

Avaliação histométrica da ação local da calcitonina de salmão no processo de reparo ósseo: estudo em ratos

Histometrical evaluation of the local effects of salmon calcitonin on the bone healing process: a study in rats

Emerson CANAVERO*

Alessandro Lorenço JANUÁRIO**

Enilson Antônio SALLUM***

Pedro Duarte NOVAES****

Francisco Humberto NOCITI Jr.***

CANAVERO, E.; JANUÁRIO, A. L.; SALLUM, E. A.; NOVAES, P. D.; NOCITI Jr., F. H. Avaliação histométrica da ação local da calcitonina de salmão no processo de reparo ósseo: estudo em ratos. **Pesq Odont Bras**, v. 14, n. 2, p. 183-187, abr./jun. 2000.

Neste estudo avaliou-se histometricamente a ação local da calcitonina de salmão em defeitos ósseos provocados cirurgicamente em fêmur de ratos. As avaliações foram feitas aos 7, 14 e 21 dias após o ato cirúrgico. Não se observou diferenças estatísticas aos 7 dias, entretanto no período de 14 dias houve diferenças com maior formação óssea no grupo tratado. No período de 21 dias, em ambos os grupos, não foi possível diferenciar o tecido ósseo neoformado e o adjacente. Os resultados demonstraram, que o efeito da calcitonina foi observado somente no início do processo de reparo dos defeitos ósseos criados cirurgicamente.

UNITERMOS: Calcitonina; Regeneração óssea.

INTRODUÇÃO

A calcitonina consiste em um hormônio polipeptídico secretado pelas células parafoliculares tireoideanas em mamíferos, que causa hipofosfatemia e hipocalcemia^{14,17,22}. Devido às suas propriedades antiosteoclásticas, antiinflamatória e analgésica, tem sido amplamente empregada no tratamento de distúrbios clínicos e biológicos caracterizados por excessiva remodelação óssea, como osteoporose pós-menopausa, doença de Paget e hipercalemia maligna^{3,14,18,19}. A ação da calcitonina consiste na alteração das estruturas responsáveis diretamente pela reabsorção óssea, zona clara e de bordadura em escova, dos osteoclastos⁸. Seu efeito hipocalcêmico está relacionado à redução do número de osteoclastos e às alterações funcionais nas células clásticas^{12,17}. Alguns autores também relatam efeito anabólico da calcitonina, relacionado ao aumento da atividade osteoblástica e da mineralização do tecido osteóide^{16,21}, além de reduzir o número de osteoclastos por bloqueio da fusão de células mononucleares da medula¹⁷. Alguns estudos

têm avaliado o efeito da aplicação local da calcitonina no reparo de defeitos ósseos^{5,15,23}. Entretanto, os resultados têm sido controversos. Desta forma, diante de resultados não conclusivos e da possibilidade de utilização clínica da calcitonina no tratamento periodontal, este trabalho teve como objetivo verificar o efeito local deste hormônio no processo de reparo ósseo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quinze ratas Wistar adultas, apresentando 250 a 300 gramas. Esses animais foram mantidos em gaiolas comunitárias, com ração e água *ad libitum*. Os animais foram anestesiados através de injeção intramuscular na região externa da coxa do animal com uma solução de 0,8 ml/kg de Francotar® (Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.) e 0,3 ml/kg de Virbaxyl® 2% (Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.). A região femoral de ambos os lados foi aberta cirurgicamente, a superfície do fêmur do animal exposta e foram realizadas duas perfurações até a cavidade medular com uma dis-

* Aluno da Graduação; ** Aluno da Pós-Graduação em Periodontia; *** Professores Assistentes Doutores da Área de Periodontia; **** Professor Assistente Doutor do Departamento de Morfologia – Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP.

tância de 5 mm entre elas. Foi empregada broca de aço esférica número 8 montada em motor elétrico de baixa rotação (1.500 rpm) e irrigada com soro fisiológico. As perfurações foram escolhidas aleatoriamente para receber ou não 0,01 ml de solução de calcitonina 100 UI/ml (Miacalcic®, Laboratório Sandoz S. A.), constituindo assim os grupos testes e controle, respectivamente. Após este procedimento, os tecidos foram suturados com fio de algodão através de sutura interrompida simples. Os animais foram sacrificados nos períodos de 7, 14 e 21 dias após o procedimento cirúrgico. Foram obtidos portanto, três grupos com cinco animais cada. Decorridos os períodos experimentais, as amostras foram removidas seccionando as articulações do joelho e quadril, dissecadas e fixadas em formol a 10% durante 24 horas.

