

62808056
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

SÉRGIO LUÍS DA SILVA PEREIRA
CIRURGIÃO-DENTISTA

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

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba-UNICAMP,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Clínica
Odontológica, Área de Periodontia.

P414e
31305/BC

PIRACICABA

-1997-

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

SÉRGIO LUÍS DA SILVA PEREIRA
CIRURGIÃO-DENTISTA

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

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba-UNICAMP,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Clínica
Odontológica, Área de Periodontia.

ORIENTADOR: PROF. DR. SÉRGIO DE TOLEDO

FOP - UNICAMP

PIRACICABA

-1997-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA 7/UNICAMP
Y4192
 V. Es.
 TOMBO BS 31305
 PROC. 281197
☐ ☐ ☐ ☒ ☐
 PREC. R\$ 11,00
 DATA 12/08/92
 N.º CPD

CM-00099581-7

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

P414e Pereira, Sérgio Luís da Silva.
 Efeito da calcitonina de salmão sobre a cicatrização de
 defeitos ósseos : estudo radiográfico e histológico em coelhos /
 Sérgio Luís da Silva Pereira. - Piracicaba : [s.n.], 1997.
 84f. : il.
 Orientador : Sérgio de Toledo.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
 I. Ossos - Defeitos. 2. Coelho como animal de laboratório. 3.
 Calcitonina. 4. Ossos - Regeneração. I. Toledo, Sérgio de. II.
 Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
 Piracicaba. III. Título.

19.CDD - 617.471
 - 619.93
 - 615.31
 - 615.362

Índices para o Catálogo Sistemático

1. Ossos - Regeneração	617.471
2. Coelhos	619.93
3. Drogas sintéticas	615.31
4. Tireóide - Hormônio	615.362



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Mestrado**, em sessão pública realizada em 19/06/97, considerou o candidato aprovado.

1. Sérgio de Toledo

2. Francisco Humberto Nociti Júnior

3. Alvaro Francisco Bosco

“Sejamos como o pássaro pousado
por um instante no ramo mais
frágil que sente tremer o galho,
mas que, no entanto, canta, porque
sabe que tem asas.”

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

- a **DEUS**, pela sua proximidade em todos os passos desta jornada.
- às memórias de meu pai **Edgard** e de meu irmão **Mauro**, pouco conhecidos, mas nunca esquecidos.
- a toda minha família, em especial à juventude de minha mãe **Sarah**, no auge dos seus 70 anos.
- à minha família piracicabana: **Paulo, Salete, Bruno, João Paulo e Pâmela**, pelo aconchego de uma morada.
- aos meus amigos de longa data, **Fior e Giuseppe**, pelo companheirismo de sempre.
- à minha namorada, amiga e companheira **Carla**, pelos momentos em que algumas vezes choramos, outras sorrimos, mas nunca sem a presença do amor.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

- À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, representada pelo diretor Prof. Dr. José Ranali.
- À FAPESP, pelo pleno incentivo científico e financeiro para a elaboração deste trabalho de pesquisa.
- À Profa. Dra. Altair A. Del Bel Cury, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.
- Aos Profs. Tit. da Área de Periodontia: Antonio Wilson Sallum e Sérgio de Toledo, e aos Profs. Drs. Antonio Fernando Martorelli de Lima, Enilson Antonio Sallum e Francisco Humberto Nociti Jr.
- Ao Prof. Dr. Tetuo Okamoto, pelo auxílio na avaliação histológica.
- Ao Prof. Dr. Alvaro Francisco Bosco, pela motivação e amizade.
- Aos amigos do curso de Pós-Graduação em Periodontia: Fernando, Getúlio, Vinícius, Marilene, Júnior, Nascimento e Werther.
- Ao secretário e amigo Paulo José Danelon, pelo auxílio na confecção deste trabalho.
- A Viviane Geraldini, pela pronta atenção nos momentos burocráticos.
- Ao técnico Paulo do Amaral, pelo processamento histológico.
- Ao Toninho e Alexandre, pelo transporte dos animais.
- Ao Sr. Luiz Guedes do Amaral, pelo cuidado e manutenção dos animais.

