

Ive Maria Falcone Patullo

**Efeito da hipofunção mastigatória na massa
óssea da mandíbula de ratas Wistar
submetidas ou não a ovariectomia**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Reumatologia

Orientador: Profa. Dra. Rosa Maria Rodrigues Pereira

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Patullo, Ive Maria Falcone

Efeito da hipofunção mastigatória na massa óssea da mandíbula de ratas Wistar submetidas ou não a ovariectomia / Ive Maria Falcone Patullo. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Reumatologia.

Orientadora: Rosa Maria Rodrigues Pereira.

Descritores: 1.Força da mordida 2.Mandíbula 3.Osteoporose 4.Ovariectomia 5.Ratos Wistar 6.Osso e ossos/anatomia & histologia 7.Densitometria

USP/FM/SBD-094/09

DEDICATÓRIA

Dedico a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, em especial ao meu querido marido Paulo Wanderley Patullo, sempre presente em minha vida, principal incentivador de meus projetos profissionais, amigo, companheiro e participante ativo nesta e em todas as minhas jornadas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Diomar e Raphael Falcone**, pessoas maravilhosas, a quem devo grande parte do que sou hoje. Obrigada pelo apoio, educação e amor.

À Profa. Dra. **Rosa Maria R Pereira**, orientadora perseverante, exemplo profissional de capacidade científica, pela amizade e incentivo constante.

À Profa Dra. **Eloisa Bonfá** pela oportunidade de aprendizado, colocando a Disciplina de Reumatologia à disposição para a realização desta pesquisa.

À **Liliam Takayama** pela amizade, paciência e ajuda nas horas de laboratório.

À **Valéria** sempre disposta a cooperar, apoio e disposição constante.

À Profa Dra. **Vanda Jorgetti**, pelo trabalho de elaboração das lâminas histológicas.

Ao meu filho **Rafael**, que juntos iniciamos essa pesquisa, obrigada pelo auxílio nas horas de laboratório.

Ao Prof. Dr. **Carlos A. Pasqualucci**, amigo e idealizador das primeiras idéias, ainda na fase de mestrado, as quais evoluíram para a realização deste projeto, permitindo que meu sonho final se transformasse em realidade.

Aos meus filhos **Paulo Neto** e **Marcos Paulo**, pela paciência e compreensão das muitas horas ausentes, exigidas pelo trabalho.

À minha cunhada **Wilma Patullo**, pela torcida e incentivos constantes.

Aos meus irmãos **Yvete**, **Ivo** e **Ivelí**, pelo apoio que sempre me deram em toda minha vida.

Às minhas amigas, **Giselia**, **Jandyra**, **Lúcia**, **Marilisa**, **Myrian**, **Stela**, colegas de profissão sempre presentes e participantes de todos meus projetos.

Às minhas amigas de infância, **Ana Maria**, **Ângela**, **Eliana**, **Katy**, **Silvia** e **Lydia**, colegas desde a época da escola (Dante Alighieri), espelho de sucessos, fonte de inspiração e coragem. E Ilária querida, que mesmo a distância, sempre demonstrou apoio.

A todos meus amigos, cunhados e colegas, que de alguma forma participaram desta minha realização, obrigada por juntos permitirem que eu realizasse mais este sonho.

ÍNDICE

Listas de Abreviaturas

Listas de Figuras, Tabelas e Gráficos

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS.....	5
3	MÉTODOS.....	7
3.1	Protocolo	8
3.1.1	Cirurgia	10
3.2	Calibração do aparelho	12
3.3	Densidade Mineral Óssea (DMO)	13
3.4	Histogramorfometria do Côndilo Mandibular	15
3.5	Análise Estatística	16
4	RESULTADOS.....	17
4.1	Densitometria óssea.....	19
4.1.1	Grupos Sham vs. Grupos OVX (com dieta de consistência semelhante)	19
4.1.2	Grupos dieta-Pellet vs. Grupos dieta-Pó (com dieta de consistência diferente)	25
4.2	Histogramorfometria do Côndilo Mandibular	26
4.2.1	Grupos Sham vs. Grupos OVX (com dieta de consistência semelhante)	26
4.2.2	Grupos dieta-Pellet vs. Grupos dieta-Pó (com dieta de consistência diferente)	27
5	DISCUSSÃO.....	32
6	CONCLUSÕES.....	38
7	REFERÊNCIAS	40
8	APÊNDICE.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

BV/TV%	porcentagem de volume ósseo
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CMO	Conteúdo Mineral Ósseo
DMO	Densidade Mineral Óssea
DP	Desvio Padrão
DXA	<i>Dual energy X-Ray Absorptiometry</i> (Absorciometria de dupla emissão de fontes de Rx)
GI	Grupo I
GII	Grupo II
GIII	Grupo III
GIV	Grupo IV
g/cm²	gramas por centímetro ao quadrado
OVX	Ovariectomia
ROI	Região observada de interesse
Rx	Raio X
SHAM	Cirurgia simulada
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação Trabecular
TbTh	Espessura Trabecular
Vs.	Versus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corte dos incisivos: (A) rata com os incisivos, (B) rata sendo submetida ao corte dos incisivos (C) rata com os incisivos cortados	9
Figura 2. Hemimandíbula após dissecção	10
Figura 3. Abertura ventral para a cirurgia de ovariectomia ou Sham.	11
Figura 4. Animal em cirurgia com exposição dos ovários.	11
Figura 5. Imagem da densitometria óssea da hemimandíbula.....	14
Figura 6. Análise histomorfométrica do côndilo mandibular dos quatro grupos analisados mostrando as alterações histológicas.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso e Densidade Mineral Óssea da coluna lombar (L1-L4) e fêmur ao início da experiência nos quatro grupos analisados.....	19
Tabela 2a. Densidade Mineral Óssea (final – inicial) (Δ DMO) na coluna lombar (L1-L4) e fêmur, e Densidade Mineral Óssea final da hemimandíbula direita (HM) comparando os grupos Sham e OVX alimentados com a mesma dieta-Pellet ou a mesma dieta-Pó	21
Tabela 2b. Densidade Mineral Óssea (final–inicial) (Δ DMO) na coluna lombar (L1-L4) e fêmur, e DMO final na hemimandíbula (HM), comparando os grupos dieta-Pellet e dieta-Pó nos grupos Sham e OVX.....	26
Tabela 3a. Parâmetros histomorfométricos do côndilo mandibular ao comparar os grupos Sham e OVX dos animais alimentados com a mesma dieta-Pellet ou a mesma dieta-Pó.....	27
Tabela 3b. Parâmetros histomorfométricos do côndilo mandibular, comparando os grupos dieta-Pellet e dieta-Pó nos animais dos grupos Sham e OVX	28

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1a. Δ DMO da coluna lombar dos quatro grupos analisados comparando grupos Sham e OVX alimentados com dieta-Pellet e dieta-Pó	22
Gráfico 1b. Δ DMO do fêmur dos quatro grupos analisados comparando grupos Sham e OVX alimentados com dieta-Pellet e dieta-Pó	23
Gráfico 1c. Densidade Mineral óssea da hemimandíbula ao final do experimento nos quatro grupos analisados, comparando grupos Sham e OVX alimentados com dieta-Pellet e dieta-Pó	24
Gráfico 2a. Parâmetros histomorfométricos do côndilo mandibular dos quatro grupos analisados, comparando grupos Sham e OVX alimentados com dieta-Pellet e dieta-Pó : (2a) Volume ósseo (BV/TV)	29
Gráfico 2b. Parâmetros histomorfométricos do côndilo mandibular dos quatro grupos analisados, comparando grupos Sham e OVX alimentados com dieta-Pellet e dieta-Pó : (2 b) Espessura trabecular (Tb/th)	30

RESUMO

Patullo IMF. *Efeito da hipofunção mastigatória na massa óssea da mandíbula de ratas Wistar submetidas ou não a ovariectomia* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 45p.

Objetivo: Examinar o efeito da hipofunção mastigatória e deficiência estrogênica no osso da mandíbula e comparar esta região com o osso da coluna e fêmur. **Métodos:** Vinte e quatro ratas Wistar foram ovariectomizadas (OVX) ou Sham-operadas (Sham) e analisadas após alimentação com dieta-normal (Pellet) ou dieta-pó (Pó), divididas em 4 grupos: (G1) Sham-Pellet; (GII) OVX-Pellet; (GIII) Sham-Pó; (GIV) OVX-Pó. A densidade mineral óssea (DMO) foi medida na coluna lombar e fêmur ao início e final do estudo, e a Δ DMO (DMO inicial - DMO final) foi calculada. A DMO do osso mandibular e a histomorfometria foram analisadas ao final do experimento.

Resultados: Os animais dos grupos Sham apresentaram Δ DMO maior na coluna (G1:13.5% vs. GII:0.74%, $p<0.01$; GIII:10.67% vs. GIV:- 4.36%, $p<0.001$) e fêmur (G1:14.43% vs. GII:4.42%, $p<0.01$; GIII:10.58% vs. GIV:0.49%, $p<0.001$) que os dos grupos OVX, mas nenhuma diferença foi observada na DMO da mandíbula entre esses grupos ($p>0.05$). Por outro lado, os animais dos grupos de dieta-Pó mostraram diminuição da DMO da mandíbula quando comparados com os dos grupos de dieta-Pellet, (GIV vs. GII, $p<0.01$; GIII vs. G1, $p<0.01$). Semelhantemente, a análise histomorfométrica do côndilo mandibular mostrou que os grupos de dieta-Pó, apresentaram significante diminuição na espessura e volume trabecular quando comparado com os grupos de dieta-Pellet (GIV vs. GII, $p<0.05$; GIII vs. G1, $p<0.01$). **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que a perda óssea mandibular foi resultado da diminuição da carga mecânica durante a mastigação, e a mandíbula não foi afetada pela supressão de estrogênio.

Descritores: 1.Força da mordida 2.Mandíbula 3.Osteoporose
4.Ovariectomia 5.Ratos Wistar 6.Osso e ossos/anatomia & histologia
7.Densitometria

SUMMARY

Patullo IMF. *Effect of mastigatory hypofunction on mandibular bone mass of Wistar rats ovariectomised or not* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 45p.

Objectives: This study was designed to examine the effect of masticatory hypofunction and estrogen deficiency on mandible bone mass and compare this site with spine and femoral bone. **Methods:** Twenty-four rats were ovariectomized (OVX) or Sham-operated (Sham) and analyzed after feeding with hard-diet (Hard) or soft-diet (Soft). They were divided into 4 groups: (G1) Sham-Hard; (GII) OVX-Hard; (GIII) Sham-Soft and (GIV) OVX-Soft. Bone mineral density (BMD) was measured in the spine and femur in the baseline and at the end of the study, and Δ BMD (final BMD – baseline BMD) was calculated. In mandible bone, BMD and histomorphometry were analyzed at the end of the experiment. **Results:** Sham rats showed higher spine (G1: 13.5% vs. GII: 0.74%, $p<0.01$; GIII: 10.67% vs. GIV: - 4.36%, $p<0.001$) and femur Δ BMD (G1: 14.43% vs. GII: 4.42%, $p<0.01$; GIII: 10.58% vs. GIV: 0.49%, $p<0.001$) than OVX but no difference was observed in mandible BMD among these groups ($p>0.05$). Soft-diet groups showed decreased mandible BMD compared with hard-diet groups (GIV vs. GII, $p<0.01$; GIII vs. G1, $p<0.01$). Similarly, mandibular condyle histomorphometry showed that soft-diet groups presented a significant decrease in trabecular thickness and volume (GIV vs. GII, $p<0.05$; GIII vs. G1, $p<0.01$) compared to hard-diet. **Conclusions:** Our results suggest that mandibular bone loss resulted from decreased mechanical loading during mastication, and was not affected by estrogen depletion.

Descriptors: 1.Bite force 2.Mandible 3.Osteoporosis 4.Ovariectomy
5.Wistar rats 6.Bone/anatomy & Histology 7.Densitometry

1 INTRODUÇÃO

Existe controvérsia quanto ao osso mandibular e o esqueleto axial ou periférico, reagirem da mesma forma frente à perda óssea por deficiência hormonal. O estrogênio é importante para o crescimento e manutenção do esqueleto feminino. A menopausa é caracterizada por deficiência de estrogênio e mudanças na massa óssea tornando-se a principal causa de osteoporose nas mulheres. (Genant *et al*, 1998)

Em pacientes com osteoporose, a etiologia para a perda óssea do esqueleto axial e apendicular, e ossos maxilares é presumivelmente diferente. Na perda óssea sistêmica, a idade e a deficiência de estrogênio são os principais fatores etiológicos (Seeman, 2004), enquanto que o comprometimento ósseo oral pode ser considerado uma consequência de fatores locais tais como, ausência de dentes ou próteses mal adaptadas, os quais levam a uma mastigação deficiente (von Wowern, 2001; Seeman, 2004).

Estudos em ratos com sinais de osteoporose no esqueleto revelaram que a ovariectomia (OVX), por si só, não promove perda óssea alveolar ou mudanças na cortical mandibular, sendo necessária uma associação a outro fator causador de osteopenia para induzir significante perda óssea mandibular (Moriya *et al*, 1998; von Wowern, 2001; Jiang *et al*, 2003). Por outro lado, foi demonstrada uma correlação positiva entre diminuição da massa óssea oral e perda dentária, em pacientes com osteoporose sistêmica (Hirai *et al*, 1993; Taguchi *et al*, 1995).

É necessário lembrar, no entanto, que a maioria dos trabalhos que relacionaram as alterações da deficiência de estrogênio com reabsorção óssea mandibular, não levaram em consideração as cargas geradas durante a mastigação e sua atuação na massa óssea mandibular. Sabe-se que o estudo experimental da função mastigatória no osso mandibular, é de difícil interpretação, devido à falta de detalhes nas análises de distribuição das cargas na mandíbula, e ao fato da alta adaptabilidade do côndilo mandibular aos fatores funcionais durante o crescimento. Desta forma, pouco se sabe como a deficiência estrogênica e/ou hipofunção mastigatória, podem afetar a estrutura interna da mandíbula (Bresin *et al*, 1999; Huiskes *et al*, 2000).

