

**JANETE DIAS ALMEIDA**

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DA  
CALCITONINA E DO *PLUMBUM METALLICUM*  
30CH NA REPARAÇÃO ÓSSEA EM MANDÍBULA  
DE RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de **DOUTOR**, pelo Programa de Pós-Graduação em **ODONTOLOGIA**, Área de Concentração em Biopatologia Bucal.

Orientadora: Profa. Adj. Yasmin Rodarte Carvalho

**SÃO JOSÉ DOS CAMPOS**

**2001**

## DEDICATÓRIA

Ao meu marido, Afranio, pelo amparo, compreensão e disponibilidade para sermos companheiros nesta linda jornada, buscando formar uma união saudável de respeito mútuo.

Aos meus filhos Larissa e Gabriel, que nos dão oportunidade de viver cada dia em busca de aprimoramento.

Aos meus pais por terem permitido que eu viesse ao mundo em busca de aprendizado, por acreditarem e investirem na minha formação e pelo exemplo de força e coragem.

**À Profa. Adj. Yasmin Rodarte Carvalho**, pelo exemplo de dignidade, ética, dedicação e competência, acrescido de humildade, respeito por todos e paciência, meu agradecimento de coração.

Ao **Prof. Adj. Luiz Antonio Guimarães Cabral**, por ter me recebido como sua orientada desde o início da minha carreira, pela confiança depositada e por estar sempre pronto a ensinar, discutir e aceitar novas possibilidades, o meu reconhecimento e agradecimento.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa da Diretora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, **Profa. Dra. Maria Amélia Máximo de Araújo**, pela oportunidade e por toda a minha formação científica.

Ao Departamento de Biociências e Diagnóstico, pela oportunidade de realização do curso.

À **Profa. Emília Angela Loschiavo Arisawa** amiga que me acompanha desde o início do trabalho, incentivando, acolhendo, compartilhando de todos os momentos.

À **Profa. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante** pelo apoio, incentivo e por ter respaldado os meus momentos de ausência da Disciplina de Semiologia.

Aos **animais**, seres que prestam serviço à comunidade científica na busca de respostas para seus questionamentos, por colaborarem com este trabalho, o meu profundo respeito.

À **Profa. Dra. Rosilene Fernandes da Rocha** agradeço a imensa colaboração na realização deste trabalho de pesquisa, principalmente durante a fase experimental.

Aos funcionários **Lourival Jacob e Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos**, funcionários do Biotério, que tornaram possível a realização deste trabalho, pela disponibilidade, convivência alegre e grande colaboração durante a elaboração da fase experimental desta pesquisa, o meu sincero agradecimento.

Aos colegas do Programa de Pós Graduação que tanto enriqueceram o trabalho com sugestões, partilha de novos achados, referências e pela contribuição em todos os momentos.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, nas pessoas do **Prof. Dr. Francisco Haiter Netto** (Radiologia) e **Prof. Dr. José Merzel** (Histologia), que nos receberam tão bem colocando inteiramente à disposição os equipamentos solicitados, bem como orientando a utilização dos mesmos.

À técnica **Ana Lourdes da Silva Machado** pela imensa colaboração na confecção das lâminas.

À **Terezinha de Fátima Arantes de Mello e Sílvia Scarpel** pela disponibilidade e ajuda em todas as dúvidas.

Ao **Laboratório Novartis S.A.** por ter cedido o Miacalcic para a realização da pesquisa.

À **Farmácia de Manipulação Bella Farma** por ter cedido o *Plumbum mettalicum* para a realização da pesquisa.

À **Kodak S.A.** por ter cedido os filmes oclusais utilizadas neste estudo para a realização da análise radiográfica.

Ao **Prof. Marco Antonio Leonel Caetano** pela elaboração da análise estatística e gráficos dos resultados da pesquisa.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, **Rosemary de Fátima Salgado** e **Erena Michie Hasegawa**, pela paciência com que sempre me receberam.

À bibliotecária **Angela de Brito Bellini**, pela amizade, disponibilidade, paciência e orientação na revisão deste trabalho.

Aos amigos do polo computacional, pela amizade, paciência e ajuda na realização da apresentação do trabalho e da aula didática.

Ao **Prof. Dr. Luiz Eduardo Blumer Rosa** e **Prof. Assistente Carlos Augusto Pavanelli** pela colaboração imprescindível para a finalização deste trabalho.

Muitos são os companheiros de jornada que possibilitaram a finalização deste trabalho, dando o suporte emocional necessário para encontrar o equilíbrio necessário para a vida. Como **seres unos que somos** agradeço a cada um por serem uma benção em minha vida.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
RESUMO.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Osso.....	19
2.2 Princípio de osteopromoção.....	32
2.3 Calcitonina.....	40
2.4 Chumbo.....	52
2.5 Densitometria.....	56
2.6 Histomorfometria.....	59
3 PROPOSIÇÃO.....	63
4 MATERIAL E MÉTODO.....	64
4.1 Animais.....	64
4.2 Procedimento cirúrgico.....	65
4.3 Características da barreira.....	67
4.4 Tratamento farmacológico.....	67
4.5 Radiografia das peças.....	69
4.6 Análise histológica.....	71
4.7 Análise histomorfométrica.....	72
4.8 Análise estatística.....	74

5 RESULTADOS.....	75
5.1 Análise da densidade óptica.....	75
5.2 Análise histológica.....	83
5.3 Análise da histomorfometria.....	100
6 DISCUSSÃO.....	106
7 CONCLUSÃO.....	113
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114
ANEXOS.....	125
<i>ABSTRACT</i> .....	128



original: 200X; e) chumbo: defeito ósseo com neoformação óssea subperiosteal junto às margens. HE, aumento original: 25X; f) chumbo: detalhe de uma das margens, com neoformação óssea subperiosteal, tecido de granulação e rede de fibrina. HE, aumento original: 100X.....

86

FIGURA 8- Período de sete dias: a) controle: uma das margens do defeito parcialmente preenchido por tecido de granulação e neoformação óssea subperiosteal. HE, aumento original 100X; b) controle: detalhe de uma das margens, com neoformação óssea subperiosteal e na superfície de corte, presença de tecido de granulação e esquirolas ósseas no interior do defeito. HE, aumento original 200X; c) calcitonina: uma das margens do defeito com trabéculas ósseas neoformadas e esquirolas. HE, aumento original 100X; d) calcitonina: detalhe da figura anterior com células de aspecto osteogênico ao redor de esquirolas ósseas. HE, aumento original 200X; e) chumbo: defeito parcialmente preenchido por tecido de granulação e neoformação óssea junto às margens. Tricrômico de Masson, aumento original 25X; f) chumbo: detalhe da neoformação óssea subperiosteal e na superfície de corte, formando em conjunto aspecto de cone. HE, aumento original 200X .....

89

FIGURA 9- Período de 14 dias: a) controle: defeito parcialmente preenchido por tecido de granulação e neoformação óssea junto às margens. Tricrômico de Masson, aumento original 25X; b) controle: lacunas de reabsorção com osteoclastos ativos junto ao tecido ósseo neoformado. HE, aumento original 400X; c) calcitonina: defeito parcialmente preenchido por trabéculas ósseas imaturas e tecido de granulação. HE, aumento

original 25X; d) calcitonina: detalhe da figura anterior com trabéculas não lamelares delimitando espaços medulares amplos, preenchidos por tecido conjuntivo frouxo e esquirolas ósseas circundadas por células de aspecto osteogênico. HE, aumento original 100X; e) chumbo: região periférica do defeito com união das margens por tecido ósseo neoformado. Tricrômico de Masson, aumento original 25X; f) chumbo: região central do defeito com aproximação das bordas de tecido ósseo neoformado. HE, aumento original 100X..... 93

FIGURA 10- Período de 21 dias: a) controle: defeito com neoformação de trabéculas ósseas espessas junto às margens. HE, aumento original 25X; b) controle: detalhe da figura anterior com espaços medulares amplos contendo tecido medular. HE, aumento original: 100X; c) calcitonina: neoformação óssea subperiosteal e na superfície de corte formando em conjunto aspecto de cone e núcleos de ossificação no interior do defeito. Tricrômico de Masson, aumento original 25X; d) calcitonina: trabéculas ósseas espessas circundadas por osteoblastos e esquirolas ósseas contornadas por osteoclastos e células de aspecto osteogênico. HE, aumento original 200X; e) chumbo: neoformação óssea subperiosteal e na superfície do corte formando em conjunto aspecto de cone. Tricrômico de Masson, aumento original 25X; f) chumbo: trabéculas ósseas espessas não lamelares delimitando espaços medulares e linhas reversas junto às margens do defeito. HE, aumento original 100X ..... 96

FIGURA 11- Período de 28 dias: a) controle: região periférica do defeito com união das margens por tecido ósseo neoformado. HE, aumento original 25X; b)

controle: trabéculas ósseas espessas delimitando espaços medulares de tamanhos variados. HE, aumento original 100X; c) calcitonina: trabéculas ósseas espessas delimitando espaços medulares de tamanhos variados. HE, aumento original 100X; d) calcitonina: núcleo de ossificação na região central do defeito. HE, aumento original 100X; e) chumbo: região central do defeito com união das margens por trabéculas neoformadas delimitando amplos espaços medulares. Tricrômico de Masson, aumento original 25X; f) chumbo: região central do defeito com união das margens por trabéculas ósseas neoformadas delimitando espaços medulares de tamanhos variados. HE, aumento original 25X 99  
 .....

FIGURA 12- Histograma dos tratamentos e Controle.....	100
FIGURA 13- Histograma dos tratamentos de acordo com os períodos de observação.....	101
FIGURA 14- Gráfico representativo da interação entre os fatores dia x grupos.....	103
FIGURA 15- Gráfico representativo do efeito dos tratamentos x controle.....	103
FIGURA 16- Gráfico representativo dos valores médios dos grupos tratados e controle.....	104

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

ANOVA – análise de variância

BMP – proteína óssea morfogenética

CH – centesimal hahnemania

F – F-teste de Snedecor

FSH – hormônio folículo estimulante

GH – hormônio do crescimento

GL – grau de liberdade

HE- hematoxilina-eosina

kVp – kilovoltagem

LH – hormônio luteinizante

mA – miliamperagem

Pb - chumbo

PGE – prostaglandina E

PTH – hormônio da paratireóide

PGI – prostaglandina I

PTFEe – politetrafluoretileno expandido

QM – quadrado das médias

rpm – rotações por minuto

TGF $\beta$  - fator de crescimento tumoral  $\beta$

ALMEIDA, J.D. **Estudo comparativo dos efeitos da calcitonina e do *Plumbum metallicum* 30CH na reparação óssea em mandíbula de ratos.** São José dos Campos, 2001. 129f. Tese (Doutorado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.

## RESUMO

Neste trabalho foi realizado estudo comparativo dos efeitos da calcitonina e do *Plumbum mettalicum* 30CH na reparação óssea guiada em mandíbulas de ratos. Foram utilizados 75 ratos com idade aproximada de três meses, que foram divididos em grupo controle, tratado com calcitonina e tratado com *Plumbum mettalicum* 30CH, com 25 animais cada. Todos os ratos foram submetidos à cirurgia para realização de defeito ósseo na região de ângulo de mandíbula de aproximadamente 4mm, o qual foi recoberto por uma barreira de politetrafluoretileno. Após a cirurgia, o grupo tratado com calcitonina passou a receber 2 UI/kg, i.m., três vezes por semana, e o grupo tratado com *Plumbum mettalicum* 30CH, três gotas diluídas em água diariamente. Os animais foram sacrificados em períodos de três, sete, 14, 21 e 28 dias, sendo suas mandíbulas removidas e encaminhadas para preparação histológica. Análises densitométrica, histológica e histomorfométrica foram realizadas. Para análise estatística, utilizou-se ANOVA, teste de Tukey e teste de Scheffé ao nível de 5%. A análise densitométrica mostrou menor densidade óptica no grupo controle em todos os períodos analisados. Foi observado o preenchimento total do defeito por tecido ósseo neoformado apenas no grupo tratado com homeopatia, aos 28 dias. Nos demais grupos não foi observada união das bordas do defeito. Na análise histomorfométrica não se encontrou diferença estatística entre os grupos tratados e controle, porém o grupo tratado com *Plumbum mettalicum* 30CH apresentou melhores resultados que o tratado com calcitonina. Concluiu-se que, nas condições utilizadas, a reparação óssea guiada de defeitos em mandíbulas de ratos machos é favorecida pelo *Plumbum mettalicum* 30CH, mas não pela calcitonina.

**PALAVRAS-CHAVE:** Calcitonina; homeopatia; mandíbula, regeneração óssea; densitometria; histomorfometria.

## 1 INTRODUÇÃO

O estudo da reparação dos defeitos ósseos é um desafio para muitos profissionais da área de saúde (Linde et al.<sup>56</sup>, 1993; Pecora et al.<sup>71</sup>, 1997). Os trabalhos relacionados à reparação óssea têm se intensificado nos últimos trinta anos (Salata et al.<sup>80</sup>, 1998), com a finalidade de adquirir novos conhecimentos que possam auxiliar em cirurgias de reconstrução (Kaban & Glowacki<sup>47</sup>, 1981; Rabie et al.<sup>74</sup>, 1996; Lew et al.<sup>55</sup>, 1997; Chesmel et al.<sup>21</sup>, 1998), reparações ósseas guiadas (Dahlin et al.<sup>25</sup>, 1988; Salata et al.<sup>80</sup>, 1998) e implantes (LeGeros & Craig<sup>53</sup>, 1993).

O cirurgião-dentista tem buscado encontrar meios de estimular a osteogênese em defeitos dos maxilares, que podem resultar, tanto em problemas funcionais quanto estéticos. A utilização de um único tipo de procedimento tem se mostrado insuficiente, assim tem se estudado a ação conjunta de outras técnicas e mesmo medicamentos locais e sistêmicos, tendo em vista que os resultados finais do tratamento podem ser imprevisíveis. Portanto, é de grande

importância a investigação da natureza da osteogênese e dos métodos de estimulação e controle (Nade<sup>69</sup>, 1994).

Além de possuir excelente comportamento mecânico, o osso revela um potencial único para regeneração, permitindo o reparo de fraturas ósseas sem que se observe qualquer cicatriz fibrosa (Sandberg et al.<sup>81</sup>, 1993; Buser et al.<sup>16</sup>, 1994; Hentunen et al.<sup>41</sup>, 1994; Szachowicz<sup>92</sup>, 1995; Hollinger & Wong<sup>43</sup>, 1996).

O mecanismo deste padrão de reparação é considerado uma recapitulação da osteogênese que ocorre no embrião e durante o período de crescimento (Sandberg et al.<sup>81</sup>, 1993; Buser et al.<sup>16</sup>, 1994).

A literatura apresenta um número escasso de estudos com utilização de medicação sistêmica, como calcitonina e alendronato sódico, indutores de neoformação óssea, em defeitos semelhantes aos realizados em procedimentos cirúrgicos. Além disso, medicamentos preparados de acordo com a farmacotécnica homeopática, voltados para esta linha de pesquisa, estão praticamente ausentes das publicações científicas. O interesse despertado pelo mecanismo de reparação óssea, somado aos fatos apresentados, motivaram a realização deste trabalho, no qual se compara o efeito da

calcitonina sintética de salmão e do *Plumbum mettalicum* 30CH sobre a reparação de defeitos cirurgicamente criados em mandíbula de ratos.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Osso

Várias áreas da Medicina e Odontologia, como Patologia, Radiologia e Cirurgia estão interessadas no osso ou mineral ósseo sob diferentes pontos de vista (Trouerbach et al.<sup>95</sup>, 1984). Este tecido difere dos demais não só na sua estrutura físico-química como também na sua capacidade de remodelação e regeneração durante o período pós-fetal, o que tem sido atribuído tanto à proliferação das células osteoprogenitoras, quanto à indução da proliferação e diferenciação das células mesenquimais (Cormack<sup>23</sup>, 1991).

O tecido ósseo é um dos mais resistentes e rígidos do corpo humano, sendo o principal constituinte do esqueleto; serve de suporte para as partes moles e protege órgãos vitais, como os contidos na caixa craniana e torácica (Mourad<sup>67</sup>, 1997); proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, e constitui um sistema de alavancas que amplia as

forças geradas na contração muscular. Funciona, ainda, como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, para manter constante sua concentração nos líquidos corporais (Junqueira & Carneiro<sup>46</sup>, 1995), e ajuda na manutenção do balanço ácido-base, produzindo fosfato adicional e carbonato (Ganong<sup>32</sup>, 1989). A concentração de cálcio e fosfato é mediada pela interação entre três hormônios: PTH, vitamina D e calcitonina. Agindo juntas essas substâncias determinam a quantidade de cálcio e fosfato absorvidos da alimentação no intestino, a deposição e absorção de cálcio e fosfato no osso e a reabsorção e excreção de cálcio e fosfato pelos rins (Huether<sup>44</sup>, 1997).

Existem dois tipos de osso: compacto e esponjoso ou trabecular. Ambos possuem os mesmos elementos estruturais, e, com poucas exceções ambos, osso compacto e esponjoso, estão presentes em todos os ossos. A grande diferença entre eles é a organização dos elementos. O osso compacto é altamente organizado, sólido e extremamente rígido, cuja unidade estrutural básica é o sistema haversiano no qual as lamelas são organizadas ao redor de canais contendo um ou mais vasos sanguíneos (canais de Havers). O osso esponjoso é menos complexo e formado por trabéculas direcionadas

pela direção da força incidente (Stevens et al.<sup>90</sup>, 1996; Mourad<sup>67</sup>, 1997).

Os ossos podem também ser classificados pelo seu formato em longo, chato, curto (cuboidal) ou irregular. A mandíbula é classificada como osso irregular, composto em parte por duas tábuas de osso compacto com osso esponjoso entre elas, e parte por osso esponjoso circundado por osso compacto (Mourad<sup>67</sup>, 1997). Segundo Von Wower<sup>98</sup> (1988), a mandíbula parece ser o osso do esqueleto humano mais exposto à uma diminuição severa do seu conteúdo mineral. A mandíbula apresenta uma diminuição do conteúdo mineral ósseo fisiológica contínua relacionada ao sexo e idade.

A formação óssea é um processo auto-limitante, no qual cada estágio é preparado e iniciado pelo estágio precedente (Linghorne<sup>58</sup>, 1960). No osso maduro a formação de tecido novo inicia-se com a produção de uma matriz orgânica pelas células ósseas (Mourad<sup>67</sup>, 1997).

O osso contém três tipos de células ativas: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (Stevens et al.<sup>90</sup>, 1996; Mourad<sup>67</sup>, 1997). As células ósseas correspondem a uma pequena parte da massa óssea, mas são responsáveis tanto pela função de

regulação da distribuição do conteúdo do componente inorgânico e, portanto, pela manutenção dos níveis circulantes de cálcio (homeostase mineral), quanto pela contínua reabsorção e formação (modelação e remodelação) da matriz óssea, fazendo com que o sistema esquelético responda a forças mecânicas geradas pela sustentação de pesos e atividade física (homeostase esquelética) (Bianco & Lazaretti-Castro<sup>12</sup>, 1999).

Durante os últimos anos, importantes avanços têm ocorrido no entendimento da origem dos osteoclastos e osteoblastos, do inter-relacionamento entre eles e dos fatores sistêmicos e locais que regulam o seu desenvolvimento. Os osteoclastos derivam de células progenitoras que residem na medula óssea de linhagem hematopoiética, da família dos monócitos, enquanto os osteoblastos são da linhagem mesenquimal (Ganong<sup>32</sup>, 1989; Manolagas & Jilka<sup>63</sup>, 1992; Manolagas<sup>62</sup>, 1995; Manolagas & Jilka<sup>64</sup>, 1995).

Apesar da designação osteoblasto sugerir imaturidade, essas células são totalmente diferenciadas para exercer a função de formação óssea. Localizam-se na superfície do tecido ósseo em sua forma ativa, com citoplasma basofílico e núcleo excêntrico distal (Stevens et al.<sup>90</sup>, 1996).

Os osteoblastos caracterizam-se por apresentar retículo endoplasmático e complexo de Golgi muito desenvolvidos, devido à biossíntese e secreção da matriz orgânica e mitocôndrias com grânulos contendo cálcio (Bianco & Lazaretti-Castro<sup>12</sup>, 1999; Schiller & Teitelbaum<sup>83</sup>, 1999). A basofilia é devido ao ácido ribonucleico (Stevens et al.<sup>90</sup>, 1996). Cerca de dez dias após ser secretada, a matriz orgânica assume sua estrutura tridimensional e forma o osteóide, dando início à mineralização. Durante esse intervalo, o colágeno é processado por peptidases, dando origem às ligações covalentes intermoleculares, que vão assegurar a estrutura da fibrila de colágeno e facilitar a calcificação. Essa região localizada entre o osso mineralizado e o osteóide em vias de mineralização, é conhecida por frente de mineralização óssea (Bianco & Lazaretti-Castro<sup>12</sup>, 1999).

A etapa inicial da produção de osso é a secreção, feita pelos osteoblastos, de moléculas de colágeno (chamadas de monômeros de colágeno) e de substância fundamental (sobretudo proteoglicanas). Os monômeros de colágeno polimerizam-se rapidamente para formar fibras colágenas; o tecido resultante é o osteóide, matriz óssea não mineralizada. Esta matriz é semelhante à cartilagem, mas difere desta porque os sais de cálcio logo nela se

precipitam. (Hollinger & Wong<sup>43</sup>, 1996; Mourad<sup>67</sup>, 1997). Os osteoblastos levam à formação de osso novo e mineralização da matriz óssea pela concentração de algumas proteínas plasmáticas (fatores de crescimento) encontradas na matriz óssea e facilitando a deposição e troca de íons cálcio no local. Com a neoformação óssea, o tecido ósseo toma forma e é remodelado através dos efeitos do fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), bem como de outras proteínas plasmáticas (fatores de crescimento) encontradas na medula óssea (Mourad<sup>67</sup>, 1997).

