

# Influência da calcitonina na reparação óssea de tíbias de ratas ovariectomizadas

EMILIA ANGELA LOSCHIAVO ARISAWA\*, ROSILENE FERNANDES DA ROCHA\*\*, YASMIN RODARTE CARVALHO\*\*, ELISABETE MORAES\*\*, JANETE DIAS ALMEIDA\*\*

## RESUMO

A reparação óssea, principalmente em decorrência dos implantes osseointegrados, tem sido objeto de estudos em diferentes condições como, por exemplo, as alterações hormonais decorrentes do climatério. Neste trabalho foi estudado a ação da calcitonina no processo de reparação óssea em tíbias de ratas ovariectomizadas. Doze ratas com aproximadamente sessenta dias foram ovariectomizadas e, um mês após esta cirurgia, um defeito ósseo na tíbia foi realizado, através de processo cirúrgico utilizando broca esférica n.º 6, sob irrigação constante de soro fisiológico. Imediatamente após a cirurgia, iniciou-se a administração de calcitonina 2 UI/kg, i.m., três vezes por semana em nove animais. Estes foram sacrificados após sete, 14 e 21 dias, sendo suas tíbias removidas e encaminhadas para preparação histológica de rotina. As ratas do grupo controle (3) foram submetidas ao mesmo procedimento, recebendo apenas soro fisiológico. Todos os espécimes foram analisados histologicamente.

## UNITERMOS

Calcitonina; regeneração óssea; osteoporose; osteogênese.

ARISAWA, E.A.L. et al. The role of calcitonin in bone repair of ovariectomized rats. *Pós-Grad. Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos*, v.3, n.1, p. , jan./jun. 2000.

## ABSTRACT

*The purpose of this study was to evaluate the role of calcitonin (CALC) in the healing process of circumscribed bone defects created in the tibia of three months-old ovariectomized rats (OVMX). A circular defect was prepared one month after ovariectomy using a rotating burr under abundant irrigation. Twelve rats were distributed in two groups: 03 OVMX exclusively and 09 OVMX treated with CALC (2 IU/kg, i.m.) three times/week, immediately after the surgical procedures. The animals, in groups of one control and three OVMX and CALC, were sacrificed at sete, 14 and 21 days. The histological analysis showed a greater bone apposition in the treated group, when compared to the untreated one, after sete, 14 and 21 days. Calcitonin, therefore, seems to be an early bone repair-inducing factor in ovariectomized animals, when administered immediately after a lesion occurs and should be more comprehensively studied, for therapeutic purposes.*

## UNITERMS

*Calcitonin; wound healing ; osteoporosis; osteogenesis.*

\*Aluna do Curso de Pós-Graduação em Odontologia \_ Área de concentração em Biopatologia Bucal (Nível Doutorado)– Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Unesp – 12245-000 - São José dos Campos – SP

\*\*Departamento de Biopatologia Bucal e Diagnóstico – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Unesp – 12245-000 - São José dos Campos – SP

## INTRODUÇÃO

O osso é considerado como a mais importante aquisição na evolução dos tecidos de suporte. Revela um potencial único de regeneração, sendo capaz de curar uma fratura ou danos locais com tecido de reparação mantendo a mesma organização estrutural, sem deixar cicatriz<sup>4,15</sup>.

Essa ação é regulada sistemicamente por hormônios circulantes, fatores de crescimento e citocinas sendo a remodelação óssea um processo de equilíbrio constante entre a reabsorção e a formação óssea<sup>4,15</sup>.

As taxas e proporções de tecido ósseo permanecem constantes após a massa óssea máxima ser atingida. Entretanto nas mulheres, após a menopausa, a taxa de perda óssea pode encontrar-se aumentada, sugerindo que os estrogênios desempenham importante função na prevenção de perda óssea<sup>15,25</sup>.

A osteoporose está relacionada à perda progressiva de massa óssea, geralmente assintomática, até a ocorrência de fraturas. Várias formas de correção deste fenômeno podem ser utilizadas como a administração de estrogênio ou de drogas que exercam um efeito hipocalcêmico, tais como a calcitonina<sup>13,15,24,25</sup>.

Este trabalho tem por objetivo avaliar histologicamente a ação da calcitonina, administrada sistemicamente, sobre a reparação de defeitos ósseos circunscritos em tíbias de ratas, na ausência de hormônios ovarianos.

