

## EFEITOS DE DIFERENTES DIETAS NA REMODELAÇÃO ÓSSEA DA MAXILA DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

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

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, deise\_sjc@hotmail.com

**Resumo-** A osteoporose caracteriza-se por perda óssea principalmente em mulheres pós-menopausa. Empregou-se o modelo experimental de osteoporose em ratas para elucidar os efeitos da deficiência hormonal e da dieta na maxila. Utilizaram-se 84 ratas, sendo 63 ovariectomizadas (OVZ) e 21 falso operadas (Sham). As OVZ receberam ração pobre em cálcio, comercial padrão ou moída e as SHAM ração padrão. 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 intramuscular. Os sacrifícios ocorreram 3, 5 e 8 semanas após ovariectomia. Após inclusão em resina analisou-se a taxa de aposição óssea, por microscopia de fluorescência. Mediu-se a distância entre 2 linhas de tetraciclina nas trabéculas, pelo programa *Image J*. O ANOVA não revelou diferenças entre os grupos Sham e OVZ. Houve significativo declínio na taxa de aposição com o tempo ( $p=0,000$ ). O grupo da dieta pobre em cálcio teve maior taxa de aposição mineral ( $p=0,000$ ). Conclui-se que deficiência hormonal e redução do esforço mastigatório não alteram aposição mineral óssea. Apesar da extração do 1º molar inferior, a consistência enrijecida da dieta pobre em cálcio favoreceu aposição mineral óssea na região do antagonista, provavelmente por dissipação de forças incidentes sobre o 2º molar superior.

**Palavras-chave:** ossos maxilares, remodelação óssea, ovariectomia, osteoporose

**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 e os ossos tornam-se susceptíveis às fraturas. Apesar de poder ser secundária a várias condições, as formas de osteoporose mais comuns são as que se desenvolvem no envelhecimento e na pós-menopausa (Rosenber, 2005). 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).

A consistência da alimentação foi alvo do estudo de Yamamoto (1996) no qual foram determinados o posicionamento dentário e parâmetros histomorfométricos em ratos em fase de crescimento, que foram submetidos à dieta líquida em comparação ao grupo controle. Sendo assim o autor deu ênfase no estudo do crescimento maxilar, encontrando diferenças significativas nos níveis e nos locais de aposição óssea conforme o tipo de dieta. 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.

Portanto 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,

### Materiais e Métodos

Foram operadas e eutanasiadas 84 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar) com 90 dias de idade, peso aproximado de 300g. Estes animais foram aleatoriamente divididos em:

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

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

c) 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 21 animais do grupo SHAM também receberam placebo (água) via oral, diariamente. 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. Após inclusão em resina analisou-se a taxa de aposição óssea, por microscopia de fluorescência. Mediu-se a distância entre 2 linhas de tetraciclina nas trabéculas, pelo programa *Image J*.

### Resultados

Os cortes ainda não corados foram fotografados em microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com ocular de 10x e objetiva de 40X, digitalizadas utilizando-se câmera digital Sony (modelo Cybershot), acoplada ao microscópio. A análise histomorfométrica utilizou o programa *Image-J*. Foi medida a distância entre as duas marcações de tetraciclina (Figura 4a e 4b) em três locais diferentes, em aproximadamente 10 campos para cada animal, e obtida uma média. Tais campos localizavam-se nas proximidades do primeiro molar maxilar esquerdo. A média foi dividida pelo intervalo de tempo entre os dois períodos de administração do marcador ósseo, e obtida a taxa de aposição mineral diária expressa em micrômetros por dia.

Os dados foram comparados estatisticamente segundo duas abordagens. Na primeira, foram considerados os efeitos dos fatores: ovariectomia e do tempo de sacrifício na remodelação óssea, e efetuado o teste de análise de variância (ANOVA, dois fatores). Na segunda abordagem, os grupos ovariectomizados que receberam ração comercial padrão, ração comercial moída e ração deficiente em cálcio foram comparados pelo teste de análise de variância (ANOVA, dois fatores – tempo de sacrifício e dieta). Sempre que a análise de variância revelava diferenças estatísticas, o teste de comparação múltipla de Tukey era efetuado.

O teste ANOVA (Tabela 1) revelou diferenças entre os grupos SHAM e OVZ com relação ao tempo de sacrifício, mas não em relação à ovariectomia.

	Grau de	Soma dos	Quadra do	F	p
--	---------	----------	-----------	---	---

	liberdade	Quadrados	Médio		
Tempo de Sacrifício	2	304,955	152,477	493,38	0,00
Hormônio	1	0,504	0,504	1,63	0,21
Interação	2	1,000	0,500	1,62	0,21
Erro	36	11,126	0,309		
Total	41	317,584			

Tabela 1 – ANOVA dois fatores, para os dados das taxas de aposição mineral diária, tendo como variáveis o tempo de sacrifício e presença ou ausência dos hormônios ovarianos

O teste de Tukey (Tabela 2) efetuado em seguida mostrou que taxa de aposição mineral diária decaía com o decorrer do tempo, não diferindo entre os grupos SHAM e OVZ.