Quando o osteóide é formado, alguns dos osteoblastos são aprisionados dentro deste, sendo então chamados de osteócitos (Guyton & Hall<sup>37</sup>, 1997). Portanto, os osteócitos são células maduras que residem em pequenos espaços ou lacunas no osso, as quais se interligam umas às outras e aos espaços vasculares por canaliculos, pequenos canais nos quais os processos dos osteócitos projetam-se e através dos quais passam os fluídos e substâncias dissolvidas envolvidas no metabolismo celular (Stevens et al.<sup>90</sup>, 1996). Devido à presença de numerosas mitocôndrias e vacúolos, acredita-se que os osteócitos participem ativamente na reabsorção óssea; uma elevação

dos níveis de paratormônio resulta em aumento do espaço perilacunar que encarcera o osteócito. Admite-se que esse processo, conhecido como osteólise osteocítica, seja responsável pela transferência rápida de cálcio da matriz óssea para o espaço extracelular (Bianco & Lazaretti-Castro<sup>12</sup>, 1999). Evidências recentes sugerem que o osteócito pode ser a célula óssea que reconhece e responde às forças mecânicas (Schiller & Teitelbaum<sup>83</sup>, 1999).

Após a formação do osteóide, os sais de cálcio começam a se precipitar sobre as superfícies das fibras colágenas. Os precipitados aparecem primeiro em intervalos ao longo de cada fibra colágena, formando diminutos ninhos que se multiplicam rapidamente e crescem por um período de dias e semanas até o produto final: os cristais de hidroxiapatita (Guyton & Hall<sup>37</sup>, 1997).

Os osteoblastos são ativos na superfície externa do osso, onde formam uma camada única de células (Mourad<sup>67</sup>, 1997). Secretam grandes quantidades de fosfatase alcalina quando estão depositando ativamente matriz óssea. Acredita-se que esta fosfatase aumenta a concentração local de fosfato inorgânico ou que ative as fibras colágenas de tal maneira que causem a deposição de sais de cálcio. Pelo fato de alguma fosfatase se difundir para o sangue, o nível

sérico de fosfatase alcalina é geralmente um bom indicador da taxa de formação do osso (Guyton & Hall<sup>37</sup>, 1997). Wlodarski & Reddi<sup>101</sup> (1986) mostraram que a fosfatase alcalina é um marcador útil para células osteindutoras.

Quando se completa a fase de formação óssea, os osteoblastos revertssem-se em células quiescentes indiferenciadas e ficam entre a população de células heterogêneas (Stevens et al.<sup>90</sup>, 1996). A estimulação osteoblástica está relacionada a fatores gerados durante os processos de reabsorção (Mourad<sup>67</sup>, 1997) e estudos *in vitro* demonstraram que o osteoblasto é a célula alvo primária na ativação hormonal do osteoclasto (Kallio et al.<sup>48</sup>, 1972; Zaidi et al.<sup>105</sup>, 1993).

Pesquisas recentes têm mostrado que os osteoblastos liberam mediadores químicos que os estimulam a remover material orgânico não mineralizado das superfícies ósseas, expondo mineral ósseo indutor de reabsorção. Os osteoclastos, em contato com o mineral ósseo, podem ser estimulados ainda pelo fator estimulador de colônias e interleucinas 1 (IL-1), 3 (IL-3) e 6 (IL-6) produzidas por macrófagos na presença de paratormônio (PTH). As células de linhagem osteoblástica (osteoblasto e osteócito) formam uma rede

celular no osso e determinam o local apropriado para que o osso seja formado ou reabsorvido, sendo que, conforme a lei de Wolfe, “o osso é remodelado de acordo com a sua função”. Os osteócitos parecem participar da manutenção da matriz óssea, influenciando a concentração de nutrientes na matriz, também podem sintetizar e repor elementos necessários à matriz, de modo a manter a homeostase mineral com a ajuda do PTH e de células osteoblásticas. O osteócito participa ainda da modificação da matriz óssea ao liberar enzimas que dissolvam as paredes mineralizadas da lacuna, preparando o osso para remodelação (Mourad<sup>67</sup>, 1997).

Mundy<sup>68</sup> (1993) discute a importância do entendimento da patofisiologia de todas as doenças ósseas e o desenvolvimento de terapias mais adequadas e faz uma revisão dos mecanismos de controle responsáveis pela remodelação óssea normal.

A remodelação é um processo iniciado pelo aparecimento de osteoclastos (Teitelbaum<sup>94</sup>, 1993) e níveis aumentados de atividade da fosfatase ácida no plasma ocorrem durante estados fisiológicos e patológicos de remodelação óssea aumentada (Zaidi et al.<sup>105</sup>, 1993).

De acordo com Zaidi et al.<sup>105</sup> (1993), o osteoclasto, outro importante componente do tecido ósseo, foi identificado, há mais de um século como sendo uma célula multinucleada, por Albert Kollinker (1873), que propôs que estas células digerem o tecido ósseo e dissolvem mineral através da secreção de substâncias químicas. Entretanto, o papel do osteoclasto tem sido pouco entendido, apesar da sua importância na patogênese da maioria das doenças ósseas e articulares. Como demonstrado pelo autor, após a administração de PTH, existe aumento da atividade e do número de osteoclastos em cultura de tecido ósseo.

Os osteoclastos são as principais células de reabsorção óssea, mas têm seu estudo dificultado por se encontrarem em matriz calcificada e serem frágeis quando isolados do osso (Roodman<sup>79</sup>, 1995). Lee et al.<sup>52</sup> (1992) desenvolveram uma técnica para estudo *in vitro* do mecanismo de diferenciação dos osteoclastos a partir de células hematopoiéticas. São células grandes, altamente especializadas, multinucleadas exibindo no citoplasma numerosas mitocôndrias e lisossomas preenchidos por enzimas hidrolíticas (Bodner et al.<sup>14</sup>, 1993; Akamine et al.<sup>2</sup>, 1994; Junqueira & Carneiro<sup>46</sup>, 1995; Stevens et al.<sup>90</sup>, 1996). Os osteoclastos são vistos em pequenos

grupos ou sozinhos na superfície óssea que está sofrendo erosão ou reabsorção; estas superfícies são reconhecíveis pela irregularidade e falta de tecido osteóide (Stevens et al.<sup>90</sup>, 1996). O processo de reabsorção envolve a junção do osteoclasto ao osso através das integrinas (Schiller & Teitelbaum<sup>83</sup>, 1999). A reabsorção ocorre pela secreção de ácido cítrico e láctico que ajuda a dissolver os minerais ósseos, e pela colagenase, que digere o colágeno, simultaneamente à ação de citocinas (Mourad<sup>67</sup>, 1997).

Em regiões de reabsorção óssea, os osteoclastos ficam em lacunas denominadas lacunas de Howship, onde têm bordas com prolongamentos vilosos que aumentam em muito a superfície da membrana plasmática. As terminações vilosas formam numerosos canais e vesículas no citoplasma celular, permitindo a reabsorção do osso sob suas bordas. O osteoclasto, para reabsorver tecido ósseo, deve aderir efetivamente à superfície do mesmo. Estas células secretam ácido mantendo, assim, pH baixo no hemivacúolo de reabsorção (Zaidi et al.<sup>105</sup>, 1993). Sugere-se que um osteoclasto é capaz de remover tecido ósseo que foi depositado por 100-1000 osteoblastos. É na junção entre o osso pré-existente e o neoformado que as linhas reversas são vistas (Stevens et al.<sup>90</sup>, 1996). Akamine et

al.<sup>2</sup> (1994) apresentam evidência de que o desenvolvimento *in vivo* dos osteoclastos é induzido por células de linhagem osteoblástica. Quando se completa a reabsorção, o osteoclasto desaparece pela degeneração tanto por reversão para sua célula mãe como através da mobilidade celular local, tornando-se um osteoclasto inativo (Mourad<sup>67</sup>, 1997).

Quinn et al.<sup>73</sup> (1994) demonstraram que uma proporção significativa de células mononucleares do sangue periférico é capaz de se diferenciar em células com características citoquímicas e funcionais de osteoclastos.

Roodman<sup>79</sup> (1995) apresenta um bom modelo para estudo da formação de osteoclastos em pacientes com uma variedade de doenças.

A matriz óssea é formada pelos elementos extra celulares do tecido ósseo, composta por cerca de 35% de material orgânico e 65% inorgânico. A maior parte dos componentes orgânicos são as fibras colágenas e dos inorgânicos os minerais cálcio e fosfato. Outras partes da matriz óssea são as proteínas, complexos de carboidrato-proteína e substância amorfa. A água compõe cinco a oito por cento da matriz (Mourad<sup>67</sup>, 1997).

As fibras colágenas constituem 90% do colágeno tipo I, que é secretado e sintetizado pelos osteoblastos. As proteoglicanas são grandes complexos de numerosos polissacarídeos que unidos a uma proteína, controlam e distribuem íons, particularmente o cálcio, através da matriz óssea, tendo papel na deposição do cálcio ósseo e na calcificação. As glicoproteínas também são complexos de carboidrato-proteína do osso, controlando as interações do colágeno que levam à formação de fibrilas e também exercem papel na calcificação. Algumas das glicoproteínas na matriz óssea incluem sialoproteína óssea, osteocalcina, osteonectina, laminina, albumina e  $\alpha$ -glicoproteína. Outras proteínas encontradas na matriz óssea são os compostos chamados proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (Mourad<sup>67</sup>, 1997). Em 1971, Urist & Strates<sup>96</sup> estudaram as BMPs em matriz óssea de cortical de ratos e as classificaram em componentes químicos osteogênicos.

As BMPs perfazem uma pequena fração da matriz óssea. Desde a descoberta de sua habilidade osteoindutiva, as BMPs têm sido estudadas para aplicação terapêutica, sendo uma das áreas de interesse o implante dentário. Estudo realizado por Sigurdsson et al.<sup>86</sup>

(1997) em cães mostrou que a BMP-2 humana recombinante, processada por bioengenharia, induziu a regeneração óssea e osteointegração podendo vir a ser um recurso de terapia no futuro.

Todos os ossos são revestidos em suas partes internas e externas por membranas conjuntivas que possuem células osteogênicas, o periósteo e endósteo, respectivamente (Junqueira & Carneiro<sup>46</sup>, 1995).

## **2.2 Princípio de osteopromoção**

O princípio da osteopromoção implica que para promover a neogênese óssea um compartimento tecidual deve ser vedado por meios físicos, como uma membrana, prevenindo que células não osteogênicas interfiram na osteogênese, dirigindo também a formação óssea (Dahlin et al.<sup>25</sup>, 1988; Linde et al.<sup>57</sup>, 1993; Dahlin et al.<sup>26</sup>, 1994). A colocação de membranas para isolar um defeito ósseo do tecido mole adjacente, cria um local protegido, para o qual células de potencial osteogênico podem migrar (Sandberg et al.<sup>82</sup>, 1993) e a osteogênese pode ocorrer relativamente desimpedida (Linde et al.<sup>57</sup>,

1993). A observação de que é possível induzir crescimento ósseo em uma região a ser preenchida é de interesse particular em Odontologia (Linghorne<sup>58</sup>, 1960).

As membranas podem ser não reabsorvíveis, como a membrana de politetrafluoretileno expandido, ou reabsorvíveis, como as membranas de ácido poliláctico e ácido poliglicólico. As membranas não biodegradáveis de politetrafluoretileno expandido (PTFEe) têm sido utilizadas para promover a osteogênese, bem como a regeneração periodontal (Zellin et al.<sup>106</sup>, 1995).

Arisawa et al.<sup>6</sup> (2000) estudando a ação da calcitonina na regeneração de defeitos ósseos cirúrgicos em tíbias de ratas ovariectomizadas, observaram que defeitos realizados nos ossos longos estudados não necessitam da utilização de métodos físicos ou barreiras que impeçam a invasão de tecido mole na lesão. Resultados semelhantes foram relatados por Silva<sup>87</sup> (2000), que administrou alendronato de sódio, um bifosfonato, em ratas ovariectomizadas após realização de defeito ósseo cirúrgico na tíbia.

O politetrafluoretileno foi produzido pelo pesquisador Plunket em 1938, sendo que a liberação para uso aconteceu em 1948 (Macedo<sup>59</sup>, 1999).

O politetrafluoretileno é um material bastante inócuo para o ser humano, sendo totalmente biocompatível, química e biologicamente inerte (Alberius et al.<sup>3</sup>, 1992; Linde et al.<sup>57</sup>, 1993; Macedo<sup>59</sup>, 1999). É extremamente resistente ao ataque da maioria dos produtos químicos corrosivos, não sendo dissolvido por nenhum solvente em temperaturas abaixo de 300<sup>o</sup> C. Tem sido confeccionado em diversas configurações para reparar hérnias, vasos, ligamentos e também para ser usado como sutura (Macedo<sup>59</sup>, 1999).

As membranas de politetrafluoretileno expandido (PTFEe) são porosas e permitem intercâmbio livre de fluido tecidual e macromoléculas, enquanto impedem a entrada de células, tais como fibroblastos, osteoblastos e células inflamatórias, que são conhecidas por produzir fatores que podem inibir ou estimular a diferenciação de células osteogênicas e/ou sua produtividade óssea (Alberius et al.<sup>3</sup>, 1992; Linde et al.<sup>57</sup>, 1993; Sandberg et al.<sup>82</sup>, 1993). A membrana limita a entrada dessas células e fatores no tecido, além de estabilizar o coágulo na área de formação óssea, sendo um mecanismo adicional para a osteopromoção (Linde et al.<sup>57</sup>, 1993).

Linde et al.<sup>56</sup> (1993), em estudo experimental em ratos machos, mostraram ser possível obter neogênese óssea pelo princípio

da osteopromoção utilizando membrana de politetrafluoretileno expandido.

As membranas são bem toleradas e a resposta inflamatória no tecido é limitada ocorrendo a formação de tecido ósseo na região do defeito e ao redor da membrana também (Sandberg et al.<sup>82</sup>, 1993). A superfície da membrana pode ser osteocondutiva, agindo como guia para as células osteogênicas e assim facilitar o crescimento ósseo (Linde et al.<sup>57</sup>, 1993).

Os princípios de osteocondução, osteoindução e regeneração tecidual guiada podem ser facilmente ilustrados usando-se um modelo de defeito ósseo de tamanho crítico, que pode ser definido como um defeito que não regenera espontaneamente durante a vida do animal (Schmitz & Hollinger<sup>85</sup>, 1986; Zellin et al.<sup>106</sup>, 1995). Quando uma lesão óssea é criada, proteínas são liberadas no leito da ferida como mitógenos locais para estimular a proliferação de células mesenquimais que se diferenciam em osteoblastos. A falta do preenchimento de defeitos ósseos críticos pode estar em parte relacionada à depleção de proteínas e fatores de crescimento indutores que estimulam osteogênese (Linde et al.<sup>57</sup>, 1993; Szachowicz<sup>92</sup>, 1995; Pecora et al.<sup>71</sup>, 1997).

Para Sweeney et al.<sup>91</sup> (1995) os modelos experimentais de defeito de tamanho crítico têm sido utilizados para minimizar dificuldades devido às diferenças em idade, espécies e áreas anatômicas.

Dahlin et al.<sup>26</sup> (1994) realizaram defeitos cirúrgicos de tamanho crítico bilaterais em mandíbulas de ratas e utilizaram membrana de politetrafluoretileno expandido em um dos lados. No lado sem a membrana observaram a invasão do defeito por tecido conjuntivo denso.

Almeida et al.<sup>4</sup> (2000) realizaram estudo da reparação óssea de defeitos cirúrgicos em mandíbulas de ratos sem a utilização de barreira física e após a análise de cortes histológicos, relataram que as lojas cirúrgicas apresentavam pouca quantidade de tecido ósseo neoformado e grande quantidade de tecido conjuntivo, além de invasão de tecido muscular.

No trabalho realizado por Yan et al.<sup>103</sup> (1994), os autores sugerem que a proliferação ativa de células osteoprogenitoras, determinadas ou induzíveis (Friedenstein<sup>31</sup>, 1976), na forma de células mesenquimais indiferenciadas ocorre no periósteo, endósteo e medula óssea. Um fator que impede a regeneração em muitos defeitos ósseos é

o rápido crescimento de tecido fibroso, usualmente a partir do tecido conjuntivo adjacente (Linde et al.<sup>57</sup>, 1993; Szachowicz<sup>92</sup>, 1995; Pecora et al.<sup>71</sup>, 1997).

Kostopoulos & Karring<sup>50</sup> (1995) demonstraram, em estudo experimental realizado em ratos machos, que um espaço isolado, ocluído por uma barreira física, de acordo com o princípio de regeneração tecidual guiada, adjacente à superfície externa do periósteo, exhibe significativamente mais preenchimento ósseo do que um espaço isolado criado adjacente à superfície interna do periósteo elevado e reposicionado.

Zellin et al.<sup>106</sup> (1995) investigaram o potencial osteopromotor de dez tipos diferentes de membranas bio e não biodegradáveis em um modelo experimental padrão de reparação óssea animal, através da microscopia eletrônica de varredura. Foram realizados defeitos padronizados transósseos bilaterais, de tamanho crítico na mandíbula de vinte e cinco ratos machos. O trabalho mostra que as membranas diferem muito na eficácia da osteopromoção, mesmo quando são quimicamente semelhantes. O princípio da osteopromoção usando membrana de politetrafluoretileno provou ser

de grande valor para diferentes aplicações clínicas (Sandberg et al.<sup>82</sup>, 1993).

Hämmerle et al.<sup>38</sup> (1996) propõem modelo de estudo utilizando um cilindro de titânio para avaliar o efeito de várias barreiras e/ou fatores escolhidos para melhorar a qualidade de reparação óssea em humanos. A avaliação foi realizada em pacientes voluntários, nos quais foi feito retalho mucoperiosteal na área retromolar da mandíbula, correspondendo a cirurgia de terceiro molar incluso, recoberta por membrana de PTFEe. Concluíram que o modelo é útil para estudo de fisiologia tecidual na regeneração óssea em humanos com mínimo risco de complicações ou efeitos adversos para os voluntários.

Simion et al.<sup>89</sup> (1996) compararam, em humanos, membranas de ácido polilático e ácido poliglicólico às membranas não reabsorvíveis de politetrafluoretileno expandido (PTFEe) no tratamento de defeitos ao redor de implantes dentários de titânio colocados em alvéolos pós exodontia. A membrana não reabsorvível mostrou ser a mais efetiva barreira física, levando à formação de osso mais denso e em maior quantidade. As membranas reabsorvíveis produziram alguma reparação óssea quando comparadas às áreas

controle, mas em menor extensão quando comparadas às áreas tratadas com PTFEe.

Schmid et al.<sup>84</sup> (1997) avaliaram, em estudo experimental realizado em coelhos, o efeito de osso mineral desproteínizado na regeneração óssea guiada utilizando membranas reabsorvíveis. Neste trabalho, o material de preenchimento contribuiu para acelerar a neogênese óssea inicial, enquanto que nos períodos posteriores de observação, não modificou o aumento do volume ósseo.

Em trabalho experimental realizado em mandíbula em 30 ratos machos, Salata et al.<sup>80</sup> (1998) concluem que o grupo de animais onde foi utilizada apenas a técnica de regeneração óssea guiada, não mostrou melhora na reparação óssea, quando comparado ao grupo controle sem qualquer tratamento.

Aaboe et al.<sup>1</sup> (1998) realizaram estudo de regeneração óssea guiada em coelhos utilizando a membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFEe) e membrana absorvível Polyglactin 910. Os melhores resultados foram obtidos pela membrana não reabsorvível.

## 2.3 Calcitonina

A calcitonina é um hormônio que foi descoberto no início da década de 1960. Foi assim denominado porque reduz a concentração do íon cálcio no sangue. Nos peixes, anfíbios, répteis e aves é secretada pelas glândulas ultimobranquiais, desempenhando um papel especialmente importante no controle da concentração sangüínea de íons cálcio quando esses animais mudam seu habitat da água doce para a água do mar, onde há grande excesso de cálcio. No homem as glândulas ultimobranquiais não existem como tais, tendo sido incorporadas à glândula tireóide. As chamadas células parafoliculares, ou células C, localizadas no tecido intersticial entre os folículos da glândula tireóide humana, são remanescentes das glândulas ultimobranquiais dos animais inferiores, constituindo apenas 0,1% da glândula tireóide (Guyton & Hall<sup>37</sup>, 1997). Pode ser observada imunorreatividade para calcitonina em outros tecidos como pulmão, timo, adrenais e sistema nervoso central (Bianco & Lazaretti-Castro<sup>12</sup>, 1999).

Desde a sua descoberta, houve muita controvérsia relacionada à responsividade celular específica a este peptídeo, às diferenças nas respostas biológicas e ao mecanismo de ação da calcitonina (e peptídeos estruturalmente relacionados) no controle e/ou modulação da remodelação óssea (Wallach et al.<sup>99</sup>, 1990).