## MATERIAL E MÉTODO

Para este estudo utilizaram-se 12 ratas fêmeas adultas (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*, Wistar) com sessenta dias de idade, peso de aproximadamente 200g, mantidas em gaiolas individuais com água e ração *ad libitum*, fornecidas pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP. Foram divididas aleatoriamente em dois grupos: ovariectomizadas sem tratamento (OVM) e ovariectomizadas tratadas (OVM + CALC)). Posteriormente foram subdivi-

das em três grupos, de acordo com o período de sacrifício sete, 14 e 21 dias.

Os animais dos grupos OVM e OVM + CALC foram submetidos a duas sessões cirúrgicas. A primeira com a finalidade de retirar os ovários e a segunda para realização do defeito ósseo cirúrgico na tíbia.

Na primeira intervenção cirúrgica todos os animais foram anestesiados e, após tricotomia da região abdominal lateral, a pele e musculatura foram incisadas com bisturi, sendo o ovário identificado, seus vasos amarrados e o mesmo retirado. Esse procedimento foi realizado bilateralmente.

Após trinta dias da ovariectomia, as ratas foram novamente anestesiadas, realizou-se tricotomia na região da tíbia, a pele e a musculatura foram incisadas com bisturi, sendo criado um defeito ósseo nessa região, utilizando-se uma broca esférica nº6, com motor de baixa rotação, sob irrigação contínua com soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%). Em seguida a lesão foi recoberta com o periósteo, a camada muscular suturada com catgut e a pele com fio de nylon. nº 4.

Os animais do grupo OVM + CALC (nove animais) receberam doses em dias alternados de 2 UI/kg de calcitonina de salmão\*, sendo a primeira dose administrada imediatamente após a realização do defeito ósseo.

O grupo OVM (três animais) recebeu apenas solução fisiológica (NaCl 0,9%), em intervalos semelhantes aos dos grupos tratados.

Um animal do grupo controle e três do grupo tratado foram sacrificados por inalação de éter sulfúrico aos sete, 14 e 21 dias. As tíbias foram removidas, dissecadas e mantidas em frascos com formol a 10% durante 24 horas, submetidas posteriormente à descalfificação e aos procedimentos laboratoriais de rotina. Cortes semi-seriados dos espécimes, com 5m de espessura, foram obtidos, corados com hematoxilina e eosina. E submetidos à análise em microscopia de luz.

## RESULTADOS

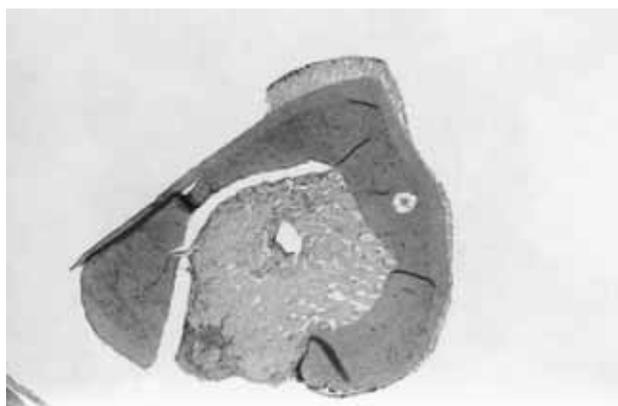
A análise histológica dos espécimes dos grupos controle e tratados apresentou as seguintes características:

\* Miacalci-Sandoz do Brasil

**a) sete dias - Controle:** a loja cirúrgica estava parcialmente preenchida por rede de fibrina contendo hemácias e leucócitos, além da presença de remanescentes de medula óssea. Próximo às bordas do defeito cirúrgico notava-se tecido de granulação e algumas áreas de tecido necrosado (Figura 2);

- **Tratado:** o interior da loja cirúrgica encontrava-se parcialmente preenchido por trabéculas ósseas imaturas, com grandes espaços medulares ocupados por tecido conjuntivo ricamente celularizado, não lamelar, com osteoblastos localizados ao redor das partes mineralizadas. Na área subjacente ao endósteo nota-se tecido de granulação formando-se a partir das corticais ósseas internas. Não existe a formação de calo ósseo (Figuras 1 e 3);

