EDUARDO MASSAHARU AOKI

Efeitos da remoção do disco e cartilagem articular no crescimento e
microarquitetura óssea da mandíbula de ratos: análise por microtomografia

São Paulo
2015

EDUARDO MASSAHARU AOKI

**Efeitos da remoção do disco e cartilagem articular no crescimento
e microarquitetura óssea da mandíbula de ratos: análise por
microtomografia**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia da
Universidade de São Paulo, em
ciências, para obter o título de
Mestre, pelo Programa de Pós-
Graduação em Odontologia

Área de concentração: Diagnóstico
Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Emiko
Saito Arita

São Paulo
2015

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.

Catálogo-na-Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Aoki, Eduardo Massaharu.

Efeitos da remoção do disco e cartilagem articular no crescimento e microarquitetura óssea da mandíbula de ratos: análise por microtomografia / Eduardo Massaharu Aoki ; orientador Emiko Saito Arita. -- São Paulo, 2015.

56 p. : fig., tab., graf. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Bucal.

Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Disfunção temporomandibular. 2. Crescimento e desenvolvimento. 3. Disco articular. 4. Cartilagem articular. 5. Microtomografia. I. Arita, Emiko Saito. II. Título.

Aoki EM. Efeitos da remoção do disco e cartilagem articular no crescimento e microarquitetura óssea da mandíbula de ratos: análise por microtomografia. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Diagnóstico Bucal).

Aprovado em: 17 / 02 / 2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Emiko Saito Arita

Instituição: FOU SP   Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Jefferson Xavier Oliveira

Instituição: FOU SP   Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Alael Barreiro Fernandes de Paiva Lino

Instituição: SPO   Julgamento: Aprovado

À minha esposa Paula, meu amor, minha amiga e companheira, uma mãe exemplar
para nossos filhos Helena e Bruno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Goichi Aoki e Catharina, pelo carinho e valores transmitidos.

Em especial à minha mãe e à minha sogra Luiza pelo suporte e compreensão neste período de grandes mudanças. Sem vocês, este trabalho não seria possível.

À minha orientadora, Dra. Emiko Saito Arita, pelos ensinamentos e paciência. Você me ensinou muito mais do que ser apenas um bom pesquisador. Você mostrou o lado humano, os valores e o caráter que precisamos aprimorar durante a vida. Muito obrigado.

Ao professor Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz e ao Dr. Henrique de Carvalho Petean, por cederem o material utilizado nesta dissertação.

Aos meus amigos Arthur Rodriguez Gonzales Cortes, pelos ensinamentos, por acreditar em mim e pelos excelentes momentos vividos até aqui. Reinaldo Abdala Junior, pela amizade, companheirismo, generosidade e todo suporte que precisei neste curso, em especial neste trabalho.

Aos Professores da Disciplina de Radiologia, Dr. Jefferson Xavier de Oliveira, Dr. Claudio Costa, Dra. Marlene Fenyo Soeiro de Matos Pereira, Dr. Cesar Angelo Lascala, Dr. Claudio Fróes de Freitas, Dr. Israel Chilvarquer e Dr. Marcelo Cavalcanti pelos ensinamentos e apoio durante o curso.

Aos meus amigos de Pós-Graduação, Marina Gazzano Baladi, Rodrigo Alves Ribeiro, Jessica Rabelo Mina Zambrana, Daniela Richarte, Denise Sabbagh Haddad, Guilherme Terra e Karina Cecília Panelli Santos, Gilberto Araújo Noro Filho, pelos momentos que tornaram este curso, muito mais agradável e prazeroso, sem nunca esquecer do aprendizado que construímos juntos.

Aos professores do curso de Especialização em Ortodontia da Sociedade Paulista de Ortodontia, Vanda Beatriz T. C. Domingos, Alael Barreiro Fernandes de Paiva Lino, Gennaro Napolitano e Vera Terra pelo apoio e incentivo.

À secretária da Disciplina Cidinha, por todo carinho e atenção. Nosso anjo da guarda no Departamento.

Aos bibliotecários pela revisão do texto em diversos momentos.

À instituição de fomento e pesquisa CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

Aoki EM. Efeitos da remoção do disco e cartilagem articular no crescimento e microarquitetura óssea da mandíbula de ratos: análise por microtomografia [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

Alterações na articulação temporomandibular (ATM) comumente geram desequilíbrios musculares que estão associados à alterações no tecido ósseo. Esta articulação pode sofrer a influência de traumas, fatores congênitos ou desordens de crescimento. Estudos sobre alterações de crescimento do complexo maxilo-mandibular decorrentes de problemas da ATM são escassos. O objetivo deste trabalho foi avaliar por meio da microtomografia os efeitos da remoção do disco articular e a remoção conjugada do disco e cartilagem articular no crescimento e na microarquitetura óssea da mandíbula de ratos. Trinta ratos da raça *Wistar* com um mês de idade foram divididos em três grupos: CTR (controle operado); RD (remoção de disco articular) e RDC (remoção conjugada do disco e cartilagem articular). Apenas o lado direito foi operado; o lado esquerdo permaneceu intacto. Após dois meses de acompanhamento, os ratos foram sacrificados e as hemimandíbulas escaneadas em microtomógrafo. A remoção do disco articular e a remoção conjugada do disco e cartilagem articular alteram o volume e microestrutura do osso trabecular da mandíbula de ratos jovens. Estas duas intervenções provocaram uma queda na qualidade de parâmetros da microestrutura do trabeculado do processo angular e diminuição do crescimento da hemimandíbula do lado operado.

Palavras-chave: Disfunção Temporomandibular. Crescimento e desenvolvimento. Disco articular. Cartilagem articular. Microtomografia

ABSTRACT

Aoki EM. Effects of articular disc and cartilage removal on mandible of growing rats: a micro-computed tomography study [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão corrigida.

Changes in the temporomandibular joint (TMJ) lead to muscle dysfunctions that are associated with bone changes. This joint region can be influenced by trauma, congenital factors or growth disorders. Studies linking TMJ problems and growth alterations are scarce. The aim of this study was to evaluate the effects of the articular disc removal or articular disc and cartilage removal on the bone microarchitecture and mandibular growth of young rats. Thirty Wistar rats (one month old) were divided into three groups: CTR (sham operated); RD (disc removal) and RDC (disc and cartilage removal). Only the right side was operated, keeping the left side intact. After two months, the rats were sacrificed and the mandibles scanned on micro-CT for quantitative analysis. Some microstructural parameters were altered by the disc removal or disc and cartilage removal. The right side presented lower growth than the left side.

Keywords: Temporomandibular disorder. Facial growth. Articular disc. Articular cartilage. Micro-computed tomography.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATM	Articulação temporomandibular
BV	Bone Volume (volume ósseo)
BV/TV	Bone volume fraction (fração óssea volumétrica)
CM	Cabeça da mandíbula
Conn.D	Conectividade por densidade
CTR	Grupo controle
DTM	Disfunções temporomandibulares
FD	Fractal Dimension (dimensão fractal)
g	Gramas
Kvp	Kilovolt pico
mA	Miliampere
mm	milímetro
mm ²	milímetro quadrado
mm ³	milímetro cúbico
PVC	Policloreto de polivinila
RD	Grupo remoção de disco articular
RDC	Grupo remoção de disco e cartilagem articular
ROI	Region of interest (região de interesse)
Tb.N	Trabecular Number (número de trabéculas)

Tb.Sp	Trabecular Separation (separação das trabéculas)
Tb.Th	Trabecular Thickness (espessura trabecular)
TV	Tissue volume (volume do tecido)
TV tot	Volume total da hemimandíbula
VOI	Volume de Interesse
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Alterações de ATM durante o crescimento	13
2.2 Crescimento mandibular: importância do disco /cartilagem articular e musculatura	15
2.3 Análise morfométrica do tecido ósseo.....	19
3 PROPOSIÇÃO	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Cirurgia	24
4.2 Micro-CT	25
4.3 Seleção do volume de interesse (VOI) – Processo angular	26
4.4 Análise da microarquitetura trabecular óssea em 3D.....	28
4.5 Análise estatística.....	29
5 RESULTADOS	31
5.1 Comparação entre lados	31
5.3 Peso corpóreo	44
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO.....	57

1 INTRODUÇÃO

A função mastigatória e a harmonia facial são notadamente influenciadas pelo tamanho e a morfologia mandibular. A cabeça da mandíbula e o disco articular são componentes da articulação temporomandibular (ATM) e desempenham uma função significativa no desenvolvimento do complexo orofacial recebendo atenção em pesquisas nas especialidades odontológicas.

