

EFEITO DA CALCITONINA DE SALMÃO SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS. ESTUDO RADIOGRÁFICO E HISTOLÓGICO EM COELHOS*

Sérgio Luís da Silva PEREIRA**

Sérgio de TOLEDO***

Tetuo OKAMOTO****

Enilson Antonio SALLUM***

Francisco Humberto NOCITI JÚNIOR***

- **RESUMO:** O objetivo deste estudo foi avaliar, histológica e radiograficamente, a ação da calcitonina de salmão sobre a cicatrização de defeitos ósseos circunscritos, criados cirurgicamente em fêmur de coelhos saudáveis. Esses foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle (n = 12) e tratado (n = 12). O grupo controle não recebeu qualquer substância durante o experimento, enquanto no grupo tratado foi aplicada dose diária de 2 UI/kg de calcitonina por via intramuscular. Os animais foram sacrificados nos períodos de 7, 14, 21 ou 28 dias após a criação dos defeitos ósseos. As áreas radiolúcidas desses foram medidas, em mm², por meio de um programa de computador denominado Auto-CAD, demonstrando que essas, em média, foram menores no grupo tratado, mas estatisticamente significantes apenas nos períodos intermediários de 14 e 21 dias. Histologicamente, aos 7 dias, os defeitos do grupo tratado apresentaram uma maior neoformação óssea. Aos

* Resumo da Dissertação de Mestrado - Área de Periodontia - Faculdade de Odontologia - Unicamp - 13414-018 - Piracicaba - SP.

** Pós-Graduando em Periodontia - Faculdade de Odontologia - Unicamp - 12414-018 - Piracicaba - SP.

*** Disciplina de Periodontia - Faculdade de Odontologia - Unicamp - 13414-018 - Piracicaba - SP.

**** Departamento de Diagnóstico e Cirurgia - Faculdade de Odontologia - UNESP - 16015-050 - Araçatuba - SP.

28 dias, houve a formação de um osso menos compacto no grupo controle. No entanto, aos 14 e 21 dias, os resultados foram semelhantes entre os dois grupos. Os resultados obtidos neste trabalho possibilitaram inferir que a calcitonina de salmão demonstrou resultados positivos quanto à cicatrização óssea em defeitos circunscritos, baseados nas análises radiográficas e histológicas realizadas.

- PALAVRAS-CHAVE: Defeitos ósseos circunscritos; calcitonina de salmão; cicatrização óssea.

Introdução

A calcitonina é um hormônio polipeptídico, descoberto por Copp et al.,⁵ secretado nas células parafoliculares da glândula tireóide dos mamíferos e participa ativamente da homeostase esquelética, através de um efeito hipocalcêmico, causado pela inibição óssea osteoclástica e influência na função renal.^{4,17,33}

Por suas propriedades antiosteoclásticas, antiinflamatórias e analgésicas, a calcitonina é utilizada para tratamento de doenças caracterizadas por excessiva remodelação óssea, como osteoporose pós-menopausa, doença de Paget e hipercalemia maligna.^{1,2,21,25,30} Apesar de existirem várias categorias de calcitonina, a de salmão é a mais utilizada em virtude de algumas características: alta potência, meia-vida longa, resistência à degradação plasmática e alta afinidade para receptores teciduais.⁴

Por ser degradada pelos sucos gástricos, a calcitonina é administrada via subcutânea, retal, endovenosa, intramuscular^{1,3,21} ou nasal, a qual elimina o desconforto de repetidas injeções, causa menores reações adversas, tem efeito analgésico e necessita de menor tempo de repouso. A administração nasal melhora consideravelmente a tolerância e aceitação da droga,²³ apesar de Wimalawansa³³ afirmar que o grau de absorção pela mucosa nasal para a circulação é variável e o benefício pequeno.

O efeito hipocalcêmico aparece seis horas após a administração da calcitonina de salmão, mas dosagens continuadas diminuem seu efeito, caracterizando o chamado "fenômeno de escape", atribuído ao hiperparatireoidismo secundário, à formação de anticorpos²⁸ e à saturação dos sítios de ligação da calcitonina na superfície dos osteoclastos, pela diminuição do número e sensibilidade desses receptores.¹

O principal fator relacionado à atividade hipocalcêmica da calcitonina é a sua união às células osteoclásticas, causando alterações morfológicas, quimiotáticas e funcionais³⁰ ou reduzindo-as a células mononucleares.¹⁹ A ligação da calcitonina nos osteoclastos é seguida por elevação do nível intracelular de AMPc e de cálcio, sugerindo que estes agem segundo mensageiros da ação da calcitonina, a qual também reduz processos enzimáticos necessários à reabsorção óssea.^{1,4}

Apesar da evidência da ação antiosteoclástica da calcitonina, o papel anabólico desse hormônio ainda é controverso, pois não se definiu sua ação sobre os fibroblastos e/ou osteoblastos. No entanto, Rao et al.²² têm relatado que as células osteoblásticas possuem receptores específicos para a calcitonina. Segundo Ito et al.,¹³ a estimulação da formação óssea ocorre quando a calcitonina é administrada antes do início da osteogênese, provocando um aumento no número de células osteoblásticas.