A calcitonina é um importante fator regulador do metabolismo mineral e esquelético interferindo na ação do PTH na manutenção da massa esquelética e atuando tanto sobre o tecido ósseo como na homeostase do cálcio. Há evidência significativa de que a calcitonina exerça função protetora contra os efeitos da deficiência dos íons cálcio no esqueleto, durante o crescimento, gestação e lactação (Zaidi et al.<sup>104</sup>, 1993; Harrison<sup>39</sup>, 1996). É um peptídeo hormonal de cadeia simples, composto por 32 aminoácidos (MacIntyre et al.<sup>60</sup>, 1980; Berne & Levy<sup>11</sup>, 1990; Hollinger & Wong<sup>43</sup>, 1996; Guyton & Hall<sup>37</sup>, 1997), com peso molecular em torno de 3400 (MacIntyre et al.<sup>60</sup>, 1980; Guyton & Hall<sup>37</sup>, 1997), diferindo na seqüência de espécie para espécie. A calcitonina sintética de salmão tem maior afinidade pelos sítios receptores de ligação em humanos, em relação às calcitoninas sintéticas de diversas espécies de mamíferos, inclusive a calcitonina sintética humana, sendo que na espécie humana é 20 vezes

ou mais ativa que a calcitonina humana. Sua biossíntese e secreção são reguladas pela concentração do íon cálcio no plasma (Ganong<sup>32</sup>, 1989).

Os receptores da calcitonina são encontrados nos ossos, nos rins, sistema nervoso central e hipófise (Marx<sup>65</sup>, 1972; Ganong<sup>32</sup>, 1989; Bianco & Lazaretti-Castro<sup>12</sup>, 1999). Sua presença no rim e osso pode justificar seu papel no metabolismo mineral; no entanto, sua ação no sistema nervoso central e na hipófise ainda necessita ser esclarecida, sendo que no osso seus receptores já foram identificados nos osteoclastos e em células da medula óssea (Bianco & Lazaretti-Castro<sup>12</sup>, 1999).

Em alguns animais jovens, mas pouco no homem, a calcitonina diminui rapidamente a concentração iônica do cálcio no sangue, começando sua ação poucos minutos após sua injeção. Assim, o efeito observado sobre a concentração sanguínea do íon cálcio é oposto ao do hormônio da paratireóide, ocorrendo muito mais rapidamente (Guyton & Hall<sup>37</sup>, 1997).

De acordo com Ganong<sup>32</sup> (1989) a calcitonina exerce seu efeito hipocalcemiante por inibição da reabsorção óssea, sendo essa ação direta e, aparentemente, devido à inibição da permeabilidade

das células ósseas ao íon cálcio. Foi sugerido ainda que protege contra hipercalcemia pós-prandial, reduzindo a motilidade do tubo digestivo e a velocidade da absorção de cálcio do conteúdo intestinal. Além disso, pode proteger os ossos da mãe do excesso de cálcio perdido durante a gravidez. A formação óssea no infante e a lactação são os principais drenos nas reservas de cálcio e as concentrações plasmáticas de 1,25-diidroxivitamina D são elevadas na gravidez. Isso poderia causar desgaste ósseo na mãe se a absorção óssea não fosse simultaneamente inibida por um aumento no nível da calcitonina plasmática (Bianco & Lazaretti-Castro<sup>12</sup>, 1999).

O principal efeito da calcitonina é reduzir os níveis circulantes de cálcio e fósforo, principalmente por uma inibição da saída destes minerais do osso. Na espécie humana, os homens possuem níveis aproximadamente duas vezes mais elevados do que o das mulheres. No rato, os níveis mais elevados são encontrados nas fêmeas. A importância fisiológica dos vários achados relacionados à calcitonina permanece desconhecida (Bianco & Lazaretti-Castro<sup>12</sup>, 1999).

A calcitonina reduz a concentração plasmática do cálcio pelo menos de duas maneiras: a) o efeito imediato é a

diminuição das atividades de absorção dos osteoclastos e possivelmente, o efeito osteolítico da membrana osteocítica por todo o osso, deslocando assim o equilíbrio a favor da deposição de cálcio nos sais de cálcio permutáveis do osso. Este efeito é especialmente significativo em animais jovens por causa do rápido intercâmbio de cálcio absorvido e cálcio depositado; b) o segundo efeito mais prolongado da calcitonina é diminuir a formação de novos osteoclastos. Inclusive porque a reabsorção osteoclástica do osso leva secundariamente à atividade osteoblástica, os números reduzidos de osteoclastos são seguidos por números reduzidos de osteoblastos. Portanto, em períodos prolongados, o resultado final é simplesmente a atividade grandemente reduzida dos osteoclastos e dos osteoblastos; assim, não há um efeito significativo por longo espaço de tempo sobre a concentração do íon cálcio plasmático. Isto é, o efeito sobre o cálcio é sobretudo transitório, durando de algumas horas a alguns dias, no máximo (Guyton & Hall<sup>37</sup>, 1997).

A calcitonina pode ser utilizada por via parenteral ou nasal. Combe et al.<sup>22</sup> (1997) realizaram estudo para analisar a equivalência de um tratamento de um mês com as formulações nasal e subcutânea da calcitonina de salmão em pacientes com fraturas

vertebrais. Os resultados mostraram ser a nasal comparável à subcutânea no que se refere ao controle da dor óssea.

O osteoclasto é a célula alvo da calcitonina (Zaidi et al.<sup>104</sup>, 1993) e em resposta à ação desta substância ele se contrai, tornando-se imóvel ou quiescente, característica única do osteoclasto (Chambers & Moore<sup>19</sup>, 1983; Roodman<sup>79</sup>, 1995). A reabsorção requer um número adequado de osteoclastos para expor o mineral ósseo, os quais devem ser ativados por um mecanismo que é dependente de estimulação osteoblástica (Zaidi et al.<sup>104</sup>, 1993). Foi demonstrado que a calcitonina inibe o processo através do qual células mostrando características citoquímicas e funcionais de osteoclastos podem ser produzidas a partir da fração monocitária de células mononucleares do sangue periférico (Farley et al.<sup>28</sup>, 1988).

A calcitonina derivada de salmão é mais potente que a humana, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, em parte porque é excretada mais lentamente da circulação (Goodman et al.<sup>34</sup>, 1996; Page et al.<sup>70</sup>, 1999). O modo de ação da calcitonina tem sido tema de investigações em osteoclastos isolados (Zaidi et al.<sup>104</sup>, 1993).

Os efeitos hipocalcêmico e hipofosfatêmico da calcitonina são causados, predominantemente, pela inibição direta da

reabsorção osteoclástica do osso (Chambers & Moore<sup>19</sup>, 1983) e influência na função renal (Berne & Levy<sup>11</sup>, 1990; Junqueira & Carneiro<sup>46</sup>, 1995). Para Guyton & Hall<sup>37</sup> (1997) a calcitonina também tem efeitos menores sobre o processamento do cálcio nos túbulos renais e no trato intestinal e efeitos opostos ao do paratormônio, porém quantitativamente parecem ter tão pouca importância que raramente são considerados. As concentrações fisiológicas de calcitonina possuem um papel insignificante na homeostase do íon cálcio humano (Page et al.<sup>70</sup>, 1999).

Os experimentos relatados por Feldman et al.<sup>29</sup> (1980) demonstram uma correlação definitiva entre os efeitos tempo-dependente na liberação de cálcio e na histologia óssea em resposta ao PTH e à calcitonina.

Weiss et al.<sup>100</sup> (1981) implantaram, subcutaneamente na região torácica de ratos machos, matriz óssea desmineralizada, preparada a partir de diáfise de rato visando investigar a influência da calcitonina de salmão na indução da formação de matriz óssea. A análise da osteogênese em ratos paratireoidectomizados mostrou que a calcitonina estimula a formação óssea em nível semelhante ao observado em ratos controle não paratireoidectomizados. As células

precursoras dos osteoblastos podem ter grande número de receptores para calcitonina ou receptores de maior afinidade, comparadas com osteoblastos diferenciados.

Hedlund et al.<sup>40</sup> (1983) estudando em costelas de ratos os efeitos precoces do paratormônio e calcitonina nos osteoclastos, observaram que injeções de paratormônio resultavam em um aumento no número de osteoclastos enquanto a calcitonina determinou diminuição de osteoclastos visíveis 30 e 60 minutos após a administração, respectivamente. Em ambos os casos a normalização ocorreu em três horas.

Chambers & Moore<sup>19</sup> (1983) estudaram *in vitro* a sensibilidade dos osteoclastos à calcitonina humana e sintética de salmão, além de outros hormônios como PTH, hormônio do crescimento (GH), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e insulina. Os autores relatam que uma pequena concentração de calcitonina levou à perda de mobilidade dos osteoclastos, o que pode estar relacionado à inibição de reabsorção óssea que o hormônio causa. O achado de que níveis próximos ao fisiológico de calcitonina podem induzir à alteração de motilidade dos osteoclastos, representa a base,

na visão dos autores, que a calcitonina pode operar como um inibidor da reabsorção óssea pela inibição da movimentação das células de reabsorção.

Arnett & Dempster<sup>7</sup> (1987) investigaram os efeitos da calcitonina e prostaglandinas I<sub>2</sub> e E<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub> e PGE<sub>2</sub>) na reabsorção e mobilidade dos osteoclastos de galinha e rato. Demonstraram que o comportamento difere em pelo menos dois aspectos: resposta à calcitonina e razão em que as células estão aptas a reabsorver osso. A reabsorção óssea pelos osteoclastos foi abolida pela calcitonina sintética em ratos. Em galinhas, os achados sugerem que a calcitonina não tem papel importante na regulação da atividade osteoclástica e podem explicar porque a injeção deste hormônio geralmente não determina uma resposta hipocalcêmica em aves. Esta diferença pode limitar a utilidade dos sistemas de osteoclastos de galinha como modelos de reabsorção óssea em mamíferos.

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que a calcitonina estimula o crescimento do tecido ósseo (Badursky et al.<sup>9</sup>, 1991; Reginster et al.<sup>78</sup>, 1992), ação esta decorrente da inibição da atividade osteoclástica, a qual reduz a longo prazo o número de

osteoclastos, levando à diminuição dos níveis circulantes dos produtos da reabsorção óssea.

Os resultados dos trabalhos realizados *in vitro* por Farley et al.<sup>28</sup> (1988), demonstraram os efeitos agudos da calcitonina de salmão em tecidos do esqueleto derivados de galinhas embriogênicas (incorporação de H<sup>3</sup> timidina ao DNA) e síntese de matriz óssea (incorporação de H<sup>3</sup> prolina ao colágeno como H<sup>3</sup> hidroxiprolina) em tibia e calvária. Os efeitos da calcitonina na liberação de Ca<sup>45</sup> de calvária de camundongos neonatais pré marcados foi estudado com e sem a adição de PTH. A intenção do estudo foi examinar e testar a hipótese que a calcitonina tem efeitos diretos no número e/ou atividade de células da linhagem dos osteoblastos que resulta em aumento da formação óssea. Suportando esta hipótese, o trabalho demonstrou que a calcitonina de salmão teve ação dose dependente direta *in vitro* em tecidos embrionários do esqueleto de galinha aumentando a proliferação de células da calvária de galinha, síntese e deposição de matriz óssea de colágeno. Este trabalho indica que a calcitonina de salmão tem ação indutora em células de linhagem osteoblástica que resulta em proliferação celular aumentada. Presumivelmente, o resultado mediado pela calcitonina no número de

osteoblastos resultaria em formação óssea aumentada. Este trabalho também indica que as células ósseas de linhagem osteoblástica (ou alguns subtipos destas células) têm receptores para calcitonina.

Para Zaidi et al.<sup>104</sup> (1993) não está claro se as alterações morfológicas ocasionadas nos osteoclastos refletem ou não um efeito celular direto da calcitonina, ou se resultam da ativação de outro alvo celular.

De acordo com Nade<sup>69</sup> (1994), a formação óssea pode ser induzida em sítios não esqueléticos em experimentos com animais e no homem, e algum controle é possível através desta forma de osteogênese pós-fetal. O autor propõe explorar os métodos para reposicionamento de osso fraturado, ausente e doente, em prática clínica, baseada em experiência prévia no entendimento do mecanismo celular. A natureza desenvolveu mecanismos para o crescimento e reparo ósseo. A pesquisa científica pode possibilitar a descoberta da chave para estes mecanismos e explorá-los. No presente, podemos fazer pouco e por isso não devemos interferir com o processo natural de reparação óssea, a menos que estejamos confiantes de que não estamos inibindo este processo.

Pereira et al.<sup>72</sup> (1997) avaliaram, histológica e radiograficamente, a ação da calcitonina de salmão em defeitos ósseos circunscritos, cirurgicamente criados em fêmur de coelhos fêmeas com tempo de observação de sete, 14, 21 e 28 dias. Os resultados possibilitaram que os autores inferissem que o medicamento utilizado demonstrou resultados positivos.

Arisawa<sup>5</sup> (2000) realizou estudo da ação da calcitonina, no processo de reparação óssea de defeitos cirúrgicos realizados em mandíbulas de ratas normais e ovariectomizadas. A calcitonina mostrou-se efetiva tanto nas ratas ovariectomizadas quanto nas ratas normais.

## **2.4 Chumbo**

Sweeney et al.<sup>91</sup> (1995) relatam a necessidade de métodos alternativos para reparo de defeitos ósseos causados por trauma ou resultantes de tratamento cirúrgico de malformações congênitas, neoplasias ou infecções.

O chumbo metálico é um metal maleável, cinza azulado, muito brilhante ao ser seccionado, abundante na natureza, porém raro em estado puro; encontra-se com mais frequência em combinação com enxofre em forma de mineral composto de sulfureto natural de chumbo; as minas mais ricas estão na Alemanha, França e Inglaterra (Lathoud<sup>51</sup>, 1982).

Para uso homeopático, utiliza-se o chumbo puro. Neste processo, o chumbo de uso comercial é triturado com lactose. As três primeiras dinamizações se fazem por trituração e as mais elevadas, por diluições (Lathoud<sup>51</sup>, 1982).

O chumbo é uma droga que mostra efeitos que não podem ser alcançados a não ser quando dinamizados. A dinamização tem por objetivo o desenvolvimento da força medicamentosa, por meio da sucussão (para líquidos) e trituração (para sólidos), operação que implica na divisão molecular até a ionização dos insumos medicamentosos. A sucussão pode ser manual ou feita em máquina, consiste em movimento contínuo e ritmado, no sentido vertical, de modo que produza choque no fundo do frasco contra um anteparo semi-rígido (Husseman & Wolff<sup>45</sup>, 1992).

De acordo com Husseman & Wolff<sup>45</sup> (1992), a grande toxicidade do chumbo torna evidente a sua aplicação apenas em doses homeopáticas. Os autores recomendam a utilização em crianças com deficiente formação óssea, por este ser um mineral que demonstra profunda afinidade com o cálcio, o que já é conhecido pela geologia e química.

O interesse biológico no chumbo tem sido centrado em sua alta toxicidade como um veneno de efeito cumulativo no homem e nos animais. Em casos de intoxicação pelo chumbo, a homeopatia é um recurso que tem menor efeito colateral. A droga que induz toxicidade em doses fisiológicas no organismo vivo, remove quando dada em forma potencializada. A potencialização é um método físico de trituração e diluição seriada com álcool e água. Estudos recentes dos efeitos biológicos e clínicos de drogas homeopáticas sugerem que a informação é transmitida às células por uma solução potencializada (Begum et al.<sup>10</sup>, 1994).

O chumbo e alguns outros elementos tóxicos são fixados e liberados pelo osso de maneira semelhante àquela do cálcio (Ganong<sup>32</sup>, 1989).

Fisher et al.<sup>30</sup> (1987) publicaram trabalho experimental sobre o efeito do chumbo diluído homeopaticamente na excreção urinária desta substância em ratos machos previamente intoxicados pelo metal citado. Os autores utilizaram *Plumbum metallicum* 5CH, 30CH e 200CH observando excreção urinária significativamente maior de chumbo no grupo tratado com 200CH.

Trabalho experimental realizado por Begum et al.<sup>10</sup> (1994) em ratos que foram induzidos à intoxicação pelo chumbo, demonstra que as drogas homeopáticas têm efeito protetor significativa na hematoxicidade subaguda por chumbo. Entretanto, o exato mecanismo de ação das drogas precisa ser entendido.

A intoxicação pelo chumbo pode causar: hemólise, tremores das mãos, dermatoses, hipertensão, endoarterite, esclerose, cólicas abdominais, prisão de ventre, perda de apetite, anemia, caquexia, cegueira, angústia e melancolia (Husseman & Wolff<sup>45</sup>, 1992).

Outro medicamento homeopático testado na reparação óssea foi a *Calcarea carbonica* 6CH, utilizada em ratos por Higo & Brandão<sup>42</sup> (1999) também com resultados positivos.

## 2.5 Densitometria

A radiografia não fornece apenas uma imagem da morfologia óssea, mas também permite uma análise microdensitométrica quantitativa dos minerais ósseos (Trouerbach et al.<sup>95</sup>, 1984).

Um dos desafios mais comuns de diagnóstico em radiologia odontológica é detectar pequenas diferenças patológicas (Chen et al.<sup>20</sup>, 1997). Para Kolbeck et al.<sup>49</sup> (1999) a maior dificuldade em avaliar a regeneração óssea está na falta de um método não invasivo preciso para quantificar a restauração da rigidez estrutural.

Em 1977, Duinkerke et al.<sup>27</sup> realizaram um trabalho de análise densitométrica de radiografias periapicais entre dez observadores diferentes e concluíram que, apesar das interpretações da mesma radiografia diferirem muito entre os dentistas, a análise densitométrica mostrou ser muito útil.

Para Bodner et al.<sup>14</sup> (1993), o exame radiográfico é o melhor método, não invasivo, para detecção de formação óssea em uma área de reparação. A formação de osteóide e mineralização é

expressa na radiografia como um aumento na radiopacidade, resultando em uma maior densidade óptica da imagem do osso. Os autores avaliaram a reparação óssea após exodontia de primeiros molares de ratos machos, jovens e sadios utilizando um penetrômetro de alumínio (*step wedge*) como escala de referência de alteração de radiopacidade. Neste estudo, os pesquisadores afirmam que a aplicação da densitometria em odontologia clínica, com um penetrômetro de alumínio na radiografia de proervação rotineira, pode melhorar significativamente a determinação do estado da cicatrização de alvéolo em um paciente.

As mensurações de densidade óssea são importantes porque têm implicações prognósticas e terapêuticas (Genant et al.<sup>33</sup>, 1996).

Considerando-se que um dos problemas na análise de imagens radiográficas através da densitometria é a variação de densidades de uma mesma amostra de radiografias obtidas com idênticos fatores radiográficos, Carvalho et al.<sup>17</sup> (1976) realizaram trabalho com o objetivo de estabelecer um método simples e efetivo para a correção de possíveis variações desses fatores, de forma a possibilitar correlações exatas entre duas ou mais radiografias da

mesma amostra ou de amostras diferentes. Os autores realizaram 88 tomadas radiográficas de pastilha de  $\text{CaCO}_3$  ao lado de dois penetrômetros de alumínio variando os seguintes fatores radiográficos: quilovoltagem, tempo de exposição, distância foco-filme, tempo de revelação e temperatura do revelador e fixador.

Em 1980, Carvalho et al.<sup>18</sup> estabeleceram as variações densitométricas da mineralização durante o processo de reparo em feridas de extração dentária em ratos, comparando os valores densitométricos aos achados histológicos. Deste trabalho, os autores deixaram patente a aplicabilidade do método densitométrico na análise de eventos biológicos envolvendo o tecido ósseo, quer na pesquisa experimental, quer na clínica, propondo a utilização de um fator de correção para as variações de fatores radiográficos.

Trouerbach et al.<sup>95</sup> (1984) analisaram os valores de equivalência radiográfica do alumínio através de estudo longitudinal de alterações ósseas em vinte indivíduos sadios, sendo dez do sexo masculino e dez do sexo feminino. Radiografias duplicadas foram realizadas com um intervalo de três meses utilizando instrumento posicionador. Alterações ósseas significativas foram observadas em

sete voluntários entre os vários períodos de observação com intervalos de seis e nove meses.

O efeito da ablação de glândulas salivares maiores na reparação, após exodontia em ratos machos, foi avaliada por Bodner et al.<sup>15</sup> (1993) através de radiografias e um método objetivo de densitometria. A fase inicial do processo de reparação pode, em parte, ser seguida clinicamente, enquanto a formação e remodelação óssea podem ser determinadas apenas histológica e radiograficamente. Neste trabalho, que apresenta informação numérica refletindo o estágio de neoformação óssea, os autores utilizaram penetrômetro cuja densidade óptica foi mensurada. Os resultados sugerem que a falta de saliva causa atraso na reparação alveolar.

## **2.6 Histomorfometria**

Para Gray<sup>35</sup> (1996) o propósito da quantificação é objetividade e reprodutividade, permitindo comparação direta de uma pessoa para outra e até de um centro de pesquisa para outro.

A estereologia é uma técnica usada para histomorfometria na quantificação de estruturas tridimensionais. Tradicionalmente, os histologistas faziam descrições verbais das estruturas microscópicas e dispensavam as técnicas histomorfométricas por requerer tempo, ser complicado e dispendioso. A estereologia é utilizada para obter informação quantitativa do volume, área da superfície, densidade numérica dos objetos. O ponto inicial da estereologia foi o teorema proposto pelo geologista francês Delesse em 1847 o qual provou que a relação entre as áreas de determinado mineral na superfície de corte da rocha é a mesma daquela que existe entre o volume mineral e o volume total da rocha (Mandarim-de-Lacerda<sup>61</sup>, 1995; Cruz-Orive<sup>24</sup>, 1997). Entretanto, a qualidade dos resultados é dependente das características estruturais do objeto estudado (Gray<sup>35</sup>, 1996).