A ATM é uma articulação sinovial, e por ela ocorre a junção entre o crânio e a mandíbula. Ela é composta pela cabeça da mandíbula (CM) que se articula na fossa mandibular do osso temporal e ambas as superfícies articulares são cobertas por cartilagem. O disco articular encontra-se entre a cabeça da mandíbula e fossa do temporal e é formado em sua maioria por um tecido conjuntivo denso fibroso, praticamente destituído de vasos sanguíneos e feixes nervosos (1) .

A cartilagem que reveste a estrutura condilar promove o crescimento ósseo endocondral, sendo considerada um centro de crescimento e adaptação regional. Histologicamente, ela é caracterizada como uma fibrocartilagem, contendo uma camada de células mesenquimais de pré-condroblastos, distribuída não linearmente, que pode sofrer diferenciação rápida em condrócitos ou osteoblastos. Isto confere à ATM um crescimento em função adaptativa que é influenciado por forças mecânicas que atuam sobre células e tecidos estruturais (atividade muscular, mastigação e deglutição) (2-4).

Lesões que afetam a ATM ou os músculos mastigatórios, na fase de crescimento, podem afetar o crescimento dos ossos gnáticos. Estas lesões podem levar à destruição dos componentes articulares entre eles, cabeça da mandíbula, disco e cartilagem articular e, conseqüentemente, levar a alterações da morfologia e qualidade óssea. Traumas, anquilose, hiperplasia condilar e a artrite juvenil idiopática podem ser causadores de lesões da ATM em pacientes em crescimento, (5, 6) sendo os exames imaginológicos de grande importância no tratamento e diagnóstico destes problemas.

A microtomografia (μ CT) é ser considerada uma técnica acurada para análise da morfologia e qualidade óssea. Ela permite a reconstrução detalhada das estruturas em três dimensões (3D) com resolução de micrômetros, fornecendo dados morfométricos do trabeculado, sendo possível estimar as propriedades mecânicas da amostra (7-9).

Existem diversos estudos em modelo animal investigando a influência da remoção de disco e cartilagem articular no crescimento mandibular. Alguns estudos investigam a qualidade óssea da cabeça da mandíbula e outros investigam a simetria mandibular (por medidas lineares). Porém, são escassos os estudos que visam entender melhor os reflexos de alterações ou remoção destes importantes componentes articulares no tecido ósseo da mandíbula de ratos em crescimento..

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura foi dividida em três tópicos para melhor entendimento. São eles:

- Alterações de ATM durante o crescimento
- Crescimento mandibular: importância do disco /cartilagem articular e musculatura
- Análise morfométrica do tecido ósseo

2.1 Alterações de ATM durante o crescimento

Por muitas vezes, a assimetria facial decorre de um desequilíbrio no crescimento mandibular. Isto pode ser originado por fatores congênitos, como em síndromes, ou então ocorrer no período de crescimento e desenvolvimento do indivíduo como em caso de traumas, disfunções da articulação temporomandibular (DTM) ou desordens de crescimento primárias (10-13).

Dentre as malformações congênitas, a microsomia hemifacial está entre as mais prevalentes, seguida da Síndrome de Treacher Collins e Pierre Robin. Em todas estas, ocorre o hipodesenvolvimento mandibular ou até micrognatia. Existem também síndromes associadas ao crescimento exagerado da mandíbula como na acromegalia e síndrome de Klinefelter (14).

Estudos epidemiológicos indicam que os jovens de 21 a 30 anos são os que apresentam maior incidência de fraturas de mandíbula, seguidos pelo grupo de crianças e adolescentes, sendo os acidentes automobilísticos a principal causa dos traumas (15, 16). Geralmente, com o tratamento de redução, o prognóstico dessas fraturas é favorável em indivíduos em crescimento (17). Porém, em muitos casos, a fratura cria um desequilíbrio no sistema neuromuscular, podendo levar às assimetrias faciais futuras (18). Em um estudo retrospectivo com 109 pacientes

ortodônticos que foram submetidos a cirurgia ortognática, foi demonstrada uma associação significativa entre trauma pré-puberal e assimetria mandibular (19).

Entre os distúrbios do crescimento mandibular, a artrite juvenil idiopática é uma das causas de assimetrias faciais adquiridas. Esta doença tem caráter inflamatório e crônico. Sua etiologia ainda é desconhecida. No entanto, está claro que ela possui características autoimunes (14). Lesões nas camadas condral e subcondral da cartilagem articular estão entre as características desta patologia e muitas vezes podem evoluir para a reabsorção condilar. As consequências da artrite juvenil idiopática incluem distúrbios no crescimento mandibular e alterações visíveis na morfologia craniofacial e oclusão, sendo características, a presença de grande convexidade facial, micrognatia e retrognatia. Em um estudo prospectivo (5), os autores avaliaram radiografias panorâmicas e cefalogramas laterais da ATM de 100 pacientes com artrite juvenil idiopática que estavam sob tratamento ortodôntico. Foi demonstrado que o envolvimento da ATM e de lesões condilares são frequentes (78%) em pacientes portadores de artrite juvenil idiopática e que essas alterações no côndilo podem levar às alterações faciais. Os autores ressaltam a importância do acompanhamento regular desses pacientes, por meio de exames de imagens por um ortodontista, durante o seu crescimento.

A hiperplasia condilar é caracterizada como um crescimento patológico exagerado da cabeça da mandíbula e pode acometer uma ou ambas. Essa patologia pode afetar o tamanho e formato da mandíbula levando a alterações na mastigação e indiretamente influenciando também a maxila. A hiperplasia condilar pode estar associada às disfunções hormonais e tumores benignos e malignos. Seu tratamento compreende condilectomia alta ou baixa, reposicionamento do disco e cirurgia ortognática (20, 21).

Muito do conhecimento científico produzido sobre a ATM se deve às pesquisas em ATM humana, que geralmente são provenientes de autópsias. Porém, isso dificulta a obtenção de dados clínicos, impossibilitando avaliações mais profundas sobre a história pregressa da doença (22). Assim, pesquisas utilizando o modelo animal tornam-se valiosas fontes de estudo (23), pois possibilitam a padronização de protocolos operacionais relativos à idade, sexo, raça e estágio da doença (24, 25).

A ATM normal de ratos foi comparada com a humana pelo ponto de vista macro e microscópico por Porto et al (26) Os autores concluíram que morfológica e histologicamente, a estrutura articular dos ratos é semelhante à de humanos e pode ser usada como modelo animal de estudo A ausência de eminência articular nos ratos é uma das principais diferenças.

2.2 Crescimento mandibular: importância do disco /cartilagem articular e musculatura

O disco articular é responsável pela manutenção do equilíbrio da ATM e dissipação das forças mastigatórias. Ele é composto por um tecido fibrocartilaginoso e situa-se entre a CM e fossa articular. O disco possui formato bicôncavo sendo mais largo no sentido mediolateral do que anteroposterior. Histologicamente é formado por populações de fibrocondrócitos, fibrócitos e fibroblastos (27, 28). A manutenção do equilíbrio da articulação e dissipação das forças mastigatórias estão entre suas principais funções (29).

Outras funções do disco articular ficam evidenciadas em pesquisas em animais. Foi observado que a integridade do disco articular permite uma reparação mais favorável em casos de fratura do processo condilar (6, 30). Por possuírem estreita relação com a cabeça da mandíbula, os autores creditam que a cápsula e disco articular desempenharam um papel fundamental na reparação, reduzindo a fratura e realinhando de forma correta o fragmento deslocado. Em caso de deslocamento anterior bilateral do disco articular em coelhos em crescimento, os autores observaram que a severidade das alterações histológicas na cartilagem condilar são inversamente correlacionadas ao crescimento mandibular, ou seja, quanto maior a alteração encontrada, menor foi o crescimento da mandíbula (31).

Estudos clínicos sugerem que desarranjos articulares, como o deslocamento de disco, estão associados à assimetria facial em crianças e adolescentes (32, 33). Este fato reforça que um correto posicionamento do disco articular, proporciona as

melhores condições para que a cartilagem articular exerça seu papel no crescimento seja estrutural ou adaptativo (31).

No complexo maxilofacial, o tecido cartilaginoso presente nas suturas (esfeno-ocipital; nasal) e na CM cumpre papel de importante centro de crescimento endocondral das estruturas ósseas. Em especial, a cartilagem que reveste a estrutura condilar possui características únicas que conferem a esta múltiplas funções como: crescimento, desenvolvimento e adaptação às forças mecânicas (2-4).