A partir dos trabalhos iniciais de Wase,³² vários outros foram conduzidos para elucidar a ação da calcitonina no tecido ósseo, utilizando-se diferentes modelos experimentais.³⁴ Como o presente trabalho baseia-se no estudo da ação da calcitonina sobre defeito ósseo provocado, a revisão deste tópico será enfatizada por investigações desta natureza.

Ziegler & Delling³⁵ induziram defeitos ósseos de 0,8 mm de diâmetro no fêmur de ratos tratados com 50 UI de calcitonina, sistemicamente, durante 6 semanas. Os resultados histológicos demonstraram aumento do processo de osteogênese.

Mantzavinos & Listgarten¹⁶ estudaram o efeito do implante de 7,2 UI/ml de calcitonina impregnada com 5% de gelatina, na cicatrização de defeitos ósseos provocados no crânio de ratos normais. A análise histológica demonstrou a formação de um osso irregular, porém altamente celularizado, separado do osso lamelar preexistente por uma linha aposicional basofílica. Aos 7 dias, numerosos osteoblastos alinhavam-se sobre a superfície óssea, principalmente na região imediatamente abaixo do implante. Aos 14 dias, a atividade osteoblástica aumentada persistiu, resultando, nos períodos de 30 e 60 dias, em uma quantidade maior de osso neoformado.

Delling & Glueckselig⁶ analisaram o potencial osteogênico de 100 UI de calcitonina diária, no reparo de defeitos ósseos circunscritos na tibia de ratos. Histologicamente, houve uma aceleração da regeneração dos defeitos corticais aos sete dias no grupo tratado. Aos 21 dias, 76,2% do defeito estavam preenchidos com calo ósseo no grupo tratado com calcitonina e após 6 semanas havia osso neoformado nos grupos tratado e controle.

Ziegler & Delling³⁶ confeccionaram defeitos ósseos circunscritos na tibia de ratos. Após administração diária de 100 UI de calcitonina, houve um preenchimento com calo ósseo duas vezes maior no grupo tratado, após 21 dias. No entanto, no período de 6 semanas, não havia diferença histológica entre os grupos controle e tratado, concluindo que o efeito da calcitonina somente é observado no período crítico de 3 a 4 semanas.

Foster & Kronman⁹ analisaram o potencial de reparo da calcitonina tópica em alvéolos pós-extração de cães, preenchidos com esponja de colágeno embebida em calcitonina. No 30^o dia, o sítio controle apresentou maior quantidade de osso maduro e estruturas mais organizadas em relação ao grupo tratado, que exibiu proliferação acelerada de osso imaturo, porém com células menos diferenciadas e aos 60 dias, os sítios-teste apresentaram-se altamente trabeculados e fracamente organizados.

McDavid et al.¹⁸ avaliaram o efeito da calcitonina aplicada localmente em defeitos ósseos na tibia de ratos. Os defeitos, estendidos até a porção medular, foram preenchidos com esponjas de gelfoam embebidas em calcitonina de salmão. A análise histológica não demonstrou efeito apreciável quando da utilização do hormônio.

Gurkan et al.¹² observaram a ação de doses diárias de calcitonina de salmão, aplicadas durante 14 e 28 dias, no processo de reparo de alvéolos pós-extração em ratos. As lojas cirúrgicas cicatrizaram-se em 4 semanas nos grupos tratado e controle, não demonstrando participação do hormônio na aceleração da mineralização óssea.

Ubios et al.,²⁹ também em alvéolos pós-extração de ratos, estudaram os efeitos da aplicação diária de calcitonina durante 14 dias. As mandíbulas apresentaram uma radiopacidade de quase todo o alvéolo nos grupos tratado e controle. Os defeitos ósseos do grupo tratado foram ocupados por osso trabecular, mas em menor grau em relação ao controle. Esse autor concluiu que apesar da calcitonina não estimular a formação óssea, acelerou o processo de cicatrização por estimular a remodelação do tecido ósseo.

El-Kafrawy & Mitchell⁷ avaliaram a ação da calcitonina na progressão da doença periodontal induzida em ratos. A análise histológica não demonstrou qualquer efeito significativo do hormônio na histomorfologia dos tecidos periodontais, apesar da constatação de seu efeito hipocalcêmico.

Shamash²⁷ avaliou a ação da calcitonina na cicatrização de defeitos ósseos periodontais de uma parede na região de pré-molares e molares em macacos. O aspecto histológico demonstrou maior número de osteoblastos e formação de tecido osteóide nos defeitos tratados com calcitonina; no entanto, clinicamente, não houve diferença significativa na altura dos defeitos ósseos entre os grupos controle e tratado.

Saffar & Lasfargues²⁶ analisaram o efeito da calcitonina em periodontite induzida em ratos. O hormônio não reduziu significativamente a extensão da reabsorção óssea, mas diminuiu a extensão da fase reversa, provocando aumento na formação do osso em relação ao grupo com periodontite não tratada e ao grupo controle.

