative stress and alveolar bone loss in chronic periodontitis. Acta Odon Scand. 2014; 72:42-7.

Mishra A, Verma M. Cancer biomarkers: are we ready for the prime time?. Cancers. 2010; 2(1):190-208.

Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Eisman JA, et al. IOF Committee of Scientific Advisors (CSA) Nutrition Working Group. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. Osteoporos Int. 2009; 20(11):1807-20.

Nakamoto T, Taguchi A, Ohtsuka M, Suei Y, Fujita M, Tanimoto K, et al. Dental panoramic radiograph as a tool to detect postmenopausal women with low bone mineral density: untrained general dental practitioners' diagnostic performance. Osteoporos Int. 2003 ;14:659. https://doi.org/10.1007/s00198-003-1419-y

Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, FENG JQ, Takayanagi H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. Nature Medicine. 2011; 17(10):1231–1234. doi:10.1038/nm.2452.

Naylor S. "Biomarkers: current perspectives and future prospects." Expert Rev Mol Diagn. 2003; 3(5):525-9.

Neville BW, Damm DD, Allen C.M, Bouquot JE. Patologia Oral e Maxilofacial. Trad.3a Ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, 972p.

Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. Am J Clin Nutr. 2008; 88(suppl):491S-9S.

Novack DV, Teitelbaum SL. The osteoclast: friend or foe? Annu Rev Pathol. 2008; 3:457–84. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151431.

Ohnaka K, Tanabe M, Kawate H, Nawata H, Takayanagi R. Glucocorticoid suppresses the canonical Wnt signal in cultured human osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun. 2005; 329:177–81.

Painter SE, Kleerekoper M, Camacho PM. Secondary osteoporosis: a review of the recent evidence. Endocr Pract. 2006; 12:436–45.

Pavičin IS, Dumancic J, Jukic T, Badel T, Badanjak A. Digital orthopantomograms in osteoporosis detection : mandibular density and mandibular radiographic indices as skeletal BMD predictors. Dentomaxillofac Radiol. 2014; 43(7):1–8. https://doi.org/10.1259/dmfr.20130366

Pavičin IS, Dumančić J, Jukić T, Badel T. The relationship between periodontal disease, tooth loss and decreased skeletal bone mineral density in ageing women. Gerodontology. 2017; 34(4), 441–5.

Pereira RMR, Carvalho JF, Paula AP, Zerbini C, Domiciano DS, Gonçalves H, et al. Diretrizes para prevenção e tratamento da osteoporose induzida por glicocorticoide. Rev. Bras. Reumatol.2012; 52(4):580-93.

Petit AR, Walsh NC, Manning C,Goldring SR, Gravallese EM. RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford). 2006; 45(9): 1068-76.

Pike JW, Meyer MB, Lee SM, Onal M, Benkusky NA. The vitamin D receptor: contemporary genomic approaches reveal new basic and translational insights. *J Clin Invest*. 2017;127(4):1146-54.

Pisani P, Renna MD, Conversano F, Casciaro E, Di Paola M, Quarta E, et al. Major osteoporotic fragility fractures: risk factor updates and societal impact. World J Orthop. 2016; 7:171.

Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. J Clin Invest.2005;115(12):3318–25. doi:10.1172/JCI27071.

Rizzoli R, Biver E. Glucocorticoid-induced osteoporosis: who to treat with what agent? Nat Rev Rheumatol. 2015 Feb;11(2):98-109. doi: 10.1038/nrrheum.2014.188.

Robling AG, Bellido T, Turner CH. Mechanical stimulation in vivo reduces osteocyte expression of sclerostin. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2006;6:354.

Saag KG, Emkey R, Schnitzer TJ, Brown JP, Hawkins F, Goemaere S, et al. Alendronate for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Glucocorticoid-induced Osteoporosis Intervention Study Group. N Engl J Med. 1998; (339):292-9.

Salgado DMRA, Zambrana JRM, Zambrana NRM, Ribeiro, RA, Caputo BV, Noro-Filho GA, Costa C. Utilização da tomografia computadorizada de feixe cônico na obtenção de índices radiomorfométricos - Revisão de Literatura. Clinical and Laboratorial Research in Denstistry. 2015;21:185-90.

Sato AY, Richardson D, Cregor M, Davis HM, Au ED, McAndrews K, et al. Glucocorticoids induce bone and muscle atrophy by tissue-specific mechanisms upstream of E3 ubiquitin ligases. Endocrinology. 2017; 158(3):664–77.