Histologicamente, a cartilagem condilar é classificada como uma fibrocartilagem, composta de células dispostas em camadas quatro camadas em diversos estágios de maturação condrogênica. São elas: zona fibrosa, proliferativa, madura e hipertrófica. A zona fibrosa, composta por fibroblastos e densas fibras de colágeno tipo I (34), semelhantes aos tendões e ligamentos, confere resistência mecânica à cartilagem (35). A zona proliferativa, composta por células mesenquimais indiferenciadas funciona como um reservatório de células, sendo estas diferenciadas de acordo com a demanda funcional da ATM. Já as zonas madura e hipertrófica, formadas por condrócitos diferenciados e colágeno tipo I e II (36), cumprem o papel de crescimento e remodelamento ósseo (4).

Mecanotransdução é a resposta bioquímica de uma célula frente a um estímulo mecânico (37, 38). Na cartilagem condilar, a mecanotransdução ocorre pela interação entre as integrinas (receptores de membrana) presentes nos condrócitos e os estímulos mecânicos ocorridos na ATM. Modificações celulares são alcançadas por mediadores bioquímicos liberados nesta interação (39, 40).

Forças mecânicas podem modular o crescimento mandibular quando aplicadas durante o período de crescimento (41). Estudos mostram que, em animais jovens, a ATM e principalmente a cartilagem condilar apresentam um crescimento compensatório em resposta às modificações no padrão oclusal. Isso fica claro em estudos que modificaram a consistência do alimento. A diminuição da consistência na dieta dos animais resultou em menor atividade do masseter (aferida por radiotelemetria) e também na diminuição da espessura da cartilagem articular, junto de um déficit de crescimento mandibular de ratos (42-44).

O avanço mandibular por meio de aparelhos ortopédicos é a base do tratamento ortodôntico e ortopédico em casos de discrepâncias maxilomandibulares. Este tipo de estímulo provoca a remodelação adaptativa (neoformação óssea) da cartilagem condilar e fossa articular (45, 46). Um dos mecanismos de neoformação óssea ocorre pela ativação de fatores endógenos das células, estimulando a ossificação endocondral na CM e intramembranosa na fossa articular (45).

Uma prova da adaptação da mandíbula em sua nova posição mais protruída é o aumento de diferenciações hipertróficas na CM e cavidade glenóide, identificadas em estudo de imunohistoquímica. Estas regiões hipertróficas estão claramente relacionadas com a neoformação óssea (47). O uso de aparelhos de avanço estimulou o crescimento mandibular mesmo em ratos que sofreram condilectomia bilateral no entanto, apresentaram menor crescimento quando comparadas com a mandíbula de ratos do grupo controle (sem condilectomia) (48).

Assim como os estímulos mecânicos estimulam a proliferação celular e o seu crescimento, a ausência dos estímulos exercem um impacto negativo nas articulações. Pesquisas em animais mostram que a imobilização de articulações provocou a diminuição na espessura e resiliência da cartilagem articular. Porém, a partir de duas semanas, sinais de recuperação da cartilagem foram observados após a remobilização da articulação (49-51).

Os músculos da mastigação também possuem papel fundamental no crescimento mandibular. Por isso, pesquisas envolvendo esta cadeia muscular são de grande valia para o entendimento do tema. A ressecção bilateral do masseter ou reposicionamento, provocou em ratos o aumento do ângulo goníaco e diminuição da espessura da cartilagem condilar (52, 53). O descolamento e reposicionamento do músculo pterigoideo medial unilateral em ratos jovens provocou a diminuição do comprimento e altura do corpo mandibular. A região do processo angular foi a mais afetada, resultando em hipodesenvolvimento desta região (54).

Porém, a cirurgia de ressecção muscular pode gerar um tecido cicatricial, sem elasticidade, inserindo mais uma variável no crescimento mandibular. Por isso, o modelo animal de atrofia unilateral de masseter, provocada por injeção de toxina botulínica, foi estudado em coelhos e ratos. Ficou claro o menor desenvolvimento ósseo do lado do masseter atrofico. Entre os achados, estão a diminuição da altura

do ramo, aumento do ângulo goníaco e alterações estruturais ósseas identificados por exames de microtomografia (55, 56).

Figura 2.1 - Hipodesenvolvimento do processo angular causado pelo descolamento e reposicionamento do músculo pterigoideo lateral (Cruz et al. 2009)

Estudos em pacientes com distrofia miotônica mostram que além dos fatores genéticos, o crescimento mandibular também é modulado por fatores ambientais. Estes pacientes com atividade do músculo masseter diminuída apresentaram medidas cefalométricas alteradas, como por exemplo, ângulo mandibular mais aberto (57, 58).

Além disso, o processo mastigatório também influencia de maneira significativa as condições do tecido ósseo mandibular. Tal tecido se adapta a cargas mecânicas através de uma série de eventos biológicos que ocorrem ao nível tecidual, de maneira que a deposição e reabsorção óssea ocorrem em conjunto no intuito de aumentar a resistência mecânica (59, 60) e alterar a morfologia deste osso (61). Um dos exemplos mais conhecidos é a adaptação do osso alveolar a cargas oclusais (62-64).

Alguns autores propuseram a divisão da mandíbula de ratos em cinco sub regiões (módulos) funcionais de desenvolvimento. Segundo os autores, cada região

delimitada na mandíbula sofre diferentes estímulos e por isso, seu crescimento responde de maneira diferenciada, de acordo com os estímulos. Os ratos foram divididos em dois grupos de acordo com a consistência da alimentação: consistente ou gelatinosa. O grupo de alimentação consistente mostrou um formato final da mandíbula com maior vantagem biomecânica, e maior integração no remodelamento ósseo entre os módulos (44).

2.3 Análise morfométrica do tecido ósseo

Parâmetros da microarquitetura do tecido ósseo fornecem dados quantitativos do tecido, úteis para avaliação da qualidade óssea e também para avaliar os resultados de terapias. Estes parâmetros podem ser quantificados em 2D pela histomorfometria ou em 3D, pela microtomografia (65).

A histomorfometria óssea é um tipo de análise quantitativa, capaz de avaliar a remodelação, o metabolismo e a microestrutura óssea. Esta técnica consiste na mensuração dos componentes do tecido ósseo (em microscópio óptico) como tipos celulares, lacunas de reabsorção e espessura trabecular assim como sua distribuição e organização no espaço medular (66, 67). Porém, ela necessita de um preparo prévio da amostra, como emblocamento em metilmetacrilato e fatiamento por micrótomo, que acabam por destruir a amostra no final do processo, impedindo que testes subsequentes sejam realizados. A histomorfometria também é útil para o estudo da resposta óssea aos medicamentos e para o diagnóstico e estudo de doenças osteometabólicas como a osteomalácia e osteoporose (68, 69). Porém, ela é realizada por análises em duas dimensões, sendo que os parâmetros da microarquitetura óssea são medidos em secções (lâminas); a terceira dimensão (profundidade) é inferida por meio de modelos baseados em análises de formatos “placa e roda”, propostos por Parffit em 1987 (70, 71).

Em contraste com as técnicas envolvendo análises histológicas, a microtomografia é um método de imagem não-destrutivo, capaz de quantificar o osso

trabecular por meio de índices específicos (9, 72). Os princípios físicos e funcionamento da microtomografia são os mesmos da tomografia computadorizada por feixe cônico. A diferença está no tamanho do foco do tubo de raios-X (micro-foco) e na resolução deste sistema (72, 73). A alta resolução (até 7 μ m) é uma de suas principais vantagens, permitindo o estudo da microarquitetura óssea de pequenos animais, como os murinos (9, 73, 74). Porém, o tempo de escaneamento torna-se bastante prolongado e a quantidade de dados armazenados é considerável, exigindo uma potente configuração de hardware para armazenamento e processamento dos dados.

Estudos indicam que a microtomografia é uma alternativa para avaliar a estrutura óssea em três dimensões pois apresenta alta reprodutibilidade e acurácia na mensuração direta de parâmetros da morfologia óssea. Ademais, maiores volumes de amostra podem ser analisados em comparação com a histomorfometria e a conectividade em 3D das trabéculas também pode ser calculada diretamente.

Outras pesquisas também mostraram forte correlação ($r=0,95$) entre parâmetros comuns entre histomorfometria e microtomografia, tanto em animais como em humanos (9, 71, 75-77). No entanto, devido à alta dose de radiação e limitações da área de escaneamento, a microtomografia é utilizada somente para análise de estruturas ósseas de pequenos animais e pequenas amostras de osso humano (77, 78).