Em síntese, a diminuição da reabsorção óssea causada pela calcitonina através da ação nos osteoclastos causa uma proporcional redução na formação óssea.²⁹ Porém, estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que a calcitonina estimula o crescimento do tecido ósseo.^{2,30} Juntos, esses achados paradoxais sugerem as seguintes hipóteses: a calcitonina exerce dois efeitos na formação óssea: uma inibição a longo prazo, causada indiretamente pela diminuição da reabsorção óssea e um efeito anabólico nas células osteoblásticas, surgindo um osso mais denso com menos cavidades de reabsorção.^{4,10}

O objetivo deste trabalho é avaliar, radiográfica e histologicamente, a ação da calcitonina de salmão sobre a cicatrização de defeitos ósseos circunscritos em fêmur de coelhos saudáveis.

Material e método

Para esse estudo foram utilizados 24 coelhos fêmeas, adultos, jovens, Nova Zelândia, com 4 meses de idade e peso médio de 2.500 g, mantidos em gaiolas com água e ração balanceada à vontade, em temperatura ambiente. Os animais foram diferenciados por meio de marcações na parte interna da orelha, divididos aleatoriamente em dois grupos (controle e tratado) e subdivididos em quatro subgrupos de três animais, de acordo com o período de sacrifício (7, 14, 21 e 28 dias).

Os animais de ambos os grupos foram pesados e sedados com injeção endovenosa de Urethane* (25%) a 0,8 g/kg, injetando-se lentamente o anestésico através de um dispositivo asséptico conectado a uma

* Sigma Chemical - MO - USA.

seringa descartável. Após a sedação, procedeu-se à tricotomia da região lateral da coxa, antissepsia com álcool iodado e, com auxílio de um campo fenestrado autoclavado, expôs-se a área a ser operada.

Com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15, fez-se a incisão de aproximadamente 5 cm de extensão até a exposição do tecido muscular que, divulsionado, expôs o fêmur. Durante o ato cirúrgico, o músculo foi afastado para proporcionar livre acesso à superfície óssea. Foram, então, realizadas três perfurações em cada fêmur com broca esférica de aço nº 6, montada em um motor elétrico de baixa rotação,* até atingir a cavidade medular. Durante todo o ato e após a cirurgia, irrigou-se abundantemente a região com soro fisiológico à temperatura ambiente. Após o preenchimento dos defeitos com coágulo, o tecido muscular foi recolocado sobre a área operada e suturado em massa com fio de algodão** através de sutura contínua. A incisão cutânea foi suturada com pontos interrompidos simples com o mesmo tipo de fio para, então, realizar-se nova antissepsia da área operada com álcool iodado.

Os coelhos do grupo tratado receberam doses diárias de 2 UI/kg de calcitonina de salmão,*** via intramuscular, por até 21 dias, sendo a primeira dose dada logo após a cirurgia e as doses subsequentes ministradas preferencialmente no mesmo horário. Os animais do grupo controle não receberam aplicação de qualquer substância. Os animais foram sacrificados por inalação de éter sulfúrico aos 7, 14, 21 ou 28 dias e os fêmures foram removidos, dissecados e mantidos em frascos com formol a 10% durante 24 horas.

Após o período inicial de fixação, os espécimes foram radiografados com o feixe de raios X incidindo perpendicularmente aos defeitos, mantendo-se uma distância de 15 cm entre o foco e a película radiográfica periapical, com tempo de exposição de 0,3 segundos. As radiografias foram processadas automaticamente.

Após radiografados, os espécimes foram recolocados na solução fixadora por mais 24 horas, descalcificados em um recipiente contendo uma solução de proporções iguais de ácido fórmico a 50% e citrato de sódio a 20% durante 2 meses, trocando-se a solução a cada 4 dias. Efetuados os procedimentos laboratoriais de rotina, cortes semi-seiados de 6 µm de espessura foram obtidos, corados com (hematoxilina e eosina)

* Dentec 405 N.

** Sutupark-Ethicon 4-0.

*** MIACALCIC - Laboratório Sandoz/S. A.

HE e tricrômico de Masson para, posteriormente, serem analisados por microscopia óptica comum.

As radiografias obtidas foram digitalizadas em um *scanner** com adaptador para transparência, sendo a imagem ampliada quatro vezes e arquivada em disquete. As leituras das imagens radiográficas foram feitas em oito radiografias de cada grupo, sendo duas para cada período de sacrifício, num total de seis defeitos analisados por período. Para tal foi utilizado um computador,** em *software* Auto-CAD.*** Em cada imagem foi demarcado um ponto fixo, aproximadamente no centro do defeito; a partir desse, estendeu-se uma reta correspondente ao raio até encontrar uma faixa radiopaca bem definida. Em seguida, era traçado um círculo, o qual delimitava a área radiolúcida em mm².