Estudos experimentais em roedores em crescimento demonstraram que a redução da capacidade de função mastigatória pode provocar mudanças morfológicas na mandíbula (Ito *et al*, 1988). A metodologia utilizada para induzir hipofunção mastigatória é alimentar os animais com dieta macia (Kiliaridis *et al*, 1999; Tanaka *et al*, 2007), sendo demonstrado que a mudança da consistência da dieta, pode levar a alteração do tamanho na região do ramo e ângulo mandibular e processo condilar. (Ito *et al*, 1988). Isto pode ser observado na sociedade moderna, onde o consumo mais freqüente da dieta com pouca carga gera a redução de estímulo na força da mastigação (Corruccini and Lee, 1984). Experimentos em ratos em crescimento demonstraram que a hipofunção mastigatória induzida pela dieta macia, promove a redução do vigor do músculo mastigatório, o qual resulta em mudanças na morfologia mandibular e na microarquitetura do

osso alveolar (Kiliaridis and Shyu , 1998; Mavropoulos *et al*, 2004 a; Mavropoulos *et al*, 2004 b).

A maioria das mulheres na pós-menopausa reconhece a importância da saúde bucal na qualidade de vida, tanto por razões estéticas, como social e psicológica. A habilidade de comer deve ser considerada particularmente importante. Adultos desdentados que receberam retentores de implantes dentários para próteses, tiveram melhora tanto no vigor dos músculos mastigatórios quanto na capacidade de mastigar (Jemt *et al*, 1993).

Sendo assim, torna-se essencial para os dentistas, entender o mecanismo fisiopatológico relativo à perda óssea oral com a finalidade de preservar a boa qualidade de vida desses pacientes.

2 OBJETIVOS

Avaliar o efeito da hipofunção mastigatória e deficiência estrogênica na densidade mineral óssea e parâmetros histomorfométricos do osso mandibular de ratas Wistar, e comparar com os ossos da coluna e fêmur.

3 MÉTODOS

3.1 Protocolo

Foram utilizadas vinte e quatro ratas Wistar com quatro meses de idade, obtidas no Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), Brasil, com peso inicial de 240g, mantidas sob condições constantes de temperatura ($20 \pm 1^\circ\text{C}$), e claridade (12h-ciclo claro/escuro) com acesso *ad libitum* à água e ração. Como modelo de osteoporose por supressão de estrogênio, 12 animais foram ovariectomizadas bilateralmente (OVX) e o grupo controle ($n=12$) submetido à cirurgia simulada (Sham), após serem anestesiados via intraperitoneal com 50 mg/Kg Ketamina ((Ketalar, Parke-Davis) e 10 mg/Kg Xylazine (Rompum, Bayer). Para a indução da hipofunção mastigatória, a consistência da ração dura tradicional foi transformada em pó. Os ratos de dieta dura tradicional, foram alimentados pela ração sólida (Pellet) (Nuvital Nutrients S/S, Curitiba, PR, Brasil). Os animais de dieta-pó alimentaram-se da mesma ração, porém ralada (Pó), e tiveram seus incisivos cortados bilateralmente ao nível gengival, dia sim dia não (Hinton and Carlson, 1986) (Figura 1).

A ração foi peneirada para excluir partículas grandes que pudesse estimular atividade roedora (Kiliaridis *et al*, 1999; Tanaka *et al*, 2007).

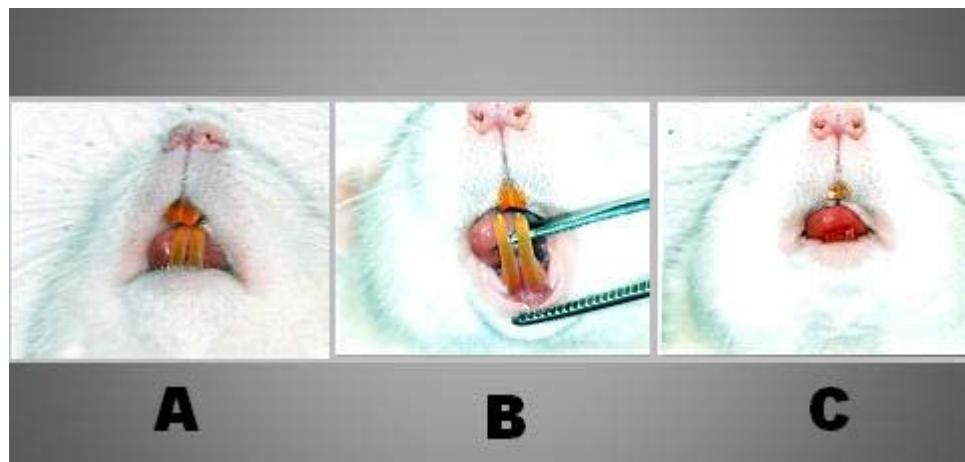


Figura 1. Corte dos incisivos: (A) rata com os incisivos, (B) rata sendo submetida ao corte dos incisivos (C) rata com os incisivos cortados

Os animais foram randomizados em 4 grupos ($n=6$ em cada grupo):

G_I: sham-operados e alimentados com dieta-Pellet (Sham-Pellet),

G_{II}: ovariectomizados e alimentados com dieta-Pellet (OVX-Pellet),

G_{III}: sham-operados e alimentados com dieta-Pó (Sham-Pó),

G_{IV}: ovariectomizados e alimentados com dieta-Pó (OVX-Pó).

Os animais foram pesados semanalmente durante o período experimental. Devido ao formato anatômico da mandíbula, que impossibilita a medição no aparelho de densitometria óssea, as mandíbulas foram dissecadas inteiras e posteriormente divididas ao meio por um bisturi, na região da sutura mediana (Figura 2). Para facilitar o manuseio, e por apresentarem tecido ósseo semelhante, a hemimandíbula direita foi usada para a medida da densidade mineral óssea (DMO) e a hemimandíbula esquerda foi submetida à análise de histomorfometria óssea.

O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.



Figura 2. Hemimandíbula após dissecção

3.1.1 Cirurgia

A cirurgia OVX, foi realizada com o animal em decúbito ventral, através de pequena incisão na região central do abdome, entre as patas inferiores (Figura 3)

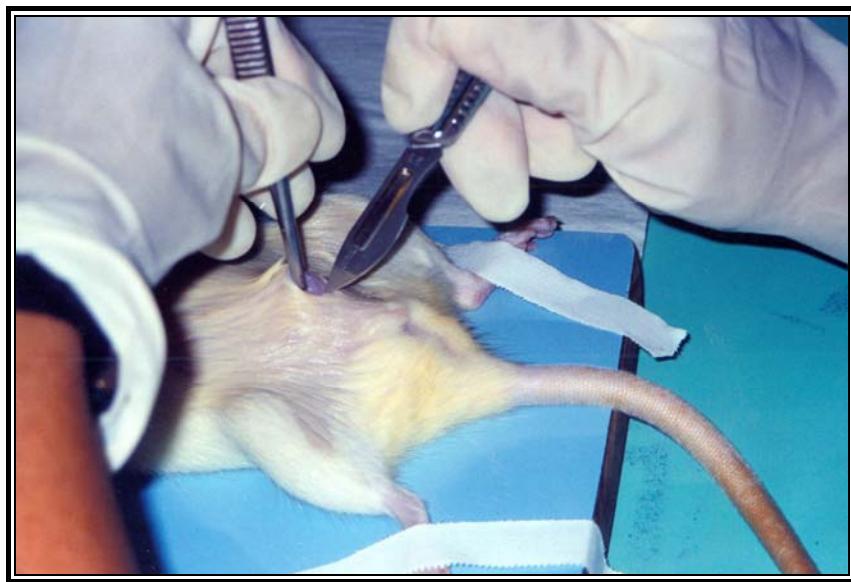


Figura 3. Abertura ventral para a cirurgia de ovariectomia ou Sham.

Os ovários e trompas foram puxados para fora da cavidade abdominal através daquela abertura, por uma pinça, seguindo-se uma sutura nas trompas dos dois lados para posterior remoção bilateral dos ovários (Figura 4).

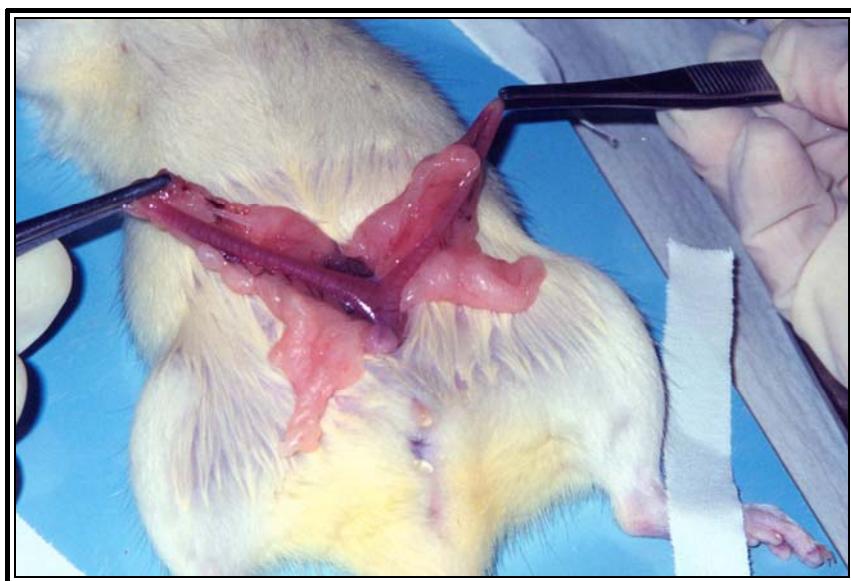


Figura 4. Animal em cirurgia com exposição dos ovários.

Ao final, a parede abdominal do animal foi devidamente suturada. Na cirurgia Sham, os animais foram submetidos à falsa cirurgia, num procedimento semelhante à cirurgia OVX, em que os ovários e trompas foram pinçados para fora da cavidade, através da incisão da parede abdominal, porém posteriormente, recolocados sem nenhuma ressecção. Em seguida, a parede abdominal do animal foi devidamente suturada.

3.2 Calibração do aparelho

A calibração do aparelho de densitometria óssea foi realizada antes do início das avaliações, em teste com bloco padrão composto por três camadas sintéticas, de constituição semelhante ao osso, com área e conteúdo mineral conhecidos. Para a precisão das medidas de DMO repetiu-se o “scan” cinco vezes após o reposicionamento das peças. A delimitação das regiões analisadas foi auxiliada por dispositivos existentes no próprio programa, para selecionar sempre o mesmo espaço, com auxílio de dispositivos oferecidos pelo aparelho a fim de padronizar as medidas.

3.3 Densidade Mineral Óssea (DMO)

A densidade Mineral Óssea (DMO) foi medida por Dupla emissão de fontes de Rx (DXA; Hologic QDR-2000, Bedford, MA, USA) utilizando software para pequenos animais, espaço para linha do scan de 0.0254cm e resolução para cada ponto de 0.0127cm. A reprodutibilidade *in vivo* foi avaliada medindo-se o coeficiente de variação ($CV=100 \times DP/\text{média}$) de 5 medidas de DMO em três ratos pesando em média 227g, resultando em 1,1% na coluna lombar (L1-L4), 1,9% no fêmur total e hemimandíbula 0,88%. Os resultados foram expressos em g/cm^2

A densidade mineral óssea (DMO) foi medida na coluna lombar e fêmur total, ao início e após 9 semanas (da Paz *et al*, 2001), para o cálculo da ΔDMO (DMO final – DMO inicial) e os animais pesados semanalmente durante o período experimental. A DMO da hemimandíbula direita total, foi medida somente ao final da experiência após sua dissecação. As amostras foram colocadas em recipiente com solução salina, com o lado lingual virado para cima. A mandíbula foi posicionada de tal forma que o braço do aparelho (scan) pode se mover perpendicular ao plano oclusal. (Elovic *et al*, 1995).

A região observada de interesse (ROI) foi definida como uma área retangular que incluiu: processo condilar, coronóide e alveolar. Determinou-se a ROI, manualmente, eliminando-se a área das coroas dos molares e incisivos. (Figura 5).

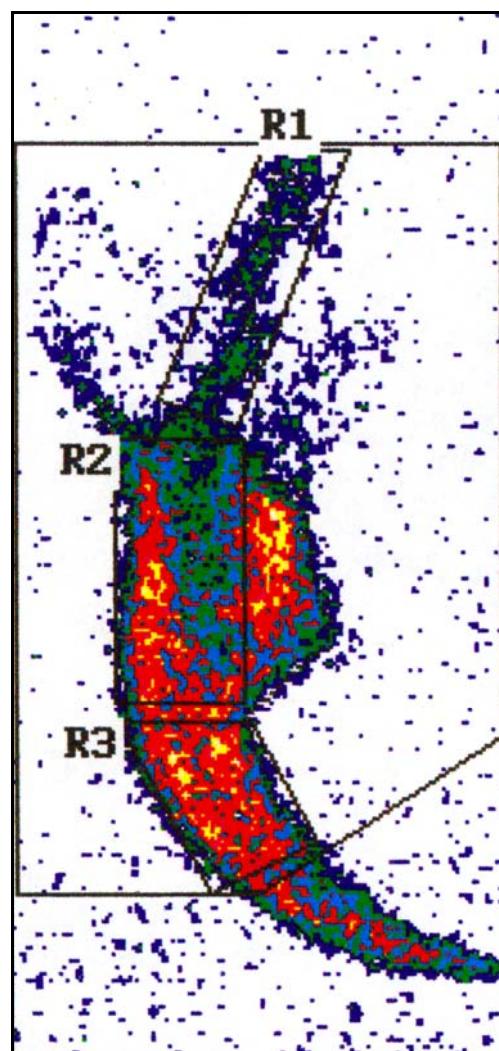


Figura 5. Imagem da densitometria óssea da hemimandíbula
R1+R2+R3 representam a região observada de interesse (ROI)

3.4 Histonorfometria do Côndilo Mandibular

O côndilo mandibular das hemimandíbulas esquerda, foi fixado em 70% de etanol, desidratado com aumento de concentração de etanol e embebido em methylmethacrilato sem descalcificação. Após a polimerização, os blocos foram colocados com a superfície do côndilo mandibular para cima. As amostras obtidas foram seccionadas longitudinalmente numa espessura de 5 – 10 μm , usando micrótomo Policut S (Reichert-Jung, Heidelberg, Germany). A secção de 5 μm foi fixada com 0,1% de azul de toluidina, pH 6,4 e examinadas pelo menos duas secções não consecutivas de cada amostra. As medidas histológicas do côndilo total foram feitas, incluindo-se uma mesma área, na região de maior convexidade do côndilo, na porção do contorno superior, no osso subcondral, diretamente abaixo da região anterior, central e posterior, a qual está em articulação com a parte do crânio. Todos os índices histomorfométricos foram descritos de acordo com nomenclatura padrão da Sociedade Americana de Pesquisa Mineral (American Society of Mineral Research).(Parfitt, 1987).