Por se tratar de um método não-destrutivo, a microtomografia permite que testes adicionais como ensaios mecânicos sejam realizados na mesma amostra escaneada(9). Por isso, muitos dos parâmetros obtidos por meio da microtomografia estão sendo relacionados com propriedades mecânicas em pesquisa com o tecido ósseo, principalmente pelo método do elemento finito (65, 79-82). Entre os parâmetros estão:

- BV (Bone Volume): Volume ósseo
- TV (Tissue Volume): Volume de tecido
- BV/TV (Bone volume/Total volume): Fração óssea volumétrica
- Tb.Th (Trabecular Thickness): Espessura trabecular

- Tb.Sp (Trabecular Separation): Separação Trabecular
- Tb.N (Trabecular Number): Número de trabéculas
- FD (fractal Dimension): Dimensão fractal
- Conn.Dn (Connectivity density): Conectividade por densidade

Apesar dos estudos mencionados, não foi possível encontrar na literatura trabalhos comparando os parâmetros mencionados em grupos sem e com alterações de ATM.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar por meio da microtomografia os efeitos da remoção do disco articular e remoção conjugada do disco e cartilagem articular no crescimento e na microarquitetura óssea da mandíbula de ratos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Parte do estudo foi realizada no Laboratório Experimental do Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Maxilofaciais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo- SP.

Utilizou-se 30 ratos Wistar com um mês de idade e peso corpóreo médio de 70g. Todos receberam ração comercial granulada para roedores (Labina, Agribands Purina) e água *ad libitum* antes da cirurgia e após, receberam ração na forma de pó por 14 dias e em granulação normal (pellet) após este período. O manuseio dos animais foi de acordo com os princípios éticos propostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Os animais foram divididos em três grupos:

- CTR: Controle operado (n=10)
- RD: remoção do disco articular (n=10)
- RDC: remoção do disco articular mais remoção da cartilagem articular (n=10); (remoção conjugada).

O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo sob número de protocolo 022/2014 (Anexo A).

4.1 Cirurgia

Sob anestesia geral induzida por injeção intraperitoneal de 10mg/ kg do peso corpóreo de hidroclorito de xilazina, e 25mg/ kg do peso corpóreo de hidroclorito de ketamina, a região pré - auricular direita dos ratos foi depilada e limpa com solução de iodo-povidine.

No lado direito, o acesso cirúrgico foi obtido através de uma incisão horizontal de um centímetro de comprimento nessa região, acompanhando o arco zigomático, identificado por palpação. Então, foi feita a divulsão dos planos celular subcutâneo e muscular. O lado esquerdo permaneceu intacto.

No grupo experimental RDC (remoção conjugada do disco articular e cartilagem articular), a cartilagem foi seccionada do côndilo mandibular por uma lâmina de bisturi nº 15, o disco articular foi removido com o uso de bisturi e uma pinça reta, e foi realizada a sutura.

No grupo experimental RD (remoção do disco articular), este foi totalmente removido também com o uso de bisturi e uma pinça reta, foi realizada a sutura.

No grupo CTR (controle operado), a operação foi a exposição do côndilo da mandíbula e do disco articular e sutura. A sutura foi realizada por planos e com fio de náilon monofilamento 4.0 agulhado.

Após dois meses de acompanhamento pós-operatório, com então três meses de idade, os animais foram pesados e sacrificados por dose letal de anestésico. A seguir, as cabeças foram removidas, fixadas em formol e dissecadas. Posteriormente, as imagens em microtomografia das hemimandíbulas foram obtidas.

4.2 Micro-CT

Todas hemimandíbulas obtidas foram escaneadas com um microtomógrafo SkyScan modelo 1176 (SkyScan; Kontich, Bélgica) trabalhando com um protocolo com os seguintes parâmetros: 50 kVp; 500 mA; 16 bits; resolução de 8,71 μm ; passo do ângulo de rotação de 0,5 grau. e 360 graus de rotação.

As hemimandíbulas foram fixadas sobre uma base de espuma de baixa densidade e envoltas por um filme de PVC (policloreto de polivinila) antes do escaneamento (figura 4.1).

Figura 4.1 – Hemimandíbulas posicionadas para escaneamento

Após a aquisição dos dados foram armazenados em disco rígido no formato TIFF e o volume total da amostra foi reconstruído na estação de trabalho com o software NRecon (Bruker, Bélgica).

4.3 Seleção do volume de interesse (VOI) – Processo angular

Para garantir a uniformidade na seleção do VOI, os volumes das hemimandíbulas foram previamente alinhados nos eixos X,Y e Z no software Data Viewer (Bruker; Bélgica), ilustrado na figura 4.2.

Com o software “CT-analyser versão 1.13 (Bruker – Bélgica), os volumes de interesse (processo angular da mandíbula) foram selecionados, tendo como limites a ponta do processo angular e o limite anterior delimitado pelo ponto mais profundo da concavidade formada entre o processo coronóide e processo angular (figura 4.3).

Figura 4.2 – Alinhamento da hemimandíbula nos três planos

Figura 4.3 - Anatomia da mandíbula do rato e delimitação do volume de interesse

4.4 Análise da microarquitetura trabecular óssea em 3D

Utilizando o software CT-analyser, as imagens foram binarizadas (figura 4.4) por meio da ferramenta “adaptive thresholding” e os seguintes parâmetros da microarquitetura do trabeculado foram selecionados para análise quantitativa com base na metodologia de Sugiyama et al (83).

Tabela 4.4 - Parâmetros da microarquitetura óssea utilizados

Parâmetro	Abreviação	Unidade
Volume de tecido	TV	mm ³
Volume ósseo	BV	mm ³
Fração óssea volumétrica	BV/TV	%
Espessura trabecular	TbTh	mm
Número de trabéculas	TbN	—
Espaçamento trabecular	TbSp	mm
Dimensão Fractal	FD	—
Volume total da hemimandíbula	TVtot	mm ³
Conectividade por densidade	Conn.Dn	—

Para que o volume total das hemimandíbulas (TV tot) pudesse ser calculado, a resolução das imagens foi reduzida em 4 vezes.

Figura 4.4 - A) secção transversal do processo angular ; B) Mesma região binarizada

4.5 Análise estatística

Inicialmente testamos a normalidade (Shapiro-Wilk) para todas as variáveis de desfecho (TV, BV, BV/TV, TbTh, TbN, TbSp, FD, Conn.D e TV tot). Estas, foram classificadas em paramétricos e não-paramétricos. A partir desta classificação, o teste estatístico adequado foi escolhido.

Para comparação das variáveis entre lado esquerdo e direito, foi aplicado o teste T de student para dados pareados (teste paramétrico) ou Wilcoxon (teste não paramétrico) . Para a comparação das variáveis entre os grupos (Controle, disco e disco e cartilagem, subdivididos em direito e esquerdo), o teste de análise de variância (*One-way ANOVA*) ou Kruskal- Wallis (não paramétrico) foram selecionados de acordo com a normalidade previamente testada. Para o ANOVA o teste post-hoc selecionado foi o de Tukey HSD e para o Kruskal-Wallis, o teste de Dunn. Foi adotado um nível de significância de 5% para todos os parâmetros

($p < 0,05$). O software utilizado para a análise estatística foi o SPSS (IBM SPSS Statistics Version 20.0 Chicago, IL, USA) .

Figura 4.5 – Resumo da metodologia

5 RESULTADOS

Os dados descritivos estão apresentados nas tabelas 5.1 a 5.3 e os gráficos ilustrando as diferenças entre os valores da média nos gráficos 5.1 a 5.9

5.1 Comparação entre lados

Grupo controle: Não houve diferença significativa das variáveis entre o lado esquerdo e direito neste grupo.

Grupo Disco: Para o grupo disco, houve diferença significativa para os seguintes parâmetros:

TbSp (separação de trabéculas) sendo o valor da média do lado direito (0,070mm) maior que a média dos valores do lado esquerdo (0,058mm) com $p=0,040$.

TVtot (Volume total da hemimandíbula), sendo o valor das médias do lado direito (244,216mm³) menor que o valor das médias lado esquerdo (263,707mm³) com $p= 0,026$.

Conn.Dn (conectividade por densidade) sendo a média dos valores do lado direito (887,816) menor que a média dos valores do lado esquerdo 1288,561).

Grupo Disco e Cartilagem- Para o grupo disco e cartilagem, houve diferença significativa para os seguintes parâmetros:

FD (Dimensão Fractal) sendo a mediana dos valores do lado direito (2,793) maior que os valores da mediana do lado esquerdo (2,760) com $p=0,015$.