As medidas foram realizadas quatro vezes em cada defeito, a partir de um mesmo ponto fixo predeterminado, traçando-se o raio em quatro direções: acima, abaixo, à direita e à esquerda. Dessas quatro medidas, obteve-se uma média aritmética da área de cada defeito. Com um total de seis defeitos medidos para cada período, em ambos os grupos, obtivemos as médias correspondentes por período que foram comparadas entre os grupos controle e tratado e analisadas estatisticamente, através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

Resultados

1 Resultados radiográficos

Fazendo-se uma análise das médias das áreas radiolúcidas (em mm²) dos grupos controle e tratado (Tabela 1), podemos notar que houve uma redução dessas do período de 7 para o de 28 dias em ambos os grupos, com picos de área radiolúcida no período intermediário de 14 dias. Comparando-se os grupos entre si, pôde-se observar que, nos quatro períodos estudados, as médias aritméticas das áreas radiolúcidas do grupo tratado foram sempre menores em relação ao grupo controle. No entanto, essa diferença foi estatisticamente significativa apenas para o período de 14 e 21 dias ($p < 0,05$).

* UMAX UC 1260.

** POWER MACINTOSH 7100/66, SOFTWARE ADOBE PHOTOSHOP 3.0.

*** R12, for DOS, Cad OVERLAY, GSX 4.1.

Tabela 1 – Médias finais das áreas radiolúcidas (em mm²) dos defeitos ósseos dos animais dos grupos controle e tratado, obtidas nos quatro períodos experimentais

Período	Grupo controle	Grupo tratado
7 dias	0,0582*	0,0421*
14 dias	0,0779**	0,0510**
21 dias	0,0648**	0,0375**
28 dias	0,0401*	0,0234*

* ns.

** p < 0,05.

Visualizando-se o gráfico de linhas (Figura 1), relacionando a área radiolúcida (em mm²) com os períodos de sacrifício, observa-se uma curva de redução da área radiolúcida semelhante entre os grupos controle e tratado. No entanto, no período compreendido entre os 7 e 14 dias, a tendência de aumento da área radiolúcida foi menor no grupo tratado, configurando uma curva menos acentuada. De outro modo, no intervalo compreendido entre os 14 e 21 dias, o grau de redução da área radiolúcida foi maior no grupo controle, o qual pode ser visualizado pelo desenho de uma curva descendente mais acentuada. Essa tendência perdurou até o período final de 28 dias. Vale ressaltar que, somente nos períodos intermediários de 14 e 21 dias, houve uma diferença estatisticamente significativa no grau de redução da área radiolúcida.

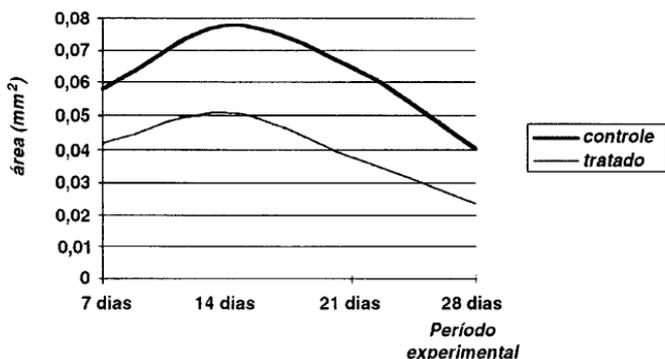


FIGURA 1 – Comparação entre as curvas de redução da área radiolúcida (em mm²) dos defeitos ósseos dos animais dos grupos controle e tratado durante o período experimental de 28 dias.

2 Resultados histológicos

Período de 7 dias

Grupo controle

A loja cirúrgica encontra-se praticamente ocupada por tecido conjuntivo neoformado bem vascularizado e rico em fibroblastos. Pequenas espículas ósseas neoformadas podem ser observadas ao longo das paredes laterais e fundo da loja cirúrgica, exibindo numerosos osteoblastos em suas bordas (Figura 2). Nas áreas mais externas, a loja cirúrgica mostra tecido conjuntivo sem diferenciação óssea.

Grupo tratado

A totalidade da loja cirúrgica encontra-se preenchida por tecido conjuntivo neoformado. Ao longo de toda a extensão da loja cirúrgica evidenciam-se delgadas trabéculas ósseas neoformadas, exibindo numerosos osteoblastos em suas bordas (Figura 3). Em alguns espécimes podem ser observadas pequenas áreas junto à superfície externa com tecido conjuntivo sem diferenciação óssea.

Período de 14 dias

Grupo controle

A totalidade da loja cirúrgica acha-se preenchida por trabéculas ósseas, geralmente delgadas, deixando amplo espaço intertrabecular ocupado por tecido conjuntivo bem vascularizado e rico em fibroblastos (Figura 4). As trabéculas ósseas mostram em suas bordas numerosos osteoblastos. Em outros espécimes observam-se, junto às paredes laterais ou fundo da loja cirúrgica, trabéculas ósseas mais desenvolvidas. Entretanto, em alguns espécimes há presença de poucas espículas ósseas junto às paredes laterais da loja cirúrgica.

Grupo tratado

Em sua totalidade, a loja cirúrgica encontra-se ocupada por trabéculas ósseas delgadas, porém mais organizadas em relação àquelas

observadas no grupo controle (Figura 5). Junto às paredes laterais podem ser observadas, na maioria dos casos, trabéculas ósseas espessas e bem organizadas.