Foram obtidos os seguintes parâmetros histomorfométricos, medidos numa região padrão, escolhidas abaixo da cartilagem de crescimento:

- (1) volume ósseo (BV/TV, %),
- (2) espessura trabecular (Tb.Th μm),
- (3) separação trabecular (Tb. Sp μm),
- (4) número de trabéculas (Tb.N/mm).

3.5 Análise Estatística

Os valores obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Foi utilizada a análise de ANOVA para determinar a significância entre os grupos, seguido do teste de Bonferroni, para variáveis em que se verificou diferença estatisticamente significante entre os grupos usando o software para estatística, Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Fixou-se um limiar máximo de 5% ($p<0,05$) para valores de “p” indicativos de significância estatística.

4 RESULTADOS

Ao início do experimento, os quatro grupos (G1 vs. GII vs. GIII vs. GIV) apresentaram características homogêneas quanto:

Peso: G1: $228,5 \pm 7,03$ g vs. GII: $234,5 \pm 3,83$ g vs. GIII: $227,3 \pm 8,11$ g vs. GIV: $240 \pm 3,98$ g, $p=0,27$;

DMO da coluna lombar: G1: $0,184 \pm 0,009$ g/cm² vs. GII: $0,190 \pm 0,007$ g/cm² vs. GIII: $0,178 \pm 0,007$ g/cm² vs. GIV: $0,195 \pm 0,12$ g/cm², $p=0,54$;

DMO do fêmur total: G1: $0,245 \pm 0,008$ g/cm² vs. GII: $0,253 \pm 0,008$ g/cm² vs. GIII: $0,235 \pm 0,007$ g/cm² vs. GIV: $0,244 \pm 0,010$ g/cm², $p=0,93$. (Tabela 1).

A média dos pesos ao final da experiência não mostrou diferença estatisticamente significante entre os quatro grupos estudados de ratos:

G1: $48,33 \pm 7,34$ g; GII: $57,33 \pm 5,11$ g; GIII: $42,33 \pm 7,80$ g; GIV: $43,5 \pm 8,66$ g, $p>0,05$.

O ganho em peso pelos grupos de dieta-Pó foi bom, não demonstrando deficiência nutricional.

Tabela 1. Peso e Densidade Mineral Óssea da coluna lombar (L1-L4) e fêmur ao início da experiência nos quatro grupos analisados

	GI Sham-Pellet n=6	GII OVX-Pellet n=6	GIII Sham-Pó n=6	GIV OVX-Pó n=6	p
Peso, g	228,5 ± 7,03	234,5 ± 3,83	227,3 ± 8,11	240 ± 3,98	0,27
DMO L1-L4, g/cm²	0,184 ± 0,009	0,190 ± 0,007	0,178 ± 0,007	0,195 ± 0,12	0,54
DMO fêmur, g/cm²	0,245 ± 0,008	0,253 ± 0,008	0,235 ± 0,007	0,244 ± 0,010	0,93

GI (Sham-Pellet) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pellet

GII (OVX-Pellet) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pellet

GIII (Sham-Pó) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pó

GIV (OVX-Pó) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pó.

Dados expressos em ± DP

4.1 Densitometria óssea

4.1.1 Grupos Sham vs. Grupos OVX (com dieta de consistência semelhante)

Foi observado um aumento significante na ΔDMO (g/cm² e %) da coluna lombar nos grupos Sham, comparados com os grupos OVX, e dieta de mesma consistência:

Grupos de dieta-Pellet: G1 Sham: $0,0248 \pm 0,009$ g/cm² vs. G2 OVX: $0,0014 \pm 0,009$ g/cm², **p<0,01**

Grupos de dieta-Pó: G3 Sham: $0,019 \pm 0,004$ g/cm² vs. G4 OVX: $-0,0085 \pm 0,014$ g/cm², **p<0,001**.

Com aumento em porcentagem nos grupos Sham:

Grupos de dieta Pellet: G1 Sham: 13,51% vs. G2 OVX: 0,74%, **p<0,01**

Grupos de dieta Pó: G3 Sham 10,67% vs. G4 OVX: -4,36%, **p<0,001**
(Gráfico 1a)

Semelhantemente, um aumento na Δ DMO (g/cm² e %) do fêmur, foi demonstrado nos grupos Sham comparados com os grupos OVX e dieta de mesma consistência:

Grupos de dieta-Pellet: G1 Sham: $0,0354 \pm 0,006$ g/cm² vs. G2 OVX: $0,0112 \pm 0,004$ g/cm², **p<0,001**

Grupos de dieta-Pó: G3 Sham: $0,0249 \pm 0,010$ g/cm² vs. G4 OVX: $0,0012 \pm 0,011$ g/cm², **p<0,001**.

Com aumento em porcentagem nos grupos Sham:

Grupos de dieta-Pellet:

G1 Sham: 14,43% vs. G2 OVX: 4,42%, **p<0,001**

Grupos de dieta-Pó:

G3 Sham: 10,58 vs. G4 OVX: 0,49%, **p<0,001** (Gráfico 1b).(Tabela 2a)

Ao contrário, não foi observada diferença significante na DMO da mandíbula comparando-se os grupos Sham com OVX, utilizando-se dieta com consistência semelhante:

Grupos de dieta-Pellet: GI Sham: $0,2108 \pm 0,007 \text{ g/cm}^2$ vs. GII OVX: $0,2146 \pm 0,005 \text{ g/cm}^2$, $p>0,05$

Grupos de dieta-Pó: GIII Sham: $0,1942 \pm 0,008 \text{ g/cm}^2$ vs. GIV OVX: $0,1982 \pm 0,005 \text{ g/cm}^2$, $p>0,05$. (Gráfico 1c) (Tabela 2a).

Tabela 2a. Densidade Mineral Óssea (final – inicial) (ΔDMO) na coluna lombar (L1-L4) e fêmur, e Densidade Mineral Óssea final da hemimandíbula direita (HM) comparando os grupos Sham e OVX alimentados com a mesma dieta-Pellet ou a mesma dieta-Pó

	GI Sham-Pellet n =6	GII OVX-Pellet n =6	<i>p</i>	GIII Sham-Pó n =6	GIV OVX-Pó n=6	<i>p</i>
L1-L4 ΔDMO, g/cm²	$0,0248 \pm 0,009$	$0,0014 \pm 0,009$	< 0,01	$0,019 \pm 0,004$	$-0,0085 \pm 0,014$	< 0,001
Fêmur ΔDMO, g/cm²	$0,0354 \pm 0,006$	$0,0112 \pm 0,004$	< 0,001	$0,0249 \pm 0,010$	$0,0012 \pm 0,011$	< 0,001
HM DMO, g/cm²	$0,2108 \pm 0,007$	$0,2146 \pm 0,005$	> 0,05	$0,1942 \pm 0,008$	$0,1982 \pm 0,005$	> 0,05

GI (Sham-Pellet) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pellet

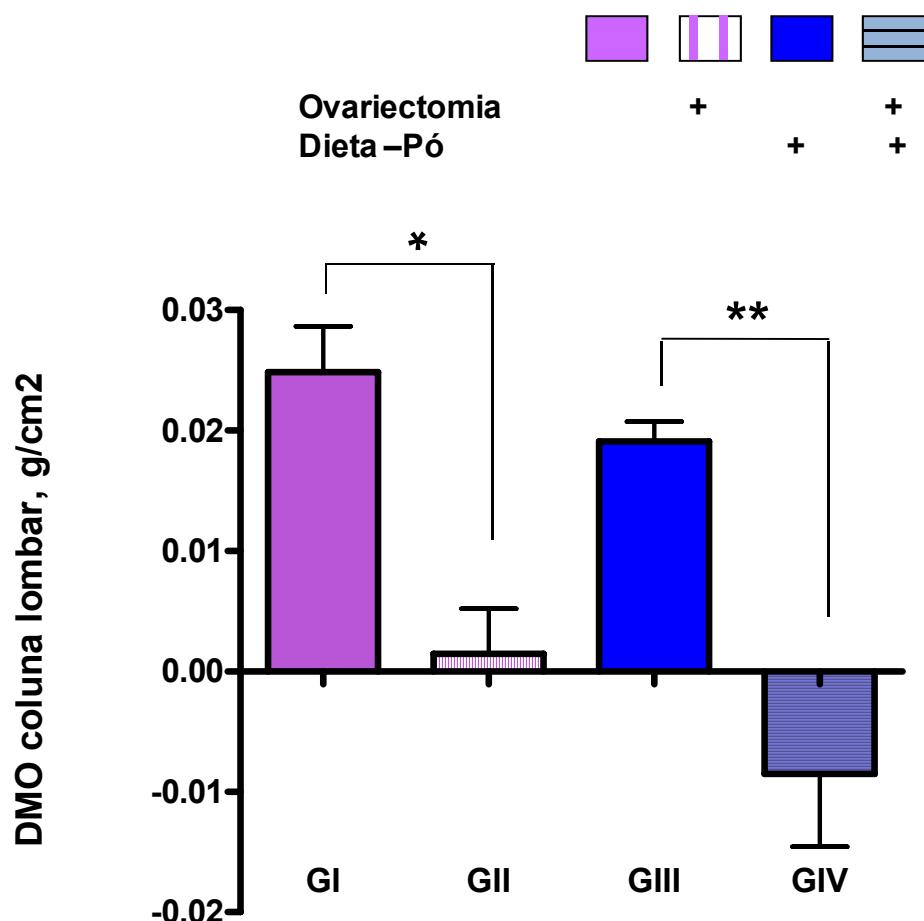
GII (OVX-Pellet) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pellet

GIII (Sham-Pó) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pó

GIV (OVX-Pó) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pó

Dados expressos em \pm DP

Gráfico 1a. Δ DMO da coluna lombar dos quatro grupos analisados comparando grupos Sham e OVX alimentados com dieta-Pellet e dieta-Pó



* p<0,01; **p<0,001

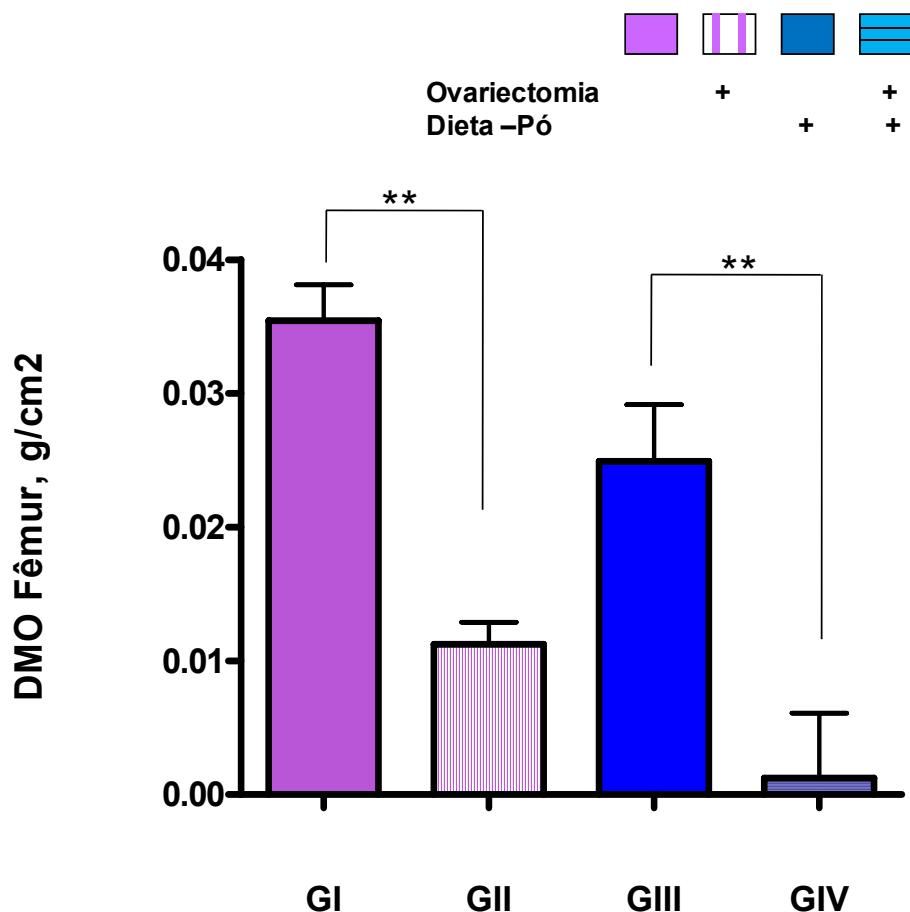
G I (Sham-Pellet) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pellet

G II (OVX-Pellet) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pellet

G III (Sham-Pó) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pó

G IV (OVX-Pó) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pó

Gráfico 1b. Δ DMO do fêmur dos quatro grupos analisados comparando grupos Sham e OVX alimentados com dieta-Pellet e dieta-Pó