Os métodos estereológicos baseiam-se em princípios geométricos-estatísticos, derivados da probabilidade das imagens dos perfis da estrutura na secção histológica coincidirem com um sistema teste apropriado. Deste modo, deve ser realizada por um método que elimine a ocorrência de vícios na amostragem. Este método consiste na aplicação de procedimentos da casualização em todos os estágios

do experimento, desde a escolha dos animais, seleção dos blocos histológicos, seleção das lâminas, seleção dos cortes histológicos em cada lâmina e sobretudo dos campos microscópicos a serem utilizados nas quantificações (Taga & Stipp<sup>93</sup>, 1994). Um sistema teste é um conjunto de linhas e pontos que deve ser superposto à imagem morfológica para a contagem estereológica (Mandarim-de-Lacerda<sup>61</sup>, 1995).

A estereologia denota todas as técnicas usadas para obter informação quantitativa de características geométricas de estruturas com um sistema teste de dimensão menor que a estrutura propriamente dita, por exemplo, retículo de ponto ou linha (Meijer et al.<sup>66</sup>, 1997).

Eventos histológicos de reabsorção e formação óssea seguem um tempo similar. Infelizmente, o índice de reabsorção óssea não pode ser medido diretamente por técnicas histomorfométricas (Wronski et al.<sup>102</sup>, 1988).

Bodner et al.<sup>13</sup> (1991) fizeram estudo histomorfométrico de três parâmetros para estimar quantitativamente a reparação tecidual (epitelização, tecido conjuntivo e formação óssea),

em oitenta ratos machos, utilizando retículo com densidade de ponto de 1 ponto/cm<sup>2</sup>.

Leichter et al.<sup>54</sup> (1998) afirmam que métodos confiáveis, significativos e reprodutíveis para mensuração são críticos em qualquer investigação científica. No estudo realizado pelos autores, a estereologia foi a técnica de mensuração escolhida para a avaliação dos tecidos constituintes em reparação de defeito periodontal. Relatam como vantagem ser reproduzível e ser possível calcular o volume do espécime, independente da orientação das secções ou do formato do objeto.

Aaboe et al.<sup>1</sup> (1998) em seu trabalho realizaram quantificação estereológica e concluíram que este é o único método que torna possível uma avaliação tridimensional exata.

### 3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem o objetivo de comparar os efeitos da administração sistêmica de calcitonina sintética de salmão e do chumbo, preparado de acordo com a farmacotécnica homeopática (*Plumbum metallicum* 30CH), na reparação óssea guiada de defeitos cirúrgicos na mandíbula de ratos.

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Animais

Foram utilizados 75 ratos (*Rattus norvegicus*, variação albinus, *Wistar*) machos, com três meses de idade e peso ao redor de 300g, mantidos em gaiolas com temperatura ambiente, alimentados com água e ração *ad libitum*, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP. Este trabalho foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, protocolo número 07/99 - PA/CEP (Anexo A).

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos constituídos de 25 animais cada:

- a) grupo I controle;
- b) grupo II tratado com calcitonina sintética de salmão;
- c) grupo III tratado com *Plumbum metallicum* 30CH.

## 4.2 Procedimento cirúrgico

As cirurgias foram realizadas na sala do Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, cuidadosamente higienizada com álcool 70% antes dos procedimentos cirúrgicos.

Os animais foram pesados para quantificação do tranqüilizante e anestésico geral a serem utilizados na anestesia. Em todo procedimento cirúrgico foi utilizada solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina\* com ketamina base\*\* na proporção de 1,0/0,5mL, na dose de 0,1mL/100g de peso, administrada lentamente, via intramuscular.

Após a anestesia, foi realizada depilação próxima ao ângulo da mandíbula. A antissepsia foi feita mediante embrocção com álcool iodado. Para a incisão da superfície cutânea, de aproximadamente 3,0cm de comprimento, utilizou-se bisturi tipo Bard & Parker e lâmina nº 15. Com o auxílio de espátula sete, os tecidos moles foram afastados para exposição da superfície óssea. Realizou-se então perfuração cirúrgica trans-óssea no ângulo mandibular do lado

---

\*Rompun da Bayer do Brasil

\*\*Francotar da Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.

direito, com brocas calibradas em forma de lança com 2,5mm de diâmetro e em seguida broca helicoidal de 3,7mm de diâmetro, a 1500 rotações por minuto (rpm), com irrigação abundante de soro fisiológico (cloreto de sódio 0,9%) estéril durante toda a perfuração óssea. Em seguida, foi posicionada uma barreira de politetrafluoretileno sobre a região perfurada, na mandíbula, por vestibular e lingual estendendo-se aproximadamente 2mm nas bordas do defeito ósseo. O tecido foi então reposicionado e suturado com fio de sutura absorvível Catgut nº 4. As margens da ferida cirúrgica foram aproximadas e suturadas com fio de sutura de seda 6.0 Ethicon\*. Foi feita embrocção com álcool iodado na região da sutura para antissepsia local e os animais colocados em gaiolas em número de 10, separados pelos grupos.

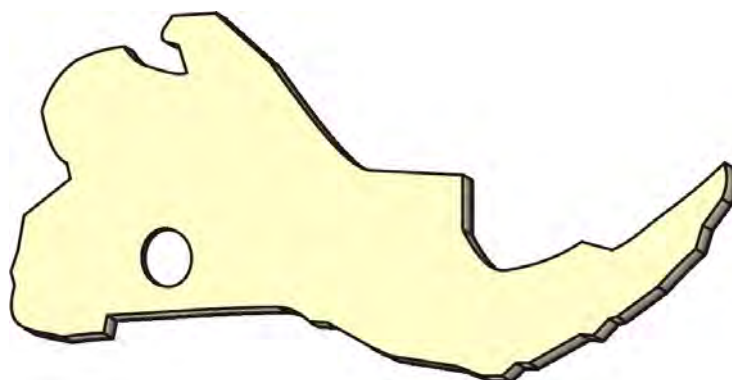


FIGURA 1- Desenho esquemático do defeito cirúrgico realizado na mandíbula

---

\*Johnson & Johnson

#### 4.2.1 Características da barreira

A barreira utilizada é densa, não absorvível, em forma de película fabricada em politetrafluoretileno puro. A membrana foi recortada em formato oval próprio para a adaptação na região do defeito ósseo realizado na mandíbula dos ratos, tendo como medidas aproximadamente 20mm de comprimento, 8mm de largura e espessura de 0,1mm. Após preparo, as películas de politetrafluoretileno foram embaladas, seladas e esterilizadas em estufa\*, a 180° C por 60 min.

#### 4.2.2 Tratamento farmacológico

Para cada período experimental, foram utilizados cinco animais de cada grupo. Os animais do grupo controle foram submetidos à lesão óssea e aos mesmos procedimentos dos outros grupos, não recebendo medicamento.

Os animais do grupo II foram tratados com calcitonina sintética de salmão\*\* que se apresentava na forma de ampolas injetáveis na concentração de 50UI. A calcitonina para ser administrada foi diluída em soro fisiológico estéril (NaCl 0,9%) para

\* Fabbe-Primar

\*\*Miacalcic fabricado pelo Laboratório Sandoz A.G. 8.500, Nürnberg, Alemanha

obtenção de solução de 5UI/ml. A dose administrada por via intramuscular (IM) foi de 2UI/kg que correspondia a 0,6UI por animal. O fármaco foi administrado imediatamente após a cirurgia e em dias alternados até o sacrifício.

No grupo III, os animais foram tratados com *Plumbum metallicum* 30CH, medicamento preparado de acordo com a farmacotécnica homeopática pela Farmácia de Manipulação Bella Farma, a partir de *Plumbum mettalicum* 4CH, adquirido do Laboratório H&N Homeopatia e Produtos Naturais Ltda.

Para o preparo até 3CH, 1mg de chumbo metálico são acrescidos a 99mg de lactose e triturados. Esta primeira trituração corresponde a 1CH. Desta trituração, 1mg são acrescidos a 99mg de lactose e triturados, chegando a 2CH; 1mg desta segunda trituração mais 99mg de lactose são triturados para obter 3CH. A partir de 3CH, são feitas diluições na proporção de 1:100 em álcool 20%. As diluições posteriores foram realizadas pela Farmácia de Manipulação Bella Farma, na proporção de 1:100 em álcool 70%. O medicamento preparado corresponde a uma diluição de chumbo  $10^{-60}$ . Cada animal recebeu três gotas diárias do medicamento que foram acrescidas à mamadeira de água.

Em todos os grupos, os animais foram sacrificados com três, sete, 14, 21 e 28 dias pós-intervenção cirúrgica, utilizando-se injeção intramuscular da mesma solução preparada para a anestesia, em dose maior. As mandíbulas foram então retiradas e fixadas em solução de formol neutro a 10%, após a remoção do tecido mole, por um período de 48 horas no mínimo.

### **4.3 Radiografia das peças**

As mandíbulas, após fixação, foram radiografadas pela exposição sobre filme oclusal\*. Foram realizadas cinquenta tomadas radiográficas, sendo que sobre cada filme foi colocada uma mandíbula do grupo controle e uma do grupo tratado de mesmo tempo de sacrifício, sendo que a face lingual das mesmas foi posicionada sobre o filme radiográfico.

No centro do filme, no sentido transversal, entre as duas mandíbulas, foi colocado um penetrômetro de alumínio e na porção inferior esquerda numeração de 1 a 5 para identificação. O penetrômetro de alumínio utilizado, especialmente confeccionado para

---

\*Kodak Ectspeed Plus EO-41P- EUA fabricado pela Eastman Kodak Company, Rochester, USA.

este experimento, apresentava formato de escada, tendo um total de oito degraus, medindo 4,0cm de comprimento e 1,0cm de largura, cada degrau com 0,5cm de comprimento e 0,4mm de altura.

Para as tomadas radiográficas foi utilizado aparelho de raios X\* da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas (UNICAMP). Os parâmetros utilizados foram distância foco - filme de 40cm e tempo de exposição de 0,25 segundos com 70kVp e 10 mA. O raio central foi perpendicular ao filme em todas as exposições.

As radiografias também foram processadas na Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, no mesmo dia em que foram realizadas, à temperatura constante de 27°C, em uma processadora automática\*\*, com ciclo mínimo de 6 minutos. As soluções para revelação\*\*\*, foram trocadas no dia anterior para assegurar processamento apropriado.

As películas radiográficas obtidas tiveram suas densidades ópticas mensuradas em fotodensitômetro\*\*\*\*, calibrado

---

\*General Electric CO (EUA) modelo 11AA5A7GE100

\*\*Gendex GXP

\*\*\*Kodak do Brasil SA

\*\*\*\*M.R.A.

a intensidade daquela luz quando emerge pelo outro lado; o logaritmo decimal da razão destas intensidades é denominado densidade da radiografia naquela área. Quanto menor for o valor da densidade óptica de uma área mensurada no fotodensitômetro, maior a radiopacidade da mesma, ou seja, maior a quantidade de tecido ósseo.

As mensurações foram feitas pelo mesmo observador duas vezes com um intervalo de quinze dias, conforme trabalho de Bodner et al.<sup>14</sup> (1993). O registro da densidade óptica de cada área é apresentado em valores numéricos em um visor digital. Entre as mensurações, o aparelho foi calibrado, tendo sido avaliada a área do defeito cirúrgico e do ramo da mandíbula.

#### **4.4 Análise histológica**

Após realização das tomadas radiográficas, as peças foram descalcificadas em solução aquosa de ácido fórmico a 20%. Após a descalcificação, as mesmas foram analisadas em lupa estereoscópica, fotografadas e então hemisseccionadas na região do defeito ósseo, no sentido ântero-posterior. Os fragmentos foram

incluídos em parafina, perpendicularmente à superfície de corte. De todas as peças obtidas foram realizados vinte cortes semi-seriados, com aproximadamente 5 $\mu$ m de espessura, corados pelos métodos de hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson para análise histológica em microscópio de luz.

#### **4.5 Análise histomorfométrica**

As lâminas foram analisadas na Área de Histologia e Embriologia do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. Para a realização da histomorfometria, utilizou-se o método estereológico baseado em Mandarim-de-Lacerda<sup>61</sup> (1995).

O número de lâminas utilizado para as contagens foi de quatro para cada animal. As lâminas foram retiradas aleatoriamente das caixas onde se encontravam. Cada corte foi visualizado com microscópio Carl Zeiss objetiva de 40X com câmera de vídeo

colorida\*. A imagem digitalizada foi visualizada em monitor de 14 polegadas conectado ao microcomputador Pentium acoplado ao programa de sistema KS400\*\*.

O programa utilizado permitiu a elaboração de um sistema teste específico que consistia de um retículo retangular composto de 128 quadrados, apresentando área de  $40 \times 10^4 \mu\text{m}^2$  cada um e por 105 pontos que representavam a intersecção das linhas que compõem os quadrados. Este retículo foi superposto aleatoriamente às imagens dos campos histológicos, sendo estas analisadas num aumento original de 400X. As imagens obtidas eram captadas pela câmara de vídeo e transferidas para o monitor de alta resolução. A contagem foi realizada através da marcação dos pontos de intersecção entre as linhas do sistema teste que incidiam sobre matriz óssea neoformada num determinado campo do defeito cirúrgico. Todos os dados foram exportados para o programa Excel.

---

\*CCD-1Ris/RGB Sony Eletronics Inc., Japan, Hyper HAD

\*\*KS400 da família KS Kontroj Elektronik Imaging System (Konto Elektronik GmbH, Image)

#### 4.6 Análise estatística

Os dados obtidos na avaliação da densidade óptica das radiografias foram submetidos a estatística descritiva, teste estatístico de ANOVA, além de ter sido realizado um teste de Tukey e Scheffé (Vieira<sup>97</sup>, 1986) para observar se os resultados do *Plumbum mettalicum* 30CH e da calcitonina sintética de salmão isolados do grupo controle eram iguais.

Também foram analisados estatisticamente os dados obtidos pelos estudos histomorfométricos de todas as lâminas através da ANOVA, do teste de Scheffé e do teste de Tukey.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Análise da densidade óptica

A análise estatística dos dados obtidos pelo estudo da densidade óptica das radiografias de todos os animais que fizeram parte do experimento possibilitou avaliar as alterações de radiopacidade nos diferentes tempos de análise. Foram criados dois grupos para o estudo: controle e tratado. O grupo tratado foi dividido em dois subgrupos: a) o grupo Miacalcic tratado com calcitonina sintética de salmão; b) grupo Pb tratado com *Plumbum mettalicum* 30CH. As análises das peças foram divididas nos cinco períodos. O Anexo B apresenta os resultados para a densitometria com os respectivos grupos (Tabela 1).

Foi utilizada a técnica da análise de variância dos fatores envolvidos (ANOVA) associada com o Teste de Tukey para averiguação de semelhanças e diferenças entre os grupos. Para este estudo foi utilizado como nível de significância a margem de erro de 5%.

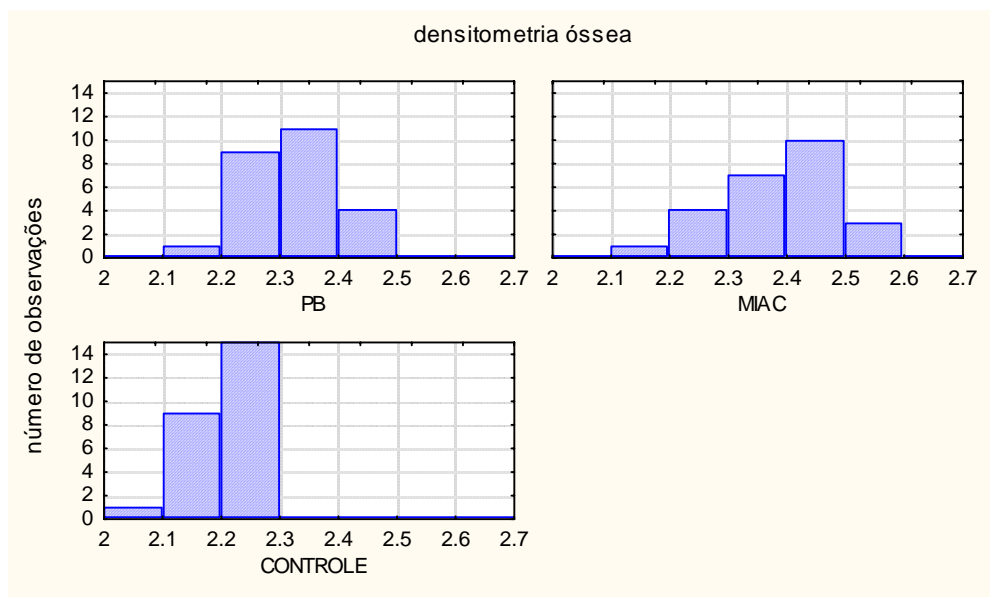


FIGURA 2- Histograma do resultado da densidade óptica das radiografias

Na Figura 2 pode-se observar o histograma dos tratamentos utilizados. Tem-se no eixo horizontal o valor da densidade óptica e no eixo vertical o número de casos observados para cada valor. Pode-se observar um histograma deslocado mais a direita no caso do Miacalcic do que para o tratamento com Pb. A Tabela 2 da estatística descritiva para cada material e o grupo controle pode ser composta da seguinte forma:

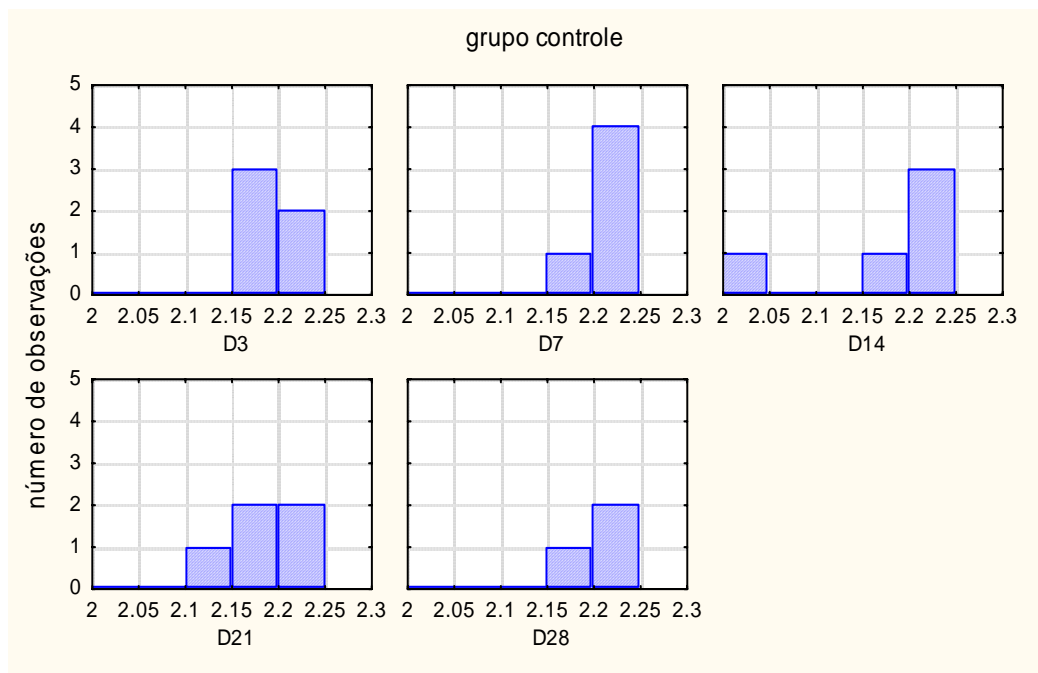
Tabela 2 - Estatística descritiva

	média	mediana	mínimo	máximo	range	desvio	kurtose
Pb	2.318	2.31	2.18	2.44	0.26	0.065	-0.352
controle	2.201	2.21	2.05	2.26	0.21	0.044	4.63
Miac	2.386	2.4	2.18	2.56	0.38	0.094	-0.43