Período de 21 dias

Grupo controle

A loja cirúrgica encontra-se, na maioria dos casos, totalmente preenchida por trabéculas ósseas bem organizadas (Figura 6). Em alguns espécimes, trabéculas ósseas delgadas são observadas junto à área mais superficial, mostrando amplo espaço intertrabecular ocupado por tecido conjuntivo bem desenvolvido.

Grupo tratado

A totalidade da loja cirúrgica acha-se preenchida por trabéculas ósseas bem organizadas (Figura 7), mostrando, praticamente, as mesmas características observadas no grupo controle. Em alguns casos, no entanto, observam-se ao longo da loja cirúrgica, trabéculas ósseas mais espessas com canais medulares reduzidos.

Período de 28 dias

Grupo controle

A loja cirúrgica acha-se, em sua totalidade, preenchida por trabéculas ósseas espessas e bem definidas (Figura 8). Em alguns pontos, no entanto, podem ser observadas áreas ocupadas por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea, notadamente próxima à superfície externa.

Grupo tratado

Em todos os espécimes observam-se as lojas cirúrgicas totalmente preenchidas por trabéculas ósseas bem desenvolvidas e com canais medulares definidos apresentando, entretanto, aspecto ósseo mais compacto em relação ao grupo controle (Figura 9).

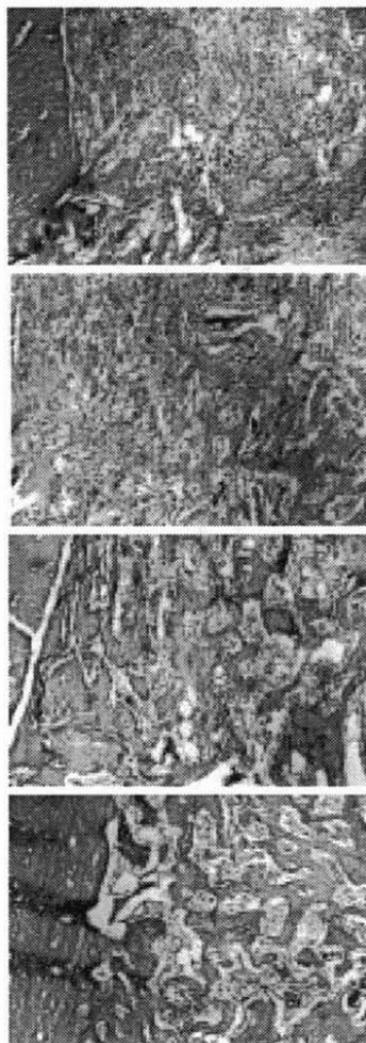


FIGURA 2 - Grupo controle. 7 dias. Pequenas espículas ósseas neoformadas (E) junto à parede lateral (P) da loja cirúrgica. (H/E 63x).

FIGURA 3 - Grupo tratado. 7 dias. Delgadas trabéculas ósseas (T), deixando amplo espaço intertrabecular (I). (H/E 63x).

FIGURA 4 - Grupo controle. 14 dias. Trabéculas ósseas delgadas (T) e presença de tecido conjuntivo (C) bem vascularizado e rico em fibroblastos. (H/E 63x).

FIGURA 5 - Grupo tratado. 14 dias. Trabéculas ósseas delgadas (T), porém bem organizadas, ocupando a loja cirúrgica. (H/E 63x).

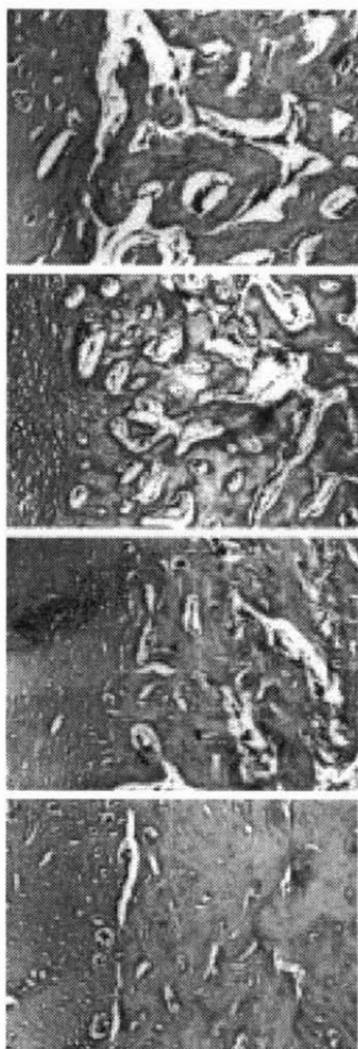


FIGURA 6 – Grupo controle. 21 dias. Loja cirúrgica ocupada por trabéculas ósseas espessas (T). (H/E 63x).

FIGURA 7 – Grupo tratado. 21 dias. Loja cirúrgica ocupada por trabéculas ósseas bem organizadas (t). (H/E 63x).

FIGURA 8 – Grupo controle. 28 dias. Loja cirúrgica mostrando a presença de trabéculas ósseas espessas e bem definidas (t). (H/E 63x).