TVtot (Volume Total da hemimandíbula), sendo a média dos valores do lado direito (241,348 mm³) menor que a média dos valores do lado esquerdo (263,446 mm³) com $p=0,012$

Tabela 5.1 – Comparação entre lados grupo CTR

Grupo		Intervalo de confiança (95%)					
CTR	Média	n	DP	Mínimo	Máximo	p	
TV_ESQ	3,774	9	0,896	-0,7370	0,3934	0,503	
TV_DIR	3,946	9	0,873				
BV_ESQ	3,273	9	0,820	-0,7047	0,3627	0,481	
BV_DIR	3,444	9	0,762				
BV_TV_ESQ	86,569	9	2,342	-2,3107	0,8817	0,374	
BVTV_DIR	87,283	9	1,088				
TbTh_ESQ	0,111	9	0,008	-0,0032	0,0126	0,173	
TbTh_DIR	0,106	9	0,012				
TbN_ESQ	7,826	9	0,580	-1,1151	0,1599	0,086	
TbN_DIR	8,303	9	1,038				
TbSp_ESQ	0,062	9	0,011	-0,0127	0,0130	0,981	
TbSp_DIR	0,062	9	0,015				
FD_ESQ	2,770	9	0,014	-0,0040	0,0076	0,487	
FD_DIR	2,768	9	0,011				
TVtot_ESQ	255,259	5	18,569	-12,8459	31,8841	0,302	
Tvtot_DIR	245,740	5	11,847				
ConnDn ESQ	1005,336	9	337,522	-294,432	410,908	0,713	
ConnDn DIR	947,098	9	302,388				

p valor para comparação direito x esquerdo (*p<0,05) e valores do intervalo de confiança

Tabela 5.2 – Comparação ente lados Grupo RD

Grupo				Intervalo de confiança (95%)			
RD	Média	n	DP	Mínimo	Máximo	p	
TV_ESQ	4,143	10	1,663	-2,0349	1,3541	0,660	
TV_DIR	4,484	10	1,105				
BV_ESQ	3,582	10	1,537	-1,8661	1,2460	0,662	
BV_DIR	3,892	10	0,960				
BV_TV_ESQ	85,925	10	2,892	-3,1597	1,4387	0,419	
BVTV_DIR	86,785	10	2,074				
TbTh_ESQ	0,106	10	0,013	-0,0118	0,0053	0,410	
TbTh_DIR	0,109	10	0,010				
TbN_ESQ	8,185	10	0,799	-0,3614	0,7485	0,450	
TbN_DIR	7,992	10	0,704				
TbSp_ESQ	0,058	10	0,019	-0,0220	-0,0006	0,040	
TbSp_DIR	0,070	10	0,023				
FD_ESQ	2,766	10	0,015	-0,0177	0,0022	0,112	
FD_DIR	2,774	10	0,011				
TVtot_ESQ	263,707	10	20,283	2,9227	36,0593	0,026	
TVtot_DIR	244,216	10	14,517				
ConnDn_ESQ	1288,56	10	493,663	32,899	768,591	0,036	
ConnDn-DIR	887,815	10	237,483				

p valor para comparação direito x esquerdo e valores do intervalo de confiança
 As lacunas em cinza são correspondentes aos valores de $p < 0,05$

Tabela 5.3 – Comparação entre lados grupo RDC

Grupo				Intervalo de confiança (95%)		
RDC	Média	n	DP	Mínimo	Máximo	p
TV_ESQ	4,179	9	2,457	-4,6460	0,3037	0,110
TV_DIR	6,351	9	2,042			
BV_ESQ	3,635	9	2,319	-4,0228	0,4161	0,110
BV_DIR	5,439	9	1,711			
BV_TV_ESQ	85,985	9	3,281	-2,1558	2,4814	0,875
BVTV_DIR	85,823	9	3,152			
TbTh_ESQ	0,108	9	0,006	-0,0086	0,0114	0,753
TbTh_DIR	0,107	9	0,014			
TbN_ESQ	7,943	9	0,258	-0,8292	0,4601	0,527
TbN_DIR	8,128	9	0,951			
TbSp_ESQ	0,065	9	0,010	-0,0405	0,0063	0,214
TbSp_DIR	0,082	9	0,031			
FD_ESQ	2,759	9	0,012	-0,0414	-0,0108	0,015*
FD_DIR	2,785	9	0,024			
TVtot_ESQ	264,714	7	17,165	6,6410	37,2070	0,012*
TVtot_DIR	242,790	7	19,686			
Conn.D_ESQ	1070,492	9	384,808	-52,610	525,422	0,096
Conn.D-DIR	834,086	9	149,871			

p valor para comparação entre lados e valores do intervalo de confiança
 As lacunas em cinza são correspondentes aos valores de $p < 0,05$

5.2 Comparação entre grupos

A comparação dos parâmetros entre os grupos foi dividida em lado esquerdo e direito. Para o lado esquerdo, não houve diferença significativa entre as variáveis analisadas.

Para o lado direito, a diferença entre os grupos mostrou-se significativa para:

BV: O valor da média do grupo RDC ($5,439\text{mm}^3$) apresentou-se maior que os grupos CTR ($3,481\text{mm}^3$) e RD ($3,892\text{mm}^3$).

TV: O valor da média do grupo RDC ($6,351\text{mm}^3$) apresentou-se maior que a média dos valores dos grupos CTR ($4,018\text{mm}^3$) e RD ($4,484\text{mm}^3$), não havendo diferença significativa entre estes.

FD: O valor da média do grupo CTR (2,767) foi menor que do grupo RDC (2,785). Entre os grupos CTR e RD (2,774); RD e RDC, não houve diferença significativa.

Tabela 5.4 - Comparação entre grupos para o lado esquerdo

Lado Esquerdo	grupo	média	DP	p
TV	CTR	3,774	0,896	0,971
	RD	4,143	1,663	
	RDC	4,539	2,581	
BV	CTR	3,273	0,820	0,942
	RD	3,582	1,537	
	RDC	3,977	2,438	
BV/TV	CTR	86,569	2,342	0,877
	RD	85,925	2,892	
	RDC	86,452	3,427	
TbTh	CTR	0,111	0,008	0,506
	RD	0,106	0,013	
	RDC	0,109	0,006	
TbN	CTR	7,826	0,580	0,406
	RD	8,185	0,799	
	RDC	7,945	0,243	
TbSp	CTR	0,062	0,011	0,736
	RD	0,058	0,019	
	RDC	0,063	0,011	
FD	CTR	2,770	0,014	0,497
	RD	2,766	0,015	
	RDC	2,762	0,015	
TVtot	CTR	255,259	18,569	0,681
	RD	263,707	20,283	
	RDC	263,446	16,292	
Conn.Dn	CTR	1005,336	337,523	0,258
	RD	1288,561	493,664	
	RDC	1022,556	393,196	

Tabela 5.5 - Comparação entre grupos para o lado direito

Lado Direito	grupo	média	DP	p
TV	CTR	4,018 ^A	0,854	0,003
	RD	4,484 ^A	1,105	
	RDC	6,351 ^B	2,042	
BV	CTR	3,481 ^A	0,728	0,003
	RD	3,892 ^A	0,960	
	RDC	5,439 ^B	1,711	
BV/TV	CTR	86,731	2,024	0,610
	RD	86,785	2,074	
	RDC	85,823	3,152	
TbTh	CTR	0,107	0,011	0,928
	RD	0,109	0,010	
	RDC	0,107	0,014	
TbN	CTR	8,222	1,012	0,947
	RD	7,992	0,704	
	RDC	8,128	0,951	
TbSp	CTR	0,069	0,025	0,555
	RD	0,070	0,023	
	RDC	0,082	0,031	
FD	CTR	2,767 ^A	0,012	0,028
	RD	2,774 ^{AB}	0,011	
	RDC	2,785 ^B	0,024	
TVtot	CTR	250,080	13,029	0,471
	RD	244,216	14,517	
	RDC	241,348	18,676	
Conn.Dn	CTR	941,852	285,577	0,610
	RD	887,816	237,484	
	RDC	834,086	149,872	

As lacunas em cinza são correspondentes aos valores de $p < 0,05$. Letras iguais indicam que não há diferença significativa entre os valores

Gráfico 5.1- Média dos valores de TV, para lado e grupo. Os conectores indicam onde houve diferença significativa

Gráfico 5.2 - Média dos valores de BV para lado e grupo

Gráfico 5.3 –Média dos valores de BV/TV para lado e grupo

Gráfico 5.4 -Média dos valores de TbTh para lado e grupo

Gráfico 5.5 - Média dos valores de TbN para lado e grupo

Gráfico 5.6 - Médias dos valores de TbSp para lado e grupo. Os * indicam diferença significativa entre os lados direito e esquerdo

Gráfico 5.7 - Média dos valores FD para lado e grupo. Os conectores indicam onde houve diferença significativa. Os * indicam diferença significativa entre os lados direito e esquerdo

Gráfico 5.8 - Média dos valores de TVtot. para lado e grupo. Os * indicam diferença significativa entre os lados direito e esquerdo

Gráfico 5.9 - Média de valores de Conn.Dn para lado e grupo. Os * indicam diferença significativa entre os lados direito e esquerdo

5.3 Peso corpóreo

A média de ganho de peso dos ratos está registrada na tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Média de ganho de peso no período experimental

Grupo	Média de ganho de peso
CTR	290,80g
RD	249,02g
RDC	234,60g

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra a importância da cartilagem e disco articular no crescimento mandibular e também na composição de sua microestrutura óssea. Foram observadas mudanças significativas de volumes totais das hemimandíbulas na comparação entre lado e grupo e também diferenças significativas entre parâmetros microestruturais.