Pb: chumbo preparado de acordo com a farmacotécnica homeopática

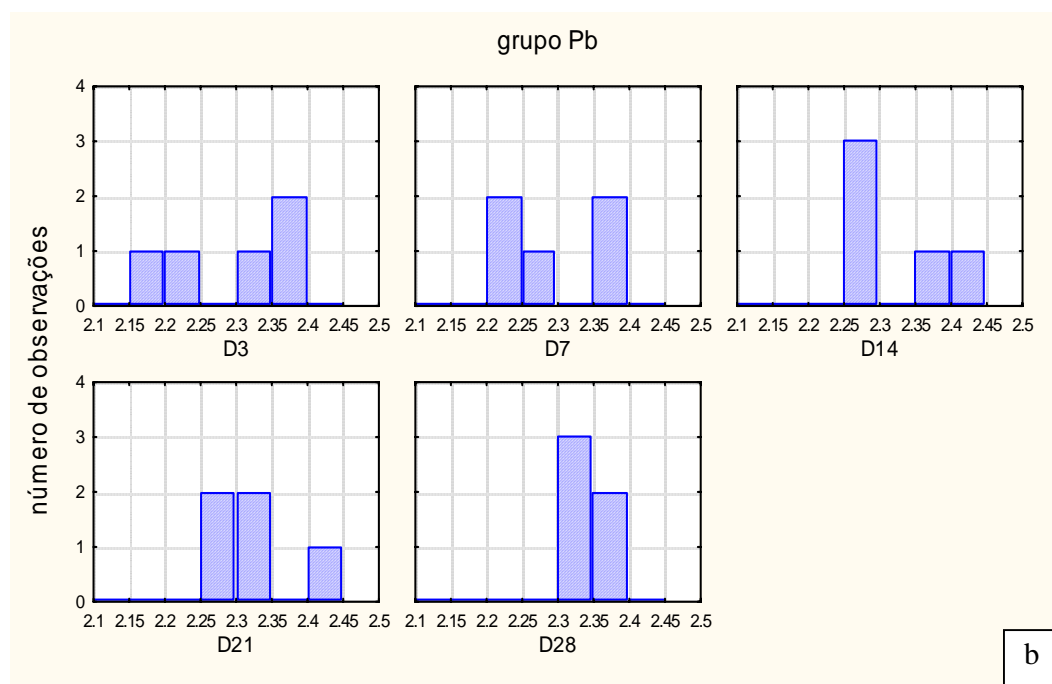
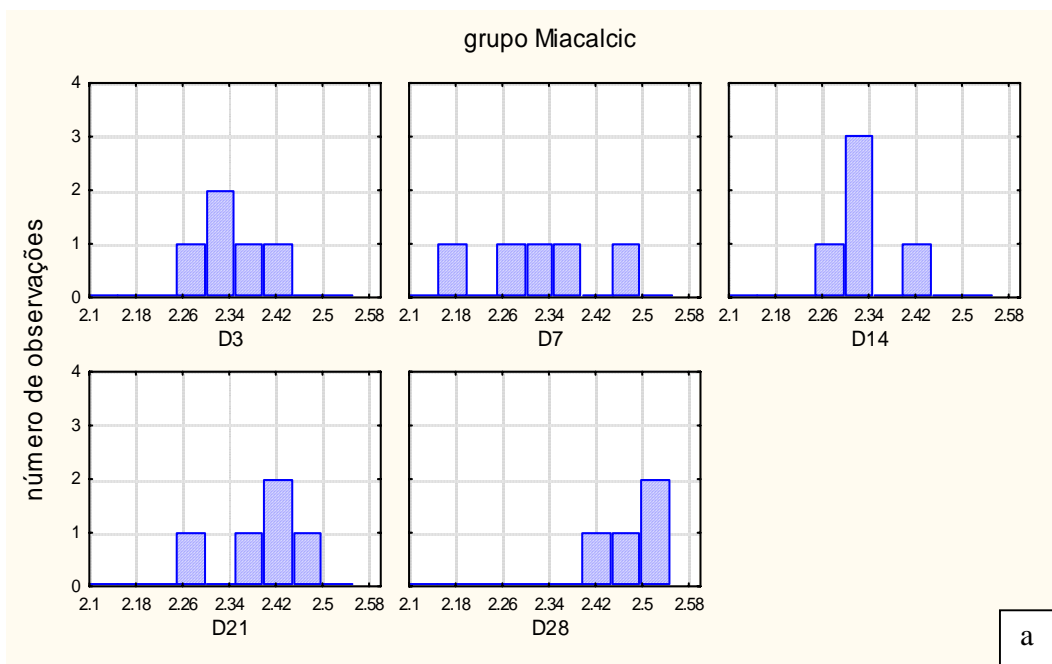
Miac: calcitonina sintética de salmão

A Tabela 2 comprova o que pode ser visualizado na Figura 2, pois tem se uma média maior para Miacalcic do que para Pb com valores mínimos e máximos maiores também. No entanto, como o desvio padrão é maior para o tratamento com Miacalcic (0.094) isso torna seus dados mais dispersos em relação à média. O grau de Kurtose negativo (-0.43) para o Miacalcic mostra que seu histograma apresenta uma assimetria à esquerda em relação à média assim como o tratamento com Pb se apresenta com uma assimetria à esquerda da média (-0.352). Por si só esses dados já nos fornecem uma boa tendência de não similaridade dos resultados dos grupos estudados em relação ao controle. No entanto isso somente poderá ser comprovado com o teste da ANOVA.



D – dia de observação

FIGURA 3 – Gráfico representativo da densidade óptica do grupo controle nos diferentes períodos de observação



D – dia de observação

FIGURA 4 – Gráfico representativo da densidade óptica relacionada ao tratamento com: a) Miacalcic; b) Pb nos diferentes períodos de observação

As Figuras 3 e 4 apresentam os histogramas dos valores da densidade óptica em relação aos diferentes períodos de observação. Pode-se observar que tanto no grupo Pb quanto no grupo Controle, houve um deslocamento dos resultados mais freqüentes para a direita. Isto é uma outra comprovação da alteração dos resultados com os tratamentos Pb e Miacalcic frente aos grupos controle. No caso do grupo Miacalcic, suas maiores freqüências sempre estiveram à frente da média obtida pelo grupo controle. Neste caso, a atenção pode ser voltada para o grupo Miacalcic no D28 e para Pb no D28. Nesses dois casos as maiores freqüências estão nitidamente a frente da média em relação ao grupo controle.

Tabela 3- Tabela da Análise de Variância

	GL (efeito)	QM (efeito)	GL (resíduo)	QM (resíduo)	F	p-nível
1	2	<b>0.218066</b>	60	<b>0.003847</b>	<b>56.68969</b>	<b>0.000000(*)</b>
2	4	<b>0.017986</b>	60	<b>0.003847</b>	<b>4.67569</b>	<b>0.002371(*)</b>
12	8	0.007774	60	0.003847	2.02093	0.059001

GL: grau de liberdade

QM: quadrado das médias

F: F-teste de Snedecor

variável 1 representa o grupo com Pb, Miacalcic e Controle

variável 2 representa os dias de observações

variável 12 representa os grupos e os dias de observações

\* estatisticamente significativa a nível de 5%

Através da ANOVA, cujos resultados se encontram na Tabela 3, pôde-se verificar diferença estatisticamente significativa

entre os diferentes tratamentos (variável 1) e entre os diferentes períodos de observação (variável 2) para  $p < 0,05$ . A variável 12 indica que os resultados dos tratamentos quando se considera os períodos de observação são estatisticamente iguais, ou seja, não existem influências expressivas entre as duas variáveis. Assim, isso quer dizer que os períodos de observação não influenciam nos resultados dos grupos estudados. Pode-se observar esse fato na Figura 5, onde a relação de proporção numérica da distância inicial entre os pontos permanece igual no 28<sup>o</sup> dia.

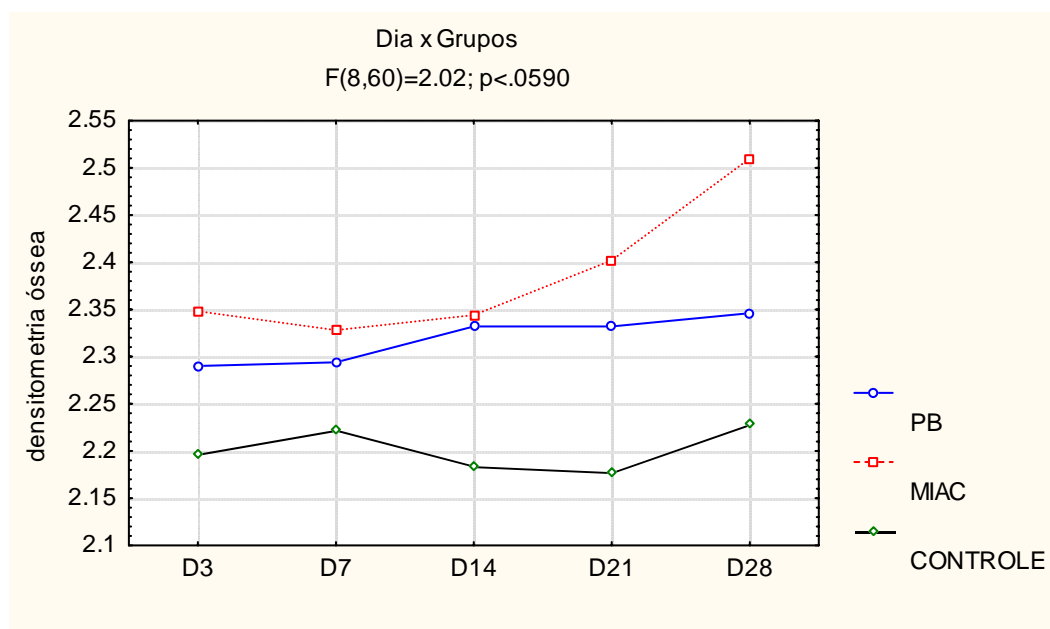


FIGURA 5 – Gráfico representativo da interação entre os fatores dia x grupos

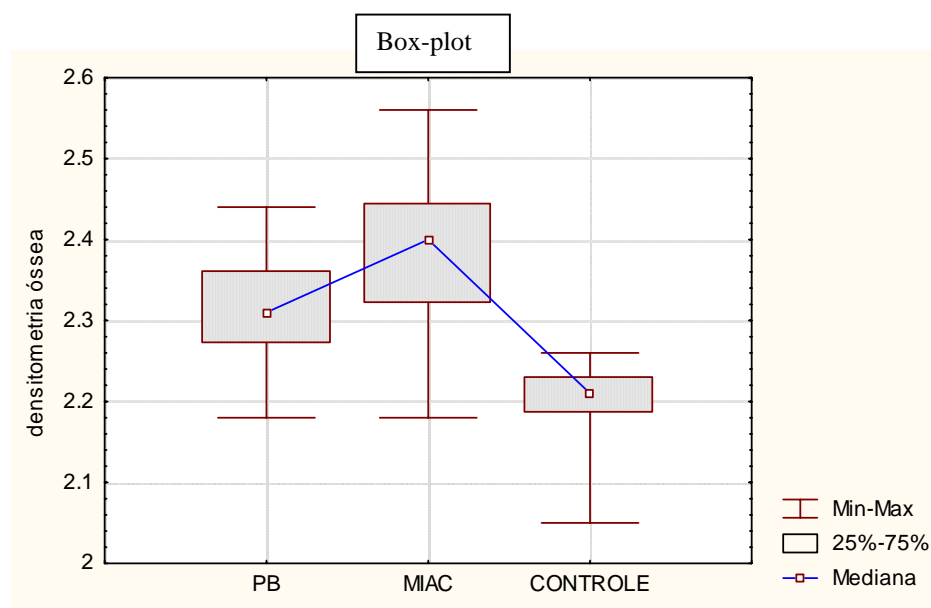


FIGURA 6 – Gráfico representativo do efeito do medicamento Pb x Miacalcic x Controle

Na Figura 6 observa-se que o valor da mediana do Miacalcic é maior do que do Pb, e seu gráfico mostra-se deslocado para cima em relação ao Pb, mostrando não somente uma diferença ( $p=0,000004$ ), mas um resultado pior em termos de densidade óptica.

Foi realizado teste de Tukey e Scheffé para observar se os resultados Pb e Miacalcic isolados do grupo controle eram iguais. Nos dois testes encontrou-se um valor para  $p < 0.001$ . Isso significa dizer que isolados do controle os dois tratamentos são diferentes entre si, com os valores Medianos e Médios para a densidade óptica do Miacalcic maiores do que Pb.

Assim sendo, após as análises apresentadas anteriormente, podemos afirmar com 95% de certeza que:

- (1) os melhores resultados foram obtidos pelo grupo controle.
- (2) o Miacalcic tem o pior desempenho em relação à densidade óptica radiográfica.
- (3) não se pode afirmar sob um nível de 5% de significância que os resultados do Miacalcic são iguais aos do Pb.
- (4) os resultados obtidos pelo Miacalcic em termos de densidade óptica são significativamente piores do que Pb.

## **5.2 Análise histológica**

Foi observado defeito cirúrgico transósseo em todos os cortes histológicos dos espécimes. Em vários cortes foi notada secção de feixe vaso-nervoso e em alguns cortes secção de germe dentário. A área onde foi posicionada a barreira física, membrana de

politetrafluoretileno, encontrava-se bastante evidente em alguns cortes.

### 5.2.1 Período de três dias

Os animais do grupo controle apresentaram a região central do defeito preenchida por coágulo sanguíneo constituído por rede de fibrina contendo hemácias e esquírolas ósseas, com fibroblastos junto às bordas. Notava-se ainda, início de neoformação óssea a partir do perióstio e também do endóstio, onde havia osso esponjoso. A superfície de corte mostrava linha basofílica representando necrose da área. Alguns espécimes exibiam tecido de granulação junto às margens do defeito, substituindo parcialmente o coágulo. Um dos animais apresentou invasão de tecido muscular na região do defeito (Figura 7).

Os animais do grupo tratado com calcitonina mostraram que a área do defeito cirúrgico estava preenchida por coágulo sanguíneo representado por rede de fibrina contendo hemácias e alguns leucócitos e esquírolas ósseas. Próximo às bordas do defeito observava-se discreta neoformação óssea a partir do

periósteo, tecido de granulação e células arredondadas com aspecto osteogênico. Na porção externa à cortical adjacente ao defeito cirúrgico notou-se neoformação subperiosteal, com diversas trabéculas ósseas imaturas e amplos espaços medulares (Figura 7).

Nos animais do grupo tratado com chumbo a área do defeito cirúrgico exibia coágulo sangüíneo formado por rede de fibrina contendo hemácias e leucócitos. Junto às bordas notava-se neoformação óssea a partir do periósteo, com algumas trabéculas imaturas projetando-se para o interior do mesmo, sobre o coágulo sangüíneo. Nas margens do defeito notava-se também discreta formação de tecido de granulação, por vezes contendo células arredondadas com características osteogênicas. Algumas esquírolas ósseas foram observadas, eventualmente com discreta neoformação óssea em sua periferia (Figura 7).

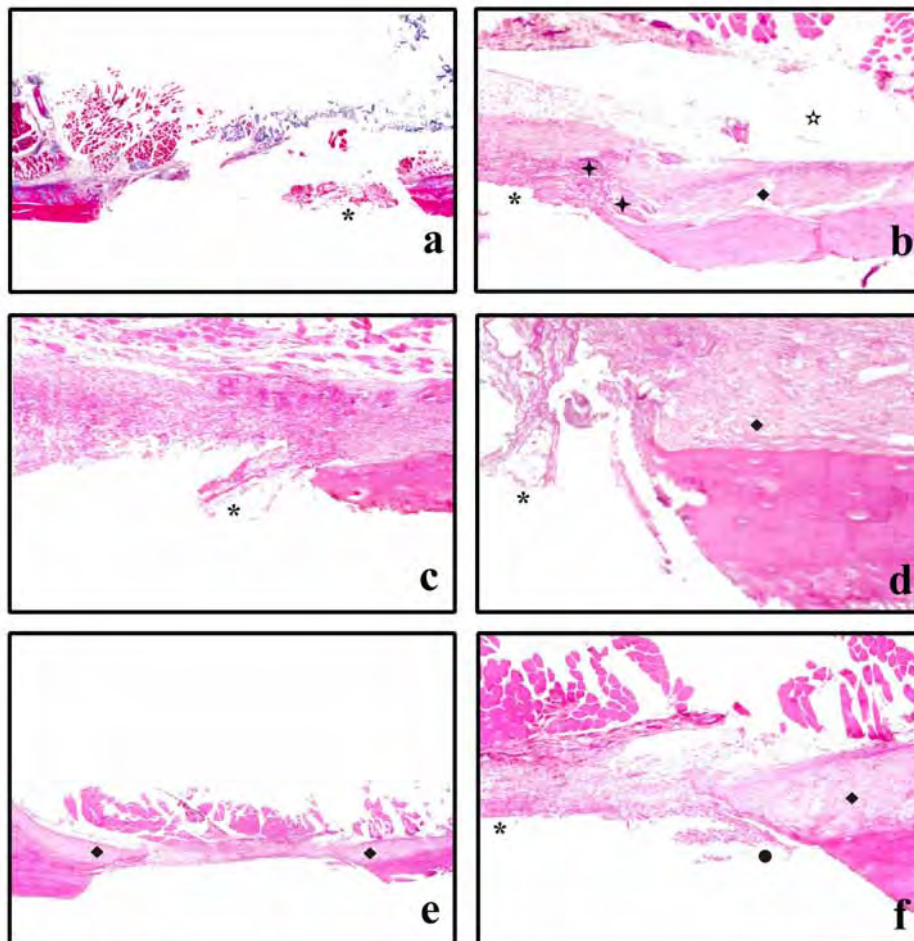


FIGURA 7- Período de três dias: a) controle: margens do defeito ósseo (→) contendo rede de fibrina (\*). Tricrômico de Masson, aumento original : 25X; b) controle uma das margens do defeito com neoformação óssea subperiosteal (◆), esquirolas (+), rede de fibrina (\*) e espaço da barreira (☆). HE, aumento original: 100X; c) uma das margens do defeito preenchido por rede de fibrina (\*). HE, aumento original: 100X; d) calcitonina: detalhe de uma das margens com neoformação óssea subperiosteal (◆) e rede de fibrina (\*). HE, aumento original: 200X; e) chumbo: defeito ósseo com neoformação óssea subperiosteal junto às margens (◆). HE, aumento original: 25X; f) chumbo: detalhe de uma das margens, com neoformação óssea subperiosteal (◆), tecido de granulação (●) e rede de fibrina (\*). HE, aumento original: 100X.

### 5.2.2 Período de sete dias

Nos animais do grupo controle, na superfície de corte do defeito observava-se tecido de granulação e na porção externa neoformação óssea constituída por trabéculas imaturas, circundadas por osteoblastos e entremeadas por tecido conjuntivo frouxo. Essas trabéculas apresentavam continuidade com o periósteo e projetavam-se para a região central do defeito. Ao redor da área de neoformação, notavam-se células volumosas agrupadas, com aspecto semelhante a células osteogênicas, porém ainda sem deposição de matriz óssea. A região central do defeito encontrava-se preenchida por tecido de granulação, esquirolas ósseas e remanescentes de coágulo (Figura 8).

Nos animais tratados com calcitonina observava-se a presença de trabéculas ósseas neoformadas a partir do periósteo, junto às margens do defeito ósseo. Este estava parcialmente preenchido por tecido de granulação ricamente celularizado, exibindo alguns grupos de células arredondadas com aspecto osteogênico. Estas por vezes estavam presentes em torno de esquirolas ósseas, as quais exibiam também osteoclastos na sua periferia. Remanescentes de coágulo sangüíneo, constituído por rede de fibrina contendo hemácias e

leucócitos também foram observados no interior do defeito cirúrgico. Diversos osteoclastos estavam presentes, tanto no tecido ósseo vizinho ao defeito quanto junto às trabéculas ósseas neoformadas (Figura 8).

Nos animais do grupo tratado com chumbo notou-se nas margens neoformação óssea com trabéculas formadas a partir do perióstio e também na região da secção cirúrgica. As trabéculas neoformadas dispunham-se em conjunto em forma de cone, com o ápice voltado para o centro do defeito e com perióstio revestindo a face externa. As trabéculas eram constituídas por tecido ósseo imaturo, não lamelar e delimitavam amplos espaços medulares, preenchidos por tecido conjuntivo frouxo. O restante do defeito estava preenchido por tecido de granulação rico em células, algumas das quais com formato arredondado e aspecto osteogênico. Esquírolas ósseas estavam presentes, exibindo reabsorção periférica com presença de osteoclastos. Nos cortes mais periféricos do defeito notava-se união do tecido ósseo neoformado a partir das bordas (Figura 8).