**b) 14 dias - Controle:** o quadro histológico mostrava-se semelhante ao observado no tratado com calcitonina aos sete dias, com pequena neoformação óssea a partir da cortical interna;

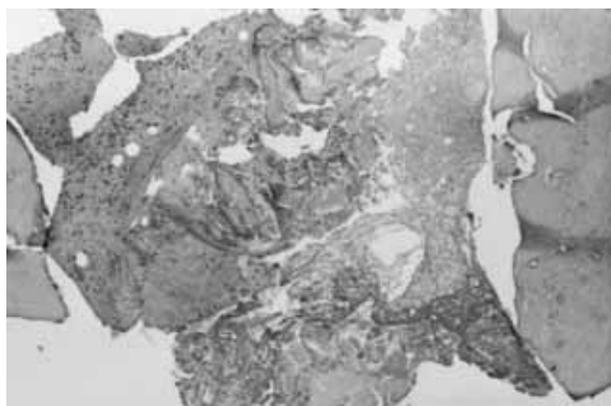


**FIGURA 1** - Visão panorâmica do defeito cirúrgico. Área da lesão parcialmente preenchida por trabéculas ósseas imaturas (calcitonina, 7 dias, 25x).

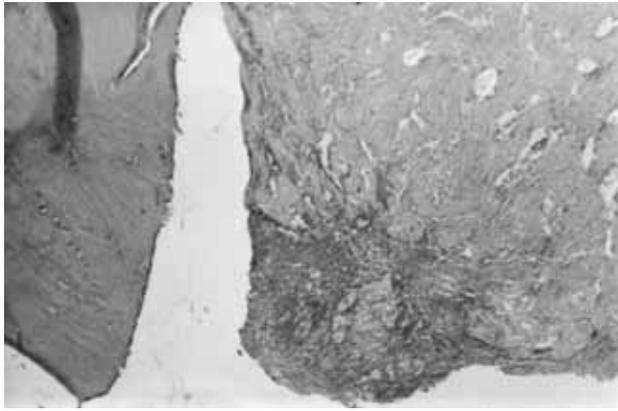
- **Tratado:** a loja cirúrgica apresentava-se quase totalmente preenchida por trabéculas ósseas espessas e bem definidas, estando apenas a porção próxima ao defeito cirúrgico com pequena área não reparada. A medula óssea apresentava algumas células de tecido adiposo;

**c) 21 dias - Controle:** também apresentou tecido ósseo formado a partir do endósteo e características semelhantes às observadas nos animais tratados com calcitonina aos 14 dias (Figura 4);

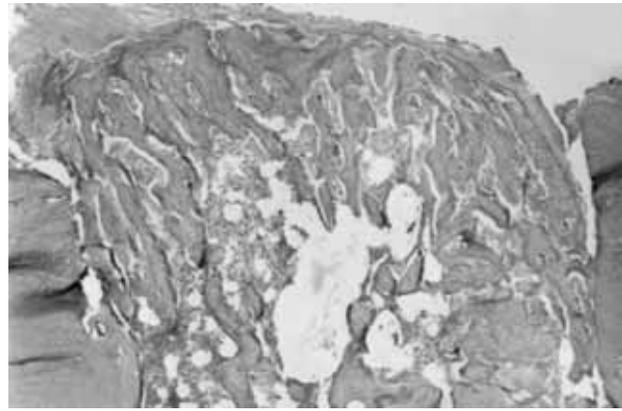
- **Tratado:** a loja cirúrgica encontrava-se em sua quase totalidade preenchida por trabéculas ósseas espessas e bem definidas. Na superfície do local do defeito cirúrgico observava-se uma depressão em sua porção externa, indicando que o preenchimento da loja cirúrgica teria origem em formação óssea a partir do endósteo. O canal medular encontrava-se remodelado apresentando numerosas células de tecido adiposo (Figura 5).



**FIGURA 2** - Detalhe da fig. 1 mostrando em maior aumento as trabéculas ósseas imaturas (calcitonina, 7 dias, 100x).



**FIGURA 3** - Área do defeito cirúrgico apresentando rede de fibrina e tecido de granulação (controle, 7 dias, 100x).



**FIGURA 4** - Loja cirúrgica apresentando trabéculas ósseas maduras (controle, 21 dias, 200x).



**FIGURA 5** - Trabéculas ósseas espessas, bem definidas preenchem grande parte do defeito cirúrgico ( calcitonina, 21 dias, 200x).