** p<0,001

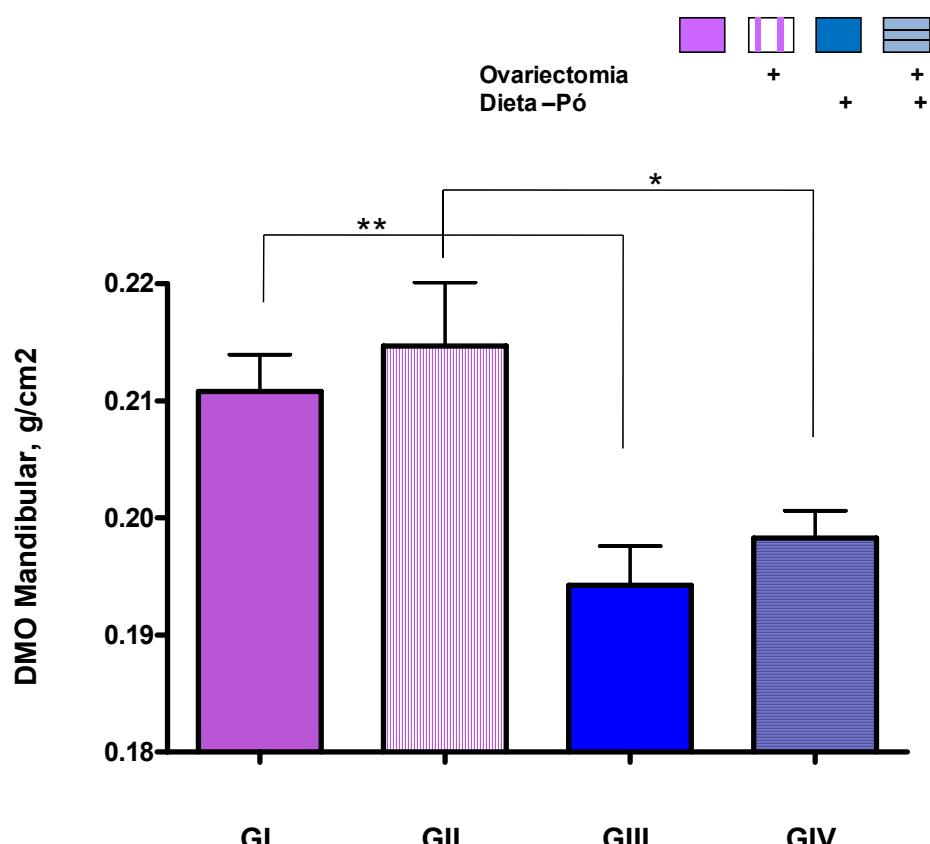
G I (Sham-Pellet) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pellet

G II (OVX-Pellet) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pellet

G III (Sham-Pó) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pó

G IV (OVX-Pó) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pó

Gráfico 1c. Densidade Mineral óssea da hemimandíbula ao final do experimento nos quatro grupos analisados, comparando grupos Sham e OVX alimentados com dieta-Pellet e dieta-Pó



* p<0,01; **p<0,001

G I (Sham-Pellet) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pellet

G II (OVX-Pellet) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pellet

G III (Sham-Pó) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pó

G IV (OVX-Pó) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pó

4.1.2 Grupos dieta-Pellet vs. Grupos dieta-Pó (com dieta de consistência diferente)

A Δ DMO da coluna lombar e fêmur nos ratos alimentados com dieta Pellet e Pó foram similares:

Para os grupos Sham:

DMO da coluna: G1 dieta Pellet: $0,0248 \pm 0,009 \text{ g/cm}^2$ vs. GIII dieta Pó $0,019 \pm 0,004 \text{ g/cm}^2$, $p>0,05$;

DMO do fêmur: G1 dieta Pellet: $0,0354 \pm 0,006 \text{ g/cm}^2$ vs. GIII dieta-Pó $0,0249 \pm 0,010 \text{ g/cm}^2$, $p>0,05$.

Para os grupos OVX:

DMO da coluna: GII dieta-Pellet: $0,0014 \pm 0,009 \text{ g/cm}^2$ vs. GIV dieta-Pó: $-0,0085 \pm 0,014 \text{ g/cm}^2$, $p>0,05$

DMO do fêmur: GII dieta-Pellet: $0,0112 \pm 0,004 \text{ g/cm}^2$ vs. GIV dieta-Pó: $0,0012 \pm 0,011 \text{ g/cm}^2$, $p>0,05$). (Gráfico 1a, 1b)

Diferentemente, para o osso mandibular, foi observada DMO com valores significantemente menores nos grupos alimentados com **dieta-Pó** comparados com os grupos de dieta-Pellet:

Grupos Sham: **GIII dieta-Pó:** $0,1942 \pm 0,008 \text{ g/cm}^2$ vs. G1 Dieta-Pellet: $0,2108 \pm 0,007 \text{ g/cm}^2$ **$p<0,01$**

Grupos OVX: **GIV dieta-Pó:** $0,1982 \pm 0,005 \text{ g/cm}^2$ vs. GII dieta-Pellet: $0,2146 \pm 0,005 \text{ g/cm}^2$ **$p<0,01$** . (Tabela. 2b) (Gráfico 1 c).

Tabela 2b. Densidade Mineral Óssea (final-inicial) (Δ DMO) na coluna lombar (L1-L4) e fêmur, e DMO final na hemimandíbula (HM), comparando os grupos dieta-Pellet e dieta-Pó nos grupos Sham e OVX

	GI Sham-Pellet <i>n</i> = 6	GIII Sham-Pó <i>n</i> = 6	<i>p</i>	GII OVX-Pellet <i>n</i> = 6	GIV OVX-Pó <i>n</i> = 6	<i>p</i>
L1-L4 ΔDMO g/cm²	0,0248 ± 0,009	0,019 ± 0,004	>0,05	0,0014 ± 0,009	-0,0085 ± 0,014	>0,05
Femur ΔDMO g/cm²	0,0354 ± 0,006	0,0249 ± 0,010	>0,05	0,0112 ± 0,004	0,0012 ± 0,011	>0,05
HM DMO, g/cm²	0,2108 ± 0,007	0,1942 ± 0,008	< 0,01	0,2146 ± 0,005	0,1982 ± 0,005	<0,01

GI (Sham-Pellet) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pellet

GII (OVX-Pellet) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pellet

GIII (Sham-Pó) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pó

GIV (OVX-Pó) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pó

Dados expressos em ± DP

4.2 Histomorfometria do Côndilo Mandibular

4.2.1 Grupos Sham vs. Grupos OVX (com dieta de consistência semelhante)

Não foi observada nenhuma diferença significante nos valores obtidos da análise de histomorfometria óssea do côndilo da mandíbula, nos parâmetros: (BV/TV, Tb.Th,Tb.Sp,Tb.N), quando comparados os grupos Sham vs. OVX, alimentados com dieta de mesma consistência:

Dieta-Pellet: GI Sham vs. GII OVX, *p*>0,05

Dieta-Pó: GIII Sham vs. GIV OVX, *p*>0,05. (Tabela 3a) (Figura 6)

Tabela 3a. Parâmetros histomorfométricos do côndilo mandibular ao comparar os grupos Sham e OVX dos animais alimentados com a mesma dieta-Pellet ou a mesma dieta-Pó

	GI Sham-Pellet n =6	GII OVX-Pellet n =6	p	GIII Sham-Pó n =6	GIV OVX-Pó n=6	p
BV/TV, %	$30,65 \pm 3,44$	$27,85 \pm 3,34$	>0,05	$18,56 \pm 2,78$	$19,85 \pm 1,77$	>0,05
Tb.Th, μm	$61,33 \pm 6$	$57,49 \pm 9,66$	>0,05	$41,41 \pm 6,06$	$42,91 \pm 9,13$	>0,05
Tb.Sp, μm	$156,66 \pm 33,6$	$173,94 \pm 39,52$	>0,05	$166,98 \pm 36,8$	$171,51 \pm 9,06$	>0,05
Tb.N, mm	$4,73 \pm 0,65$	$4,44 \pm 0,74$	>0,05	$4,95 \pm 0,92$	$4,63 \pm 0,29$	>0,05

GI (Sham-Pellet) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pellet

GII (OVX-Pellet) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pellet

GIII (Sham-Pó) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pó

GIV (OVX-Pó) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pó

BV/TV – volume ósseo; Tb.Th – espessura trabecular

Tb.Sp – separação trabecular; Tb.N – número de trabéculas.

Dados expressos em \pm DP

4.2.2 Grupos dieta-Pellet vs. Grupos dieta-Pó (com dieta de consistência diferente)

Os parâmetros histomorfométricos do côndilo mandibular: BV/TV e Tb.Th apresentaram valores significantemente menores nos ratos alimentados com **dieta-Pó** comparados com aqueles alimentados com dieta-Pellet: tanto para os grupos Sham:

BV/TV: GIII dieta-Pó: $18,56 \pm 2,78$ % vs. GI dieta-Pellet: $30,65 \pm 3,49\%$,
p<0,001;

Tb.Th: GIII dieta-Pó: $41,41 \pm 6,06 \mu\text{m}$ vs. GI dieta-Pellet: $61,33 \pm 6,00 \mu\text{m}$,
p<0,01,

quanto para os animais dos grupos OVX:

BV/BT: **GIV dieta-Pó**: $19,85 \pm 1,77\%$ vs. GII dieta-Pellet: $27,84 \pm 3,34\%$,
p<0,01;

Tb.Th: **GIV dieta-Pó**: $42,91 \pm 9,13\text{ }\mu\text{m}$ vs. GII dieta-Pellet: $57,49 \pm 9,66\text{ }\mu\text{m}$,
p<0,05. (Tabela 3b) (Gráficos 2a; 2b) (Figura1)

Tabela 3b. Parâmetros histomorfométricos do côndilo mandibular, comparando os grupos dieta-Pellet e dieta-Pó nos animais dos grupos Sham e OVX

	GI Sham-Pellet n = 6	GIII Sham-Pó n = 6	p	GII OVX-Pellet n=6	GIV OVX-Pó n=6	p
BV/TV, %	$30,65 \pm 3,44$	$18,56 \pm 2,78$	< 0,001	$27,84 \pm 3,34$	$19,85 \pm 1,77$	<0,01
Tb.Th, μm	$61,33 \pm 6$	$41,41 \pm 6,06$	< 0,01	$57,49 \pm 9,66$	$42,91 \pm 9,13$	<0,05
Tb.Sp, μm	$156,66 \pm 33,69$	$166,98 \pm 36,84$	$> 0,05$	$173,94 \pm 39,52$	$171,51 \pm 9,06$	$>0,05$
Tb.N, mm	$4,73 \pm 0,65$	$4,95 \pm 0,92$	$> 0,05$	$4,44 \pm 0,74$	$4,63 \pm 0,29$	$>0,05$

GI (Sham-Pellet) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pellet

GII (OVX-Pellet) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pellet

GIII (Sham-Pó) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pó

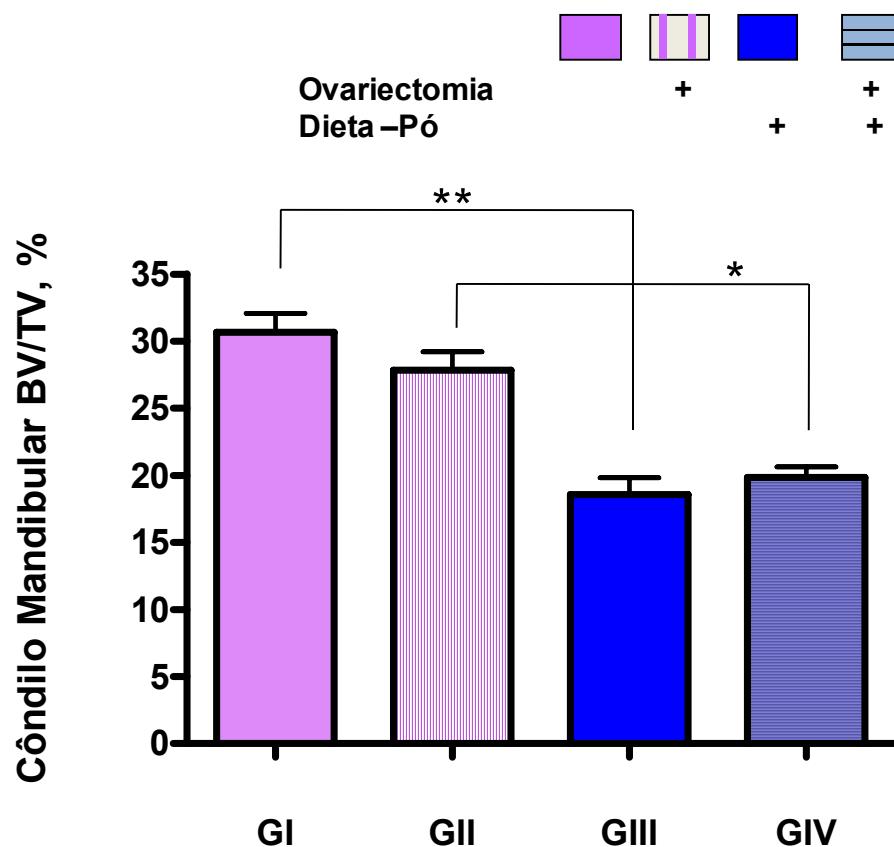
GIV (OVX-Pó) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pó

BV/TV – volume ósseo; Tb.Th – espessura trabecular

Tb.Sp – separação trabecular; Tb.N – número de trabéculas.

