

EFEITO DO TRATAMENTO HORMONAL E DA DEFICIÊNCIA DE CÁLCIO NA REMODELAÇÃO ÓSSEA DA MAXILA EM RATAS

Costa, G. P.¹; Leite, D. S.²; Prado, R. F.³; Silveira, V. A. S.⁴; Carvalho, Y. R.⁵

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” / Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Avenida Francisco José Longo, 777, São José dos Campos – SP; CEP : 12245-000, giselly.parizoto@hotmail.com

Resumo- A osteoporose caracteriza-se por perda óssea em mulheres pós-menopausa. O objetivo foi avaliar o efeito da dieta deficiente em cálcio e da terapia de reposição hormonal na remodelação do osso maxilar de ratas ovariectomizadas. Utilizaram-se 147 ratas, sendo 126 ovariectomizadas (OVZ) e 21 falso-operadas (Sham). Das 126 ratas ovariectomizadas, 21 receberam ração com baixo teor de cálcio, 21, ração comercial moída e as demais ração comercial padrão. Das 84 ratas ovariectomizadas que receberam ração comercial padrão, 21 receberam 17 β -estradiol via oral, 21, extrato de isoflavonas a 40% via oral, 21 associação de ambos e 21, água, via oral, como placebo. O grupo Sham recebeu ração comercial padrão e placebo. Os sacrifícios ocorreram 3, 5 e 8 semanas após a ovariectomia. Após inclusão em resina analisou-se o volume trabecular ósseo. Sham e OVZ foram semelhantes entre si, diferindo com o tempo. Com relação ao tratamento, o grupo OVZ não apresentou diferença estatística. Com relação à dieta o grupo OVZ que recebeu ração moída diferiu do grupo que recebeu ração padrão. Conclui-se que a ovariectomia, a ração deficiente em cálcio e os medicamentos não tiveram efeito na remodelação óssea maxilar.

Palavras-chave: hormônios, remodelação óssea, osteoporose, deficiência de cálcio, maxila
Área do Conhecimento: Patologia Bucal

Introdução

A osteoporose é a mais comum e mais significativa osteopatia metabólica. Caracteriza-se pelo aumento da porosidade do esqueleto resultando na diminuição da massa óssea tornando os ossos susceptíveis às fraturas. O tecido ósseo apresenta características dinâmicas, encontrando-se em constante processo de remodelação (LERNER 2006). A remodelação óssea tem papel fundamental na homeostasia dos níveis plasmáticos de cálcio (HADJIDAKIS 2006). Na osteoporose, ocorre uma maior reabsorção óssea em comparação à velocidade de aposição óssea. Conseqüentemente ocorre perda da massa óssea (ROBLING et al 2006).

Moriya et al. (1998) realizaram um estudo para verificar a relação entre osteoporose experimental e a perda óssea alveolar induzida por meio da ovariectomia em ratas com dieta padrão ou pobre em cálcio. Na densidade mineral, tanto na maxila quanto na mandíbula, foi constatado que não houve uma diferença significativa entre os grupos SHAM e OVZ que receberam dieta padrão, mas os que receberam dieta deficiente em cálcio apresentavam menor massa óssea. Assim, concluíram que a osteoporose isoladamente não corresponde a um fator de perda óssea nestes ossos.

Os sintomas relacionados à deficiência estrogênica e suas conseqüentes doenças podem

ser tratados ou estabilizados com a terapia de reposição hormonal com 17 β -estradiol ou outros estrógenos, em combinação ou não com a progesterona (WUTTKE et al. 2002). Breitman et al. (2003) sugerem que dietas ricas em alimentos contendo isoflavonas e cálcio podem contribuir na manutenção da massa óssea em mulheres na pós-menopausa. Isoflavonas são fitoestrógenos (compostos não esteróides encontrados em diversos vegetais) presentes principalmente na soja que podem agir como agonistas dos estrógenos (ALVES, SILVA 2002).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da redução do esforço mastigatório e da dieta deficiente em cálcio na perda óssea decorrente da deficiência estrogênica, bem como da terapia de reposição estrogênica, do tratamento com isoflavonas da soja, e de sua associação na remodelação do osso maxilar de ratas ovariectomizadas.

Metodologia

Foram operadas e eutanasiadas 147 ratas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar), com 90 dias de idade, peso aproximado de 300g. Estes animais foram aleatoriamente divididos em:

a) ovariectomizados - constituído por 126 animais, os quais foram submetidos à ovariectomia;

b) Sham – constituído por 21 animais, os quais foram falsamente operados.