## DISCUSSÃO

O reparo das fraturas ósseas segue os mesmos princípios da reparação no tecido conjuntivo ou em outros tecidos mesenquimais. Estas são ativadas pelos hormônios de crescimento, tireóideos e paratireóideos, e inibidas pela calcitonina e cortisona. Uma interrupção temporária do suprimento sanguíneo com a associação de desvitalização e necrose do tecido ósseo resulta na ativação da reparação óssea<sup>4,15,16,22</sup>.

Acredita-se que esta regeneração ocorra baseada em dois mecanismos combinados: a indução da proliferação e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas e, a indução da proliferação de células osteoprogenitoras pré-formadas.

Existem dois tipos de células osteoprecursoras ou osteogênicas: as determinadas e as induzíveis<sup>11</sup>. As células osteogênicas determinadas são células do estroma da medula óssea e as induzíveis

veis da camada profunda do periósteo e do endósteo. Estas células proliferam e diferenciam-se em osteoblastos após reagirem à indução pela proteína morfogenética<sup>16</sup>.

As células osteoprecursoras induzíveis são encontradas em tecidos distantes do tecido ósseo como, por exemplo, tecido conjuntivo subcutâneo, tecido muscular esquelético e fígado sendo semelhantes a fibroblastos, com indução mais complexa<sup>19</sup> e a resposta acontece por neoformação óssea indireta<sup>4</sup>.

A osteogênese é mais rápida quando o princípio indutor atua sobre as células osteoprecursoras determinadas, ocorrendo a neoformação óssea direta ou intramembranosa<sup>22</sup>.

O tecido ósseo é depositado e reabsorvido continuamente, entretanto com a idade a taxa de reabsorção é maior do que a de deposição. Numerosos estudos têm sido realizados para tentar elucidar

as relações existentes entre a reabsorção, a regeneração óssea e os hormônios sexuais femininos<sup>24,25,27</sup>.

A menopausa é conseqüência da exaustão dos folículos ovarianos, assim como, na ovariectomia, a parada no desenvolvimento folicular resulta em déficit de estrogênio, levando os níveis deste hormônio a praticamente zero<sup>8,15,25</sup>.

Uma das conseqüências mais comuns desta perda hormonal é a osteoporose, devido à estreita ligação existente entre a deficiência do estrogênio e a patologia. Define-se atualmente a osteoporose como uma doença esquelética sistêmica caracterizada por baixa massa óssea com deterioração da microestrutura do tecido.

A osteoporose é conseqüência de um desarranjo no metabolismo ósseo caracterizado por uma reabsorção óssea patológica e progressiva, acompanhada por uma osteogênese reduzida. Esta baixa massa óssea é atribuída à deficiência de estrogênio e a diminuição da densidade óssea com a idade pode ser explicada, pelo menos parcialmente, pelo aumento de secreção do hormônio paratireóide<sup>5,10,29</sup> resultante da deficiência da vitamina D e da baixa absorção de cálcio.

Fatores hormonais, nutricionais e ambientais interferem no seu desenvolvimento tais como a atividade física adequada, anorexia nervosa, fumo, dieta e o estado geral de saúde, entretanto, a falta de estrogênio parece exercer um papel fundamental. Mulheres que tiveram menopausa precoce por causas naturais ou por ovariectomia desenvolvem precocemente a osteoporose<sup>25</sup>.

A calcitonina é um hormônio tireóidiano hipocalcêmico<sup>6</sup>, secretado nas células parafoliculares da glândula tireóide dos mamíferos e participa ativamente da homeostase esquelética, pois normaliza a concentração dos íons cálcio no plasma. É um peptídeo de cadeia simples sendo sua biossíntese e secreção reguladas pela concentração de cálcio no plasma<sup>6</sup>. Os efeitos hipocalcêmicos e hipofosfatêmicos da calcitonina são causados, predominantemente, pela inibição direta da reabsorção osteoclástica do osso e por influência na função renal<sup>9,15,17,19,23</sup>.

Por suas propriedades anti-osteoclásticas, anti-inflamatórias e analgésica a calcitonina é utilizada no tratamento de doenças caracterizadas por excessiva remodelação óssea como a osteoporose.