Dados expressos em \pm DP

Gráfico 2a. Parâmetros histomorfométricos do côndilo mandibular dos quatro grupos analisados, comparando grupos Sham e OVX alimentados com dieta-Pellet e dieta-Pó : (2a) Volume ósseo (BV/TV)



* p<0,01; ** p<0,001

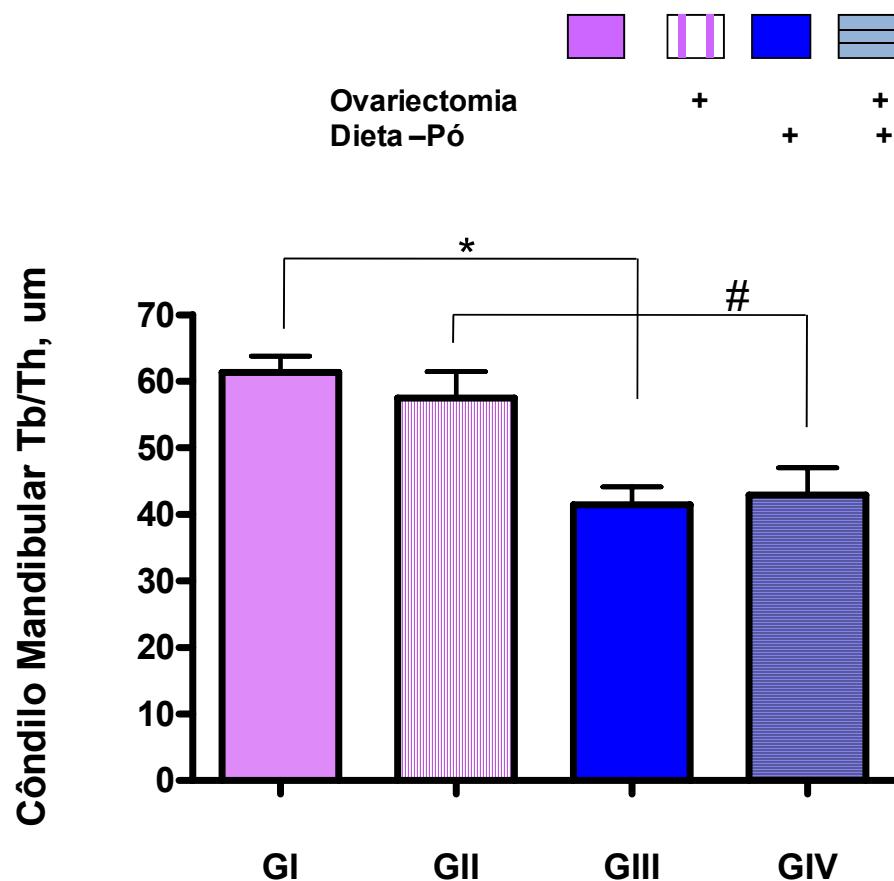
G I (Sham-Pellet) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pellet

G II (OVX-Pellet) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pellet

G III (Sham-Pó) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pó

G IV (OVX-Pó) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pó

Gráfico 2b. Parâmetros histomorfométricos do côndilo mandibular dos quatro grupos analisados, comparando grupos Sham e OVX alimentados com dieta-Pellet e dieta-Pó : (2 b) Espessura trabecular (Tb/th)



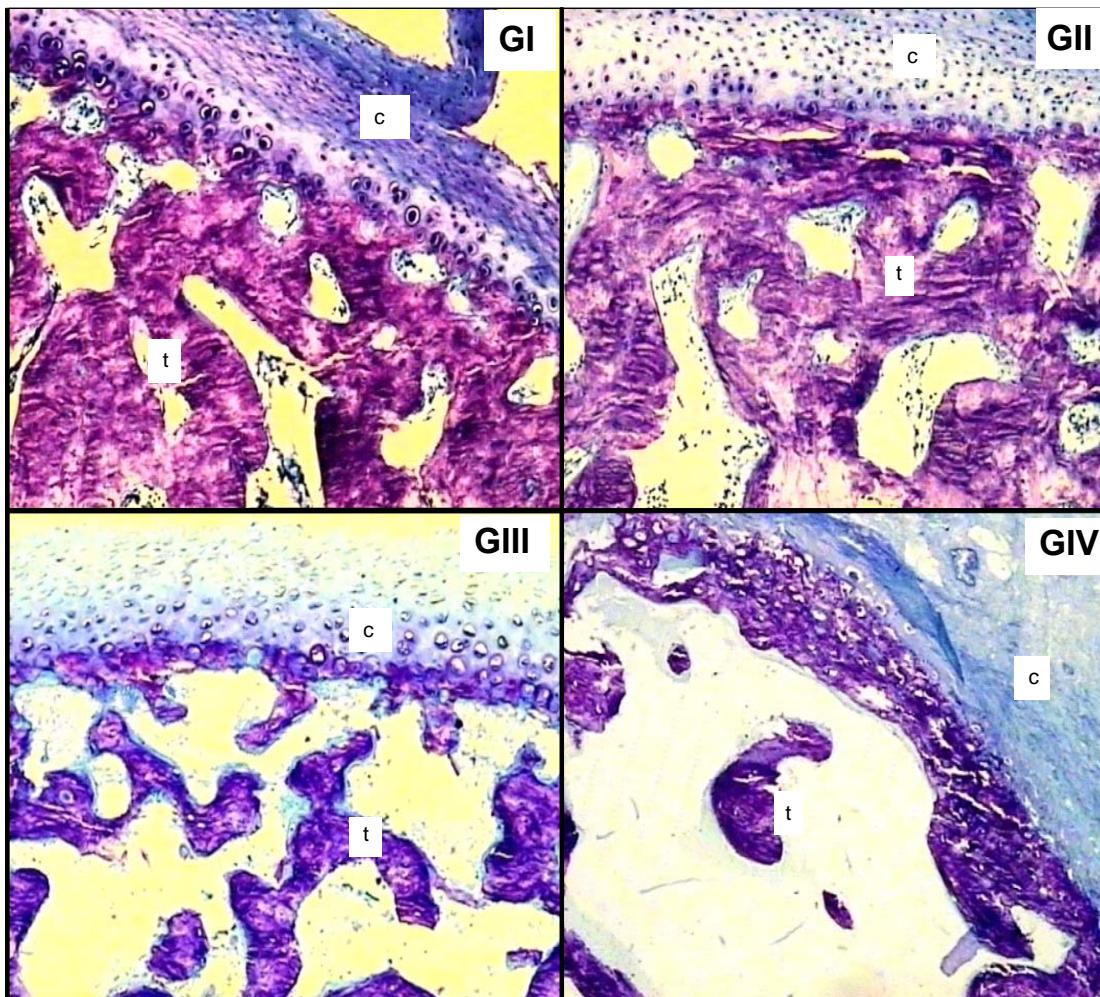
* p<0,01; # p<0,05.

G1 (Sham-Pellet) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pellet

GII (OVX-Pellet) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pellet

GIII (Sham-Pó) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pó

GIV (OVX-Pó) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pó



GI (Sham-Pellet) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pellet

GII (OVX-Pellet) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pellet

GIII (Sham-Pó) - ratas sham operadas e alimentadas com dieta Pó

GIV (OVX-Pó) - ratas ovariectomizadas e alimentadas com dieta Pó

Figura 6. Análise histomorfométrica do côndilo mandibular dos quatro grupos analisados mostrando as alterações histológicas. Observar aspecto normal das trabéculas óssea nos grupos de dieta–Pellet (GI e GII) e a diminuição do volume e número de trabéculas dos grupos de dieta-Pó (GIII e GIV). Coloração azul de toluidina; aumento X 100. (t) osso trabecular (c) cartilagem condilar

5 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a hipofunção mastigatória é o principal fator para a perda óssea mandibular em ratas Wistar.

A ovariectomia em ratos é conhecida por causar perda de massa óssea (Wronski *et al*, 1988). Entretanto, a alteração nos ossos do esqueleto, induzida por OVX pode variar dependendo da região a ser observada, e provocar efeitos diferentes, na região do osso mandibular, na coluna lombar e fêmur (Li *et al*, 1996; Yamashiro and Yamamoto, 1997).

Os dados da literatura são controversos. Alguns estudos mostraram relação positiva entre osteoporose sistêmica induzida por deficiência estrogênica e baixa densidade mineral na mandíbula. (Tanaka *et al*, 2002; Yang *et al*, 2005). Yang *et al.*, demonstraram em ratas ovariectomizadas a necessidade de uma deficiência de estrogênio a longo prazo para que haja diminuição da espessura da cortical mandibular. Estes autores concluem que deva haver um período considerável de deficiência de estrogênio para que seja observada em mulheres, uma redução na cortical mandibular (Yang *et al*, 2005).

Por outro lado, vários estudos em animais, falharam em detectar mudanças na cortical óssea mandibular após OVX (Moriya *et al*, 1998; Jiang *et al*, 2003). Alguns autores encontraram que o conteúdo mineral ósseo e as propriedades mecânicas das mandíbulas das ratas OVX, são semelhantes

àquelas das ratas sham-operadas, e que o osso mandibular desses animais não apresentaram perda óssea após OVX (Elovic *et al*, 1995; Yamashiro and Yamamoto, 1997). Jiang *et al*, concluíram que a perda óssea na mandíbula provocada apenas pela OVX era menor que aquela provocada apenas por dieta deficiente de cálcio; em particular, as ratas OVX não mostraram diminuição significante na DMO e conteúdo mineral ósseo (CMO) da cortical mandibular comparada ao grupo Sham (Jiang *et al*, 2003).

Essas divergências podem estar relacionadas ao fato de que a maioria desses estudos não analisou simultaneamente, a deficiência de estrogênio associada à função mastigatória, como resultado de perda óssea oral. Recentemente, um estudo experimental em ratos adultos, mostrou que o osso mandibular foi menos afetado pela ovariectomia e/ou por desnutrição com, proteína isocalórica comparando a mandíbula com a tibia proximal, sugerindo que as cargas mecânicas no processo alveolar durante a mastigação, podem proteger o osso alveolar dos efeitos observados em outros pontos do esqueleto (Mavropoulos *et al*, 2007).

As cargas aplicadas na mandíbula são provenientes de forças derivadas dos dentes durante a mastigação ou mordida; este fato parece ser mais importante que a deficiência de estrogênio. Tem sido preconizado que cargas mecânicas aumentam a formação e suprimem a reabsorção óssea (Sakata *et al*, 1999; Tanaka *et al*, 2007). Uma dieta líquida/pastosa (sem carga), associada com redução de forças aplicada à mandíbula durante a mastigação, pode resultar em redução na formação óssea e aumento na reabsorção óssea mandibular. Por outro lado, o osso mandibular sob

condições de forças intermitentes da oclusão é estimulado à formação óssea e, portanto, contra-ataca a aceleração de reabsorção óssea, induzida pela deficiência de estrogênio (Tanaka *et al*, 1999; 2007). Muitos relatos demonstraram que a dieta sem carga, também é responsável pelo aumento de maloclusão por apinhamento dentário, que implica em arcos maxilares estreitos e curtos (Yamamoto, 1996; Kiliaridis *et al*, 1999). Tem sido demonstrado também, que a densidade trabecular dos côndilos, diminui significantemente quando os incisivos dos ratos são nivelados para reduzir a carga mecânica nos côndilos (Hinton and Carlson, 1986).

Mavropoulos *et al*, também observaram que a alteração da consistência da dieta de ratos em crescimento, induz a um menor osso alveolar, densidade mineral e diminuição do osso trabecular e espessura, devido à redução da função mastigatória (Mavropoulos *et al*, 2004 b). Outros autores investigaram as mudanças provocadas pelo efeito da OVX em mandíbulas com e sem dentes, comparando-as com a região da tíbia e fêmur. Os resultados mostraram que a perda de massa óssea na mandíbula dos animais OVX edêntulos, foi semelhante ‘aquela que ocorreu na tíbia e fêmur, enquanto pouco efeito da OVX na massa óssea das mandíbulas com dentes foi observado, sugerindo que a função mecânica relativa à força da mordida preveniu a perda óssea nas mandíbulas com dentes (Elsubeih *et al*, 2009).

O osso está constantemente em adaptação funcional do meio ambiente promovendo reabsorção e remodelação óssea quando necessário. A alteração da função mastigatória por mudança de consistência da dieta pode

provocar mudanças no formato da mandíbula e induzir alterações na massa óssea, espessura e densidade óssea (Kiliaridis *et al.*, 1996; Bresin *et al.*, 1999). Ödman *et al.*, encontraram que animais alimentados com dieta macia e redução de carga mecânica, resultou em mandíbulas com anatomia adaptada. Comparada com animais com função mastigatória normal, o grupo de hipofunção mastigatória mostrou morfologia diferente (Ödman *et al.*, 2008).

Estas observações estão em concordância com os achados em ossos longos, onde as alterações funcionais provocam mudanças no formato transversal e longitudinal da estrutura óssea. Woo *et al* demonstraram que a espessura do osso aumenta em 17% quando porcos jovens são exercitados (Woo *et al*, 1981). Ao contrário, em fêmur imobilizado, o diâmetro foi reduzido, nos ratos em crescimento (Osako *et al*, 1991). A ausência de atividade física leva a um impacto negativo na massa óssea de ossos longos, assim como, a imobilização da mandíbula pode iniciar mudanças do tipo da osteoporose com mudanças na expansão da cavidade medular e redução da espessura trabecular (Shimahara *et al*, 1991). Igualmente, indivíduos parcial ou totalmente desdentados que também apresentam problemas de função mastigatória, mostraram uma redução óssea no processo alveolar residual e no corpo mandibular (Klemmetti and Vainio, 1994; Tagushi *et al*, 1995).

O efeito da atividade física na massa óssea é localizado (concentrado) e depende do tipo, duração, freqüência e intensidade do exercício. Semelhantemente, a mastigação promove melhor qualidade dos ossos maxilares, ao gerar durante a trituração dos alimentos a força oclusal,

cuja pressão varia de acordo o número de dentes presentes, consistência da dieta e saúde bucal. A oclusão funcional é crucial para a manutenção do volume e estrutura da mandíbula. O osso mandibular reage em resposta a cargas funcionais da oclusão com melhora na massa óssea e fortalecimento das propriedades mecânicas e estruturais.

Concluindo, os achados de nosso experimento mostraram que os grupos submetidos à hipofunção mastigatória tiveram aumento na perda óssea mandibular. Em contraste, os grupos com a função mastigatória normal, não apresentaram perda, apesar da deficiência de estrogênio. Estes resultados confirmam a hipótese que a presença de força oclusal normal, promove proteção contra o desenvolvimento de osteopenia na mandíbula. Devemos, portanto, alertar aos dentistas para a importância de preservar e restabelecer a função mastigatória normal do paciente, através de tratamento interdisciplinar, devolvendo uma oclusão com melhores condições de mastigação, com a finalidade de preservar a perda óssea nos maxilares e consequentemente contribuir para a manutenção da saúde oral.

6 CONCLUSÕES

Pelo presente trabalho podemos concluir que:

1. A hipofunção mastigatória foi o principal fator de indução de perda óssea mandibular.
2. A deficiência de estrogênio não afetou o osso mandibular, diferente do observado no osso da coluna lombar e fêmur.
3. A hipofunção mastigatória não comprometeu o osso da coluna lombar nem do fêmur.

7 REFERÊNCIAS

- Bresin A, Kiliaridis S, Strid KG (1999). Effect of mastigatory function on the internal bone structure in the mandible of the growing rat. *Eur J Oral Sci* 107: 35-44.
- Corruccini RS, Lee GT (1984). Occlusal variation in Chinese immigrants to the United Kingdom and their offspring. *Arch Oral Biol* 29: 779-782.
- da Paz LH, de Falco V, Teng NC, dos Reis LM, Pereira RM, Jorgetti V (2001). Effect of 17beta-estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. *Braz J Med Biol Res*; 34:1015-22.
- Elsubeihi ES, Heersche JN (2009). Comparison of the effect of ovariectomy on bone mass in dentate and edentulous mandibles of adult rats. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 17:9-21.
- Elovic RP, Hipp JA, Hayes WC (1995). Ovariectomy decreases the bone area fraction of the rat mandible. *Calcif Tissue Int* 56: 305-310.
- Genant HK; Giglielmi G; Jergas M (1998). Bone Densitometry and osteoporosis, Ed Springer/ Germany.
- Hinton RJ, Carlson DS (1986). Response of mandibular joint to loss of incisal function in the rat. *Acta Anat* 125:145-151.