Schett G, Stach C, Zwerina J, Voll R, Manger B. How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 2008; 58(10):2936-48.

Scully C, Challacombe SJ. Pemphigus vulgaris: update on etiopathogenesis, oral manifestations, and management. Crit Rev Oral Biol Med. 2002; 13(5): 397–408.

Scully C, De Almeida OP, Porter SR, Gilkes JJ. Pemphigus vulgaris: the manifestations and long-term management of 55 patients with oral lesions. Br J Dermatol. 1999 Jan; 140(1):84–89.

Segal A, Wong DT. "Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better." Eur J Dent Educ. 2008; 12(1):22-9.

Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. Cell. 1979; 16:885–93.

Singh A, Sharma RK, Siwach RC, Tewari S, Narula SC. Association of bone mineral density with periodontal status in postmenopausal women. Journal of Investigative and Clinical Dentistry, 2013, 5(4), 275–82. doi:10.1111/jicd.12047

Sintov AC, Yarmolinsky L, Dahan A, Ben-Shabat S. Pharmacological effects of vitamin D and its analogs: recent developments. Drug Discov Today. 2014. 19(11): 1769-74.

Sodhi CP, Phadke SA, Batlle D, Sahai A. Hypoxia stimulates osteopontin expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells: potentiation by high glucose. Diabetes. 2001; 50:1482-90.

Sözen t, Özişik L, Başaran NÇ. An overview and management of osteoporosis. Eur J Rheumatol. 2017 Mar; 4(1):46–56.

Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers?. Curr Opin HIV AIDS. 2010;5(6):463-66.

Swanson C, Lorentzon M, Conaway HH, Lerner UH. Glucocorticoid regulation of osteoclast differentiation and expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappaB in mouse calvarial bones. Endocrinology. 2006; 147(7):3613–22.

Taguchi A, Tanimoto K, Suei Y, Otani K, Wada T. Oral signs as indicators of possible osteoporosis in elderly women. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1995 Nov; 80(5): 612–6.

Taguchi A, Suei Y, Ohtsuka M, Otani K, Tanimoto K, Hollender LG. Relationship between bone mineral density and tooth loss in elderly Japanese women. Dentomaxillofac Radiol. 1999 Jul; 28(4): 219–23. doi: 10.1038/sj/dmfr/4600445

Taguchi A, Ohtsuka M, Suei Y, Tanimoto K, Kodama I. Panoramic radiographs for identifying individuals with undetected osteoporosis. Journal of Bone and Mineral Research. 2003; *18*(9):1689–94.

Taguchi A, Suei Y, Horner K, Devlin H, Nakamoto T, Yamashina A, et al. Is there any difference between the British and Japanese definitions of the mandibular cortical index (MCI) on panoramic radiographs? A pilot study. Oral Radiol. 2004; 20:44-8.

Taguchi A, Tsuda M, Ohtsuka M, Kodama J, Sanada M, Nakamoto T, et al. Use of dental panoramic radiographs in identifying younger postmenopausal women with osteoporosis. Osteoporos Int. 2006; 17(3):387-94.

Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. Nat Rev Immunol. 2007 Apr:7(4): 292–304. doi: 10.1038/nri2062

Tokairin T, Nishikawa Y, Watanabe H, Doi Y, Omori Y, Yoshioka T, et al. Osteopontin expression in the liver with severe perisinusoidal fibrosis: autopsy case of down syndrome with transient myeloproliferative disorder. Pathology International. 2008; 58:64-8.

Trijau S de Lamotte G, Pradel V, Natali F, Allaria-Lapierre V, Coudert H, et al. Osteoporosis prevention among chronic glucocorticoid users: results from a public health insurance database. EMD Open. 2016; (2):249.

Valerio CS, Trindade AM, Mazzieiro ET, Amaral TP, Manzi FR. Use of digital panoramic radiography as an auxiliary means of low bone mineral density detection in post-menopausal women. Dentomaxillofac Radiol. 2013;42(10):20120059.

Van Staa TP, Laan RF, Barton IP, Cohen S, Reid DM, Cooper C. Bone density threshold and other predictors of vertebral fracture in patients receiving oral glucocorticoid therapy. Arthritis Rheum. 2003; 48:3224-9.

Van Staa TP, Leufkens HG, Cooper C. Use of inhaled corticosteroids and risk of fractures. J. Bone Miner. Res. 2001;16:581–8.