Processamento histológico

A descalcificação foi realizada em solução de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 50% em partes iguais¹¹ e incluídas em parafina rotineiramente. Secções transversais seriadas com 6 µm de espessura foram obtidas e coradas por hematoxilina e eosina. Para a análise histométrica foram selecionadas cinco lâminas, numa distância de aproximadamente 30 µm entre elas. As avaliações histométricas foram realizadas através da utilização de um microscópio de luz Zeiss – objetiva de 4/0 - 10 – com uma câmera de vídeo CCD-IRIS/RGB, ambos adaptados a um microcomputador 166 acoplado a um software analisador de imagens KS 400 – versão 2.0. Este equipamento foi utilizado com a finalidade de quantificar área de tecido ósseo neoformado na cavidade óssea criada cirurgicamente.

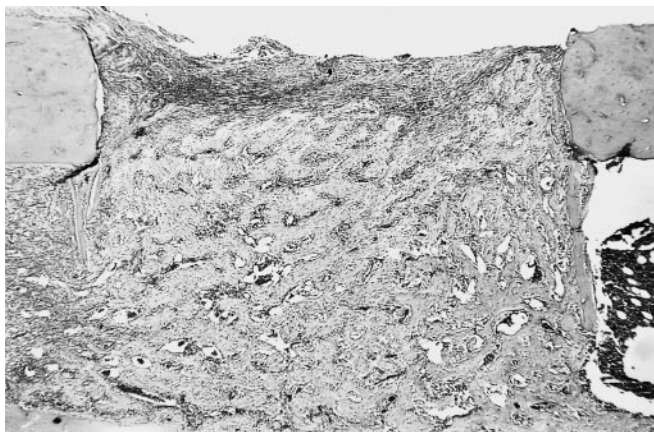


FIGURA 1 - Aspecto histológico do defeito ósseo provocado. Observa-se o defeito preenchido por tecido de granulação com infiltrado inflamatório – 7 dias (grupo controle).

Análise estatística

Os resultados obtidos foram comparados estatisticamente através do teste *t* de Student não pareado ($\alpha = 1\%$) entre os animais do mesmo período.

RESULTADOS

Microscopia de luz

Período de 7 dias

No período experimental de 7 dias, observou-se claramente as delimitações do ato cirúrgico (Figura 1). A cortical óssea próxima à área cirúrgica manteve sua organização tecidual inicial. O espaço produzido pelo ato cirúrgico na superfície óssea do fêmur apresentou-se preenchido por tecido ósseo desorganizado, espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo frouxo, e trabéculas ósseas contendo osteócitos no interior da matriz (Figura 2). Na periferia das trabéculas ósseas, observou-se uma camada celular composta principalmente por osteoblastos.

Período de 14 dias

Neste período ainda se observou nitidamente o contorno da área óssea cirúrgica. Entretanto, o tecido que preenchia a perfuração nos animais do grupo teste, apresentou-se de maneira mais organizada e compacta (Figura 4). Para o grupo controle (Figura 3), da mesma forma que para o grupo experimental, observaram-se trabéculas ósseas com numerosos osteócitos e circundadas por osteoblastos, porém, estas apresentaram-se menos organizadas e compactas em relação ao grupo experimental. Histologicamente, observou-se quadro inflamatório composto principalmente por células