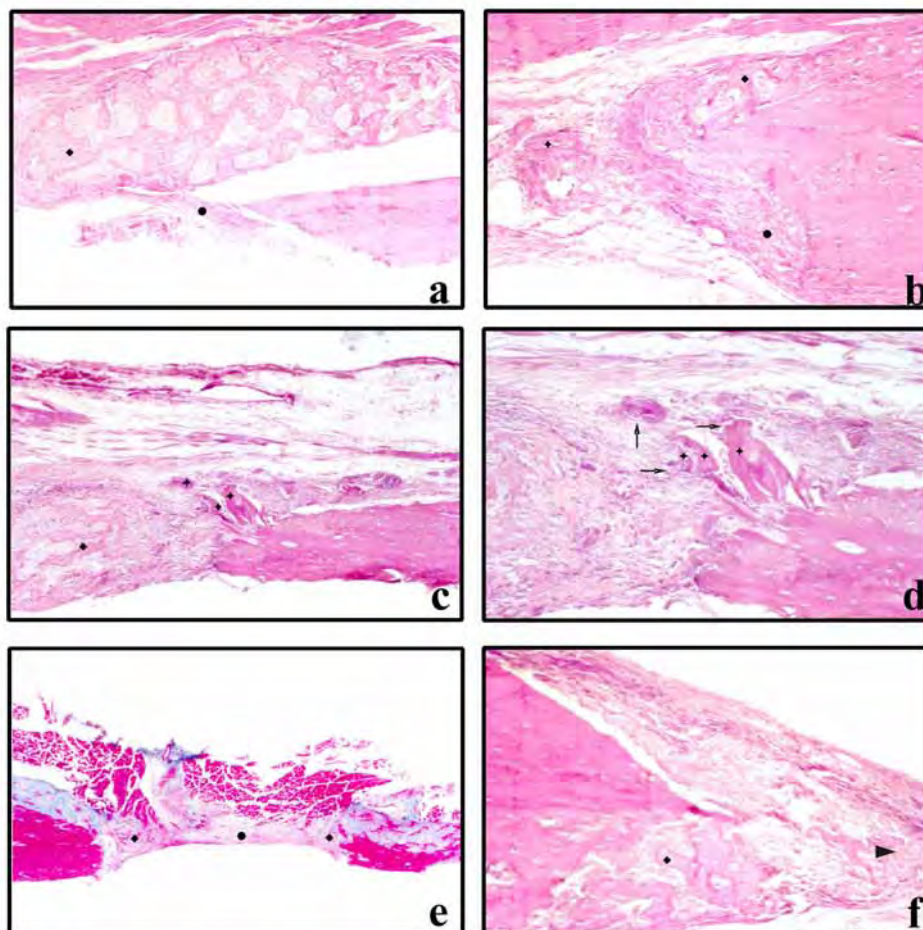


FIGURA 8- Período de sete dias: a) controle: uma das margens do defeito parcialmente preenchido por tecido de granulação (●) e neoformação óssea subperiosteal (◆). HE, aumento original 100X; b) controle: detalhe de uma das margens, com neoformação óssea subperiosteal (◆) e na superfície de corte, presença de tecido de granulação (●) e esquirolas ósseas (✦) no interior do defeito. HE, aumento original 200X; c) calcitonina: uma das margens do defeito com trabéculas ósseas neoformadas (◆) e esquirolas (✦). HE, aumento original 100X; d) calcitonina: detalhe da figura anterior com células de aspecto osteogênico (→) ao redor de esquirolas ósseas (✦). HE, aumento original 200X; e) chumbo: defeito parcialmente preenchido por tecido de granulação (●) e neoformação óssea junto às margens (◆). Tricrômico de Masson, aumento original 25X; f) chumbo: detalhe da neoformação óssea subperiosteal e na superfície de corte (◆), formando em conjunto aspecto de cone (▶). HE, aumento original 200X

### 5.2.3 Período de 14 dias

No grupo de animais controle notava-se tecido ósseo neoformado já apresentando organização periosteal, com trabéculas ósseas imaturas parcialmente contornadas por osteoblastos e contendo grande número de osteócitos incluídos. Essas trabéculas delimitavam espaços medulares amplos, preenchidos por tecido conjuntivo frouxo. As áreas de neoformação óssea apresentavam linhas de aposição evidentes. Em algumas regiões, notava-se a presença de osteoclastos, tanto no osso preexistente quanto no neoformado. Células gigantes multinucleadas eram observadas ainda ao redor de esquirolas ósseas, em torno das quais havia organização de células osteogênicas. Nos cortes mais periféricos, observava-se união do tecido ósseo neoformado a partir das margens, enquanto na região central havia a interposição de tecido de granulação (Figura 9).

No grupo de animais tratados com calcitonina notou-se neoformação óssea a partir do periósteo e também na região da secção cirúrgica. As trabéculas neoformadas em conjunto dispunham-se em forma de cone, com o ápice voltado para o centro do defeito. As trabéculas ósseas estavam parcialmente circundadas por osteoblastos,

exibiam linhas de aposição e linhas reversas e delimitavam amplos espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo frouxo. Algumas esquirolas ósseas estavam presentes, com osteoclastos em sua periferia e sendo, por vezes, contornadas por tecido ósseo neoformado. Em alguns cortes mais periféricos notou-se união das bordas do defeito ósseo. O restante do mesmo estava preenchido por tecido de granulação (Figura 9).

No grupo de animais tratados com chumbo notou-se maior quantidade de tecido ósseo neoformado do que no período anterior, com trabéculas imaturas ricas em células e delimitando amplos espaços medulares. Alguns osteoclastos foram observados junto ao tecido ósseo neoformado. Nos cortes mais periféricos do defeito, observava-se união do tecido neoformado a partir das bordas, enquanto que nos mais centrais notava-se a aproximação, porém ainda não havia união. Nessa região observava-se tecido de granulação, com células arredondadas de aspecto osteogênico exibindo discreta deposição de matriz óssea, constituindo núcleos de ossificação. Algumas esquirolas ósseas contendo células gigantes multinucleadas em sua periferia estavam presentes (Figura 9).

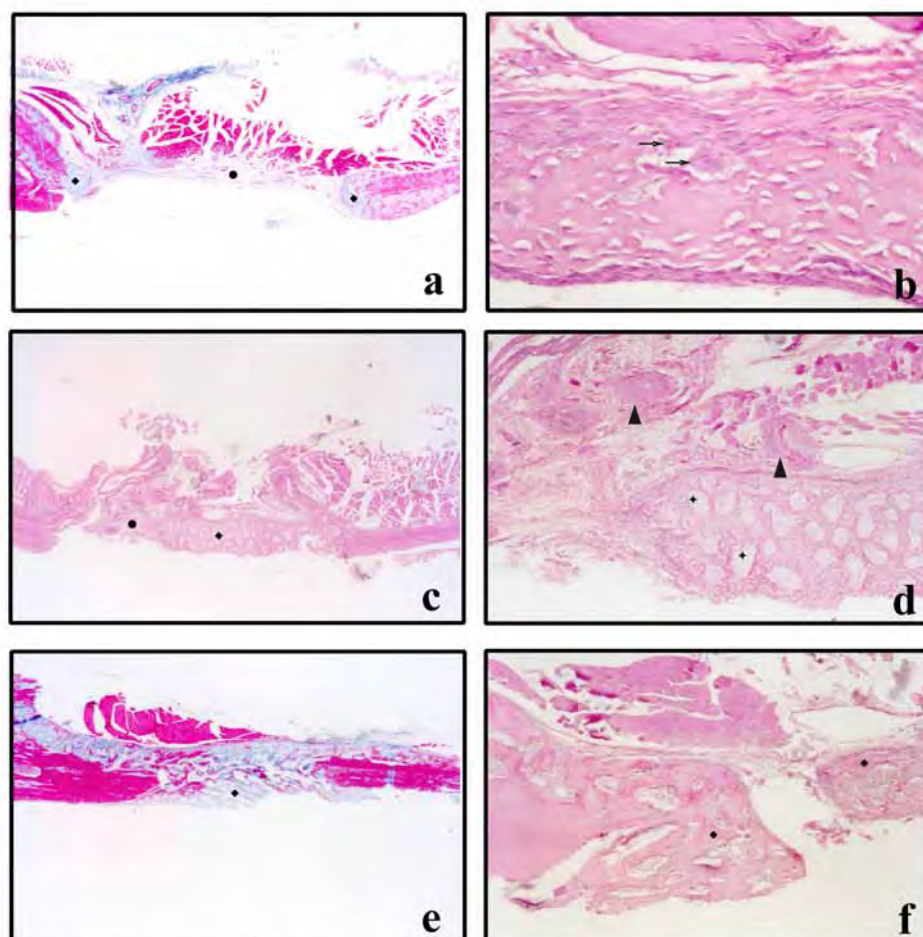


FIGURA 9- Período de 14 dias: a) controle: defeito parcialmente preenchido por tecido de granulação (●) e neoformação óssea junto às margens (◆). Tricrômico de Masson, aumento original 25X; b) controle: lacunas de reabsorção com osteoclastos ativos (→) junto ao tecido ósseo neoformado (◆). HE, aumento original 400X; c) calcitonina: defeito parcialmente preenchido por trabéculas ósseas imaturas (◆) e tecido de granulação (●). HE, aumento original 25X; d) calcitonina: detalhe da figura anterior com trabéculas não lamelares delimitando espaços medulares amplos, preenchidos por tecido conjuntivo frouxo (✦) e esquirolas ósseas circundadas por células de aspecto osteogênico (▶). HE, aumento original 100X; e) chumbo: região periférica do defeito com união das margens por tecido ósseo neoformado (◆). Tricrômico de Masson, aumento original 25X; f) chumbo: região central do defeito com aproximação das bordas de tecido ósseo neoformado (◆). HE, aumento original 100X

#### 5.2.4 Período de 21 dias

No grupo de animais controle o tecido ósseo neoformado exibia remodelação com osteoclastos na superfície de corte. As trabéculas ósseas mostravam-se mais maduras com inclusão de osteócitos e estavam entremeadas por espaços amplos contendo ora tecido medular, ora tecido conjuntivo frouxo. Algumas esquirolas ósseas apresentavam-se circundadas por osteoclastos e osteoblastos, com deposição de matriz óssea. Mais externamente, notava-se tecido conjuntivo fibroso contendo algumas células de aspecto arredondado, semelhantes às células osteogênicas. Em cortes mais periféricos foi possível observar completa neoformação óssea na área do defeito, mostrando união da neoformação endosteal com a periosteal (Figura 10).

No grupo de animais tratados com calcitonina, as trabéculas ósseas neoformadas exibiam aspecto mais maduro, delimitavam espaços medulares, em geral menores, os quais continham ora tecido conjuntivo frouxo, ora medula hematopoiética. Algumas esquirolas ósseas estavam presentes, circundadas por células arredondadas com características osteogênicas e células gigantes

multinucleadas. O restante do defeito ósseo estava preenchido por tecido de granulação, no interior do qual notavam-se diversos núcleos de ossificação. Em cortes mais periféricos notava-se união das bordas do defeito (Figura 10).

No grupo de animais tratados com chumbo o tecido ósseo neoformado apresentava aspecto mais denso, as trabéculas exibiam linhas reversas e células gigantes multinucleadas na periferia e espaços preenchidos por tecido medular hematopoiético. O tecido ósseo neoformado estava revestido por perióstio, com camada mais celular junto ao tecido ósseo e camada mais fibrosa externamente. Um dos espécimes deste grupo apresentou união do tecido ósseo neoformado a partir das bordas, porém, no restante dos espécimes notava-se ainda a interposição de tecido de granulação na região mais central. Nesta observavam-se algumas esquirolas ósseas circundadas por osteoclastos e células com aspecto osteogênico (Figura 10).

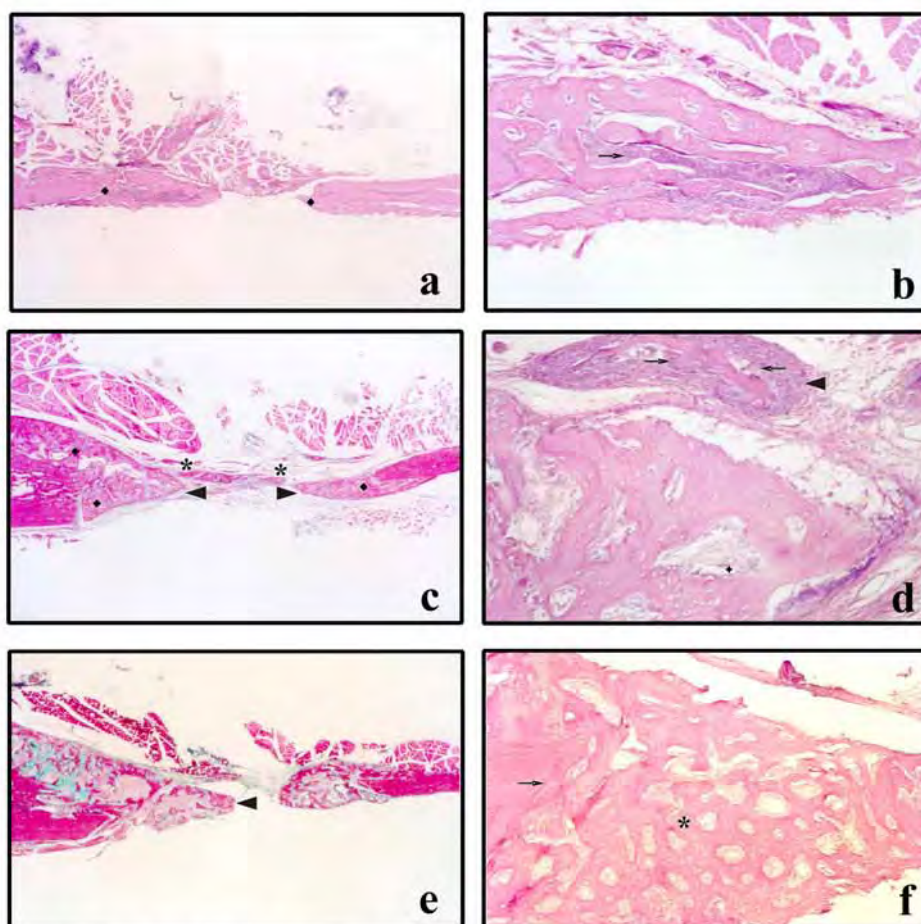


FIGURA 10- Período de 21 dias: a) controle: defeito com neoformação de trabéculas ósseas espessas junto às margens (◆). HE, aumento original 25X; b) controle: detalhe da figura anterior com espaços medulares amplos contendo tecido medular (→). HE, aumento original: 100X; c) calcitonina: neoformação óssea subperiosteal e na superfície de corte (◆) formando em conjunto aspecto de cone (▶) e núcleos de ossificação (✱) no interior do defeito. Tricrômico de Masson, aumento original 25X; d) calcitonina: trabéculas ósseas espessas circundadas por osteoblastos (✦) e esquirolas ósseas contornadas por osteoclastos (→) e células de aspecto osteogênico (▶). HE, aumento original 200X; e) chumbo: neoformação óssea subperiosteal e na superfície da corte formando em conjunto aspecto de cone (▶). Tricrômico de Masson, aumento original 25X; f) chumbo: trabéculas ósseas espessas não lamelares (✱) delimitando espaços medulares e linhas reversas junto às margens do defeito (→). HE, aumento original 100X

### 5.2.5 Período de 28 dias

No grupo de animais controle as trabéculas ósseas neoformadas mostraram-se mais maduras, com os osteócitos por vezes se dispondo em padrão lamelar e com osteoclastos na periferia. Os espaços medulares continham tecido conjuntivo frouxo ou tecido medular hematopoiético. Em algumas regiões, notava-se tecido de granulação, tanto no interior do defeito, quanto junto à secção cirúrgica. Em diversos cortes mais periféricos observava-se toda a extensão do defeito preenchida por tecido ósseo (Figura 11).

No grupo de animais tratados com calcitonina o tecido ósseo neoformado mostrou-se mais organizado, com trabéculas mais maduras apresentando diversas linhas reversas. Os espaços medulares eram menores e muitos deles estavam preenchidos por medula hematopoiética. Nos cortes da porção mais interna do defeito notava-se ainda a presença de tecido de granulação na região mais central (Figura 11).

No grupo de animais tratados com chumbo notou-se a união das bordas do defeito em toda a sua extensão, exceto em um dos espécimes no qual houve invasão de tecido muscular. O tecido ósseo

neoformado apresentava trabéculas mais maduras do que as observadas nos outros períodos, por vezes com disposição lamelar e osteócitos menores. Em algumas trabéculas observavam-se áreas irregulares de reabsorção óssea na periferia, associadas com osteoclastos (Figura 11).

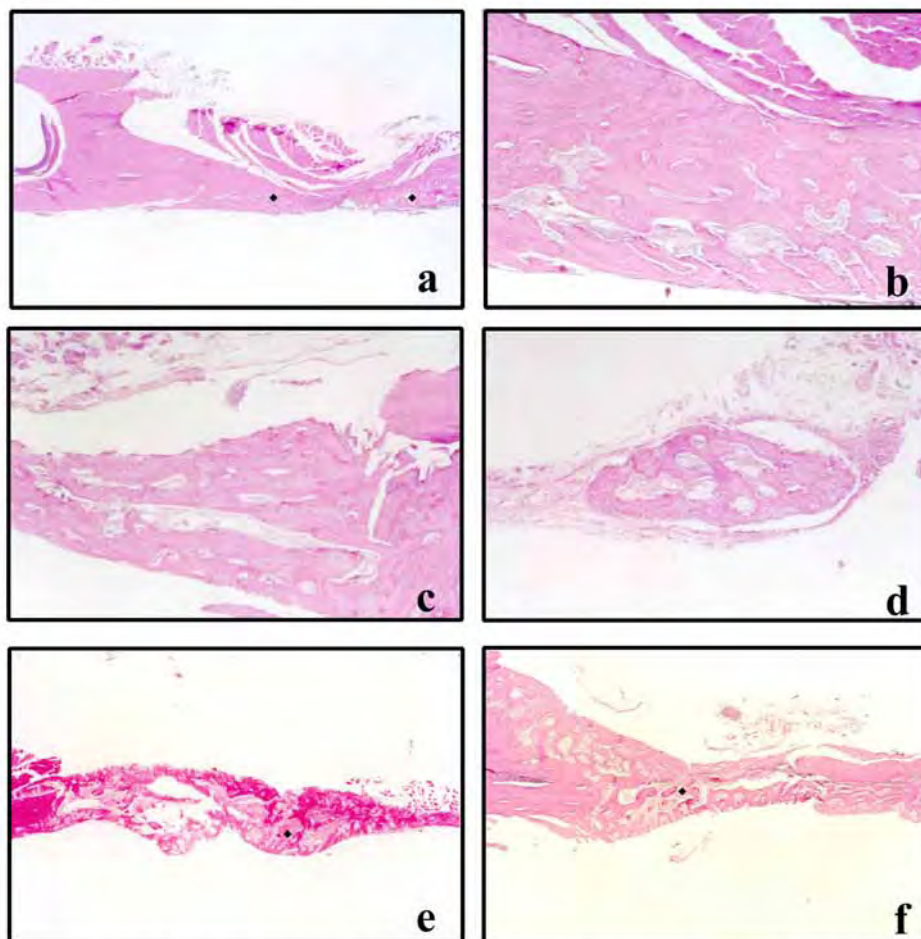


FIGURA 11- Período de 28 dias: a) controle: região periférica do defeito com união das margens por tecido ósseo neoformado ( ◆ ). HE, aumento original 25X; b) controle: trabéculas ósseas espessas delimitando espaços medulares de tamanhos variados. HE, aumento original 100X; c) calcitonina: trabéculas ósseas espessas delimitando espaços medulares de tamanhos variados. HE, aumento original 100X; d) calcitonina: núcleo de ossificação na região central do defeito. HE, aumento original 100X; e) chumbo: região central do defeito com união das margens por trabéculas neoformadas ( ◆ ) delimitando amplos espaços medulares. Tricrômico de Masson, aumento original 25X; f) chumbo: região central do defeito com união das margens por trabéculas ósseas neoformadas ( ◆ ) delimitando espaços medulares de tamanhos variados. HE, aumento original 25X

### 5.3 Análise da histomorfometria

A Tabela 4 formada pelos dados adquiridos do experimento encontra-se no Anexo C.

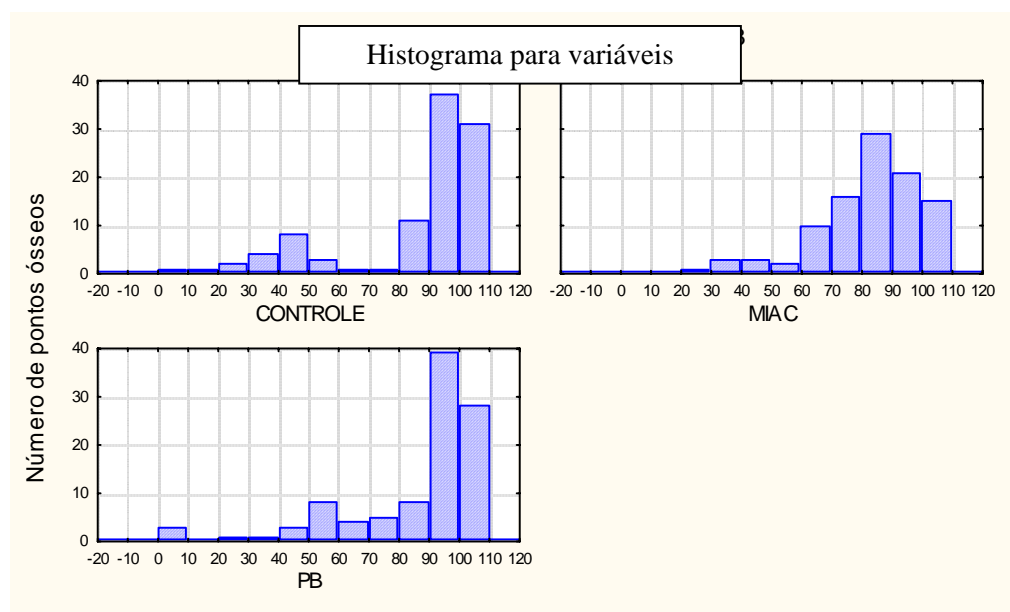


FIGURA 12 – Histograma dos Tratamentos e Controle

Pode-se observar na Figura 12 a grande semelhança existente entre o grupo Controle e o grupo tratado com Pb tanto em frequência quanto em média de valores. O grupo tratado com Miacalcic encontra-se com média deslocada para esquerda em relação aos outros dois grupos. As respectivas médias e desvio-padrão são:

Tabela 5- Tabela da média e desvio padrão

	Média	Desvio-Padrão
Controle	84.36	24.2
Pb	85.34	23.07
Miacalcic	81.94	17.14

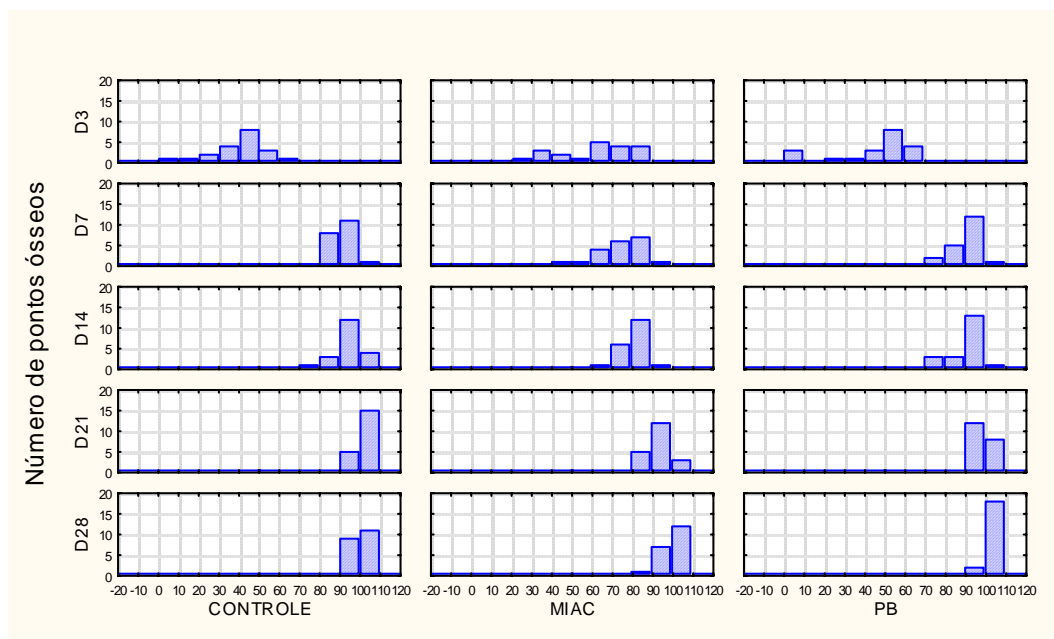


Figura 13 – Histograma dos tratamentos de acordo com os períodos de observação

A Figura 13 mostra que o grupo controle apresenta poucos pontos em relação aos dois grupos tratados, mas ao final do período de 28 dias praticamente não ocorrem diferenças em termos de média de pontos ósseos encontrados. Ocorre sim uma maior frequência no grupo Pb sobre a média de 100 pontos. Essa frequência é maior do que o grupo Miacalcic e Controle, informando que a presença de 100 pontos ósseos é mais frequente com o tratamento com Pb no término do período, apesar de todos apresentarem a mesma média. Como no caso anterior, faz-se uso da ANOVA para avaliar os comportamentos entre os grupos.