A influência da musculatura no crescimento ósseo está comprovada em diversos estudos. Uma das principais teorias é a de Julius Wolff. A Lei de Wolff, datada de 1892, diz que cargas mecânicas podem afetar a arquitetura óssea dos seres vivos. Se a carga mecânica sobre um osso aumenta, o osso se remodela para adaptar-se à nova demanda mecânica. Isso inclui mudanças na arquitetura do trabeculado interno, seguido de mudanças na no osso cortical, para tornar-se mais espesso e denso. O inverso também é verdadeiro, assim, diante a redução de cargas mecânicas, o osso torna-se menos espesso e menos denso, devido a falta de estímulos para que ocorra a remodelação óssea (59, 64).

A posição de maior estabilidade da ATM é ditada pela condição muscular em que a CM encontra-se mais superoanteriormente na fossa articular, com o disco articular propriamente entreposto entre estas estruturas (12).

Assim, o menor volume das hemimandíbulas nos grupos RD e RDC (comparando os lados) pode ser explicado pelo desarranjo articular provocado pela remoção do disco e cartilagem articular. Provavelmente, este desarranjo causou um desequilíbrio nas tensões dos músculos mastigatórios e na tentativa de compensar a instabilidade causada pela ausência do disco e/ou cartilagem, menores tensões foram geradas no lado direito. Na comparação entre grupos (lado direito), o grupo RDC apresentou menor volume em relação aos grupos CTR e RD (iguais entre si) sugerindo que a remoção de disco e cartilagem causam danos maiores à função e crescimento da mandíbula do rato.

A média dos pesos corpóreos finais dos ratos também indica nesta direção. O grupo RDC foi o que apresentou menor peso corpóreo. Mostrando que problemas causados na ATM influenciaram diretamente todo o sistema estomatognático, o que prejudicou também a alimentação do animal.

Cruz et al. (54) observaram que o processo angular dos ratos no lado operado sofreu um hipodesenvolvimento considerável em comparação ao lado controle quando realizado o deslocamento e reposicionamento do músculo pterigoideo medial unilateralmente. O maior volume observado do processo angular no lado direito do grupo RDC em relação aos demais neste estudo, nos levam a acreditar que o desarranjo da ATM dos ratos pode ter causado uma parafunção nos animais, ativando em demasia os músculos de fechamento em especial, o pterigoideo medial. Pesquisa anterior de Cortes et al. (62) mostra que a tensão muscular está associada ao aumento de volume ósseo, como forma de adaptação ao novo padrão de tensões musculares aumentadas.

Dentre os parâmetros estudados a FD está diretamente relacionada com propriedades mecânicas dos ossos (84). Uma das diferenças significativas entre os grupos analisados foi observada com a variável de dimensão fractal (FD). Esta descreve o modo como um objeto preenche o espaço em que se encontra. O osso trabeculado possui uma complexa rede de trabéculas interligadas que por fim, pode ser considerado uma estrutura fractal (85). O método de “contagem de cubos” é o mais utilizado para se obter a FD. Além do mais, propriedades mecânicas do osso estão correlacionadas com a FD. Caldwell et al. (86) desenvolveram artrite inflamatória experimental em coelhos e mostraram que o grupo com artrite apresentou maiores valores de FD em relação ao grupo controle demonstrando que maiores valores de FD estão correlacionados com estrutura de trabeculado deficiente. No presente estudo, na comparação entre grupos, não houve diferenças no lado esquerdo. No entanto, comparando-se os grupos no lado direito, os maiores valores de FD foram nos grupos RD e RDC. Assim, a remoção do disco articular e a remoção do disco e cartilagem, provocaram alterações no trabeculado dos ratos que, em última instância, pode ser considerado mais frágil que o trabeculado do grupo controle.

A conectividade por densidade (Conn.Dn) também pode ser expressada como número de trabéculas por unidade de mm^3 . Existem controvérsias sobre sua relação

com propriedades mecânicas, no entanto, ela expressa a quantidade de trabéculas interligadas dentro de um determinado volume, que por final, influencia na qualidade óssea (84). Sendo assim, os efeitos deletérios causados pela remoção do disco articular se refletiram na diminuição dos valores de Conn.Dn.

O tecido ósseo do lado direito nos grupos RD e RDC remodelou-se de forma diferente do lado esquerdo e do grupo controle, resultando em assimetrias mandibulares. No intuito de avaliar tais alterações, o processo angular foi escolhido como região de interesse por ser esta a região de inserção dos músculos masseter e pterigoideo medial, pois em pesquisas anteriores, foi comprovado que a remoção do disco articular leva a alterações na mastigação e consequentemente nos músculos mastigatórios (87). Tais alterações podem ter impacto significativo no tecido ósseo dos rebordos maxilares. Tais achados da literatura corroboram os presentes resultados, demonstrando que a remoção do disco articular teve um impacto significativo nas condições do tecido ósseo do processo angular dos ratos analisados

Tsai et al. (56) afirmaram que a operação de simulação do lado controle em modelos animais introduz mais um viés nos estudos pois gera um tecido cicatricial, que pode limitar os movimentos mastigatórios. Porém, vale ressaltar que não houve diferença significativa das variáveis estudadas entre os lados no grupo controle e também na comparação entre os grupos (lado controle). Assim, a operação de exposição da ATM no grupo controle não influenciou a morfologia e parâmetros microestruturais do trabeculado ósseo quando os lados foram comparados.

Hichijo et al. (42), em 2014, observaram os efeitos da demanda mastigatória no desenvolvimento mandibular de ratos e observaram que animais alimentados com ração de consistência mole desenvolveram menor atividade muscular do masseter, e também menor crescimento mandibular em relação ao grupo alimentado com ração de consistência firme. A atividade muscular do masseter foi monitorada pelo método de radiotelemetria, que permite o movimento livre do animal em estudo, assegurando um comportamento normal em suas atividades diárias. No presente estudo, todos os animais foram alimentados apenas com ração em pó após a cirurgia, o que provavelmente provocou a hipofunção dos músculos da mastigação e provavelmente gerando um crescimento mandibular insuficiente em todos os grupos. No entanto, o lado direito nos grupos RD e RDC apresentou um volume menor que o lado

esquerdo. Pode-se deduzir a partir deste fato que a mastigação do lado direito ficou ainda mais comprometida pela remoção do disco e também pela remoção do disco e cartilagem.

Deve-se ter cautela ao comparar a ATM dos ratos com a humana. O formato da mandíbula é diferente, os movimentos mastigatórios são distintos. Porém, existe uma certa equivalência entre os organismos. Porto et al (26) estudaram a ATM de ratos e descreveram: “A ATM é envolvida por uma fina cápsula, formada por tecido fibroso e cobertura sinovial. O ângulo mandibular é proeminente. A fossa articular é rasa, sem eminência articular. De acordo com os achados histológicos, a ATM é composta por diferentes tecidos, são eles a cabeça da mandíbula, a fossa mandibular e o disco fibrocartilaginoso. Uma camada de cartilagem hialina recobre a superfície articular do côndilo e do osso temporal. De acordo com os achados morfométricos e histológicos, a estrutura articular em ratos é, no geral, similar a articulação humana. Exceto que nesses animais não há eminência articular.” Indicando uma relevância clínica dos estudos em modelo animal da ATM

Em resumo, os parâmetros da microarquitetura óssea estudados indicam que o lado direito (nos grupos experimentais) apresentou um osso com menor conectividade e possivelmente com piores propriedades mecânicas. Isto nos leva a crer que a remoção do disco e da cartilagem articular gerou um desarranjo no equilíbrio das tensões musculares aplicadas aos ossos que por final se refletiram nos parâmetros de interesse.

Este estudo nos leva a refletir sobre as consequências de danos à ATM em indivíduos em crescimento. Independente se causados por traumas ou patologias adquiridas ou congênitas, estes pacientes devem ser acompanhados periodicamente por uma equipe multidisciplinar formada por ortodontistas, radiologistas e cirurgiões Buco-maxilofaciais para que o impacto negativo seja minimizado, garantindo assim uma melhor qualidade de vida ao paciente.