Tempo de Sacrifício	Média	Grupos homogêneos
7	6,8464	A
21	1,6236	B
45	0,7400	C

Tabela 2 – Teste de Tukey para os dados referentes à taxa de aposição mineral diária entre os grupos SHAM e OVZ, com relação ao tempo de sacrifício. \*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

A comparação pelo teste ANOVA (Tabela 3) revelou diferenças estatísticas entre os grupos ovariectomizados com relação às dietas ingeridas após a ovariectomia. Os animais ovariectomizados que receberam dieta moída e deficiente em cálcio diferiram daqueles que foram alimentados com dieta comercial padrão. O fator tempo de sacrifício, bem como a interação entre o tempo e o tipo de dieta também foram significantes.

	Grau de liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Tempo de Sacrifício	2	416,749	208,375	554,65	0,000
dieta	2	60,196	30,098	80,11	0,000
Interação	4	83,461	20,865	55,54	0,000
Erro	54	20,287	0,376		
Total	62	580,693			

Tabela 3 - Análise de variância para os dados referentes à taxa de aposição mineral diária dos grupos, tendo como variáveis o tempo de sacrifício e as dietas.

Com relação à dieta, os grupos MOI e OVZ foram semelhantes entre si e estatisticamente diferentes do grupo ESP, de acordo com o teste de Tukey (Tabela 4).

Hormônio	Média	Grupos homogêneos
ESP	5,2033	A
OVZ	3,1795	B
MOI	3,0833	B

Tabela 4 – Análise de Tukey para os dados referentes à taxa de aposição mineral diária entre os grupos ovariectomizados e as dietas ingeridas com relação ao tempo de sacrifício. \*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

Verificou-se que os grupos tiveram taxas de aposição decaindo com o decorrer do tempo de acordo com o teste de Tukey (Tabela 5).

Tempo de Sacrifício	Média	Grupos homogêneos
7	7,0162	A
21	3,7319	B
45	0,7181	C

Tabela 5 – Análise de Tukey para os dados referentes à taxa de aposição mineral diária tendo como variável o tempo de sacrifício. \*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

A Tabela 6 mostra que os grupos ESP, OVZ e MOI aos 7 dias foram estatisticamente semelhantes entre si. Aos 21 dias, os grupos OVZ e MOI foram estatisticamente semelhantes entre si e diferentes do grupo ESP. Aos 45 dias todos os grupos foram estatisticamente semelhantes entre si.

Hormônio	Tempo de Sacrifício	Média	Grupos homogêneos
ESP	7	7,4586	A
ESP	21	7,3971	A
OVZ	7	6,9829	A
MOI	7	6,6071	A
OVZ	21	1,9071	B
MOI	21	1,8914	B
ESP	45	0,7543	C
MOI	45	0,7514	C
OVZ	45	0,6486	C

Tabela 6 – Análise de Tukey para os dados referentes à taxa de aposição mineral diária tendo como variáveis o tempo de sacrifício e presença ou ausência dos hormônios ovarianos. \*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

### 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.

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. O mesmo ocorreu na análise radiográfica. 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. Sendo assim, considera-se de grande interesse a comparação dos resultados histomorfométricos obtidos neste estudo baseados na análise de cortes de material não desmineralizado com aqueles que poderiam ser obtidos a partir de material desmineralizado.

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 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. Os estudos encontrados na literatura sobre a consistência da dieta não utilizaram esta estratégia em ratas ovariectomizadas com o intuito de provocar maior perda óssea, mas sim, verificaram alterações no desenvolvimento ósseo de animais em crescimento (Yamamoto et al.).

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. Em outro estudo deste grupo de pesquisa, tal ração foi moída para administração aos animais, o que foi de grande dificuldade, utilizando-se um moedor de café manual, diferentemente da ração comercial, que facilmente fragmenta-se. Talvez este seja o motivo pelo qual a deficiência em cálcio não causou perda óssea considerável nas ratas, uma vez que a dieta deficiente em cálcio utilizada não foi moída.

A comparação das dietas mostrou que o grupo que recebeu a dieta deficiente em cálcio teve maior taxa de aposição mineral diária. Acredita-se que deficiência hormonal e a redução do esforço mastigatório não alteram a aposição mineral óssea. Apesar da extração do 1º molar inferior, a consistência enrijecida da dieta deficiente em cálcio favoreceu a aposição mineral óssea na região do antagonista, provavelmente por dissipação de forças incidentes sobre os outros molares superiores.

### Conclusão

Conclui-se que a ovariectomia não causa perda óssea maxilar na região do primeiro molar, mesmo na ausência do dente antagonista, a ração deficiente em cálcio não colabora com perda óssea adicional no modelo utilizado, mas causa aumento da taxa de aposição mineral óssea diária, provavelmente em virtude de sua consistência, a ração comercial moída mostra-se uma boa alternativa para o estudo da perda óssea maxilar em ratas ovariectomizadas.

### Referências

- Rosenber AE. Bone, joints and soft tissue tumors. In: Kumar,V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of disease.

Philadelphia: Elsevier Saunders; 2005. p.1273-325.

- 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.

- Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2006, 8:455- 98.

- Yamamoto S. The effects of food consistency on maxillary growth in rats. Eur J Orthod. 1996 Dec;18(6):601-15.

- 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.

- 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.

- 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.

- Zaffe, D. et al. Induction and pharmacological treatment of oral osteopenia in rats. Minerva Stomatol, v.48, n.3, p.45-62, Mar. 1999.

- Ejiri 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, Hipp 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.