Vedi S, Elkin SL, Compston JE. A histomorphometric study of cortical bone of the iliac crest in patients treated with glucocorticoids. Calcif. Tissue Int. 2005; 77:79–83.

Veldman C, Feliciani C. Pemphigus: a complex T celldependent autoimmune disorder leading to acantholysis. Clin Rev Allergy Immunol. 2008; 34(3):313-20.

Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Fracture risk associated with different types of oral corticosteroids and effect of termination of corticosteroids on the risk of fractures. Calcif. Tissue Int. 2008; 82:249–57.

Vieira AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: The Kappa Statistic. Fam Med. 2005; 37(5):360-3.

Wallach S, Cohen S, Reid DM, Hughes RA, Hosking DJ, Laan RF, et al. Effects of risendronate treatments on bone density and vertebral fracture in patients on corticosteroid therapy. Calcif Tissue Int. 2000; (67):277-85.

Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, Libby E, Macleod NB, Nagai Y, et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. Mol Endocrinol. 2005;19: 2685-95.

Watanabe PCA. Osteoporose e a radiografia panorâmica: O que o cirurgião-dentista pode analisar. Ver ABRO. 2009; 11(3):5-21.

Weaver CM, Gordon CM, Janz KF, Kalkwarf HJ, Lappe JM, Lewis R, et al. The National Osteoporosis Foundation's position statement on peak bone mass development and lifestyle factors: a systematic review and implementation recommendations. *Osteoporos Int*. 2016;27(4):1281-386.

Weinstein RS. Clinical practice. Glucocorticoidinduced bone disease. N. Engl. J. Med. 2011; 365:62–70.
White SC, Rudolph DJ. Alterations of the trabecular pattern of the jaws in patients with osteoporosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod. 1999;88:628–35.

Wong DT. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. J AM Dent Assoc. 2006; 137:313-21.

Yasar F, Akgunlu F. The differences in panoramic mandibular indices and fracta dimension between patients with and without spinal osteoporosis. Dentomaxillofac Radiol. 2006; 35(1):1-9.

Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DT. "Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities." Clin Microbiol Rev. 2013, 26(4):781-91.

Zanotti S, Gibertini S, Di Blasi C, Cappelletti C, Bernasconi P, Mantegazza R, et al. Osteopontin is highly expressed in severely dystrophic muscle and seems to play a role in muscle regeneration and fibrosis. Histopathology. 2010; 59:1215-28.

Zlataric DK, Celebic A. Clinical bone densitometric evaluation of the mandible in removable denture wearers dependent on the morphology of the mandibular cortex. J Prosthet Dent. 2003;90:86–91.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Osteoporose medicamentosa: expressão salivar de biomarcadores ósseos em pacientes submetidos à corticoterapia e sua correlação entre índices radiomorfométricos versus densitometria óssea

Pesquisador: Silvia Vanessa Lourenço

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 53383715.8.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.730.951

Apresentação do Projeto:

A pesquisa selecionará 25 pacientes com diagnóstico confirmado de Pênfigo Vulgar Oral (PVO), com idade entre 18 e 60 anos, em seguimento regular no ambulatório de Estomatologia do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas. Também serão incluídos na pesquisa 25 pacientes saudáveis, pareados para idade e gênero (grupo controle). Amostras de saliva serão coletadas de todos os indivíduos participantes (caso e controle). Como protocolo de acompanhamento clínico destes pacientes no Ambulatório de Estomatologia do Hospital das Clínicas, todos são submetidos a exames periódicos de densitometria óssea e a radiografias panorâmicas digitais, cujos resultados serão utilizados para estudo de possíveis associações entre os índices radiomorfométricos e a incidência de osteoporose.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a expressão salivar de proteínas associadas ao metabolismo ósseo em indivíduos diagnosticados com pênfigo vulgar, submetidos à corticoterapia prolongada, correlacionando-a à incidência de osteoporose medicamentosa e à análise imaginológica.

Objetivos Secundários:- Dados demográficos;- Determinar os valores de biomarcadores

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

relacionados ao turnover ósseo: Fator nuclear Kappa B (RANK-L); Osteocalcina; Fosfatase alcalina óssea; Esclerostina; Proteína morfogenética óssea (BMP-8); - Analisar a incidência de osteoporose medicamentosa por intermédio dos valores resultantes da densidade óssea mineral (Densitometria por absorção de raios-X de dupla energia - DEXA) aos índices radiomorfométricos, obtidos por radiografias panorâmicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram bem mensurados.