- Hirai TT, Ishijima T, Hashikawa Y, et al (1993). Osteoporosis and reduction of residual ridge in edentulous patients. *J Prosthet Dent* 69: 49-56.
- Huiskes R, Ruimerman R, Van Lenthe GH et al (2000). Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature* 405: 704-706.
- Ito G, Mitani S, Kim JH (1988). Effect of soft diet on craniofacial growth mice. *Anat Anaz* 165: 151-166.
- Jemt T, Book K, Karlsson S (1993). Occlusal force and mandibular movements in patients with removable overdentures and fixed prostheses supported by implants in the maxilla. *Int J Oral Maxillofac Implants* 8:301-308
- Jiang G, Matsumoto H, Fuji A (2003). Mandible bone loss in osteoporosis rats. *J Bone Miner Metab* 21: 388-395.
- Kiliaridis S, Bresin A, Holm J et al (1996). Effects of masticatory muscle function on bone mass in the mandible of growing rats. *Acta Anat* 155: 200-205.
- Kiliaridis S, Shyu BC (1998) Isometric muscle tension generated by masseter stimulation after prolonged alteration of the consistency of the diet fed to growing rats *Arch Oral Biol* 33:467-472.
- Kiliaridis S, Thilander B, Kjellberg H et al (1999). Effect of low masticatory function on condylar growth: A morphometric study in the rat. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 116: 121-125.
- Klemmetti E, Vainio P (1994). Effect of maxillary edentulousness on mandibular residual ridges. *Scand J Dent Res* 102: 309-312.

- Li M, Shen Y, Qi H et al (1996). Comparative study of skeletal response to strogen depletion at red and yellow marrow sites in rats. *Anat Res* 245: 472-480.
- Moriya Y, Ito K, Murai S (1998). Effects of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. *J Oral Sc* 40: 171-175.
- Mavropoulos A, Bresin A, Kiliaridis S. (2004 a). Morphometric analysis of the mandible in growing rats with different mastigatory functional demands: adaptation to na upper posterior bite Black. *Eur J Oral Sci* 112:259-266.
- Mavropoulos A, Kiliaridis S, Bresin A, Ammann P (2004 b). Effect of different masticatory functional and mechanical demands on the structural adaptation of the mandibular alveolar bone in young growing rats. *Bone* 35:191-197.
- Mavropoulos A, Rizzoli R, Ammann P (2007). Different responsiveness of alveolar and tibial bone to bone loss stimuli. *J Bone Miner Res* 22:403-410.
- Ödman A, Mavropoulos A, Kiliaridis S (2008). Do masticatory functional changes influence the mandibular morphology in adult rats? *Arch Oral Biol* 53:1149-54.
- Osako T, Ohira Y, Ito G et al (1991). Structure and mineral content in weight-bearing bones following hindlimb suspension in young rats. *Japan J Physiol* 41: 923-932.
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH et al (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. *J Bone Mineral Res*; 2: 595-611.
- Sakata T, Sakai A, Tsirukami H et al (1999). Trabecular bone turnover and bone marrow cell development in tail-suspended mice. *J Bone Miner Res*; 14: 1596-1604.

- Seeman E (2004). Estrogen, androgen, and the pathogenesis of bone fragility in women and men *Curr Osteoporos Rep* 2: 90-96.
- Shimahara M, Ono K, Hashiguchi N et al (1991). An experimental study on mandibular movement and osteoporosis. *Res Commun Chem Pathol Pharmc* 74: 287-297.
- Taguchi A, Tanimoto K, Suei Y et al (1995). Tooth loss and mandibular osteopenia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 79: 127-132.
- Tanaka M, Ejiri S, Nakajima M et al (1999). Changes of cancellous bone mass in rat mandibular condyle following ovariectomy. *Bone* 25: 339-347.
- Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E et al (2002). Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Perio Res* 37:161-165.
- Tanaka E, Sano R, Kawai N et al (2007). Effect of food consistency on the degree of mineralization in the rat mandible. *An Biom Eng* 35: 1617-1621.
- von Wowern N (2001). General and oral aspects of osteoporosis: a review. *Clin Oral Investig* 5: 71-82.
- Woo SL, Kuie SC, Amiel D (1981). The effect of prolonged physical training on the properties of log bone. *J Bone Joint Surg Am* 63: 780-786.
- Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM (1988) .Temporal relationship between bone loss and increase bone turnover in ovariectomized rats. *Calc Tissue Int* 43: 179-183.
- Yamamoto S (1996). The effects of food consistency on maxillary growth in rats. *Eur J Orthod* 18: 601-615.

Yamashiro T, Yamamoto T (1997). Differential responses of mandibular condyle and femur to oestrogen deficiency in young rats. *Arch Oral Biol* 43: 191-195.

Yang J, Farnell D, Devlin H *et al* (2005). The effect of ovariectomy on mandibular cortical thickness in the rat. *J Dent* 33: 123-129.

8 APÊNDICE

7.1 Artigo enviado para publicação

Influence of ovariectomy and masticatory hypofunction on mandibular bone remodeling.

Running title: Estrogen deficiency and masticatory hypofunction.

Keywords: Ovariectomy, Masticatory hypofunction, Mandible, DXA, Histomorphometry.

Ive Maria F Patullo¹, Liliam Takayama¹, Rafael F Patullo¹, Vanda Jorgetti², Rosa Maria R Pereira¹

Bone Metabolism Laboratory of Rheumatology Division¹ and Nephrology Division², Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Ive Maria F Patullo, DDS, MSc

Liliam Takayama, biologist

Rafael F Patullo¹, DDS

Vanda Jorgetti², MD, PhD, Assistant Professor

Rosa M. Pereira, MD, PhD, Associated Professor

Address reprints requests and correspondence to:

Rosa Maria Rodrigues Pereira

Disciplina de Reumatologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Av. Dr. Arnaldo, 455- 3º andar- Reumatologia, sala 3105

São Paulo, SP, 01246-903 , Brazil

Phone: 5511-30617213, 5511-30617490

FAX: 55 11 30617490

E-mail: rosamariarp@yahoo.com; ivemariap@yahoo.com.br

Abstract

Introduction This study was designed to examine the effect of masticatory hypofunction and estrogen deficiency on mandible bone mass and compare this site with spine and femoral bone.

Methods Twenty-four rats were ovariectomized (OVX) or Sham-operated (Sham) and analyzed after feeding with hard-diet (Hard) or soft-diet (Soft). They were divided into 4 groups: (GI) Sham-Hard; (GII) OVX-Hard; (GIII) Sham-Soft and (GIV) OVX-Soft. Bone mineral density (BMD) was measured in the spine and femur in the baseline and at the end of the study, and Δ BMD (final BMD-baseline BMD) was calculated. In mandible bone, BMD and histomorphometry were analyzed at the end of the experiment.

Results Sham rats showed higher spine (GI:13.5% vs. GII:0.74%, $p<0.01$; GIII:10.67% vs. GIV:- 4.36%, $p<0.001$) and femur Δ BMD (GI:14.43% vs. GII:4.42%, $p<0.01$; GIII:10.58% vs. GIV:0.49%, $p<0.001$) than OVX, but no difference was observed in mandible BMD among these groups ($p>0.05$). Soft-diet groups showed decreased mandible BMD compared with hard-diet groups (GIV vs. GII, $p<0.01$; GIII vs. GI, $p<0.01$). Similarly, mandibular condyle histomorphometry showed that soft-diet groups presented a significant decrease in trabecular thickness and volume (GIV vs. GII, $p<0.05$; GIII vs. GI, $p<0.01$) compared to hard-diet.

Conclusion Our results suggest that mandibular bone loss resulted from decreased of mechanical loading during mastication, and was not affect by estrogen depletion.

Introduction

There is controversy if mandible bone and axial or peripheral skeleton, react similarly to estrogen deficiency bone loss. The estrogen is important for the growth and maintenance of the female skeleton. Menopause leads to estrogen deficiency and changes in bone mass and it is major cause of osteoporosis in women. (Genant *et al*, 1998)

The etiology of skeletal and oral bone loss in osteoporotic patients is presumed to differ. Age and estrogen deprivation are major etiologic factor in systemic skeletal bone loss (Seeman, 2004), while oral bone atrophy may be considered a consequence of local factors, such as absence of teeth, impaired adapted prostheses which lead to decrease of mastication (von Wowern, 2001; Seeman, 2004).

Studies in rats with skeletal osteoporosis have revealed that ovariectomy (OVX), by itself, does not promote alveolar bone loss or changes in the mandibular cortical thickness, requiring association with other osteopenic factors to induce significant mandibular bone loss (Moriya *et al*, 1998; von Wowern, 2001; Jiang *et al*, 2003). By the other way, it has been found a positive correlation between oral bone mass reduction and loss of teeth from patient with systemic osteoporosis (Hirai *et al*, 1993; Taguchi *et al*, 1995).

However, the majority of works reporting alterations due to estrogen depletion and mandibular bone resorption did not take into consideration the loads generated during mastication, and their action on mandible bone mass. The growth of the condyle is known to be highly adaptable to functional

factors, and the comparison of experimental studies is difficult by the lack of detailed analyses of the load distribution within the condyle. Meanwhile, it is unclear whether estrogen deficiency and/or masticatory hypofunction could affect the internal bone structure in the whole mandible in the different manner (Bresin *et al*, 1999; Huiskes *et al*, 2000).

Experimental studies in growing rodents have shown that reduced masticatory function causes morphological changes in the mandible (Ito *et al*, 1988). A method used to alter the masticatory function is feeding the animals with a soft diet (Kiliaridis *et al*, 1999; Tanaka *et al*, 2007). Altering the consistency of the diet in this way has been shown to cause overall size differences in the ramus region, angular and condylar processes (Ito *et al*, 1988). The softer diet consumed in modern societies is likely to generate reduced masticatory forces (Corruccini and Lee, 1984). Studies on growing rats have shown that masticatory hypofunction induced by a soft diet lead to reduced masticatory muscle strength that results in changes of the mandibular morphology and the alveolar bone microarchitecture (Kiliaridis and Shyu , 1998; Mavropoulos *et al*, 2004a; Mavropoulos *et al*, 2004b).

Most elderly people perceive their oral health status as important to their quality of life, for a variety of physical, social and psychological reasons. The ability to eat is considered to be particularly important. It is therefore essential for dentists to understand the pathophysiological mechanism related to oral bone loss in order to preserve the good quality of life of these patients. Edentulous adults who received implant retained bridges had an

improvement of both masticatory muscle strength and chewing ability (Jemt *et al*, 1993)

Therefore, the aim of this study was to assess the role of estrogen depletion and masticatory hypofunction in mandible bone, and compares this site with spine and femur bone.

Material and Methods

Protocol

Twenty-four 4-month-old female Wistar rats presenting an initial body weight of 240 g, provided by the Animal Center of the Medicine School of the University of São Paulo (FMUSP), Brazil, were maintained under constant conditions of temperature ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) on a 12/12h light-dark cycle with *ad libitum* access to food and water.

As a estrogen-depletion bone loss osteoporosis model, 12 animals were bilaterally ovariectomized (OVX) and the control group (n=12) was subjected to Sham surgery (Sham), after being anesthetized via intraperitoneal injection of 50 mg/kg ketamine (Ketalar, Parke-Davis) and 10 mg/kg Xylazine (Rompum, Bayer). To induce masticatory hypofunction, the consistency of the diet was altered from a standard hard-diet (Hard) to soft-diet (Soft). Rats in the hard-diet group were fed a standard solid diet (Nuvital Nutrients S/A, Curitiba, PR, Brazil) The soft-diet animals were given the same diet in a powdered form, with water added in standardized proportions (2/5=food/water) (Kiliaridis *et al*, 1999; Tanaka *et al*, 2007) and the maxillary incisors of these rats were trimmed bilaterally to the level of gingiva every other day (Hinton and Carlson, 1986). The bedding material of the cages of the soft-diet group was sifted to exclude large particles which could stimulate gnawing activity (Kiliaridis *et al*, 1999; Tanaka *et al*, 2007). The animals were randomized by weight into four groups (n=6): GI: sham-operated rats fed on a hard-diet (Sham-Hard); GII: ovariectomized rats fed on a hard-diet (OVX-Hard); GIII: sham-operated

rats fed on a soft-diet (Sham-Soft); and GIV: ovariectomized rats fed on a soft-diet (OVX-Soft).

Bone mineral density (BMD) was measured in the lumbar spine and total femur at the baseline and after 9 weeks (da Paz *et al*, 2001), and Δ BMD (final BMD - baseline BMD) was calculated. The animals were weighed each week during the experimental period. Because of the anatomic shape of the mandible that limits the measurement, the mandibles were dissected, and the right side was used to measure final BMD and the left side was submitted to histomorphometry.

The design was approved by the Animal Ethics Committee of COBEA (Brazilian College of Experimental Animals) in accordance with procedures set by UFAW (the Universities Federation for Animals Welfare).

Bone Mineral Density Measurement (BMD)

The bone mineral density (BMD) was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) using a clinical densitometer (Hologic QDR-2000, Bedford, MA, USA) and software for small animals. *In vivo* reproducibility was checked by measuring the coefficient of variation ($CV=100 \times SD/mean$) of five BMD measurements in three rats with mean weight of 227g, resulting in 1.1% in the lumbar spine (L1-L4), 1.9% in total femur and 0,88% the hemimandible.

BMD of the entire right side of the mandibles were measure after dissection. The region of interest (ROI) was defined as a retangular area that included: condylar, coronoid and alveolar process. The ROI measurement

was set by hand for elimination of molar and incisors (crown). The samples were placed in a saline-filled container, lingual side up. The mandible was positioned so that the scanning was moved in a direction perpendicular to the occlusal plane. (Elovic *et al*, 1995).