7 CONCLUSÃO

A remoção do disco articular e a remoção conjugada do disco e cartilagem articular alteram o volume e microestrutura do osso trabecular da mandíbula de ratos jovens. Estas duas intervenções provocaram uma queda na qualidade de parâmetros da microestrutura do trabeculado do processo angular e diminuição do crescimento da hemimandíbula do lado operado em comparação ao lado não operado.

REFERÊNCIAS

1. Okeson JP. Management of Temporomandibular Disorders and Occlusion. fourth edition ed: Mosby; 1998 1998.
2. Dixon ADH, D. A. N.; Ronning, O. Fundamentals of craniofacial growth. first edition ed: CRC Press; 1997.
3. Enlow DHH, M. G. Essentials of Facial Growth. First Edition ed. Company WBS, editor 1998.
4. Shen G, Darendeliler MA. The Adaptive Remodeling of Condylar Cartilage-- A Transition from Chondrogenesis to Osteogenesis. Journal of Dental Research. 2005;84(8):691-9.
5. Billiau AD, Hu Y, Verdonck A, Carels C, Wouters C. Temporomandibular joint arthritis in juvenile idiopathic arthritis: prevalence, clinical and radiological signs, and relation to dentofacial morphology. J Rheumatol. 2007;34(9):1925-33.
6. Li Z, Zhang W, Li ZB, Li JR. Mechanism in favorable prognosis of pediatric condylar fractures managed by closed procedures: an experimental study in growing rats. Dent Traumatol. 2010;26(3):228-35.
7. Ulrich D, van Rietbergen B, Laib A, Rueggsegger P. The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone. Bone. 1999;25(1):55-60.
8. Mulder L, Koolstra JH, de Jonge HW, van Eijden TM. Architecture and mineralization of developing cortical and trabecular bone of the mandible. Anat Embryol (Berl). 2006;211(1):71-8.
9. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. J Bone Miner Res. 2010;25(7):1468-86.
10. Akhil G, Senthil Kumar KP, Raja S, Janardhanan K. Three-dimensional assessment of facial asymmetry: A systematic review. J Pharm Bioallied Sci. 2015;7(Suppl 2):S433-7.
11. Murphy MK, MacBarb RF, Wong ME, Athanasiou KA. Temporomandibular disorders: a review of etiology, clinical management, and tissue engineering strategies. Int J Oral Maxillofac Implants. 2013;28(6):e393-414.
12. Okeson JP. Evolution of occlusion and temporomandibular disorder in orthodontics: Past, present, and future. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2015;147(5 Suppl):S216-23.
13. Tanaka E, Detamore MS, Mercuri LG. Degenerative disorders of the temporomandibular joint: etiology, diagnosis, and treatment. J Dent Res. 2008;87(4):296-307.
14. Pirttiniemi P, Peltomäki T, Müller L, Luder HU. Abnormal mandibular growth and the condylar cartilage. Eur J Orthod. 2009;31(1):1-11.
15. Martini MZ, Takahashi A, de Oliveira Neto HG, de Carvalho Junior JP, Curcio R, Shinohara EH. Epidemiology of mandibular fractures treated in a Brazilian level I trauma public hospital in the city of São Paulo, Brazil. Braz Dent J. 2006;17(3):243-8.
16. Patrocínio LG, Patrocínio JA, Borba BH, Bonatti Bde S, Pinto LF, Vieira JV, et al. Mandibular fracture: analysis of 293 patients treated in the Hospital of Clinics, Federal University of Uberlândia. Braz J Otorhinolaryngol. 2005;71(5):560-5.

17. Choi J, Oh N, Kim IK. A follow-up study of condyle fracture in children. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005;34(8):851-8.
18. Defabianis P. Treatment of condylar fractures in children and youths: the clinical value of the occlusal plane orientation and correlation with facial development (case reports). *J Clin Pediatr Dent*. 2002;26(3):243-50.
19. Skolnick J, Iranpour B, Westesson PL, Adair S. Prepubertal trauma and mandibular asymmetry in orthognathic surgery and orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1994;105(1):73-7.
20. Rodrigues DB, Castro V. Condylar hyperplasia of the temporomandibular joint: types, treatment, and surgical implications. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2015;27(1):155-67.
21. Wolford LM, Movahed R, Perez DE. A classification system for conditions causing condylar hyperplasia. *J Oral Maxillofac Surg*. 2014;72(3):567-95.
22. Lekkas C, Honee GL, van den Hooff A. Effects of experimental defects of the articular disc of the temporomandibular joint in rats. *J Oral Rehabil*. 1988;15(2):141-8.
23. Hagandora CK, Almarza AJ. TMJ disc removal: comparison between pre-clinical studies and clinical findings. *J Dent Res*. 2012;91(8):745-52.
24. Ogi N, Ishimaru J, Kurita K, Handa Y, Jones RH, Goss AN. Comparison of different methods of temporomandibular joint disc reconstruction--an animal model. *Aust Dent J*. 1997;42(2):121-4.
25. Porto GGV, B. C. E.; Silva-Junior, V. A. Comparison between human and rat TMJ: anatomic and histological features. *Acta Cir Bras*. 2010;25(3):290-93.
26. IPorto GG, Vanconcelos BC, Andrade ES, Silva-Junior VA. Comparison between human and rat TMJ: anatomic and histopathologic features. *Acta Cir Bras*. 2010;25(3):290-3.
27. Almarza AJ, Athanasiou KA. Design characteristics for the tissue engineering of cartilaginous tissues. *Ann Biomed Eng*. 2004;32(1):2-17.
28. Detamore MS, Athanasiou KA. Structure and function of the temporomandibular joint disc: implications for tissue engineering. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003;61(4):494-506.
29. Tanaka E, van Eijden T. Biomechanical behavior of the temporomandibular joint disc. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(2):138-50.
30. Luz JG, de Araujo VC. Rotated subcondylar process fracture in the growing animal: an experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001;30(6):545-9.
31. Bryndahl F, Warfvinge G, Eriksson L, Isberg A. Cartilage changes link retrognathic mandibular growth to TMJ disc displacement in a rabbit model. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011;40(6):621-7.
32. Schellhas KP, Pollei SR, Wilkes CH. Pediatric internal derangements of the temporomandibular joint: effect on facial development. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1993;104(1):51-9.
33. Gidakou IK, Tallents RH, Kyrkanides S, Stein S, Moss ME. Comparison of skeletal and dental morphology in asymptomatic volunteers and symptomatic patients with bilateral disk displacement without reduction. *Angle Orthod*. 2004;74(5):684-90.
34. Mizoguchi I, Takahashi I, Nakamura M, Sasano Y, Sato S, Kagayama M, et al. An immunohistochemical study of regional differences in the distribution of type I and type II collagens in rat mandibular condylar cartilage. *Arch Oral Biol*. 1996;41(8-9):863-9.
35. Ruggiero L, Zimmerman BK, Park M, Han L, Wang L, Burris DL, et al. Roles of the Fibrous Superficial Zone in the Mechanical Behavior of TMJ Condylar Cartilage. *Ann Biomed Eng*. 2015.