Riscos: Os riscos e desconfortos relacionados à participação nessa pesquisa são mínimos e inerentes à coleta de saliva, na qual será solicitado ao/à participante da pesquisa para expelir em um recipiente apropriado. No caso de apresentar dificuldade para a realização deste procedimento, o(a) participante da pesquisa terá total autonomia para não realizá-la ou decidir fazer em outro momento em que se sinta mais confortável. A amostra utilizada na pesquisa será coletada por profissional habilitado, sob condições adequadas de segurança e limpeza, não acarretando prejuízo ou desconforto adicional ao do procedimento que será realizado. A coleta da amostra salivar do(a) participante da pesquisa será realizada no mesmo dia de sua consulta, já pré-agendada, no Ambulatório de Estomatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP), não acarretando em deslocamentos adicionais aos que já realiza durante seu tratamento.

Benefícios: A partir do estudo proposto, espera-se desenvolver técnicas de diagnose não invasivas e mais confortáveis aos pacientes considerados de risco ao desenvolvimento da doença osteoporótica, facilitando tanto o manejo clínico, como planejamento mais adequado e seguro em intervenções odontológicas nestes indivíduos. A participação neste estudo trará benefícios diretos com a realização de exame clínico oral, informações atualizadas pertinentes à doença pênfigo vulgar e suas possíveis repercussões no organismo (saúde oral e do corpo todo); orientação profissional médica e odontológica, culminando em um diagnostico e acompanhamento mais precisos dos participantes da pesquisa. Indiretamente, o(a) participante da pesquisa irá colaborar com o conhecimento científico nesta área, possibilitando a definição de um melhor método de diagnóstico, mais confortável, não invasivo, nos protocolos de tratamento de pênfigo vulgar e osteoporose. Nenhum custo será cobrado.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.730.951

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todas as pendências foram corrigidas pela pesquisadora e o projeto não apresenta comprometimento ético.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos apresentados pela pesquisadora estão adequados: 1.Folha de Rosto, 2.TCLE, 3.Carta de autorização do HC, 4.Projeto Detalhado.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_636846.pdf	17/08/2016 14:13:59		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.docx	17/08/2016 14:13:31	Cibele Pidorodeski Nagano	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECibele.docx	17/08/2016 14:10:20	Cibele Pidorodeski Nagano	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.docx	17/08/2016 14:09:26	Cibele Pidorodeski Nagano	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaHC.docx	11/12/2015 10:20:10	Cibele Pidorodeski Nagano	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.730.951

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 16 de Setembro de 2016

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido

1/2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto:
OSTEOPOROSE MEDICAMENTOSA: EXPRESSÃO SALIVAR DE BIOMARCADORES ÓSSEOS EM PACIENTES SUBMETIDOS À CORTICOTERAPIA E SUA CORRELAÇÃO ENTRE ÍNDICES RADIOMORFOMÉTRICOS *VERSUS* DENSITOMETRIA ÓSSEA

Pesquisadores: Doutoranda Cibele Pidorodeski Nagano, Profa. Dra. Silvia Vanessa Lourenço e Profa. Dra. Emiko Saito Arita
Instituições: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) e Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP)
Local: Ambulatório de Estomatologia do Hospital das Clínicas (HC-FMUSP)

Convite para participação voluntária

As informações abaixo destinam-se a esclarecer e solicitar sua participação voluntária nesta pesquisa. Antes de concordar, é de extrema importância que o(a) participante da pesquisa compreenda as informações e instruções contidas neste documento. Os pesquisadores estão aptos a esclarecer suas dúvidas a qualquer momento. Salientamos, ainda, que o(a) participante da pesquisa tem plena liberdade de desistir a qualquer momento de participar do estudo. Sua desistência não trará nenhum prejuízo em sua relação com os pesquisadores ou com o seu tratamento realizado no Hospital das Clínicas.