Mandibular bone histomorphometry

The left mandibular bone were dissected and fixed in 70% ethanol, dehydrated through serially increased concentrations of ethanol, and embedded in methyl methacrylate without decalcification. After polymerization, the blocks were unilaterally ground up to the mid-sagittal surface of the mandibular bone. The samples obtained were sliced longitudinally at 5-10 µm thickness, using a Policut S microtome (Reichert-Jung, Heidelberg, Germany). The 5-µm sections were stained with 0.1% toluidine blue, pH 6.4, and at least two nonconsecutive sections of each sample were examined. The histological measurement of the mandible (whole condyle) was taken at the same area of the greatest convexity of the condyle in its larger superior portion of the contour, in the subchondral bone directly below the anterior, central and posterior regions which is in articulation with the cranial part of the joint.

All histomorphometric indices were reported according to the standardized nomenclature recommended by the *American Society of Mineral Research* (Parfitt *et al*, 1987). The following histomorphometric parameters, measured at a standardized site below the growth plate, were obtained: (1) bone volume (BV/TV, %); (2) trabecular thickness (Tb.Th, µm);

(3) trabecular separation (Tb.Sp, μm); (4) trabecular number (Tb.N/mm). All animal data were obtained using blinded measurements.

Statistical analysis

All data are presented as the mean and standard deviation (SD). Analysis of variance (ANOVA) was used to determine significant differences between groups. Multiple analyses of variance were also used to study the effects of the two experimental factors, OVX (OVX vs. SHAM) and soft-diet (Soft vs Hard) on the variables under study. The Bonferroni test was used to perform post-hoc comparisons between groups using Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Significance level of $P < 0.05$ was used for all comparisons

Results

At the baseline of the experiment, no difference was observed between the four groups (G1 vs. GII vs. GIII vs. GIV) related to body weight (228.5 ± 7.03 g vs. 234.5 ± 3.83 g vs. 227.3 ± 8.11 g vs. 240 ± 3.98 g, $p=0.27$), lumbar spine BMD (0.184 ± 0.009 g/cm 2 vs. 0.190 ± 0.007 g/cm 2 vs. 0.178 ± 0.007 g/cm 2 vs. 0.195 ± 0.12 g/cm 2 , $p=0.54$) and femur BMD (0.245 ± 0.008 g/cm 2 vs. 0.253 ± 0.008 g/cm 2 vs. 0.235 ± 0.007 g/cm 2 vs. 0.244 ± 0.010 g/cm 2 , $p=0.93$). The mean body weight at the end of the experiment showed no statistically significant difference between the four groups of rats (G1 48.33 ± 7.34 g; GII 57.33 ± 5.11 g; GIII 42.33 ± 7.80 g; GIV 43.5 ± 8.66 g, $p>0.05$). Weight gain in the soft-diet group was quite good. Nutritional inadequacy was hardly a problem.

The success of ovariectomy was confirmed at necropsy by failure to detect ovarian tissue and by observation of marked atrophy of the uterine horns in OVX group.

Bone Mineral Density

1. Sham groups vs. OVX groups

A significant higher Δ BMD (g/cm 2 and %) in lumbar spine was observed in the Sham groups compared to the OVX groups with the same consistency of diet (Hard: G1: 0.0248 ± 0.009 g/cm 2 vs. GII: 0.0014 ± 0.009 g/cm 2 , $p<0.01$ and Soft: GIII: 0.019 ± 0.004 g/cm 2 vs. GIV: -0.0085 ± 0.014 g/cm 2 , $p<0.001$), (Hard: G1: 13.51% vs. GII: 0.74%, $p<0.01$ and Soft: GIII: 10.67% vs. -4.36%, $p<0.001$) (Graphic 1a).

Similarly, a higher Δ BMD (g/cm^2 or %) in femur was demonstrated in the Sham groups compared to the OVX groups (Hard: GI: 0.0354 ± 0.006 g/cm^2 vs. GII: 0.0112 ± 0.004 g/cm^2 , $p<0.001$ and Soft: GIII: 0.0249 ± 0.010 g/cm^2 vs. GIV: 0.0012 ± 0.011 g/cm^2 , $p<0.001$); (Hard: GI: 14.43% vs. GII: 4.42%, $p<0.001$ and Soft: GIII: 10.58 vs. GIV: 0.49%, $p<0.001$) (Graphic 1b).

In contrast, no significant difference in mandible BMD was observed comparing the Sham groups and the OVX groups using equivalent consistency of diet (Hard: GI: 0.2108 ± 0.007 g/cm^2 vs. GII: 0.2146 ± 0.005 g/cm^2 , $p>0.05$ and Soft: GIII: 0.1942 ± 0.008 g/cm^2 vs. GIV: 0.1982 ± 0.005 g/cm^2 , $p>0.05$) (Graphic 1c).

2- Hard-diet groups vs. Soft-diet groups

Lumbar and femur Δ BMD in rats fed on hard and soft-diets were comparable; in the Sham groups (lumbar Δ BMD: GI: 0.0248 ± 0.009 g/cm^2 vs. GIII 0.019 ± 0.004 g/cm^2 , $p>0.05$ and femur Δ BMD: GI: 0.0354 ± 0.006 g/cm^2 vs. GIII 0.0249 ± 0.010 g/cm^2 , $p>0.05$) and in the OVX groups (lumbar Δ BMD: GII: 0.0014 ± 0.009 g/cm^2 vs. GIV: -0.0085 ± 0.014 g/cm^2 , $p>0.05$ and femur Δ BMD: GII: 0.0112 ± 0.004 g/cm^2 vs. GIV 0.0012 ± 0.011 g/cm^2 , $p>0.05$) (Graphic 1a, 1b).

Differently, significantly lower mandible BMD was observed in the soft-diet groups compared to the hard-diet groups (Sham: GIII 0.1942 ± 0.008 g/cm^2 vs. GI: 0.2108 ± 0.007 g/cm^2 , $p<0.01$ and OVX: GIV: 0.1982 ± 0.005 g/cm^2 vs. GII: 0.2146 ± 0.005 g/cm^2 , $p<0.01$) (Graphic 1c).

Mandibular bone histomorphometry

1- Sham groups vs. OVX groups

No significant difference in mandibular bone histomorphometry parameters (BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N) were observed in the Sham groups compared to the OVX groups with the same consistency of diet (Hard: G1 vs. GII, p>0.05 and Soft: GIII vs. GIV, p>0.05) (Graphic 2a, 2b and Figure1).

2- Hard diet groups vs. Soft diet groups

The mandibular bone histomorphometry parameters: BV/BT and Tb.Th were significantly lower in rats fed with soft-diet compare to those fed on hard-diet in the Sham groups (BV/TV: GIII: $18.56 \pm 2.78\%$ vs. G1: $30.65 \pm 3.49\%$, p<0.001; Tb.Th: GIII: $41.41 \pm 6.06 \mu\text{m}$ vs. G1: $61.33 \pm 6.00 \mu\text{m}$, p<0.01) and OVX groups (BV/TV: GIV: $19.85 \pm 1.77\%$ vs. GII: $27.84 \pm 3.34\%$, p<0.01; Tb.Th: GIV: $42.91 \pm 9.13 \mu\text{m}$ vs. GII: $57.49 \pm 9.66 \mu\text{m}$, p<0.05) (Graphic 2a, 2b and Figure1).

Discussion

The present study demonstrated that masticatory hypofunction is the major factor to induced mandible bone loss in female Wistar rats.

Ovariectomy in rats is known to cause bone loss in vertebra and in femur (Wronski *et al*, 1988). However, the skeletal alteration associated with ovariectomy varies with the region observed, and may cause differential effects on the mandible, spine and femoral bone (Li *et al*, 1996; Yamashiro and Yamamoto, 1997).

Some reports showed a positive correlation between systemic osteoporosis due to estrogen deficiency and low mineral density in the mandible (Tanaka *et al*, 2002; Yang *et al*, 2005). Yang *et al*, demonstrated that a long-term estrogen deficiency in OVX rats is necessary to decrease the mandibular cortical thickness and suggested that in humans a considerable duration of estrogen deficiency may be required before a reduction of mandible cortical bone loss (Yang *et al*, 2005).

On the other hand, many studies have failed to detect mandible bone loss following OVX in animals (Moriya *et al*, 1998; Jiang *et al*, 2003). Some authors found that the mineral content and mechanical properties of the mandibles of OVX rats are similar to those of Sham operated rats, and that rat mandible bone did not show bone loss after OVX (Elovic *et al*, 1995; Yamashiro and Yamamoto, 1997). Jiang *et al*, concluded that bone loss in the mandible caused by ovariectomy alone were lower than those caused by dietary calcium deficiency alone; in particular, OVX rats showed no significant decrease in cortical BMC and BMD compared to Sham (Jiang *et*

al, 2003). Recently, an experimental study in adults rats, showed that mandibular bone was less affected by ovariectomy and/or isocaloric protein undernutrition comparing this site with proximal tibia, suggesting that mechanical loading of alveolar process during mastication may protect the alveolar bone from the detrimental effects observed in other skeletal sites (Mavropoulos *et al*, 2007).

These controversies could be related to that the majority of these studies did not analyze simultaneously the role of estrogen depletion and masticatory function in oral bone loss.

The mandible is loaded by forces applied to the teeth during mastication or biting and this factor seems to be more important than estrogen deficiency. It has been reported that mechanical loading accelerates formation and suppresses bone resorption (Sakata *et al*, 1999; Tanaka *et al*, 2007) . A switch to a soft diet linked with reduced forces applied to the mandible during mastication is assumed to result in a reduction of bone formation and increased bone resorption. The mandibular bone that was under conditions in which intermittent loading by occlusion, frequently stimulated bone formation and that counteracted the acceleration of bone resorption induced by estrogen deficiency (Tanaka *et al*, 1999; 2007). Some researchers demonstrated that a soft-diet is also responsible for increase malocclusion from dental crowding, which implies narrower, shorter jaws (Yamamoto, 1996; Kiliaridis *et al*, 1999). It was also demonstrated that when rats' incisors were cut off and fed with soft diet to reduce mechanical loading on the condyle; the trabecular density of the condyles decreased significantly (Hinton and Carlson, 1986).

Mavropoulos *et al* have also demonstrated that alteration of food consistency in young growing rats induced a lower mandibular alveolar bone, mineral density and decreased trabecular bone volume and thickness due to a reduction of masticatory functional and mechanical demands (Mavropoulos *et al*, 2004 b). Other authors investigated the effect of OVX on the edentulous and dentate mandibles, comparing these to changes in tibia and femur in rats. The results showed that loss of bone mass in the edentulous mandible of OVX animals was similar to that occurring in tibia and femur, while lack of a significant effect of OVX on bone mass in the dentate mandible suggests that functional loading related to biting force prevented bone loss in the dentate mandible (Elsubeih *et al*, 2009).

Bone is constantly adapting to its functional environment, by both modeling and remodeling. The altered masticatory function by feeding animals a soft-diet, caused change in mandibular shape and induced alterations in bone mass, bone thickness and bone density (Kiliaridis *et al*, 1996; Bresin *et al*, 1999). Ödman *et al*, found that the animals fed a soft diet with a reduced mechanical loading had a smaller mandible with some significant shape adaptations. Compared to animals with normal masticatory function, the hypofunctional group showed morphological differences compared to the normal group (Odman *et al*, 2008) .

This is in agreement with observations in long bones, where functional alterations causes change in transversal and longitudinal shapes. Woo *et al* showed that the thickness of the total femur increased by 17% when young pigs were exercised (Woo *et al*, 1981). In contrast, the diameter of the

immobilized femur of growing rats was reduced (Osako *et al*, 1991). The absence of physical activity may result in a negative effect on long bone mass. Likewise, jaw immobilization may cause the onset of osteoporosis-like alterations, such as expansion of the marrow cavity and reduction in trabecular bone width (Shimahara *et al*, 1991).

Equally, individuals with partial or total edentulism, who also displayed problems in masticatory function, showed a reduced amount of bone in the residual alveolar process and mandibular body (Klemmetti and Vainio, 1994; Tagushi *et al*, 1995).

The physical activity effect on bone mass is local (concentrated) and depends on type, duration and intensity of the exercise. Mastication promotes better quality maxillary bones by generating occlusal forces when triturating food, with pressure varying according to the number of existing teeth, diet consistency and oral health. Functional occlusion is crucial in maintaining the volume and structure of the mandible. The mandibular bone reacts in response to functional loading of occlusion with an improvement of bone mass and their structural mechanical properties.

In conclusion, the findings of the experiments conducted in this work suggest that the groups submitted to masticatory hypofunction, which annulled the intensity of the occlusion forces, increased bone loss in mandible. In contrast, the groups with normal masticatory function presented no mandible bone loss in despite of estrogen depletion. These results support the concept that the presence of normal occlusion forces may promote protection against the development of mandible osteopenia.

Acknowledgements

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)
#305691/2006-6 (RMRP)

References

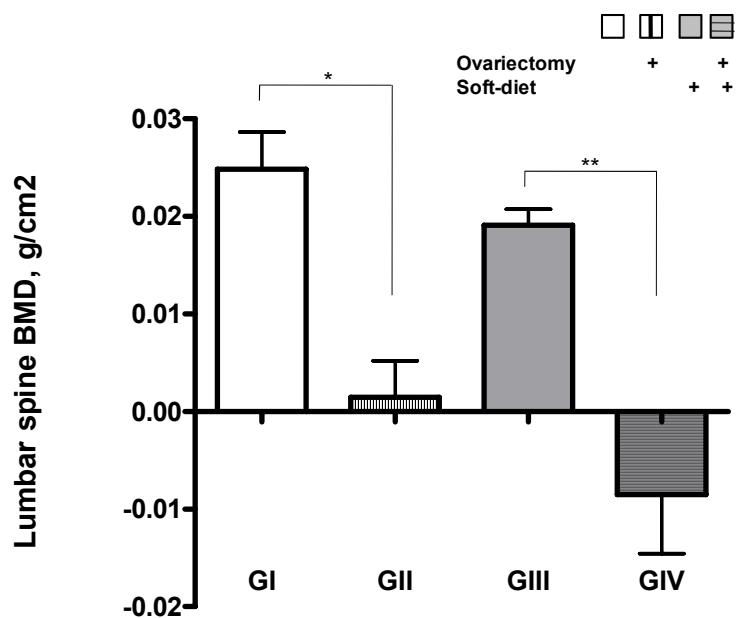
- Bresin A, Kiliaridis S, Strid KG (1999). Effect of mastigatory function on the internal bone structure in the mandible of the growing rat. *Eur J Oral Sci* **107**: 35-44.
- Corruccini RS, Lee GT (1984). Occlusal variation in Chinese immigrants to the United Kingdom and their offspring. *Arch Oral Biol* **29**: 779-782.
- da Paz LH, de Falco V, Teng NC, dos Reis LM, Pereira RM, Jorgetti V (2001). Effect of 17beta-estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. *Braz J Med Biol Res* **34**:1015-22.
- Elsubeih ES, Heersche JN (2009). Comparison of the effect of ovariectomy on bone mass in dentate and edentulous mandibles of adult rats. *Eur J Prosthodont Restor Dent* **17**:9-21.
- Elovic RP, Hipp JA, Hayes WC (1995). Ovariectomy decreases the bone area fraction of the rat mandible. *Calcif Tissue Int* **56**: 305-310.
- Genant HK; Giglielmi G; Jergas M (1998). Bone Densitometry and osteoporosis, Ed Springer/ Germany.
- Hinton RJ, Carlson DS (1986). Response of mandibular joint to loss of incisal function in the rat. *Acta Anat* **125**:145-151.
- Hirai TT, Ishijima T, Hashikawa Y, et al (1993). Osteoporosis and reduction of residual ridge in edentulous patients. *J Prosthet Dent* **69**: 49-56.
- Huiskes R, Ruimerman R, Van Lenthe GH et al (2000). Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone. *Nature* **405**: 704-706.