Estudos em animais experimentais simulando a osteoporose são importantes, já que, se esta condição constitui um fator de risco com relação ao aumento de fraturas, a administração sistêmica de um medicamento pode favorecer a regeneração mais rápida de um defeito ósseo<sup>25,28-9</sup>. A calcitonina derivada do salmão é mais potente que a humana, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, em parte porque é excretada mais lentamente da circulação<sup>15</sup>.

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que a calcitonina favorece a osteogênese por inibir a reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos, além de possuir um leve efeito analgésico, relativa segurança e efeitos colaterais mínimos<sup>2, 21,25</sup>. Neste estudo utilizou-se a calcitonina administrada via parenteral, devido a sua degradação pelos sucos gástricos<sup>19</sup>. A via intramuscular foi escolhida pela facilidade de aplicação e pelo melhor controle da dosagem, sendo que a dose e o intervalo de administração seguiram os protocolos utilizados terapêuticamente em humanos<sup>30</sup>.

Um aumento nítido tanto na quantidade de tecido ósseo neoformado, como na densidade das trabéculas ósseas dos animais tratados foi observado ao compararmos os resultados histológicos entre os grupos controle e tratado sete e 14 dias, resultados semelhantes aos obtidos por Delling & Glueckselig<sup>8</sup> e Pereira et al.<sup>20</sup> Uma explicação para este fato seria a possível inibição da fase de reabsorção óssea, realizada pelos osteoclastos, com simultânea aceleração da fase formativa, segundo hipótese proposta por Baron & Saffar<sup>3</sup>.

Os resultados histológicos observados nos animais tratados após 21 dias apresentavam um trabeculado ósseo espesso e organizado, compatível com o descrito por Pereira<sup>20</sup>, que relataram preenchimento total do defeito ósseo no grupo tratado.

A maior densidade óssea encontrada no grupo tratado poderia ser explicada por ser a calcitonina uma substância que favorece a formação óssea com uma menor quantidade de lacunas de reabsorção<sup>12</sup>.

A perda óssea que ocorre nos ossos longos e vértebras em animais ovariectomizados deve-se, provavelmente, à aceleração do *turnover* ósseo, no qual o aumentada reabsorção óssea excede a quantidade de neoformação<sup>9,26</sup>. Este fenômeno pode ser interpretado mais como uma supressão da ação osteosclerótica do que como perda óssea.

Nossos resultados indicam que a administração de calcitonina, em animais ovariectomizados, imediatamente após a realização de um defeito ósseo, pode exercer um efeito anabólico direta ou indiretamente sobre esse tecido, já que estudos anteriores demonstraram sua ação sobre os osteoclastos<sup>14,18,24</sup> e, em grau menor, sobre os osteoblastos<sup>18</sup>.

Estudos citoquímicos, histológicos e densitométricos posteriores são necessários para um entendimento mais detalhado dos mecanismos envol-

vidos na reparação óssea quando a osteoporose está presente.