Tabela 6- A análise de variância pode ser resumida conforme:

	GL (efeito)	QM (efeito)	GL (resíduo)	QM (resíduo)	F	p-nível
v1	2	306.28	285	94.66842	3.2353	<b>0.040798 (*)</b>
v2	4	25736.59	285	94.66842	271.8603	<b>0.000000(*)</b>
v12	8	1238.28	285	94.66842	13.0802	<b>0.000000(*)</b>

GL: grau de liberdade

QM: quadrado das médias

F: F-teste de Snedecor

v1: é o grupo formado por: Controle, Pb e Miacalcic

v2: é o grupo formado por: 3, 7, 14, 21 e 28 dias de observação

v12: é a interação entre os dias e os grupos de tratamentos e controle

\*estatisticamente significativa a nível de 5%

A Figura 14 mostra o mesmo resultado observado nos histogramas. O grupo controle tem menos pontos de intersecção no terceiro dia, mas ao final do período de 28 dias seu valor é estatisticamente igual ao obtido pelo Miacalcic. Neste dia o valor estatisticamente diferente foi do Pb que conseguiu uma média de 101.85 pontos contra 98.7 do grupo Controle e 98.95 do grupo Miacalcic. Neste mesmo período o pior resultado em variabilidade foi do grupo Miacalcic que obteve um desvio padrão de 4.11 contra 3.86 do Controle e apenas 2.15 do Pb.

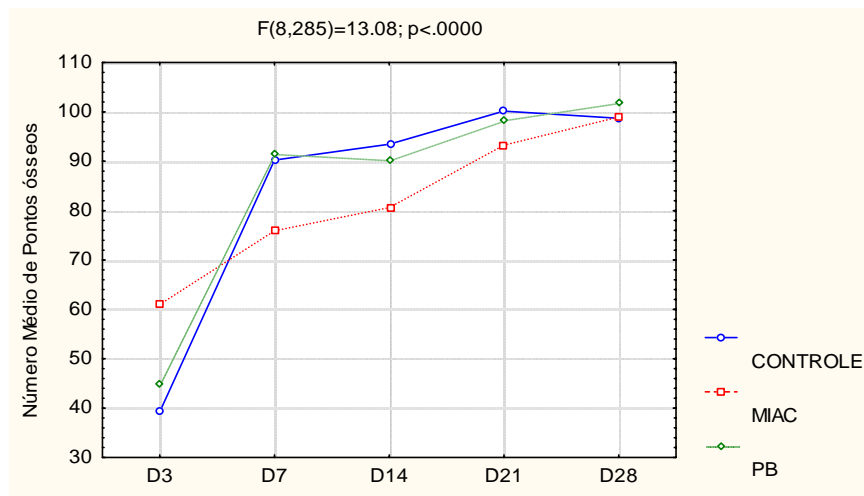


FIGURA 14 – Gráfico representativo da interação entre os fatores dia x grupos

A Figura 15 apresenta a comparação entre os tratamentos e Controle com o gráfico de box-plot. A probabilidade de serem iguais os tratamentos é menor do que o nível de significância ( $p < 0.05$ ), o que nos leva a concluir com 95% de certeza que existe diferença significativa de tratamento.

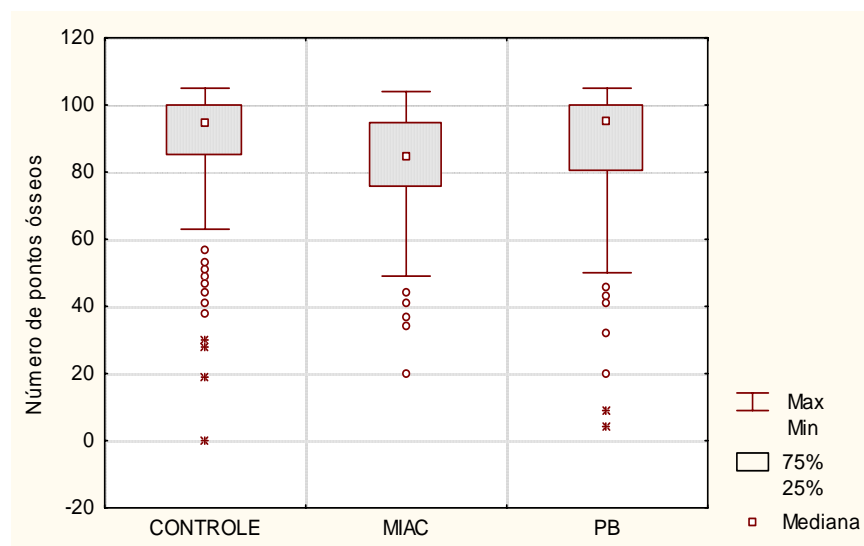


FIGURA 15- Gráfico representativo do efeito dos tratamentos x controle

Como existe diferença estatística é interessante saber qual tratamento fornece valores mais expressivos. A Figura 16 mostra a relação existente entre as médias, e por ela, visualmente pode-se observar que o pior resultado foi do grupo tratado com Miacalcic.

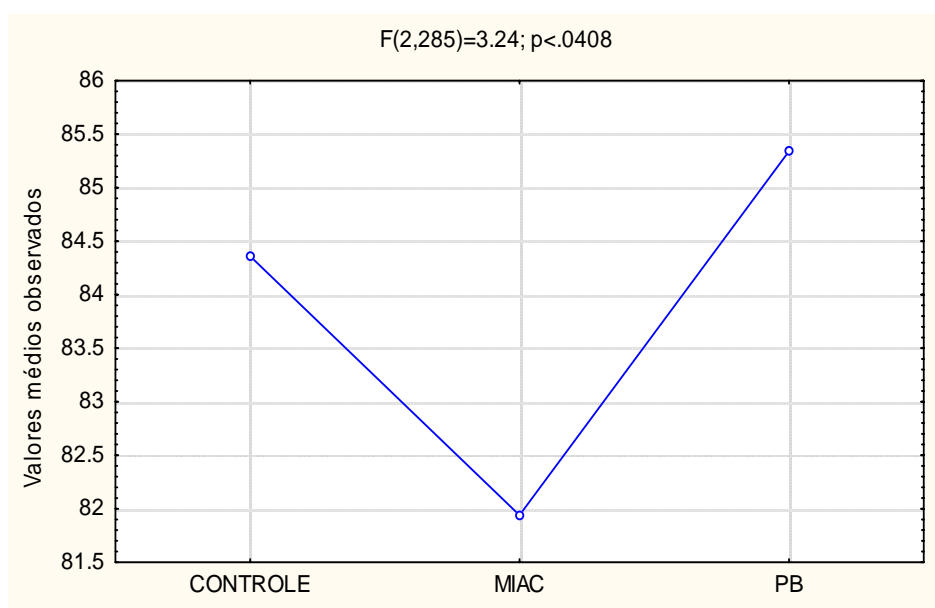


FIGURA 16- Gráfico representativo dos valores médios dos grupos tratados e controle

Para se tentar estabelecer diferenças e igualdades entre os grupos, utilizou-se de dois testes, ambos ao nível de 5% de significância. O primeiro foi o teste de Scheffé que apresentou como resultado a Tabela 7.

Tabela 7- Resultado do teste de Scheffé

	CONTROLE	MIAC	Pb
CONTROLE	XXXX	0.214762	0.776160
MIAC	0.214762	XXXX	<b><u>0.048776</u></b>
Pb	0.776160	<b><u>0.048776</u></b>	XXXX

Por este teste fica evidente que o grupo tratado com Miacalcic é estatisticamente igual ao grupo Controle e diferente do grupo Pb (marcado em negrito). A probabilidade do grupo Miacalcic ser igual ao grupo Pb é menor que o nível de significância ( $p < 0.048$ ).

O segundo teste, teste de Tukey, confirma o primeiro resultado, uma vez que o teste de Scheffé, sendo realizado sobre contrastes, pode fornecer valores tendenciosos (Tabela 8).

Tabela 8- Resultados do teste de Tukey

	CONTROLE	MIACALCIC	Pb
CONTROLE	XXXX	0.183676	0.756271
MIAC	0.183676	XXXX	<b>0.035940</b>
Pb	0.756271	<b>0.035940</b>	XXXXXX

Como pode ser observado, a probabilidade do grupo Miacalcic ser igual ao grupo Pb é de menos de 3.5% (menor que 5% de nível de significância). No entanto, a probabilidade de ser igual ao controle é de cerca de 18%. Isso nos leva a concluir que o grupo Miacalcic tem o mesmo comportamento do grupo Controle e é diferente do Pb.

## 6 DISCUSSÃO

A densitometria analisa a densidade óptica representada pela quantidade de luz que atravessa o filme radiográfico.

A análise da densidade óptica mostrou que o grupo tratado com *Plumbum mettalicum* 30CH e calcitonina apresentaram valores superiores ao controle em todos os períodos analisados. Valores mais elevados de densidade óptica indicariam a passagem de luz com menor facilidade, portanto, com menor quantidade de tecido interposto.

Essa discrepância entre os resultados obtidos e os esperados poderia ser devida a uma série de fatores técnicos operacionais envolvidos, como: variação das correntes elétricas, dificuldade de se estabelecer o centro do defeito em todos os espécimes e o local de leitura, já que o centro é a região onde o tecido ósseo se forma por último.

Portanto este método não se mostrou muito útil para o tipo de análise realizada neste trabalho, embora diversos autores preconizem a utilização na avaliação de reparação óssea de alvéolos de humanos e ratos (Bodner et al.<sup>14-15</sup>, 1993).

Todos os grupos mostraram que o defeito ósseo foi inicialmente preenchido por coágulo sangüíneo, contendo esquírolas ósseas resultantes do procedimento cirúrgico. Desde o período de três dias notou-se discreta neoformação óssea a partir do periósteo da região adjacente ao defeito. Nos outros prazos observou-se que o coágulo foi paulatinamente substituído por tecido de granulação, com aumento progressivo de neoformação óssea.

Em todos os tempos foram observadas esquírolas ósseas, as quais exibiam osteoclastos e, por vezes, organização de células arredondadas, com aspecto de células osteogênicas ao seu redor. No grupo controle, notou-se deposição de matriz óssea em torno dessas esquírolas aos 21 dias, enquanto no grupo tratado com calcitonina essa neoformação foi notada aos 14 dias e no grupo tratado com chumbo, já aos três dias. Esses fragmentos ósseos possivelmente tiveram ação osteoindutora sobre as células mesenquimais indiferenciadas da região, a qual foi favorecida pelo microambiente

criado por meio da utilização de barreira física, com a concentração de proteínas e fatores de crescimento que estimulam a osteogênese (Linde et al.<sup>56</sup>, 1993; Szachowicz<sup>92</sup>, 1995; Pecora et al.<sup>71</sup>, 1997).

A presença de osteoclastos nos diversos períodos, nos três grupos, mostra que a remodelação óssea ocorre concomitantemente ao processo de reparação (Bianco & Lazaretti-Castro<sup>12</sup>, 1999). Isso também torna-se evidente pela presença de linhas basófilas reversas nos últimos períodos de observação.

Nos grupos controle e tratado com calcitonina, não foi observado o preenchimento total do defeito na região mais central do mesmo, em nenhum dos espécimes. No grupo tratado com chumbo, pôde-se observar uma completa união das bordas do defeito cirúrgico em um dos animais do período de 21 dias e também no período de 28 dias. Embora o defeito tenha sido preenchido em extensão, foi observado que não houve reconstituição da espessura total do tecido ósseo. Em um dos animais deste período foi notada a interposição de tecido muscular na região do defeito cirúrgico, impedindo que a neoformação óssea preenchesse a região central do mesmo. Esses achados confirmam o que já foi demonstrado por outros autores, que a interposição de células não osteogênicas na área de um defeito ósseo

cirúrgico impede a migração de células com potencial osteogênico, interferindo com a reparação (Dahlin et al.<sup>25</sup>, 1988; Linde et al.<sup>57</sup>, 1993, Sandberg et al.<sup>81</sup>, 1993; Dahlin et al.<sup>26</sup>, 1994; Almeida et al.<sup>4</sup>, 2000).

Embora os resultados da análise estatística dos dados obtidos pela histomorfometria tenham mostrado comportamento semelhante entre os grupos tratados e o controle, os grupos de animais tratados apresentaram-se diferentes entre si, com melhores resultados para o *Plumbum metallicum* 30CH. A análise histológica, de caráter qualitativo, mostrou evidência de um efeito favorável do *Plumbum metallicum* 30CH, uma vez que foi o único grupo onde o completo preenchimento do defeito cirúrgico, na sua extensão, foi observado, em detrimento aos resultados da análise estatística dos achados histomorfométricos serem de semelhança entre os grupos tratados e o controle.

Husseman & Wolff<sup>45</sup> (1992) propõem a utilização do chumbo preparado de acordo com a farmacotécnica homeopática para o tratamento de crianças com formação óssea deficiente. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que esse medicamento foi eficiente na estimulação da reparação óssea, vindo ao encontro da

recomendação dos autores citados. A presença de neoformação óssea em torno das esquirolas remanescentes na região do defeito cirúrgico foi observada desde o período de três dias, nos animais do grupo tratado com *Plumbum metallicum* 30CH. Tal fato parece refletir uma ação efetiva do medicamento na estimulação da osteogênese, que teria favorecido o completo preenchimento ósseo do defeito em extensão.

Apesar do chumbo ser considerado um mineral extremamente tóxico para o ser humano e animais (Begum et al.<sup>10</sup>, 1994) não foi observado efeito adverso no presente trabalho com a utilização do mesmo em dose homeopática, que é a única forma de aplicação possível, de acordo com Husseman & Wolff<sup>45</sup> (1992).

A calcitonina tem sido empregada há muitos anos no tratamento de osteoporose em mulheres na fase pós-menopausa, como inibidor da reabsorção óssea (Raubenheimer<sup>75</sup>, 2000). Além disso, alguns autores, através de estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que esse hormônio estimula o crescimento do tecido ósseo (Ziegler & Delling<sup>107</sup>, 1972; Weiss et al.<sup>100</sup>, 1981; Farley et al.<sup>28</sup>, 1988; Badursky et al.<sup>9</sup>, 1991; Reginster et al.<sup>78</sup>, 1992).

Farley et al.<sup>28</sup> (1988) estudando *in vitro* os efeitos da calcitonina de salmão em células da calvária de camundongos

neonatais verificaram aumento do número de osteoblastos, o que resultaria em formação óssea aumentada.

Embora alguns trabalhos experimentais tenham mostrado um efeito favorável da calcitonina de salmão na reparação de defeitos cirúrgicos em ratas ovariectomizadas ou não (Ziegler & Dellinger<sup>107</sup>, 1972; Weiss et al.<sup>100</sup>, 1981; Reginster et al.<sup>78</sup>, 1992; Pereira et al.<sup>72</sup>, 1997; Arisawa<sup>5</sup>, 2000; Arisawa et al.<sup>6</sup>, 2000), o mesmo não foi observado no presente estudo, o qual utilizou ratos machos. Nesta pesquisa, os animais do grupo tratado com calcitonina mostraram menor formação óssea, verificada tanto na análise morfológica quanto histomorfométrica, quando comparados aos demais.

Bianco & Lazaretti-Castro<sup>12</sup> (1999) relatam que na espécie humana a quantidade de calcitonina presente em indivíduos do sexo feminino é menor que no masculino, ao contrário do que é observado em ratos.

Não se pode afirmar que este seja um fator determinante na diferença dos resultados obtidos no presente trabalho com relação aos de Arisawa<sup>5</sup> (2000) e Arisawa et al.<sup>6</sup> (2000), evidenciando a necessidade de novas pesquisas que possam esclarecer este ponto.



## 7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados tornou possível concluir que, em defeitos cirúrgicos realizados em mandíbulas de ratos machos, a reparação óssea guiada é favorecida pelo *Plumbum mettalicum* 30CH, mas não pela calcitonina.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- 1 AABOE, M. et al. Unbiased stereological methods used for quantitative evaluation of guided bone regeneration. **Clin Oral Implants Res**, v.9, n.3, p.163-9, 1998.
- 2 AKAMINE, A.; KIMURA, R.; MAEDA, K. Implanted bone particles induce osteoclast development in the presence of osteoblast lineage cells. **Bone**, v.15, n.3, p.343-9, 1994.
- 3 ALBERIUS, P.; DAHLIN, C.; LINDE, A. Role of osteopromotion in experimental bone grafting to the skull: a study in adult rats using a membrane technique. **J Oral Maxillofac Surg**, v.50, n.8, p.829-34, Aug. 1992.
- 4 ALMEIDA, J.D. et al. Estudo da reparação óssea em mandíbula de ratos. **Pós-Grad Rev Fac Odontol. São José dos Campos**, v.3, n.1, p.49-53, jan./jun. 2000.
- 5 ARISAWA, E.A.L. **Influência da calcitonina na regeneração óssea em mandíbulas de ratas ovariectamizadas**. 2000. 107f. Tese (Doutorado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.
- 6 ARISAWA, E.A.L. et al. Influência da calcitonina na reparação óssea de tíbias de ratas ovariectomizadas. **Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos**, v.3, n.1, p.54-59, jan./jun. 2000.
- 7 ARNETT, T.R.; DEMPSTER, D.W. A comparative study of disaggregated chick and rat osteoclasts *in vitro*: effects of calcitonin and prostaglandins. **Endocrinology**, v.120, n.2, p.602-8, 1987.

---

\* Baseado em :

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Rio de Janeiro. **Referências bibliográficas NBR6023**. Rio de Janeiro, 2000. 22p.

- 8 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA. **Dicionário de especialidades farmacêuticas**. 25 ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 1996/97. 962p.
- 9 BADURSKI, J.E. et al. Chondroprotective action of salmon calcitonin treatment in experimental arthropathies. **Calcif Tissue Int**, v.49, n.1, p.27-34, 1991.
- 10 BEGUM, R.; KOSHY, R.; SENGUPTA, A. Effect of homoeopathic drugs plumbum and opium on experimentally induced lead toxicity in rats. **Indian J Exp Biol**, v.32, n.3, p.192-5, Mar. 1994.
- 11 BERNE, R.M.; LEVY, M.N. Regulação endócrina do metabolismo do cálcio e do fosfato. In: **Fisiologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Ed.Guanabara, 1990. p. 698-713.
- 12 BIANCO, A.C.; LAZARETTI-CASTRO, M. Fisiologia do metabolismo mineral. In: AIRES, M.M. **Fisiologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap.72, p.855-76.
- 13 BODNER, L. et al. Extraction wound healing in desalivated rats. **J. Oral Pathol Med** v.20, n.4, p.176-8, 1991.
- 14 BODNER, L. et al. Extraction site healing in rats: a radiologic densitometric study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.75, n.3, p.367-72, Mar. 1993.
- 15 BODNER, L. et al. Long-term effect of desalivation on extraction wound healing: a densitometric study in rats. **Dentomaxillofac Radiol**, v.22, n.4, p.195-8, Nov. 1993.
- 16 BUSER, D.; DAHLIN, C.; SCHENK, R.K. **Guided bone regeneration in implant dentistry**. Chicago: Quintessence Books, 1994. 265p.
- 17 CARVALHO, A. et al. Fator de correção em densitometria radiográfica. **Rev Fac Farm Odontol Araraquara**, v.10, supl.1, p.115-24, 1976.