FIGURA 9 – Grupo tratado. 28 dias. Loja cirúrgica totalmente preenchida por tecido ósseo bem desenvolvido (W), com canais medulares definidos (M). (H/E 63x).

Discussão

De acordo com O'Doherty et al.,²¹ em razão da degradação plasmática da calcitonina de salmão pelos sucos gástricos, ela é administrada via parenteral. Apesar de efeitos adversos terem sido relatados,^{11,21} Wallach³¹ afirma que não ocorre toxicidade orgânica após administração da calcitonina. Por essas razões, surgiu a calcitonina via nasal,²⁴ apesar de Wimalawansa³³ afirmar que a administração nasal reduz o potencial terapêutico da droga. Em nosso trabalho, utilizamos a calcitonina de salmão, via intramuscular, pela facilidade de aplicação da droga, melhor controle da dosagem e pela dificuldade de se realizar a aplicação via nasal em animais.

Com relação à dose de calcitonina administrada em coelhos, via intramuscular, há divergências na literatura. Reginster et al.²⁴ usaram 1 UI/kg; Lupulescu¹⁴ e Lupulescu & Habowsky,¹⁵ 64 UI/kg e Badurski,² 2 UI/kg. Para nosso estudo, seguiu-se a dose de 2 UI/kg, via intramuscular, que corresponde à dosagem terapêutica em humanos.²

Com relação ao tempo de administração da droga, alguns autores relataram perda de sua efetividade em razão ao "fenômeno de escape".^{8,28} Reginster et al.,²⁴ utilizando doses diárias de calcitonina em coelhos durante 6 semanas, observaram a produção de anticorpos contra a calcitonina. Em nosso estudo, como aplicamos a calcitonina por até 21 dias, segundo Lupulescu,¹⁴ acreditamos não ter ocorrido resistência à droga, pois segundo Berne & Levy,⁴ esse fenômeno ocorre após 18 meses de tratamento continuado.

Algumas das limitações na análise dos resultados radiográficos baseiam-se na sua característica bidimensional, possibilitando a observação apenas da redução horizontal da área radiolúcida. Outro fato a ser explorado é o método de medição utilizado. O programa de computador Auto-CAD possibilita medir área circular bem delimitada. Aos 7 dias, o defeito ainda apresentava-se radiolúcido, com formato circular bem demarcado, favorecendo a medição. De outro modo, a partir do 14º dia, as limitações desse método foram crescentes, uma vez que a área radiolúcida tornava-se mais irregular.

Portanto, para minimizar o erro de medição intra-examinador, propusemos medir quatro vezes cada defeito, traçando-se os raios nos sentidos horizontal (esquerdo e direito) e vertical (acima e abaixo), a partir de um mesmo ponto central, até encontrar uma faixa radiopaca bem definida. Isso feito, a área circular radiolúcida era determinada pelo

computador em mm². Incontestavelmente, áreas radiopacas e radiolúcidas eram desprezadas ou incluídas, principalmente nos defeitos irregulares. Acreditamos que as medições com diferentes raios minimizaram os erros de medida, embora esse programa seja relativamente novo na Odontologia, não havendo, portanto, trabalhos relatados na literatura que possam comprovar a sua eficiência. Mas, com o aperfeiçoamento desse, ajustando-o ao objetivo da pesquisa proposta, julgamos que o programa possibilite uma precisão maior na mensuração da perda óssea radiográfica.

Comparando-se os resultados histológicos entre os grupos controle e tratado no período de 7 dias, pudemos notar uma nítida diferença na quantidade de tecido ósseo neoformado, em que o número de trabéculas ósseas foi maior no grupo que recebeu a calcitonina. Esses achados estão de acordo com os relatos de Delling & Glueckselig,⁶ que demonstraram a formação de grandes quantidades de osso trabecular, aos 7 dias, em defeitos ósseos circunscritos no fêmur de ratos tratados com calcitonina. Uma hipótese para a aceleração da neoformação óssea foi dada por Baron & Saffar,³ que relataram ser a inibição da fase reversa responsável pelo início mais rápido da fase formativa.

Aos 14 dias, os defeitos do grupo controle estavam preenchidos totalmente por trabéculas ósseas delgadas, porém menos organizadas, contradizendo os resultados de Ubios et al.,²⁹ nos quais a quantidade de osso trabecular foi maior no grupo que não recebeu a calcitonina. Ainda em relação a esse período, os relatos de McDavid et al.¹⁸ e de Gurkan et al.¹² não encontraram resultados positivos no grau de cicatrização óssea após a administração do hormônio.

Já no período de 21 dias, os resultados histológicos foram semelhantes nos dois grupos, em que ambos apresentaram um trabeculado ósseo espesso e bem organizado, preenchendo totalmente a loja cirúrgica. No entanto, para Ziegler & Delling,³⁶ a administração diária de calcitonina em ratos ocasionou, ao final de 21 dias, um preenchimento ósseo do defeito duas vezes maior em relação ao do grupo controle.