36. Teramoto M, Kaneko S, Shibata S, Yanagishita M, Soma K. Effect of compressive forces on extracellular matrix in rat mandibular condylar cartilage. *J Bone Miner Metab.* 2003;21(5):276-86.
37. Vincent TL. Targeting mechanotransduction pathways in osteoarthritis: a focus on the pericellular matrix. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13(3):449-54.
38. Lammerding J, Kamm RD, Lee RT. Mechanotransduction in cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1015:53-70.
39. Lee HS, Millward-Sadler SJ, Wright MO, Nuki G, Salter DM. Integrin and mechanosensitive ion channel-dependent tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins and beta-catenin in human articular chondrocytes after mechanical stimulation. *J Bone Miner Res.* 2000;15(8):1501-9.
40. Cheng K, Xia P, Lin Q, Shen S, Gao M, Ren S, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on integrin-FAK-PI3K/Akt mechanochemical transduction in rabbit osteoarthritis chondrocytes. *Ultrasound Med Biol.* 2014;40(7):1609-18.
41. McNamara JA, Jr. Neuromuscular and skeletal adaptations to altered function in the orofacial region. *Am J Orthod.* 1973;64(6):578-606.
42. Hichijo N, Kawai N, Mori H, Sano R, Ohnuki Y, Okumura S, et al. Effects of the masticatory demand on the rat mandibular development. *J Oral Rehabil.* 2014;41(8):581-7.
43. Kiliaridis S, Thilander B, Kjellberg H, Topouzelis N, Zafiriadis A. Effect of low masticatory function on condylar growth: a morphometric study in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1999;116(2):121-5.
44. IAnderson PS, Renaud S, Rayfield EJ. Adaptive plasticity in the mouse mandible. *BMC Evol Biol.* 2014;14:85.
45. Rabie AB, She TT, Hagg U. Functional appliance therapy accelerates and enhances condylar growth. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003;123(1):40-8.
46. Woodside DG, Metaxas A, Altuna G. The influence of functional appliance therapy on glenoid fossa remodeling. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1987;92(3):181-98.
47. Owtad P, Potres Z, Shen G, Petocz P, Darendeliler MA. A histochemical study on condylar cartilage and glenoid fossa during mandibular advancement. *Angle Orthod.* 2011;81(2):270-6.
48. Tsolakis AI, Spyropoulos MN, Katsavrias E, Alexandridis K. Effects of altered mandibular function on mandibular growth after condylectomy. *Eur J Orthod.* 1997;19(1):9-19.
49. Vanwanseele B, Lucchinetti E, Stussi E. The effects of immobilization on the characteristics of articular cartilage: current concepts and future directions. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2002;10(5):408-19.
50. Lydiatt DD, Davis LF. The effects of immobilization on the rabbit temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg.* 1985;43(3):188-93.
51. Glineburg RW, Laskin DM, Blaustein DI. The effects of immobilization on the primate temporomandibular joint: a histologic and histochemical study. *J Oral Maxillofac Surg.* 1982;40(1):3-8.
52. Yonemitsu I, Muramoto T, Soma K. The influence of masseter activity on rat mandibular growth. *Arch Oral Biol.* 2007;52(5):487-93.
53. Bayram B, Uckan S, Cetinsahin A, Arman Ozcirpici A, Ozdemir H, Yazici C. Repositioning of the masseter muscle and its effect on skeletal growth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(5):e1-5.
54. Cruz DZ, Rodrigues L, Luz JG. Effects of detachment and repositioning of the medial pterygoid muscle on the growth of the maxilla and mandible of young rats. *Acta Cir Bras.* 2009;24(2):93-7.

55. Kwon TG, Park HS, Lee SH, Park IS, An CH. Influence of unilateral masseter muscle atrophy on craniofacial morphology in growing rabbits. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(8):1530-7.
56. Tsai CY, Huang RY, Lee CM, Hsiao WT, Yang LY. Morphologic and bony structural changes in the mandible after a unilateral injection of botulinum neurotoxin in adult rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(5):1081-7.
57. Kiliaridis S, Mejersjo C, Thilander B. Muscle function and craniofacial morphology: a clinical study in patients with myotonic dystrophy. *Eur J Orthod.* 1989;11(2):131-8.
58. Zanoteli E, Yamashita HK, Suzuki H, Oliveira AS, Gabbai AA. Temporomandibular joint and masticatory muscle involvement in myotonic dystrophy: a study by magnetic resonance imaging. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(2):262-71.
59. Frost HM. A 2003 update of bone physiology and Wolff's Law for clinicians. *Angle Orthod.* 2004;74(1):3-15.
60. Frost HM. Emerging views about "osteoporosis", bone health, strength, fragility, and their determinants. *J Bone Miner Metab.* 2002;20(6):319-25.
61. Jiang Y, Zhao J, Rosen C, Geusens P, Genant HK. Perspectives on bone mechanical properties and adaptive response to mechanical challenge. *J Clin Densitom.* 1999;2(4):423-33.
62. Cortes AR, Jin Z, Morrison MD, Arita ES, Song J, Tamimi F. Mandibular tori are associated with mechanical stress and mandibular shape. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014;72(11):2115-25.
63. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Anderson JJ. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. *J Bone Miner Res.* 1993;8(5):567-73.
64. Frost HM. Bone's mechanostat: a 2003 update. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003;275(2):1081-101.
65. Lespessailles E, Chappard C, Bonnet N, Benhamou CL. Imaging techniques for evaluating bone microarchitecture. *Joint Bone Spine.* 2006;73(3):254-61.
66. Dalle Carbonare L, Bertoldo F, Valenti MT, Zenari S, Zanatta M, Sella S, et al. Histomorphometric analysis of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Micron.* 2005;36(7-8):645-52.
67. Vidal B, Pinto A, Galvao MJ, Santos AR, Rodrigues A, Cascao R, et al. Bone histomorphometry revisited. *Acta Reumatol Port.* 2012;37(4):294-300.
68. Kulak CA, Dempster DW. Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010;54(2):87-98.
69. Tamminen IS, Isaksson H, Aula AS, Honkanen E, Jurvelin JS, Kroger H. Reproducibility and agreement of micro-CT and histomorphometry in human trabecular bone with different metabolic status. *J Bone Miner Metab.* 2011;29(4):442-8.
70. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987;2(6):595-610.
71. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res.* 1989;4(1):3-11.
72. Rueggsegger P, Koller B, Muller R. A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int.* 1996;58(1):24-9.

73. Clark DP, Badea CT. Micro-CT of rodents: state-of-the-art and future perspectives. *Phys Med*. 2014;30(6):619-34.
74. Ho JT, Wu J, Huang HL, Chen MY, Fuh LJ, Hsu JT. Trabecular bone structural parameters evaluated using dental cone-beam computed tomography: cellular synthetic bones. *Biomed Eng Online*. 2013;12:115.
75. Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, et al. Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone*. 1998;23(1):59-66.
76. Thomsen JS, Laib A, Koller B, Prohaska S, Mosekilde L, Gowin W. Stereological measures of trabecular bone structure: comparison of 3D micro computed tomography with 2D histological sections in human proximal tibial bone biopsies. *J Microsc*. 2005;218(Pt 2):171-9.
77. Gonzalez-Garcia R, Monje F. Is micro-computed tomography reliable to determine the microstructure of the maxillary alveolar bone? *Clin Oral Implants Res*. 2013;24(7):730-7.
78. Bagi CM, Berryman E, Moalli MR. Comparative bone anatomy of commonly used laboratory animals: implications for drug discovery. *Comp Med*. 2011;61(1):76-85.
79. Ichappard D, Basle MF, Legrand E, Audran M. Trabecular bone microarchitecture: a review. *Morphologie*. 2008;92(299):162-70.
80. Dalle Carbonare L, Valenti MT, Bertoldo F, Zanatta M, Zenari S, Realdi G, et al. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. *Micron*. 2005;36(7-8):609-16.
81. Mittra E, Rubin C, Qin YX. Interrelationship of trabecular mechanical and microstructural properties in sheep trabecular bone. *J Biomech*. 2005;38(6):1229-37.
82. Prot M, Saletti D, Pattofatto S, Bousson V, Laporte S. Links between mechanical behavior of cancellous bone and its microstructural properties under dynamic loading. *J Biomech*. 2015;48(3):498-503.
83. Sugiyama T, Meakin LB, Browne WJ, Galea GL, Price JS, Lanyon LE. Bones' adaptive response to mechanical loading is essentially linear between the low strains associated with disuse and the high strains associated with the lamellar/woven bone transition. *J Bone Miner Res*. 2012;27(8):1784-93.
84. Odgaard A. Three-dimensional methods for quantification of cancellous bone architecture. *Bone*. 1997;20(4):315-28.
85. Jiang C, Pitt RE, Bertram JE, Aneshansley DJ. Fractal-based image texture analysis of trabecular bone architecture. *Med Biol Eng Comput*. 1999;37(4):413-8.
86. Caldwell CB, Moran EL, Bogoch ER. Fractal dimension as a measure of altered trabecular bone in experimental inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res*. 1998;13(6):978-85.
87. Hayashi H, Fujita T, Shirakura M, Tsuka Y, Fujii E, Terao A, et al. Role of articular disc in condylar regeneration of the mandible. *Exp Anim*. 2014;63(4):395-401.

ANEXO A - Parecer do CEUA/FOUSP **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Tel. (11) 3091 7887/7863

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo CEUA/FOUSP N° 022/2014 referente ao projeto intitulado: **"Estudo da qualidade e morfologia óssea no crescimento mandibular de ratos jovens com remoção do disco articular e cartilagem da cabeça da mandíbula por meio de microtomografia"** sob a responsabilidade de execução do(os) autor(es) Prof(a). Dr(a). **Emiko Saito Arita**, e o(s) pesquisador(es) **Eduardo Massaharu Aoki e Reinaldo Abdala Júnior**, foi analisado na presente data e considerado isento de análise da CEUA por utilizar ossos de *Rattus norvegicus*, albinos, Wistar provenientes de protocolo aprovado pela CEUA-ICB sob o n° 046/2012.

São Paulo, 04 de novembro de 2014.

Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
Presidente da CEUA/FOUSP