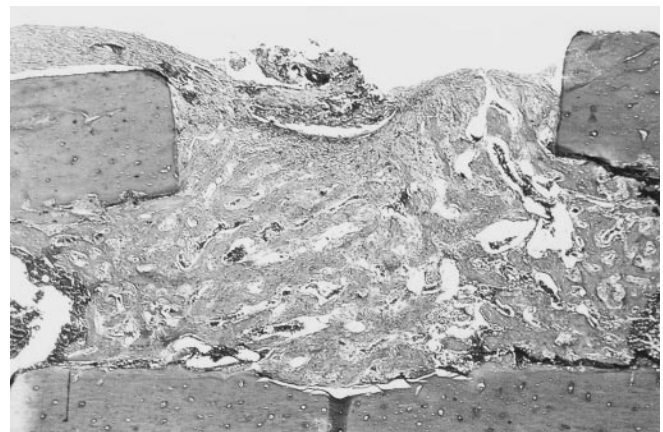


FIGURA 2 - Fotomicrografia ilustrando o defeito ósseo preenchido por tecido de granulação e infiltrado de células inflamatórias – 7 dias (grupo experimental).

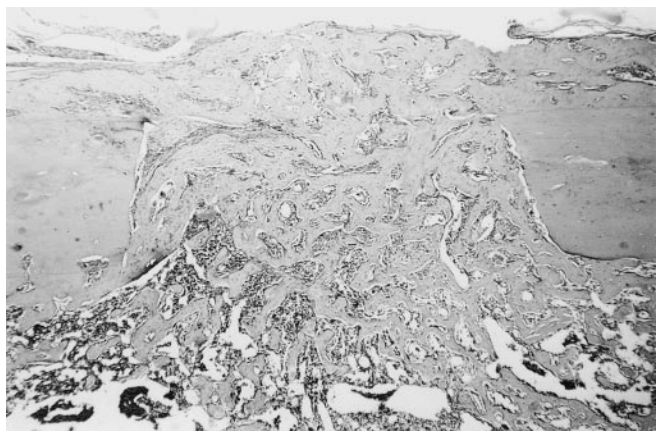


FIGURA 3 - Fotomicrografia do defeito ósseo ilustrando a substituição parcial do tecido de granulação por trabéculas de tecido ósseo neoformado - 14 dias (grupo controle).

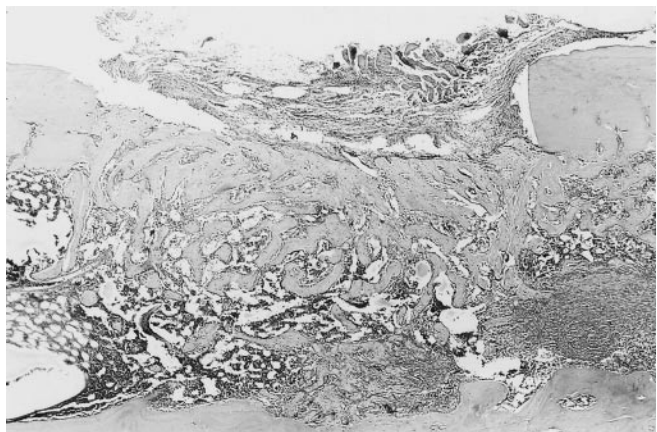


FIGURA 4 - Fotomicrografia do defeito ósseo ilustrando a substituição parcial do tecido de granulação por trabéculas de tecido ósseo neoformado - 14 dias (grupo experimental).

mononucleares. Em ambos os grupos, porém de maneira mais evidente no grupo experimental, observou-se a obliteração parcial da entrada da perfuração cirúrgica por tecido ósseo imaturo proveniente do periósteo.

Período de 21 dias

Vinte e um dias após a confecção da cirurgia, observou-se a obliteração da área operada em ambos os grupos (Figuras 5 e 6). O tecido ósseo apresentou-se mais organizado que no período anterior. O aspecto histológico mostrou a presença de tecido completamente maduro. Na maioria dos espécimes examinados, como consequência da neoformação óssea local, não se observou as delimitações entre o tecido ósseo normal. O tecido medular revelou a presença de um infiltrado difuso de célu-