AO PROFESSOR DOUTOR **SÉRGIO DE TOLEDO**,
PELA COMPREENSÃO E ORIENTAÇÃO MAS , SOBRETUDO,
PELA AMIZADE.

SUMÁRIO

LISTAS	Pág.
I.SIGLAS.....	2
II.GRÁFICOS.....	2
III.TABELAS.....	3
IV.FIGURAS.....	4
RESUMO	6
INTRODUÇÃO	8
REVISÃO DA LITERATURA	
I.REMODELAÇÃO ÓSSEA.....	11
II.CALCITONINA-COMPORTAMENTO QUÍMICO-BIOLÓGICO.....	13
III.CALCITONINA-ESTUDOS EM HUMANOS.....	18
IV.CALCITONINA-ESTUDOS LABORATORIAIS "IN VITRO".....	22
V.CALCITONINA-ESTUDOS LABORATORIAIS "IN VIVO".....	25
PROPOSIÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS	
I.SELEÇÃO DOS ANIMAIS.....	35
II.FASE CIRÚRGICA.....	35
III.DOSAGEM E APLICAÇÃO DA CALCITONINA.....	38
IV.OBTENÇÃO DAS PEÇAS E FIXAÇÃO.....	38
V. OBTENÇÃO DAS RADIOGRAFIAS.....	38
VI.PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	38
VII.AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA.....	39
VIII.PROCESSAMENTO DAS IMAGENS RADIOGRÁFICAS.....	39
IX.QUANTIFICAÇÃO DAS IMAGENS RADIOGRÁFICAS.....	39
X.ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
RESULTADOS	
I.RESULTADOS CLÍNICOS.....	42
A)Observações clínicas.....	42
B)Peso dos animais.....	42
II.RESULTADOS RADIOGRÁFICOS.....	44
III.RESULTADOS HISTOLÓGICOS.....	45
DISCUSSÃO	57
CONCLUSÕES	65
APÊNDICE	67
SUMMARY	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

SIGLAS	SIGNIFICADOS
<i>AMPc</i>	adenosina monofosfato cíclico
<i>ANOVA</i>	analysis of variance
<i>C</i>	coelho
<i>dl</i>	decilitro
<i>DNA</i>	ácido desoxirribonucléico
<i>et al.</i>	e colaboradores
<i>FDA</i>	Food and Drug Administration
<i>Fig.</i>	figura
<i>Figs.</i>	figuras
<i>g</i>	grama (s)
<i>H.E.</i>	hematoxilina e eosina
<i>kg</i>	quilograma (s)
<i>Kv</i>	quilovoltagem
<i>mA</i>	miliamperagem
<i>mg</i>	micrograma (s)
<i>ml</i>	mililitro
<i>mm</i>	milímetro (s)
<i>mm²</i>	milímetros quadrados
<i>n^o</i>	número
<i>N</i>	Newtons
<i>NS</i>	não significante
<i>Pg</i>	picogramas
<i>Rpm</i>	rotações por minuto
<i>RX</i>	raios-X
<i>Tab.</i>	tabela
<i>UI</i>	unidades internacionais

II. GRÁFICOS	Pág.
<i>Gráfico 1. Comparação entre os valores médios dos pesos final e inicial(em g) dos animais do grupo controle, durante o período experimental de 28 dias.</i>	43
<i>Gráfico 2. Comparação entre os valores médios dos pesos final e inicial(em g) dos animais do grupo tratado, durante o período experimental de 28 dias.</i>	43
<i>Gráfico 3. Comparação entre as curvas de redução da área radiolúcida (em mm²) dos defeitos ósseos dos grupos controle e tratado durante o período experimental de 28 dias.</i>	45