## CONCLUSÃO

A administração de calcitonina em ratas ovariectomizadas, imediatamente após a realização de um defeito ósseo cirúrgico circunscrito, apresenta, histologicamente, uma maior neoformação óssea após o período de sete e 14 dias dias em relação aos animais não tratados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA. *Dicionário de especialidades farmacêuticas*. Miocalcic. Publicações Científicas, 1994/95. 546 p.
- BADURSKI, J. E et al. Chondroprotective action of salmon calcitonin treatment in experimental arthropathies. *Calcif.Tissue Int.*, v. 49, p.27-34, 1991.
- BARON, R., SAFFAR, J. L. A quantitative study of the effects of prolonged calcitonin treatment on alveolar bone remodeling in the golden hamsters. *Calcif. Tissue Res.*, v. 22, p. 265-74, 1977.
- BERNE, R.M, LEVY, M. N. *Fisiologia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Ed.Guanabara, 1990. 568 p.
- CHAPUY, M.C. et al. Age-related changes in parathyroid hormone and 25 hydroxycholecalciferol levels. *J. Gerontol.*, v.38, p. 19-22, 1983.
- COPP, D. H. Evidence for calcitonin - a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. *Endocrinology*, v. 70, p. 638-49, 1962.
- DEMPSTER, D. W. et al. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. *Bone*, v. 16, p. 157-61, 1995.
- DELLING, G., GLUECKSELING, W. The effect of calcitonin on the regeneration of circumscribed tibia defect and in mineral contents of bone in the rat. *Israel. J. Med. Sci.*, v. 7, n. 3, p. 367-78, 1971.
- ETO, S. et al. Medical treatment of malignant hypercalcemia. *Gan to-Kagaku-Ryoho*, v. 20, n. 15, p. 2311-8, 1993.
- FORERO, M.S. et al. Effect of age on circulating immunoreactive and bioactive parathyroid hormone levels in women. *J. Bone Miner. Res.*, v.2, p. 363-6, 1987.
- FRIEDENSTEIN, J. Precursor cells of mechanocystes. *Int. Ver. Cytol.*, v. 47, p. 327-30, 1976.
- GIDEON, A.R., MARTIN, T.J. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption. A hypothesis. *Calcif. Tissue Int.*, v. 33, p. 349-51, 1981.
- GOODMAN, A.G., et al. *The pharmacological basis of therapeutics*, 9. Ed. USA: MacGraw-Hill, Interamericana, 1996. 1905 p.
- GRAVEL, M.R. et al. Platelet-activating factor induces pseudopods formation in calcitonin-treated rabbit osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.*, v. 9, n. 11, p. 1769-76, 1994.
- HARRISON, T. R. *Medicina interna*. 13. ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, Interamericana, 1996. 2.765 p.
- HOLLINGER, J., WONG, M.E.K. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol.*, v. 82, n. 6, p. 594-606, 1996.
- MARX, S.J. et al. Calcitonin receptors of kidney and bone. *Science*, v. 178, n.1, p. 999-1001, 1972.
- NICHOLSON, G.C. et al. Abundant calcitonin receptor in isolated rat osteoclasts. *J. Clin. Invest.*, v. 78, p. 355-60, 1986.
- O'DOHERTY, D.P. et al. A comparison of the acute effects of subcutaneous and intranasal calcitonin. *Clin. Sci*, v. 78, p. 215-9, 1990.
- PEREIRA, S. L. S., et al. Efeito da calcitonina de salmão sobre a cicatrização de defeitos ósseos. Estudo radiográfico e histológico em coelhos. *Rev. Odontol. UNESP*, v.26, n.2, p. 471- 88, 1997.
- RAO, L.G. et al. Immunohistochemical demonstration of calcitonin binding to specific cell types in fixed bone tissue. *Endocrinology*, v. 108, p. 1972-8, 1981.
- REDDY, A.H. Cell biology and biochemistry of endochondral bone development. *Coll. Rev.*, v. 1, n.1, p. 209, 1981.
- REGINSTER, J.Y. et al. Endogenous production of specific antibodies does not decrease hypocalcemic response to calcitonin in young rabbits. *Calc. Tissue Int.*, v. 50, p. 518-20, 1992.
- ROBERT, W. E. et al. Bone physiology and metabolism in dental implantology: Risk factor for osteoporosis and other metabolic bone diseases. *Implant. Dent.* v.11, p. , 1992.
- SIMINOSKI, K., JOSSE, R.G. Calcitonin in the treatment of osteoporosi. *Can. Med Assoc. J.*, v.155, n.7, p. 962-5, 1996.
- TAKAHASHI, S. et al. Downregulation of calcitonin receptor mRNA expression by calcitonin during human osteoclast-like cell differentiation. *J. Clin. Invest.*, v. 95, p. 167-71, 1995.
- WALLACH, S. Calcitonin, osteoclasts and bone turnover. *Calcif. Tissue Int*, v. 47, p. 388-91, 1990.
- WRONSKI, T. J. et al. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif.Tissue Int.*, v. 43, p. 179-83, 1988.
- YOUNG, G. et al. Age-related rise in parathyroid hormone in man: the use of intact and midmolecule antisera to distinguish hormone secretion from retention. *J. Bone Miner. Res.*, v.2, 367-74, 1987.
- ZIEGLER, R., DELLING, G. Effect of calcitonin on the regeneration of a circumscribed bone defect (bored hole in the rat tibia). *Acta Endocrinol.*, v. 69, n. 3, p. 497-506, 1972.