De acordo com o tratamento recebido os animais ovariectomizados foram ainda divididos em subgrupos:

a) Grupo isoflavonas (ISO) – constituído por 21 ratas, as quais receberam 15mg/Kg/dia, de extrato de isoflavonas a 40% via oral, alimentadas com ração comercial padrão;

b) Grupo Estrógeno (EST) - constituído por 21 ratas, as quais receberam 1mg/kg/dia de valerato de 17 β -estradiol via oral, alimentadas com ração comercial padrão;

c) Grupo Associação (ASS) - constituído por 21 ratas, as quais receberam 1mg/kg/dia de valerato de 17 β -estradiol associado a 15mg/Kg/dia de extrato de isoflavonas a 40% via oral, alimentadas com ração comercial padrão;

d) Grupo Ovariectomizado placebo (OVZ) - constituído por 21 ratas, as quais receberam placebo (água), via oral, alimentadas com ração comercial padrão.

e) Grupo Ração Moída (MOI) - constituído por 21 ratas, as quais receberam placebo (água), via oral, alimentadas com ração comercial moída;

f) Grupo Ração Especial (ESP) - constituído por 21 ratas, as quais receberam placebo (água) via oral, alimentadas com ração deficiente em cálcio (dieta AIN-93M 0,1% de cálcio e 0,5% de fósforo – RHOESTER – Indústria e Comércio Ltda).

Os animais do grupo Sham também receberam placebo (água) via oral, diariamente. Os sacrifícios ocorreram 3, 5 e 8 semanas após a ovariectomia.

Após 15 dias removeu-se o 1º molar inferior para reduzir o esforço mastigatório. No dia seguinte e 2 dias antes do sacrifício, injetou-se tetraciclina via intramuscular.

As maxilas esquerdas foram removidas, dissecadas, fixadas em solução de formol a 10% durante o tempo mínimo de 48 horas, radiografadas e incluídas em resina, em frascos de vidro. Estes frascos foram quebrados e os blocos cortados em Labcut. Os cortes obtidos foram colados em lâminas de plaxiglass incolor e estas fixadas em um dispositivo para desgaste, com o objetivo de se obter a mínima espessura com máximo de detalhes. Após este procedimento as lâminas foram coradas com azul de toluidina e fotografadas em microscópio de luz, para análise histomorfométrica com parâmetros estáticos, através do programa *Image-J* por planimetria por contagem de pontos.

Resultados

Os dados foram comparados estatisticamente segundo três abordagens. Na primeira considerou-se como variáveis os fatores ovariectomia

(presença ou ausência de hormônios ovarianos) e o tempo de sacrifício na remodelação óssea. Na segunda, considerou-se tratamento (placebo, estrógeno, isoflavonas, associação) e tempo de sacrifício na remodelação óssea das ratas ovariectomizadas. Na terceira, considerou-se os grupos ovariectomizados que receberam ração comercial padrão, ração comercial moída e ração deficiente em cálcio.

Para esses dados foi efetuado o teste ANOVA dois fatores. Sempre que a análise de variância revelava diferenças estatísticas, o teste de comparação múltipla de Tukey era efetuado.

Quando se comparou o grupo Sham ao OVZ, o teste ANOVA revelou diferenças com relação ao tempo de sacrifício (Tabela 1). O teste Tukey efetuado em seguida mostrou que aos 45 dias, o volume trabecular foi estatisticamente menor (Tabela 2).

Tabela 1 - ANOVA para os dados do volume trabecular tendo como variáveis o tempo de sacrifício e presença ou ausência dos hormônios ovarianos.

	Grau de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Tempo de Sacrifício	2	205,327	102,664	6,66	0,003
Hormônio	1	49,032	49,032	3,18	0,083
Interação	2	49,651	24,825	1,61	0,214
Erro	36	554,938	15,415		
Total	41	858,948			

Os animais ovariectomizados que receberam dieta moída e deficiente em cálcio diferiram daqueles que foram alimentados com dieta comercial padrão. Houve, também, interação entre o tempo de sacrifício e a dieta administrada (Tabela 3). O teste Tukey efetuado em seguida mostrou que o grupo MOI tinha menores médias de volume trabecular que o grupo OVZ (Tabela 4).