- Ito G, Mitani S, Kim JH (1988). Effect of soft diet on craniofacial growth mice. *Anat Anaz* **165**: 151-166.
- Jemt T, Book K, Karlsson S (1993). Occlusal force and mandibular movements in patients with removable overdentures and fixed prostheses supported by implants in the maxilla. *Int J Oral Maxillofac Implants* **8**:301-308
- Jiang G, Matsumoto H, Fuji A (2003). Mandible bone loss in osteoporosis rats. *J Bone Miner Metab* **21**: 388-395.
- Kiliaridis S, Bresin A, Holm J et al (1996). Effects of masticatory muscle function on bone mass in the mandible of growing rats. *Acta Anat* **155**: 200-205.
- Kiliaridis S, Shyu BC (1998) Isometric muscle tension generated by masseter stimulation after prolonged alteration of the consistency of the diet fed to growing rats *Arch Orall Biol* **33**:467-472.
- Kiliaridis S, Thilander B, Kjellberg H et al (1999). Effect of low masticatory function on condylar growth: A morphometric study in the rat. *Am J Orthod Dentofac Orthop* **116**: 121-125.
- Klemmetti E, Vainio P (1994). Effect of maxillary edentulousness on mandibular residual ridges. *Scand J Dent Res* **102**: 309-312.
- Li M, Shen Y, Qi H et al (1996). Comparative study of skeletal response to estrogen depletion at red and yellow marrow sites in rats. *Anat Res* **245**: 472-480.
- Moriya Y, Ito K, Murai S (1998). Effects of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. *J Oral Sc* **40**: 171-175.

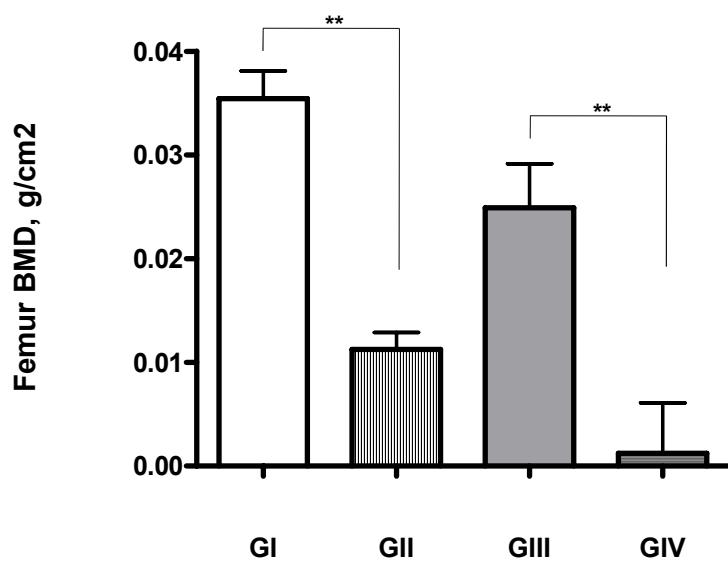
- Mavropoulos A, Bresin A, Kiliaridis S. (2004 a). Morphometric analysis of the mandible in growing rats with different mastigatory functional demands: adaptation to an upper posterior bite. *Eur J Oral Sci* **112**:259-266.
- Mavropoulos A, Kiliaridis S, Bresin A, Ammann P (2004 b). Effect of different masticatory functional and mechanical demands on the structural adaptation of the mandibular alveolar bone in young growing rats. *Bone* **35**:191-197.
- Mavropoulos A, Rizzoli R, Ammann P (2007). Different responsiveness of alveolar and tibial bone to bone loss stimuli. *J Bone Miner Res* **22**:403-410.
- Ödman A, Mavropoulos A, Kiliaridis S (2008). Do masticatory functional changes influence the mandibular morphology in adult rats? *Arch Oral Biol* **53**:1149-54.
- Osako T, Ohira Y, Ito G et al (1991). Structure and mineral content in weight-bearing bones following hindlimb suspension in young rats. *Japan J Physiol* **41**: 923-932.
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH et al (1987). Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. *J Bone Mineral Res*; **2**: 595-611.
- Sakata T, Sakai A, Tsirukami H et al (1999). Trabecular bone turnover and bone marrow cell development in tail-suspended mice. *J Bone Miner Res*; **14**: 1596-1604.
- Seeman E (2004). Estrogen, androgen, and the pathogenesis of bone fragility in women and men. *Curr Osteoporos Rep* **2**: 90-96.

- Shimahara M, Ono K, Hashiguchi N et al (1991). An experimental study on mandibular movement and osteoporosis. *Res Commun Chem Pathol Pharmc* **74**: 287-297.
- Taguchi A, Tanimoto K, Suei Y et al (1995). Tooth loss and mandibular osteopenia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **79**: 127-132.
- Tanaka M, Ejiri S, Nakajima M et al (1999). Changes of cancellous bone mass in rat mandibular condyle following ovariectomy. *Bone* **25**: 339-347.
- Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E et al (2002). Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Perio Res* **37**:161-165.
- Tanaka E, Sano R, Kawai N et al (2007). Effect of food consistency on the degree of mineralization in the rat mandible. *An Biom Eng* **35**: 1617-1621.
- von Wowern N (2001). General and oral aspects of osteoporosis: a review. *Clin Oral Investig* **5**: 71-82.
- Woo SL, Kuie SC, Amiel D (1981). The effect of prolonged physical training on the properties of log bone. *J Bone Joint Surg Am* **63**: 780-786.
- Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM (1988) .Temporal relationship between bone loss and increase bone turnover in ovariectomized rats. *Calc Tissue Int* **43**: 179-183.
- Yamamoto S (1996). The effects of food consistency on maxillary growth in rats. *Eur J Orthod* **18**: 601-615.
- Yamashiro T, Yamamoto T (1997). Differential responses of mandibular condyle and femur to oestrogen deficiency in young rats. *Arch Oral Biol* **43**: 191-195.
- Yang J, Farnell D, Devlin H et al (2005). The effect of ovariectomy on mandibular cortical thickness in the rat. *J Dent* **33**: 123-129.

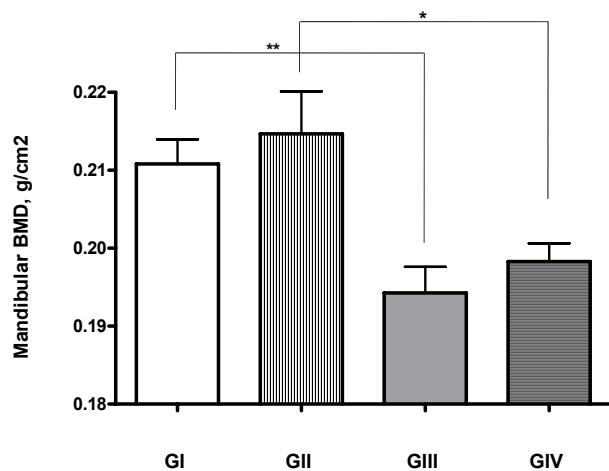
(a)



(b)



(c)



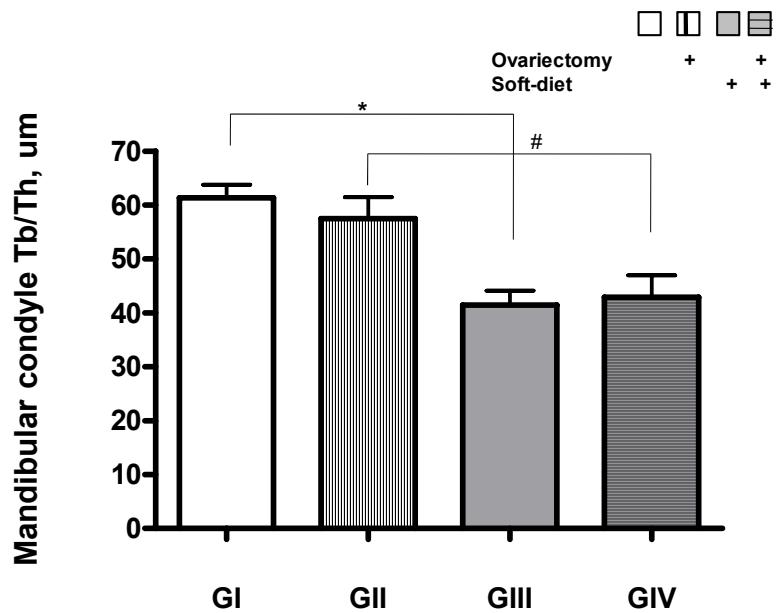
Graphic 1: Bone mineral density change (Δ BMD) in lumbar spine (a) and in femur (b), and the final BMD in the right mandible (c) compared Sham and OVX groups fed with Hard-diet or Soft-diet.

p < 0.05

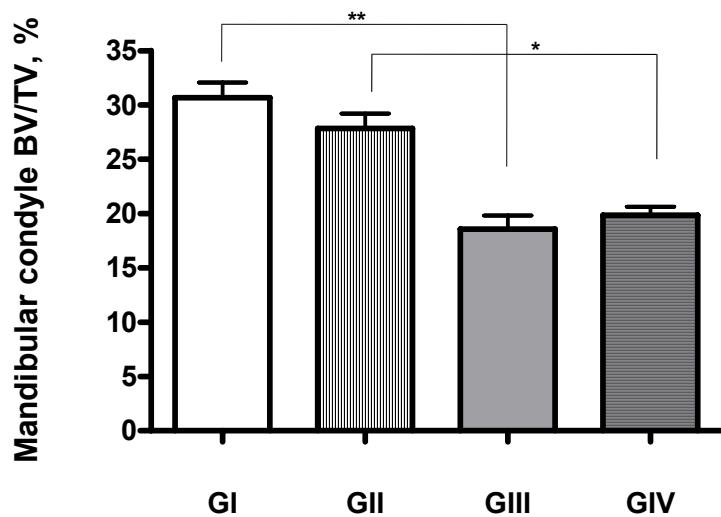
* p < 0.01

** p < 0.001

(a)



(b)



Graphic 2: Histomorphometric parameters on mandibular condyle compared Sham and OVX groups fed with Hard-diet or Soft-diet: (a) Trabecular Thickness (Tb/Th) and (b) Bone volume (BV/TV)

$p < 0.05$

* $p < 0.01$

** $p < 0.001$

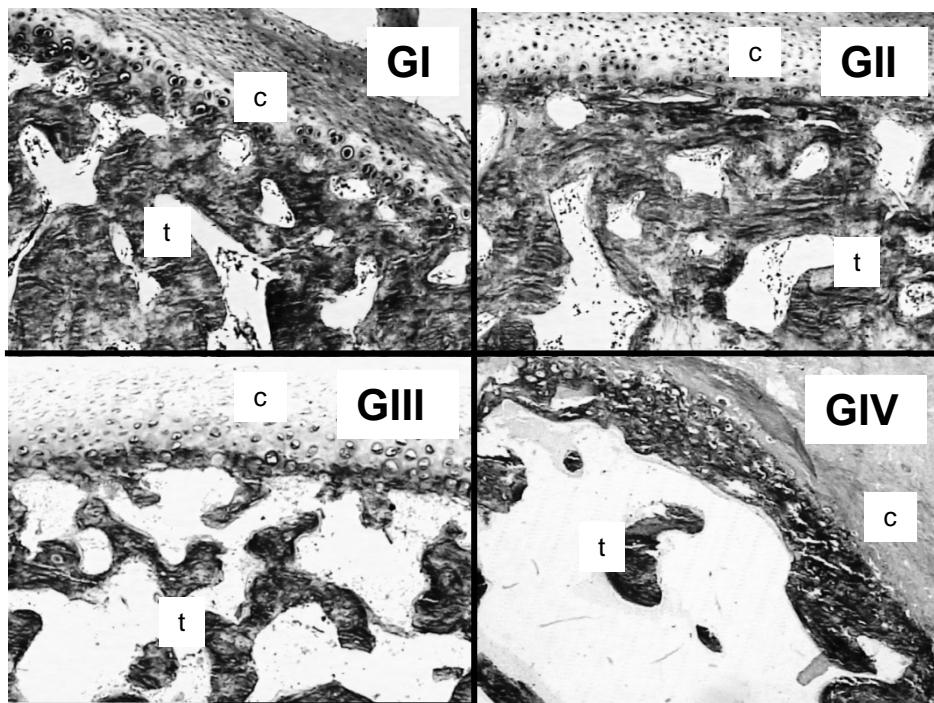


Figure 1. Histological changes in mandibular condyle: the trabecular thickness and number were lower in rats fed with soft-diet (GIII, GIV) compare to those fed on hard-diet (G1,GII). (Toluidine blue stain; X 100).

(t) trabecular bone, (c) condylar cartilage,

G1 (Sham-Hard) - sham operated rats fed on a hard-diet,

GII (OVX-Hard) - ovariectomized rats fed on a hard-diet,

GIII (Sham-Soft) - sham operated rats fed on a soft-diet,

GIV (OVX-Soft) - ovariectomized rats fed on a soft-diet.