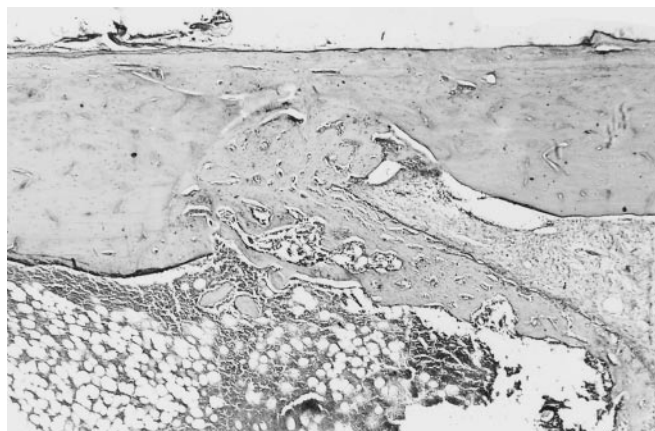


FIGURA 5 - Fotomicrografia que ilustra o fechamento do defeito ósseo na sua porção cortical - 21 dias (grupo controle).

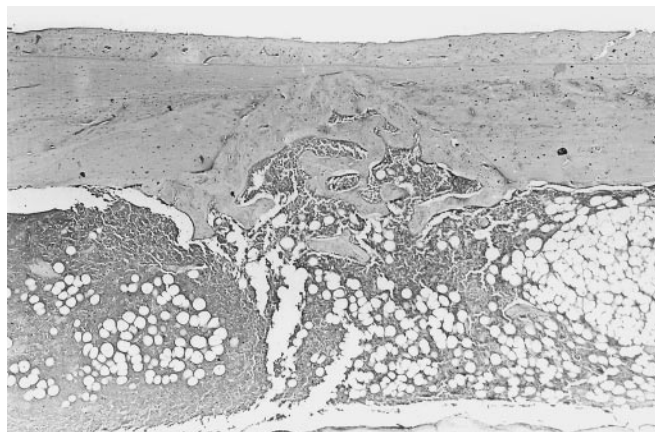


FIGURA 6 - Fotomicrografia que ilustra o fechamento do defeito ósseo na sua porção cortical - 21 dias (grupo experimental).

las inflamatórias rica em células mononucleares. Trabéculas ósseas foram observadas nesta região.

Histometria

As avaliações histométricas revelaram para o grupo controle, no período de 7 dias, uma área média de tecido ósseo neoformado de 7,21 mm² e 6,82 mm² para o grupo controle e experimental, respectivamente. Quando comparados pelo teste *t* de Student não pareado, os resultados não foram estatisticamente significantes ($P > 0,01$). Em relação ao período de quatorze dias, observou-se uma área média de tecido ósseo neoformado de 2,81 mm² e 3,91 mm² para o grupo controle e experimental, respectivamente. Quando comparados pelo teste *t* de Student não pareado, os resultados foram estatisticamente significantes ($P < 0,01$).

Para o grupo experimental de 21 dias, em ambos os grupos, as áreas cirúrgicas se encontravam completamente substituídas por tecido ósseo neoformado. A quantificação do tecido ósseo neoformado não foi realizada entre o tecido ósseo neoformado e a cortical óssea preexistente, pois não se podia diferenciar os limites entre os tecidos.

DISCUSSÃO

A calcitonina é encontrada em diversas espécies, mas a proveniente do salmão é a mais utilizada devido à características que a tornam altamente potente: meia-vida longa, resistência à degradação plasmática e grande afinidade para receptores específicos^{1,7,17,20}.

O defeito ósseo circunferencial tem sido relatado como o tipo de defeito ideal para o estudo da ação de diferentes substâncias no processo de cicatrização óssea, pois a manutenção do coágulo sanguíneo no interior do defeito ósseo torna-se um parâmetro confiável para a comparação entre os grupos controle e experimental¹³.