1. **Objetivos do estudo:** Com esta pesquisa, poderemos avaliar três métodos de diagnóstico para a detecção da osteoporose, sendo um laboratorial, no qual avaliaremos a **saliva**, e **dois exames de imagem**, com a finalidade de estudar possíveis alterações no tecido ósseo de pacientes em tratamento com medicamentos denominados corticoides (por ex: Prednisona), por um período prolongado (tempo maior que 3 meses);

2. **Procedimentos:** Sua participação nesta pesquisa consistirá em ser avaliado pelos métodos citados no item 1:

   - **Coleta da amostra:** A coleta da amostra de sua saliva será realizada no mesmo dia de sua consulta, já pré-agendada, no Ambulatório de Estomatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP), não acarretando em deslocamentos adicionais aos que já realiza durante seu tratamento. Caso o (a) Sr(a) não seja portador da doença pênfigo vulgar, a coleta do material (saliva) será realizada através da mesma técnica para comparação com os pacientes que a apresentam.
   Você será instruído a ficar por 2 horas sem se alimentar ou ingerir líquidos, assim como realizar higiene oral ou fumar, antes da coleta salivar. A coleta será realizada pelo período da manhã entre 8:00 e 12:00. Sentado confortavelmente em uma cadeira em ambiente bem ventilado e arejado, com a cabeça levemente inclinada para frente, sem deglutir, será solicitado que você colete um pouco de saliva, de forma a expelir (cuspir) em um frasco apropriado, por 5 minutos. Posteriormente, sua saliva será enviada para análises de laboratório.

   - **Avaliação imaginológica:** Sendo o(a) participante da pesquisa portador de pênfigo vulgar e paciente do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas, periodicamente, lhe são solicitados diversos exames para um adequado controle de sua saúde. Dentre eles, a densitometria óssea (para avaliar a saúde do esqueleto) e a radiografia panorâmica (a qual contribui para a avaliação da saúde oral e dos ossos que suportam os dentes), realizados no Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas. Nós, pesquisadores, analisaremos o resultado destes exames por via computadorizada, dentro do próprio complexo hospitalar;

3. **Riscos e desconfortos:** Os riscos e desconfortos relacionados à sua participação são mínimos e inerentes à coleta de saliva, na qual lhe será solicitado para cuspir em um recipiente apropriado. No caso de apresentar dificuldade para a realização deste procedimento, o participante da pesquisa tem total autonomia para não realizá-la ou decidir fazer em outro momento em que se sinta mais confortável. A amostra utilizada na pesquisa será coletada por profissional habilitado, sob condições adequadas de segurança e limpeza, não acarretando prejuízo ou desconforto adicional ao do procedimento que será realizado;

Rubrica (participante da pesquisa): Rubrica (pesquisador):

4. **Benefícios:** Sua participação neste estudo trará benefícios diretos com a realização de exame clínico oral, informações atualizadas pertinentes à sua doença e suas possíveis repercussões no organismo (saúde oral e do corpo todo); orientação profissional médica e odontológica, culminando em um diagnostico e acompanhamento mais precisos de sua doença. Indiretamente, você irá colaborar com o conhecimento científico nesta área, possibilitando a definição de um melhor método de diagnóstico, mais confortável, não invasivo, nos protocolos de tratamento de pênfigo vulgar e osteoporose. Nenhum custo lhe será cobrado;

5. **Garantia do sigilo da identidade do participante da pesquisa e descarte do material:** as informações fornecidas serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Os participantes da pesquisa não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados em qualquer forma. As amostras salivares não utilizadas serão descartadas em recipiente próprio (lixo biológico)

6. **Desistência:** O(a) participante da pesquisa tem o direito de desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhuma penalidade e sem perder os benefícios aos quais tenha. Ressalta-se que a desistência de sua participação nesta pesquisa não culminará, de nenhuma forma, na continuidade de seu tratamento realizado no Ambulatório de Estomatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Este documento é elaborado em duas vias, sendo uma do participante da pesquisa e uma do pesquisador.
Comitê de Ética em Pesquisa (Seres Humanos) Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – 05508-000 – São Paulo – SP Fone: (11) 3091.7960 – E-mail: cepfo@usp.br Horário de Funcionamento: segunda a sexta-feira das 8 às 17h (exceto feriados e recesso universitário). O Comitê é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. (Resolução CNS nº 466 de 2012)

Pesquisadores:

Doutoranda Cibele Pidorodeski Nagano	**Profª Drª Silvia Vanessa Lourenço**

- contato do pesquisador: cibele.nagano@usp.br; tel: (11) 2648-8219, Faculdade de Odontologia – USP: Av. Prof. Lineu Prestes, 2227

Após ter sido informado e ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador, **concordo** em participar de forma voluntária desta pesquisa.

São Paulo, _ ___ de _____ _____ de _____

ASSINATURA (Participante da pesquisa)