Tabela 2 – Análise de Tukey para os dados do volume trabecular tendo como variável o tempo de sacrifício

Tempo de Sacrifício	Média	Grupos homogêneos
7	43,749	A
21	43,160	A
45	38,792	B

Tabela 3 - Análise de variância para os dados de Histomorfometria com parâmetros estáticos da maxila na região do primeiro molar tendo como variáveis o tempo de sacrifício e as dietas.

	Grau de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Tempo de Sacrifício	2	394,69	147,346	1,68	0,196
Dieta	2	1005,27	502,637	5,73	0,006
Interação	4	1135,31	283,827	3,24	0,019
Erro	54	4737,07	87,724		
Total	62	7172,35			

Tabela 4 – Análise de Tukey para os dados do volume trabecular tendo como variável o tipo de ração

Tempo de Sacrifício	Média	Grupos homogêneos
OVZ	75.251	A
ESP	68.443	AB
MOI	65.760	B

Aos 7 dias a dieta pobre em cálcio favoreceu diminuição do volume trabecular. Contudo, com o decorrer do tempo, todos os grupos tiveram seus volumes trabeculares diminuídos (Tabela 5).

Tabela 5 - Teste de Tukey para os dados do volume tendo como variáveis a dieta e o tempo de sacrifício *médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

GRUPO	TEMPO	MÉDIA	GRUPOS HOMOGÊNEOS
OVZ	7	83.856	A
OVZ	21	74.666	AB
OVZ	45	67.231	B
ESP	7	66.616	B
ESP	21	70.253	AB
ESP	45	68.461	AB
MOI	7	68.147	AB
MOI	21	59.546	B
MOI	45	69.589	AB

Discussão

Novos conhecimentos que possam orientar as condutas terapêuticas dos profissionais da saúde para o atendimento de mulheres com osteoporose pós-menopáusicas podem contribuir para a melhoria da qualidade de vida destas pacientes. Justifica-se assim, a contínua busca de novos conhecimentos sobre o papel da deficiência estrogênica no processo de remodelação óssea alveolar por diversas metodologias, que foi alvo deste estudo.

Utilizaram-se sete grupos experimentais diferentes, com três períodos de sacrifício em cada um deles. O primeiro foi o grupo controle falso-ovariectomizado (SHAM), o segundo, o grupo ovariectomizado controle (OVZ), que recebeu água como placebo e ração padrão. O terceiro grupo recebeu estrógeno e ração padrão (EST), o quarto, extrato de isoflavonas da soja e ração padrão (ISO) e o quinto, associação do hormônio e do fitohormônio e ração padrão (ASS). O sexto grupo recebeu água como placebo e dieta deficiente em cálcio (ESP) e o último água como placebo e ração padrão moída (MOI). Sendo assim, objetivava-se explorar a ação dos tratamentos com isoflavonas da soja e sua associação ao estrógeno e esclarecer o papel da deficiência em cálcio na perda óssea maxilar induzida por ovariectomia, bem como uma possível forma de redução do esforço mastigatório para a adequação do modelo experimental.

Na análise estatística com parâmetros estáticos verificou-se ligeira superioridade no grupo SHAM, contudo, sem significância estatística. A dificuldade de obtenção de alterações osteopênicas nos ossos gnáticos de roedores é muito discutida. Por este motivo, utilizou-se a extração do primeiro molar mandibular em todos os grupos experimentais, para diminuir o esforço mastigatório, favorecendo a perda óssea.

A administração dos medicamentos foi empregada nos grupos ovariectomizados para tratar a perda óssea, porém, esta não foi estatisticamente significativa. Aparentemente, o tratamento empregado não teve efeitos sobre o tecido ósseo da região do septo inter-radicular do primeiro molar maxilar esquerdo. Os benefícios da terapia com isoflavonas da soja sobre o tecido ósseo são motivo de grande discussão (ALVES, SILVA 2002). Cai et al. (2005). compararam as proteínas e as isoflavonas da soja com o estrógeno, percebendo que somente o estrógeno tem efeito preventivo na remodelação óssea decorrente da deficiência estrogênica nos animais ovariectomizados.

Os resultados do volume trabecular dos animais que receberam ração deficiente em cálcio foram inesperados, uma vez que a literatura relata perda óssea acentuada utilizando esta

metodologia (TEÓFILO et al., MORIYA et al., HARA et al.). Observou-se que a média do grupo ESP foi inferior à do grupo OVZ, mas sem significância estatística. Diante disso, acredita-se que uma técnica mais sensível, que permita análise detalhada da região, com a observação de um número maior de níveis histológicos talvez apresente resultados mais refinados.