No período de 28 dias, a semelhança histológica entre os dois grupos foi evidente, com toda a loja cirúrgica preenchida por um trabeculado ósseo espesso, organizado e bem desenvolvido. Entretanto, Foster & Kronman⁹ observaram que a aplicação tópica de calcitonina resultou, aos 30 dias, em um osso imaturo, mais celularizado e menos organizado, discordando dos relatos de Mantzavinos & Listgarten,¹⁶ que observaram formação óssea maior no grupo tratado com a calcitonina.

Ainda com relação ao período final de 28 dias, vale ressaltar que o grupo tratado apresentou um tecido ósseo mais compacto, com menos canais medulares. Essa maior densidade óssea pode ser explicada pelos relatos de Gideon & Martin,¹⁰ em que a calcitonina concorreria para a formação óssea com menos cavidades de reabsorção.

Esses resultados nos levam a crer que a ação do hormônio ocorreu mais efetivamente na primeira semana, em que há maior grau de remodelação óssea, concordando com os resultados de autores que relataram ser a efetividade do hormônio proporcional ao grau de *turnover* ósseo.^{2,23,36} A semelhança histológica entre os dois grupos nos períodos intermediários de 14 e 21 dias demonstra que a efetividade do hormônio pode ter sido reduzida, corroborando os resultados de outros autores,^{8,28} embora o osso mais compacto observado no grupo tratado no período de 28 dias denote um efeito positivo do hormônio nos estágios finais de cicatrização óssea.

A definição sobre a efetividade da calcitonina sobre a cicatrização óssea é limitada, pois os estudos divergem em relação à metodologia, variando o modelo experimental, as doses empregadas, bem como a via e o tempo de administração da calcitonina. No entanto, tomando-se como base os trabalhos citados anteriormente, podemos admitir que a calcitonina exerce, por um tempo limitado, um efeito anabólico direta ou indiretamente sobre o tecido ósseo, uma vez que já está comprovada sua ação sobre os osteoclastos^{11,20,30} e, em menor grau, sobre os osteoblastos.^{13,22}

Conclusão

- Os defeitos ósseos dos coelhos tratados com a calcitonina apresentaram, em média, uma menor área radiolúcida, com resultados estatísticos significantes nos períodos de 14 e 21 dias.
- Os defeitos ósseos dos coelhos tratados com a calcitonina demonstraram uma maior neoformação óssea no período de 7 dias, com semelhança histológica entre os grupos nos períodos de 14 e 21 dias.
- Os defeitos ósseos dos coelhos tratados com a calcitonina, embora semelhantes aos do grupo controle, apresentaram um osso mais compacto, caracterizado pela presença de canais medulares reduzidos, ao final do período de 28 dias.

Agradecimento

À Fapesp pelo pleno incentivo financeiro e científico para a elaboração deste trabalho.

PEREIRA, S. L. da S. et al. Effect of calcitonin on bone healing process of circumscribed bone defects. Histological and radiographic analysis. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.26, n.2, p.471-488, 1997.

- **ABSTRACT:** *The purpose of this study was to evaluate, in healthy animals, the role of salmon calcitonin in the bone healing process of circumscribed bone defects in the twenty-four (24) young adults rabbits femur. Twelve (12) animals, selected at random, formed the control and test groups (salmon calcitonin – 2 IU/kg during 21 days). The rabbits were sacrificed 7, 14, 21 and 28 days after the surgical procedures. The radiolucid areas of the bone defects were measured, in mm², by Auto-CAD software. The results showed statistical differences (p < 0.05) at 14 and 21 days, favoring the test group. At 7 days, the bone defects of the test group showed more bone regeneration. Nevertheless, at 14 and 21 days, the results was similar among two groups, with the new bone more compact in the test group than control group. Thus, this study did demonstrate the positive role of salmon calcitonin in the bone healing process of circumscribed bone defects in healthy rabbits, considering the radiographic and histological analysis.*
- **KEYWORDS:** *Circumscribed bone defects; salmon calcitonin; bone healing process.*

Referências bibliográficas

- 1 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA. *Dicionário de especialidades farmacêuticas: miacalcic*. São Paulo: Publicações Científicas, 1994/1995. p.546.
- 2 BADURSKI, J. E. et al. Chondroprotective action of salmon calcitonin in experimental arthropathies. *Calcif. Tissue Int.*, v.49, p.27-34, 1991.
- 3 BARON, R., SAFFAR, J. L. A quantitative study of the effects of prolonged calcitonin treatment on alveolar bone remodelling in the golden hamsters. *Calcif. Tissue Res.*, v.22, p.265-74, 1977.