- 18 CARVALHO, A. et al. Mineralização no processo de reparo em feridas de extração dentária em ratos: contribuição ao estudo densitométrico. **Ars Cvrandi Odontol**, v.7, n.7, p.304-12, Out. 1980.
- 19 CHAMBERS, T.J.; MOORE, A. The sensitivity of isolated osteoclasts to morphological transformation by calcitonin. **J Clin Endocrinol Metab**, v.57, n.4, p. 19-24, 1983.
- 20 CHEN, S.K.; HOLLENDER, L.; OMNELL, K.A. Detection of small differences in mass using a direct digital dental X-ray system. **Dentomaxillofac Radiol**, v.26, n.1, p.63-6, Jan. 1997.
- 21 CHESMEL, K.D. et al. Healing response to various forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. **J Oral Maxillofac Surg**, v.56, n.7, p.857-63, July 1998.
- 22 COMBE, B.; COHEN, C.; AUBIN, F. Equivalence of nasal spray and subcutaneous formulations of salmon calcitonin. **Calcif Tissue Int**, v.61, n.1, p.10-5, 1997.
- 23 CORMACK, D.H. Osso. In: HAM, A. W. **Histologia**. 9 ed. Rio de Janeiro: Lippincott, 1991. 847p.
- 24 CRUZ-ORIVE, L.M. Stereology of single objects. **J Microscopy**, v.186, n.2, p.93-107, 1997.
- 25 DAHLIN, C. et al. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plast Reconstr Surg**, v.81, n.5, p.672-6, May 1988.
- 26 DAHLIN, C. et al. Restoration of mandibular nonunion bone defects. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.23, n.4, p.237-42, 1994.
- 27 DUINKERKE, A.S.H. et al. Densitometric analysis of experimentally produced periapical radiolucencies. **Dent Rad**, v.43, n.5, p.783-977, 1977.
- 28 FARLEY, J.R. et al. The anti-bone-resorptive agent calcitonin also acts *in vitro* to directly increase bone formation and bone cell proliferation. **Endocrinology**, v.123, n.1, p.159-67, 1988.

- 29 FELDMAN, R.S.; KRIEGER, N.S.; TASHJIAN, A.H. Effects of parathyroid hormone and calcitonin on osteoclast formation *in vitro*. **Endocrinology**, v.107, n.4, p.1137-39, 1980.
- 30 FISHER, P. et al. The influence of the homoeopathic remedy plumbum metallicum on the excretion kinetics of lead in rats. **Hum Toxicol**, v.6, p.321-4, 1987.
- 31 FRIEDENSTEIN, A.J. Precursor cells of mechanocytes. **Int Rev Cytol**, v.47, p.327-30, 1976.
- 32 GANONG, W.F. Regulação hormonal do metabolismo do cálcio e fisiologia óssea. In:\_. **Fisiologia médica**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 1989. Cap.21, p.333-444.
- 33 GENANT, H.K. et al. Noninvasive assesment of bone mineral and structure: state of the art. **J Bone Min Res**, v.11, n.6, p.707-30, 1996. (Review).
- 34 GILMAN, A.G. (Ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, Interamericana, 1996, 1905 p.
- 35 GRAY, T. Quantitation in histopathology. In: BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. (Ed.) **Theory and practice of histological techniques**. 4. ed. New York: Churchill Livingstone, 1996, Chap. 30, p.641-71.
- 36 GRIFFITH, J.Q.; FARRIS, E.J. **The rat in laboratory investigation**. Lippincott: J. B. Lippincott, 1942. 488p.
- 37 GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Hormônio partireóideo, calcitonina, metabolismo do cálcio e do fosfato, vitamina D, ossos e dentes. In:\_. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, 1997. Cap.79, p.895-904.
- 38 HÄMMERLE, C.H.F. et al. A novel model system for the study of experimental guided bone formation in humans. **Clin Oral Implants Res**, v.7, n.1, p.38-47, 1996.

- 39 HARRISON, T.R. **Medicina interna**. 13. ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, Interamericana, 1996. 2765p.
- 40 HEDLUND, T.; HULTH, A.; OLOF, J. Early effects of parathormone and calcitonin on the number of osteoclasts and on serum-calcium in rats. **Acta Orthop Scand**, v.54, n.6, p.802-4, 1983.
- 41 HENTUNEN, T.A. et al. Osteoclast recruiting activity in bone matrix. **Bone Miner**, v.25, n.3, p.183-98, 1994.
- 42 HIGO, C.D.; BRANDÃO, A.A.H. Análise histológica da ação do fosfato de cálcio preparado segundo técnica homeopática (*Calcarea phosphorica* 6CH) na cicatrização de defeitos ósseos circunscritos na tíbia de ratos sadios. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9, 1999, Botucatu. **Resumos...** São Paulo: UNESP. 1999, p. 113.
- 43 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 Oral Radiol Endod**, v. 82, n.6, p.594-606, Dec. 1996.
- 44 HUETHER, S.E. The cellular environment: fluids and electrolytes, acids and bases. In: McCANCE, K.L.; HUETHER, S.E. **Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children**. 3. ed. Sant Louis: Mosby, 1997. Chap.3, p.82-113.
- 45 HUSSEMAN, F.; WOLFF., O. Chumbo. In:\_. **A imagem do homem como base da arte médica: esboço de uma medicina orientada pela Ciência Espiritual**. Trad. Szajewski, U.; Wilda, H. São Paulo: Associação Beneficente Tobias, 1992. (Patologia e Terapêutica, v.2, p.408-14).
- 46 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: **Histologia básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1995. Cap.8, p.108-26.

- 47 KABAN, L.D.; GLOWACKI, J. Induced osteogenesis in the repair of experimental mandibular defects in rats. **J Dent Res**, v.60, n.7, p.1356-64, July 1981.
- 48 KALLIO, D.M.; GARANT, P.R.; MINKIN, C. Ultrastructural effects of calcitonin on osteoclasts in tissue culture. **J Ultrastruc Res**, v.39, n.3, p.205-16, 1972.
- 49 KOLBECK, S. et al. Digital radiography: a predictor of regenerate bone stiffness in distraction osteogenesis. **Clin Orthop Rel Res**, n.366, p.221-8, Sept. 1999.
- 50 KOSTOPOULOS, L.; KARRING, T. Role of periosteum in the formation of jaw bone: an experiment in the rat. **J Clin Periodontol**, v.22, n.3, p.247-54, Mar. 1995.
- 51 LATHOUD. **Materia medica homeopatica**. Buenos Aires: Albatros, 1982. p.681-7.
- 52 LEE, M.Y.; LOTTSELDT, J.L.; FEVOLD, K.L. Identification and characterization of osteoclast progenitors by clonal analysis of hematopoietic cells. **Blood**, v.80, n.7, p.1710-6, Oct. 1992.
- 53 LeGEROS, R.Z.; CRAIG, R.G. Strategies to affect bone remodeling: osteointegration. **J Bone Miner Res**, v.8, suppl.2, p.S583-96, 1993.
- 54 LEICHTER, J.W.; PACK, A.R.C.; KARDOS, T.B. A comparison of stereological and computer-assisted histomorphometric analysis as tools for histological quantification in regenerative studies. **J Periodontal Res**, v.33, n.2, p.99-104, 1998.
- 55 LEW, D. et al. Repair of craniofacial defects with hydroxyapatite cement. **J Oral Maxillofac Surg**, v.55, n.12, p.1441-51, Dec. 1997.
- 56 LINDE, A. et al. Creation of new bone by an osteopromotive membrane technique : an experimental study in rats. **J Oral Maxillofac Surg**, v.51, n.8, p.892-7, Nov. 1993.

- 57 LINDE, A. et al. Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. **J Periodontol**, v.64, n.11, suppl., p.1116-28, Nov. 1993.
- 58 LINGHORNE, W.J. The sequence of events in osteogenesis as studied in polyethylene tubes. **Ann N Y Acad Sci**, v.85, p.445-60, Mar. 1960.
- 59 MACEDO, N.L. **Regeneração óssea vertical em implantes osteointegrados inseridos parcialmente na tíbia de coelhos**. 1999. 131f. Tese (Doutorado em Odontologia, Área de Concentração em Prótese Bucomaxilofacial) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.
- 60 MacINTYRE, I. et al. Chemistry, physiology and therapeutic applications of calcitonin. **Arthritis Rheum**, v.23, n.10, p.1139-47, Oct. 1980.
- 61 MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Estereologia. In:\_. **Métodos quantitativos em morfologia**. Rio de Janeiro: EdUERJ, 1995. p.72-115.
- 62 MANOGALAS, S.C. Bone marrow, clastic, and blastic cell system: quo vadis? **Calcif Tissue Int**, v.56, suppl.1, p.S52-3, 1995.
- 63 MANOLAGAS, S.C.; JILKA, R.L. Cytocines, hematopoiesis, osteoclastogenesis, and estrogens. **Calcif Tissue Int**, v.50, n.3, p.199-202, 1992.
- 64 MANOGALAS, S.C.; JILKA, R.L. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling: emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. **N Engl J Med**, v. 332, n.5, p.305-11, 1995.
- 65 MARX, S.J. et al. Calcitonin receptors of kidney and bone. **Science**, v.178, n.1, p.999-1001, 1972.
- 66 MEIJER, G.A. et al. Image analyses in clinical pathology. **J Clin Pathol**, v.50, n.5, p.365-70, 1997.

- 67 MOURAD, L.A. Structure and function of musculoskeletal system. In: McCANCE, K.L.; HUETHER, S.E. **Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children**. 3. ed. Sant Louis: Mosby, 1997. Chap.41, p.1435-85.
- 68 MUNDY, G.R. Cytokines and growth factors in the regulation of bone remodeling. **J Bone Miner Res**, v.8, suppl.2, p.505-10, 1993.
- 69 NADE, S. Stimulating osteogenesis. **Injury**, v.25, n.9, p.577-83, Oct. 1994.
- 70 PAGE, C.P. et al. As drogas e o sistema musculoesquelético. In:\_. **Farmacologia integrada**. Madrid: Manole, 1999. p.341.
- 71 PECORA, G. et al. Bone regeneration with a calcium sulfate barrier. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.84, n.4, p.424-9, Oct. 1997.
- 72 PEREIRA, S.L.S. et al. Efeito da calcitonina de salmão sobre a cicatrização de defeitos ósseos. **Rev Odontol UNESP (São Paulo)**, v.26, n.2, p.471-88, 1997.
- 73 QUINN, J.M.W.; McGEE, J.O'D.; ATHANASOU, N.A. Cellular and hormonal factors influencing monocyte differentiation to osteoclastic bone-resorbing cells. **Endocrinology**, v.134, n.6, p.2416-23, 1994
- 74 RABIE, A.B.M. et al. The effect of demineralized bone matrix on the healing of intra membranous bone grafts in rabbit skull defects. **J Dent Res**, v.75, n.4, p.1045-51, Apr. 1996.
- 75 RAUBENHEIMER, E.J. Recent advances in the diagnosis and management of metabolic bone diseases. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF INTERNATIONAL ASSOCIATION ORAL PATHOLOGY, 10, 2000, La Antigua. **Anais...** La Antigua: IAOP, 2000. p.1-14.
- 78 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, n.6, p.518-20, 1992.
- 79 ROODMAN, G.D. Application of bone marrow cultures to the study of osteoclast formation and osteoclast precursors in man. **Calcif Tissue Int**, v.56, suppl.1, p.S22-3, 1995.
- 80 SALATA, L.A.; CRAIG, G.T.; BROOK, I.M.. Bone healing following the use of hydroxyapatite or ionomeric bone substitutes alone or combined with a guided bone regeneration technique: an animal study. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.13, n.1, p.44-51, 1998.
- 81 SANDBERG, E.; ARO, H.T.; VUORIO, E.I., Gene expression during bone repair. **Clin Orthop**, n.289, p.292-312, Apr. 1993.
- 82 SANDBERG, E.; DAHLIN, C.; LINDE, A. Bone regeneration by the osteopromotion technique using bioabsorbable membranes: an experimental study in rats. **J Oral Maxillofac Surg**, v.51, n.10, p.1106-14, Oct. 1993.
- 83 SCHILLER, A.L.; TEITELBAUM, S.L. Bones and joints. In: RUBIN, E.; FARBER, J.L. **Pathology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1999. Chap.26, p.1336-47.
- 84 SCHMID, J. et al. Blood-filled spaces with and without filler materials in guided bone regeneration. **Clin Oral Implant Res**, v. 8, n. 2, p. 75-81, 1997.
- 85 SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop**, n.205, p. 299-308, Apr. 1986.
- 86 SIGURDSSON, T.J. et al. Bone morphogenetic protein-2 for peri-implant bone regeneration and osseointegration. **Clin Oral Implant Res**, v.8, n.5, p.367-74, 1997.
- 87 SILVA, C.M.O.M. **Avaliação da ação do alendronato sódico sobre a reparação óssea na ausência dos hormônios ovarianos**. 2000. 102f. Tese (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia

de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos

- 88 SIMINOSKI, K.; JOSSE, R.G. Calcitonin in the treatment of osteoporosis. **Can Med Assoc J**, v.155, n.7, p.962-5, Oct. 1996.
- 89 SIMION, M. et al. Guided bone regeneration using resorbable and nonresorbable membranes: a comparative histologic study in humans. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.11, n.6, p.735-42, 1996.
- 90 STEVENS, A.; LOWE, J.; BANCROFT, J.D. Bone. In: BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. (Ed.). **Theory and practice of histological techniques**. 4. ed. New York: Churchill Livingstone, 1996. Chap.15, p.309-39.
- 91 SWEENEY, T.M. et al. Repair of critical size rat calvarial defects using extracellular matrix protein gels. **J Neurosurg**, v.83, p.710-5, Oct. 1995.
- 92 SZACHOWICZ, E.H. Facial bone wound healing. **Otolaryngol Clin North Am**, v.28, n.5, p.865-81, Oct. 1995.
- 93 TAGA, R.; STIPP, A.C.M. **Manual prático de morfometria ao microscópio óptico: planejamento e desenvolvimento de um experimento**. Bauru:USP/FOB Departamento de Morfologia. 1994. 35p. (Apostila).
- 94 TEITELBAUM, S.L. Bone remodeling and the osteoclast. **J Bone Miner Res**, v.8, suppl.2, p.S523-5, 1993.
- 95 TROUERBACH, W.T. et al. A study of the radiographic aluminum equivalent values of the mandible. **Oral Surg**, v.58, n.5, p.610-6, Nov. 1984.
- 96 URIST, M.R.; STRATES, B.S. Bone morphogenetic protein. **J Dent Res**, v.50, suppl.6, p.1392-406, 1971.
- 97 VIERA, S. **Introdução à bioestatística**. 4. ed. Rio de Janeiro: Campus, 1986. 294p.

- 98 Von WOWERN, N. Bone mineral content of mandibles: normal reference values-rate of age-related bone loss. **Calcif Tissue Int**, v.43, p.193-8, 1988.
- 99 WALLACH, S.; CARSTENS JUNIOR, J.B.; AVIOLI, L.V. Calcitonin, osteoclasts, and bone turnover. **Calcif Tissue Int**, v.47, n.6, p.388-91, 1990. (Comment).
- 100 WEISS, R.E. et al. Calcitonin stimulates bone formation when administered prior to initiation of osteogenesis. **J Clin Invest**. v.68, n.3, p.815-8, Sept. 1981.
- 101 WLODARSKI, K.H.; REDDI, A.H. Alkaline phosphatase as a marker of osteoconductive cells. **Calc Tissue Int**, v.39, n.6, p.382-5, 1986.
- 102 WRONSKI, T.J.; CINTRÓN, M., DANN, L.M. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. **Calcif Tissue Int**. v.43, n.3, p.179-83, 1988.
- 103 YAN, J.; LIANJIA, Y.; WHITE, F.H. An immunocytochemical study of bone morphogenetic protein in experimental fracture healing of the rabbit mandible. **Chin Med Sci J**, v.9, n.2, p.91-5, Jun. 1994.
- 104 ZAIDI, M. et al. Osteoclast function and its control: review article. **Exp Physiol**, v.78, n.6, p.721-39, 1993.
- 105 ZAIDI, M. et al. Role of the endothelial cell in osteoclast control: new perspectives. **Bone**, v.14, n.2, p.97-102, 1993.
- 106 ZELLIN, G.; GRITLI-LINDE, A.; LINDE, A. Healing of mandibular defects with different biodegradable and non-biodegradable membranes: an experimental study in rats. **Biomaterials**, v.16, n.8, p.601-9, 1995.
- 107 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.

Anexo A- Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Animal – São  
José dos Campos

## Anexo B- Análise densitométrica

Tabela 1- Valores obtidos na análise densitométrica das mandíbulas de ratos

Controle (Pb)	Tratamento (Pb)	Controle (Miac)	Tratamento(Miac)
<b>30 dia</b>			
2.23	2.38	2.22	2.32
2.23	2.18	2.26	2.43
2.18	2.22	2.18	2.27
2.17	2.31	2.24	2.38
2.17	2.36	2.27	2.34
<b>70 dia</b>			
2.24	2.36	2.26	2.32
2.23	2.21	2.34	2.46
2.25	2.25	2.31	2.40
2.19	2.36	2.18	2.28
2.20	2.29	2.22	2.18
<b>140 dia</b>			
2.05	2.26	2.17	2.27
2.19	2.30	2.23	2.34
2.23	2.40	2.25	2.44
2.21	2.42	2.22	2.34
2.23	2.28	2.27	2.33
<b>210 dia</b>			
2.15	2.44	2.09	2.42
2.20	2.30	2.16	2.29
2.19	2.27	2.23	2.46
2.21	2.33	2.26	2.44
2.14	2.32	2.13	2.40
<b>280 dia</b>			
2.21	2.31	2.25	2.53
2.22	2.35	2.28	2.53
2.26	2.36	2.35	2.48
2.19	2.31	2.20	2.45
2.26	2.40	2.31	2.56

## Anexo C- Análise histomorfométrica

Tabela 4- Quantificação dos pontos de intersecção das lâminas avaliadas

Controle	Tratamento (Pb)	Tratamento(Miac)
<b>3º dia</b>		
44 49 41 53	4 8 46 9	70 80 78 77
41 20 63 49	20 57 67 52	51 44 34 66
46 19 28 0	69 54 65 54	81 89 84 61
30 38 57 51	54 41 32 52	73 37 41 20
40 31 47 38	50 56 43 64	68 67 62 37
<b>7º dia</b>		
80 84 95 85	89 100 78 79	58 72 49 76
101 95 97 95	95 94 91 86	68 78 84 86
98 90 89 85	93 89 96 91	69 79 86 84
92 93 82 85	98 90 89 89	87 63 78 81
92 90 90 87	96 91 98 97	91 63 89 77
<b>14º dia</b>		
97 79 93 89	97 96 95 96	82 79 79 77
82 95 89 92	81 82 79 73	89 89 80 90
90 98 100 100	99 83 96 97	80 71 81 80
95 96 100 101	90 96 75 94	87 85 72 75
91 92 95 95	91 91 100 94	81 82 68 85
<b>21º dia</b>		
102 96 90 104	90 97 100 95	94 91 95 89
104 96 101 101	99 100 104 100	96 95 89 82
102 100 100 101	103 96 100 93	92 93 102 95
100 102 101 103	100 99 98 99	84 99 100 100
102 98 98 102	94 102 99 98	88 94 96 91
<b>28º dia</b>		
91 101 95 90	96 102 102 97	100 102 92 100
98 96 105 101	101 103 102 102	100 95 104 104
96 102 101 99	103 103 102 102	95 102 88 103
100 101 104 100	101 104 101 104	99 102 99 100
96 100 101 97	102 101 104 105	98 100 95 101

ALMEIDA, J.D. **Comparative study of the effects of calcitonin and *Plumbum metallicum* 30CH in mandibular bone repair of rats.** São José dos Campos, 2001. 129f. Tese (Doutorado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.

### ABSTRACT

*The purpose of this work was to compare the effects of calcitonin and *Plumbum mettalicum* 30CH on guided mandibular bone repair of male rats. We analyzed the mandible of 75 rats, approximately three months old, which were divided into control group, group treated with calcitonin and group treated with *Plumbum mettalicum* 30CH. Each group was composed by 25 animals. A circumscribed bone defect of 4mm diameter was prepared in the mandibular bone, in the angle region. The defect was covered with a PTFE barrier in all animals. The group treated with calcitonin received 2UI/Kg i.m. three times a week and the group treated with homeopathy received three drops diluted in the water every day. Both treated groups began immediately after surgery. The animals were sacrificed after three, seven, 14, 21 and 28 days. Their mandibles were removed, and after routine histological processing they were submitted to densitometric, histological and histomorphometrical analysis. For statistical analysis, ANOVA, Tukey and Scheffé tests ( $p < 0,05$ ) were used. The densitometric analysis showed lower optical density in the group control than in the others, at all periods. Only in the group treated with *Plumbum mettalicum* 30CH, the defects were completely healed at the final observation period. The histomorphometrical analysis showed no statistical difference between control, calcitonin and homeopathy treated groups, however the last one had better results than the one treated with calcitonin. It was concluded that, in circumscribed mandibular defects in male rats, *Plumbum mettalicum* 30CH induces better bone repair than calcitonin.*

*Key words: Calcitonin; bone regeneration; homeopathy; densitometry; histomorphometry.*

Autorizo a reprodução xerográfica deste trabalho.

São José dos Campos, 06 de março de 2001.

---

Janete Dias Almeida