A diminuição do volume trabecular no grupo ovariectomizado que recebeu ração padrão moída, quando comparado ao que recebeu ração padrão confere uma informação importante para os futuros trabalhos sobre remodelação óssea maxilar com ovariectomia. O esforço mastigatório já fora relacionado com a diminuição da perda óssea na literatura e, como alternativa para redução desse esforço, Zaffe et al., Ejiri et al. e Elovic (1999) removeram molares em associação à cirurgia de ovariectomia para obtenção de perda óssea nos ossos maxilares. Considerando-se o sofrimento do animal no pós-operatório, bem como o tempo despendido para tal procedimento, a simples administração da ração moída mostra-se uma metodologia mais adequada para a mesma finalidade. O volume trabecular das ratas que receberam a ração especial foi ligeiramente superior àquele encontrado nas ratas alimentadas com ração moída. Este fato pode ser devido à consistência extremamente rígida da dieta especial. Talvez este seja o motivo pelo qual a deficiência em cálcio não tenha causado perda óssea considerável nas ratas, uma vez que a dieta deficiente em cálcio utilizada não foi moída.

Conclusão

Concluiu-se que a ovariectomia não causou perda óssea maxilar na região do primeiro molar, os medicamentos, nas doses administradas, não tiveram efeito na remodelação óssea maxilar, a ração deficiente em cálcio não colaborou com perda óssea adicional no modelo utilizado, porém causou aumento da taxa de aposição mineral óssea diária, provavelmente em virtude de sua consistência e, a ração comercial moída mostrou-se uma boa alternativa para o estudo da perda óssea maxilar em ratas ovariectomizadas.

Referências

- ALVES, DL; SILVA, RC. Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal. São Paulo: Atheneu, 2002. 105p.
- BREITMAN PL; FONSECA, D; CHEUNG, AM, WARDA, WE. Isoflavones with supplemental calcium provide greater protection against the loss of bone mass and strength after ovariectomy compared to isoflavones alone Bone 33. 2003 Oct;33(4):597-605.

- CAI, DJ; ZHAO, Y; GLASIER, J; CULLEN, D; BARNES, S; TURNER, CH; WASTNEY, M; WEAVER, CM. Comparative effect of soy protein, soy isoflavones, and 17beta-estradiol on bone metabolism in adult ovariectomized rats. J Bone Miner Res. 2005 May, 20(5): 828-39.
- EJITI, S; TOYOOKA, E; TANAKA, M; ANWAR, RB; KOHNO, S. Histological and histomorphometrical changes in rat alveolar bone following antagonistic tooth extraction and/or ovariectomy. Archives of Oral Biology, v.51, p. 941—950, 2006.
- ELOVIC, RP; HIPPI, JA; HAYES, WC. Maxillary molar extraction causes increased bone loss in the mandible of ovariectomized rats. J Bone Miner Res. 1995 Jul;10(7):1087-93.
- HADJIDAKIS, DJ; ANDROULAKIS II. Bone remodeling. Ann N Y Acad Sci. 2006 Dec;1092:385-96. ure of the mandible in newborn mice. Eur J of Ortho. 2006 Apr; 28(2):190-4.
- HARA, T; SATO, T; OKA, M; MORI, S; SHIRAI, H. Effects of ovariectomy and/or dietary calcium deficiency on bone dynamics in the rat hard palate, mandible and proximal tibia. Arch Oral Biol. 2001 May;46(5):443-51.
- LERNER, UH. Bone Remodeling in Postmenopausal Osteoporosis. J Dent Res. 2006 Jul, 85(7):584-95.
- MORIYA, Y; ITO, K; MURAI, S. Effects of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. J Oral Sci. 1998 Dec;40(4):171-5.
- ROBLING, AG; CASTILHO, AB; TURNER, CH. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2006, 8:455- 98.
- TEÓFILO, JM; AZEVEDO, AC; PETENUSCI, SO; MAZARO, R; LAMANO-CARVALHO, TL. Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxilla and proximal tibia of female rats. Pesqui Odontol Bras. 2003 Oct-Dec;17(4):302-6.
- WUTTKE, W; JARRY, H; BECKER, T; SCHULTENS, A; CHRISTOFFEL, V; GORKOW, C; SEIDLOVA-WUTTKE, D. Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? Maturitas, v.44, suppl.1, p.9s-20s, 2003.
- ZAFFE, D. et al. Induction and pharmacological treatment of oral osteopenia in rats. Minerva Stomatol, v.48, n.3, p.45-62, Mar. 1999.