- 4 BERNE, R. M., LEVY, M. N. *Fisiologia*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1990. p.698-707.
- 5 COPP, D. H. Evidence for calcitonin – a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. *Endocrinology*, v.70, p.638-49, 1962.
- 6 DELLING, G., GLUECKSELIG, W. The effect of calcitonin on the regeneration of circumscribed tibia defect and in mineral contents of bone in the rat. *Isr. J. Med. Sci.*, v.7, p.367-78, 1971.
- 7 EL-KAFRAWY, A. H., MITCHELL, D. F. Dental and periodontal effects of calcitonin in hamsters. *J. Dent. Res.*, v.55, p.554, 1976.
- 8 ETO, S, NAKANO, Y., OKADA, Y. Medical treatment of malignant hypercalcemia. *Gan To Kagaku Ryoho*, v.20, p.2311-8, 1993.
- 9 FOSTER, S. C., KRONMAN, J. H. The effects of topical thyrocalcitonin on the extraction sites in the jaws of dogs. *Oral Surg.*, v.38, p.866-73, 1974.
- 10 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.
- 11 GRAVEL, M. R. et al. Platelet-activating factor induces pseudopod formation in calcitonin-treated rabbit osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.*, v.9, p.1769-76, 1994. [Abstract].
- 12 GURKAN, L. et al. Effects of salmon calcitonin on growth of teeth and on extraction socket healing in young rats. *Scand. J. Dent. Res.*, v.91, p.425-30, 1983.
- 13 ITO, N. et al. Response of osteoblastic clonal cell line (MC 373-E1) to [Asu¹⁻⁷] eel calcitonin at a specific cell density or differentiation stage. *Calcif. Tissue Int.*, v.40, p.200-5, 1987.
- 14 LUPULESCU, A. Effect of calcitonin on fibroblasts and collagen formation in rabbits: an ultrastructural and scanning electron microscopic study. *J. Morphol.*, v.142, p.447-66, 1973.
- 15 LUPULESCU, A., HABOWSKY, J. Effects of calcitonin on wound healing; a morphological study in rabbits. *J. Surg. Res.*, v.25, p.260-8, 1978.
- 16 MANTZAVINOS, Z., LISTGARTEN, M. A. Thyrocalcitonin stimulated bone formation by local application to rat calvaria in vivo. *J. Periodontol.*, v.41, p.663-6, 1970.
- 17 MARX, S. J. et al. Calcitonin receptors of kidney and bone. *Science*, v.178, p.999-1001, 1972.
- 18 McDAVID, P. T., EL-KAFRAWY, A. H., MITCHELL, D. F. Lack of effect of topical calcitonin on connective tissue. *J. Dent. Res.*, v.56, p.540, 1977.
- 19 MEGHJI, S. Bone remodelling. *Br. Dent. J.*, v.172, p.235-42, 1992.
- 20 NICHOLSON, G. C. et al. Abundant calcitonin receptor in isolated rat osteoclasts. *J. Clin. Invest.*, v.78, p.355-60, 1986.

- 21 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.
- 22 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.
- 23 REGINSTER, J. Y. et al. The effect of salmon calcitonin on blood-ionized calcium in the presence of anti-salmon calcitonin antibodies (from pagetic patients) in young rabbits. *Curr. Ther. Res.*, v.47, p.1063-72, 1990.
- 24 _____. Endogenous production of specific antibodies does not decrease hypocalcemic response to calcitonin in young rabbits. *Calcif. Tissue Int.*, v.50, p.518-20, 1992.
- 25 _____. Long-term (3 years) prevention of trabecular postmenopausal bone loss with low-dose intermittent nasal salmon calcitonin. *J. Bone Miner. Res.*, v.9, p.69-73, 1994.
- 26 SAFFAR, J. L., LASFARGUES, J. J. A histometric study of the effect of indomethacin and calcitonin on bone remodelling in hamsters periodontitis. *Arch. Oral Biol.*, v.29, p.555-8, 1984.
- 27 SHAMASH, D. B. Stimulation of osteogenesis by topical application of calcitonin in periodontal osseous defects. *J. Periodontol.*, v.48, p.619-29, 1977.
- 28 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.
- 29 UBIOS, A. M., FURNO, G. J., GUGLIELMOTTI, M. B. Effect of calcitonin on alveolar wound healing. *J. Oral Pathol. Med.*, v.20, p.322-4, 1991.
- 30 WALLACH, S. Calcitonin, osteoclasts and bone turnover. *Calcif. Tissue Int.*, v.47, p.388-91, 1990.
- 31 _____. Calcitonin. History and Prospects. *Semin. Arthritis Rheumatism*, v.23, p.256-60, 1994.
- 32 WASE, A. W. et al. Action of thyrocalcitonin on bone. *Nature*, v.214, p.388-9, 1967.
- 33 WIMALAWANSA, S. J. Long and short-terms side effects and safety of calcitonin in man: a prospective study. *Calcif. Tissue Int.*, v.52, p.90-3, 1993.
- 34 YAMAMOTO, M. et al. Endogenous calcitonin attenuates parathyroid hormone-induced cancellous bone loss in the rat. *Endocrinology*, v.136, p.788-95, 1995.
- 35 ZIEGLER, R., DELLING, G. The effect of calcitonin on atrophy and new formation of bone. *7th Acta Endocrinologica Congress*, v.138, p.183, 1969. [Abstract, 183].
- 36 _____. Effect of calcitonin on the regeneration of a circumscribed bone defect (bored hole in the rat tibia). *Acta Endocrinologica*, v.69, p.497-506, 1972.