No presente trabalho, em relação aos aspectos morfológicos, se observou que o processo de reparação dos defeitos ósseos apresentou características semelhantes para os grupos controle e experimental, ou seja, formação de um tecido de granulação infiltrado por células inflamatórias seguidas pela diferenciação osteoblástica e a formação de trabéculas ósseas, as quais foram previamente relatadas^{2,10,13,23}. Através da análise histométrica observou-se maior quantidade de tecido ósseo neoformado para o grupo experimental somente no período de 14 dias após o tratamento do defeito ósseo com a aplicação da calcitonina ($P < 0,01$). Em relação aos demais períodos avaliados, 7 e 21 dias, não se observou diferenças estatísticas ($P > 0,01$). A possibilidade da calcitonina contribuir para a observação de maior atividade proliferativa, o que resultaria em uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado, tem sido atribuída à atividade biológica, ou seja a inibição da osteoclasia^{1,4}. Tais autores^{1,4} relataram ainda que

devido à presença do hormônio, o tecido ósseo neoformado se apresentaria de uma forma mais densa, fato esse observado no presente trabalho (Figura 4).

De maneira geral, os trabalhos que avaliam a utilização da calcitonina no reparo de defeitos ósseos têm apresentado resultados controversos^{5,6,9,22}. Há relatos de que a calcitonina poderia participar de maneira positiva, negativa e até mesmo não ter efeito durante a reparação óssea. Entretanto, alguns aspectos devem ser considerados quando compara-se os trabalhos, entre eles estariam a utilização de diferentes modelos animais (cães, ratos, coelhos, etc.), o tipo de defeito provocado e a região onde o defeito ósseo foi provocado. Finalmente, outro aspecto que certamente merece atenção, é o fato de que os investigadores têm se utilizado de animais clinicamente saudáveis em suas avaliações, o que poderia influenciar os efeitos biológicos esperados da calcitonina⁵. Desta forma, parece interessante a investigação de possíveis benefícios produzidos pela calcitonina no processo de reparação óssea em modelos animais que apresentem alguma forma de alteração do metabolismo ósseo, natural ou induzida (por exemplo a osteoporose).

CONCLUSÃO

Dentro das condições experimentais empregadas, a calcitonina de salmão exerceu uma ação positiva no início do processo de reparação óssea, o que, entretanto, não resultou em benefícios significativos no período final de experimentação.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro (FAPESP 98/02617-3) e às funcionárias da Disciplina de Histologia, Maria Aparecida Santiago Varella e Ivani Odas Demetrio pela dedicação e empenho no auxílio ao processamento histológico.

CANAVERO, E.; JANUÁRIO, A. L.; SALLUM, E. A.; NOVAES, P. D.; NOCITI Jr., F. H. Histometrical evaluation of the local effects of salmon calcitonin on the bone healing process: a study in rats. **Pesq Odont Bras**, v. 14, n. 2, p. 183-187, abr./jun. 2000.

The purpose of the present study was to histometrically evaluate the effects of salmon calcitonin on the bone healing of surgically created bone defects in rats. The animals were sacrificed 7, 14 and 21 days after the surgical procedure. After the 7- and 21-day periods, differences between the experimental and control groups were not observed ($P > 0.01$). After the 14-day period, a larger amount of new bone was observed in the experimental group ($P < 0.01$). Thus, within the limits of the present study, it can be concluded that although salmon calcitonin positively participated in the initial phase of bone healing, it did not result in a larger amount of new bone at the end of the experimental period.

UNITERMS: Calcitonin; Bone regeneration.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro : Guanabara, 1990. 707 p.
2. BOURNE, G. H. The relative importance of periosteum and endosteum in bone healing and the relationship of vitamin C to their activities. **Prov Rov Soc Med**, v. 37, p. 275-279, 1944.
3. CARSTENS Jr., J. H.; FEINBLATT, J. D. Future horizons for calcitonin: a U.S. perspective. **Calcif Tissue Int**, v. 49, Suppl 2, p. s2-s6, 1991.
4. RODAN, G. A.; MARTIN, T. J. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption. **Calcif Tissue Int**, v. 33, n. 4, p. 349-351, 1981.
5. GURKAN, L.; EKELAND, A.; LANGELAND, N. *et al.* Effects of salmon calcitonin on growth of teeth and on extraction socket healing in young rats. **Scand J Dent Res**, v. 91, n. 6, p. 425-430, Dec. 1983.
6. Mac DAVID, P. T.; EL-KAFRAWY, A. H.; MITCHELL, D. F. Lack of effect of topical calcitonin on connective tissue. **J Dent Res**, v. 56, n. 5, p. 540, May 1977.
7. MARX, S. J.; WOODWARD, C. J.; AURBACH, G. D. *et al.* Calcitonin receptors of kidney and bone. **Science**, v. 178, n. 64, p. 999-1001, Dec. 1972.
8. MARKS Jr., S. C. The origin of osteoclasts: evidence, clinical implications and investigative challenges of an extra skeletal source. **J Oral Pathol**, v. 12, n. 4, p. 226-256, Aug. 1983.
9. MANTZAVINOS, Z.; LISTGARTEN, M. A. Thyrocalcitonin stimulated bone formation by local application to rat calvaria in vivo. **J Periodontol**, v. 41, n. 12, p. 663-666, Dec. 1970.
10. MELCHER, A. H.; IRVING, J. T. Healing in a circumscribed defect in the rat femur. **Proceedings of the First European Symposium on Bone and Tooth**, 337-341, 1964.
11. MORSE, A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bone sectioning in paraffin. **J Dent Res**, v. 24, n. 3-4, p. 143-153, 1945.
12. PAZZAGLIA, U. E.; ZATTI, G.; DI NUCCI, A. *et al.* Inhibitory effect of salmon calcitonin on bone resorption: morphological study of the tibial growth plate in rats. **Calcif Tissue Int**, v. 52, n. 2, p. 125-129, Feb. 1993.
13. PALLASH, T. J. The healing pattern of an experimentally-induced defect in the rat femur studied with tetracycline labeling. **Calcif Tissue Int**, v. 2, p. 334-342, May 1968.
14. PEARSE, A. G. 5-hydroxytryptophan uptake by dog thyroid "C" cells, and its possible significance in polypeptide hormone production. **Nature**, v. 211, n. 49, p. 598-600, Aug. 1966.
15. PEREIRA, S. L. S. **Efeito da calcitonina de salmão sobre a cicatrização de defeitos ósseos. Estudo radiográfico e histológico em coelhos**. Piracicaba, 1997, 83 p. Tese (mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
16. PIERCE, A. Pathophysiological and therapeutic aspects of dento alveolar resorption. **Aust Dent Journal**, v. 34, n. 5, p. 437-448, May 1989.
17. REGINTER, J. Y. Effect of calcitonin on bone mass and fracture rates. **Am J Med**, v. 91, n. 5B, p. 19S-22S, Nov. 1991.
18. REGINTER, J. Y.; DEROISY, R.; FRANCHIMONT, P. Treatment of osteoporosis: current data and prospects. **Rev Rhum Ed Fr**, v. 61, n. 10 (Pt 2), p. 155S-164S, Dec. 1994.
19. RICO, H.; REVILLA, M.; HERNANDEZ, E. R. *et al.* Total and regional bone mineral content and fracture rate in postmenopausal osteoporosis treated with salmon calcitonin: a prospective study. **Calcif Tissue Int**, v. 56, n. 3, p. 181-185, March 1995.
20. SILIGARD, G.; SAMORI, B.; MELANDRI, S. *et al.* Correlations between biological activities and conformational properties from human, salmon, eel, porcine calcitonins and Elcatonin by CD spectroscopy. **Eur J Biochem**, v. 221, n. 3, p. 1117-1125, May 1994.
21. STEIN, B.; TAKIZAWA, M.; KATZ, I. *et al.* Salmon calcitonin prevents ciclosporin-A induced high turnover bone loss. **Endocrinology**, v. 129, n. 1, p. 92-98, Jul. 1991.
22. UBIOS, A. M.; JANES FURNO, G.; GUGLIELMOTTI, M. B. Effect of calcitonin on alveolar wound healing. **J Oral Pathol Med**, v. 20, n. 7, p. 322-324, Aug. 1991.
23. ZIELER, R.; DELLING, G. Effect of calcitonin on the regeneration of a circumscribed bone defect (bored hole in the rat tibia). **Acta Endocrinologica**, v. 69, n. 3, p. 497-506, Mar. 1972.

Recebido para publicação em 10/01/00
Enviado para reformulação em 25/02/00
Aceito para publicação em 05/04/00