III. TABELAS	Pág.
<i>Tab. 1. Valores médios dos pesos inicial e final (em g) dos animais dos grupos controle e tratado obtidos em cada período experimental.</i>	43
<i>Tab. 2. Médias finais das áreas radiolúcidas (em mm²) dos defeitos ósseos dos animais dos grupos controle e tratado, obtidas nos quatro períodos experimentais.</i>	44
<i>Tab. 3. Grupo controle. Distribuição dos animais por período de sacrifício e valores dos pesos (em g) no início e final do experimento.</i>	67
<i>Tab. 4. Grupo tratado. Distribuição dos animais por período de sacrifício e valores dos pesos (em g) no início e final do experimento.</i>	67
<i>Tab. 5. Grupo controle. Média aritmética das quatro medidas da área radiolúcida, realizadas nas radiografias do defeito ósseo nº 1, de dois animais por período.</i>	68
<i>Tab. 6. Grupo controle. Média aritmética das quatro medidas da área radiolúcida, realizadas nas radiografias do defeito ósseo nº 2, de dois animais por período.</i>	68
<i>Tab. 7. Grupo controle. Média aritmética das quatro medidas da área radiolúcida, realizadas nas radiografias do defeito ósseo nº 3, de dois animais por período.</i>	68
<i>Tab. 8. Grupo tratado. Média aritmética das quatro medidas da área radiolúcida, realizadas nas radiografias do defeito ósseo nº 1, de dois animais por período.</i>	69
<i>Tab. 9. Grupo tratado. Média aritmética das quatro medidas da área radiolúcida, realizadas nas radiografias do defeito ósseo nº 2, de dois animais por período.</i>	69
<i>Tab. 10. Grupo tratado. Média aritmética das quatro medidas da área radiolúcida, realizadas nas radiografias do defeito ósseo nº 3, de dois animais por período.</i>	69
<i>Tab. 11. Grupo controle. Média aritmética da soma das médias obtidas em cada período após a avaliação radiográfica I.</i>	70
<i>Tab. 12. Grupo tratado. Média aritmética da soma das médias obtidas em cada período após a avaliação radiográfica I.</i>	70

IV. FIGURAS	Pág.
<i>Fig. 1. Exposição da superfície óssea do fêmur, após divulsão e afastamento cuidadoso do tecido muscular.</i>	36
<i>Fig. 2. Início da criação dos defeitos ósseos com broca esférica de aço nº 6, irrigada diretamente com soro fisiológico.</i>	37
<i>Fig.3. Observação clínica dos defeitos ósseos circunscritos, após o preenchimento natural com coágulo sangüíneo</i>	37
<i>Fig. 4. Traçado do raio lateral direito a partir do centro de defeito até a faixa radiopaca bem definida.</i>	40
<i>Fig. 5. Delimitação e quantificação (em mm²) da área radiolúcida do defeito ósseo circunscrito, realizadas pelo sistema Auto-Cad.</i>	40
<i>Fig. 6. Grupo controle. 7 dias. Pequenas espículas ósseas neoformadas junto à parede lateral da loja cirúrgica.</i>	48
<i>Fig. 7. Grupo controle. 7 dias. Presença de osteoblastos nas bordas das espículas ósseas. (H.E. - 160X)</i>	48
<i>Fig. 8. Grupo tratado. 7 dias. Delgadas trabéculas ósseas, deixando amplo espaço intertrabecular. (H.E. - 63X)</i>	49
<i>Fig. 9. Grupo tratado. 7 dias. Trabéculas ósseas exibindo em suas bordas numerosos osteoblastos. (H.E. - 160X)</i>	49
<i>Fig. 10. Grupo controle. 14 dias. Trabéculas ósseas delgadas e presença de tecido conjuntivo bem vascularizado e rico em fibroblastos. (H.E. - 63X)</i>	50
<i>Fig. 11. Grupo controle. 14 dias. Trabéculas ósseas, exibindo numerosos osteoblastos em suas bordas. (H.E. - 160X)</i>	50
<i>Fig. 12. Grupo tratado. 14 dias. Trabéculas ósseas delgadas, porém bem organizadas ocupando a loja cirúrgica. (H.E. - 63X)</i>	51
<i>Fig. 13. Grupo tratado. 14 dias. Detalhe da figura anterior, mostrando as trabéculas ósseas bem organizadas. (H.E. - 160X)</i>	51
<i>Fig. 14. Grupo controle. 21 dias. Loja cirúrgica ocupada por trabéculas ósseas espessas. (H.E. - 63 X)</i>	52
<i>Fig. 15. Grupo controle. 21 dias. Detalhe da figura anterior, mostrando as trabéculas ósseas espessas. (H.E. - 160X)</i>	52
<i>Fig. 16. Grupo tratado. 21 dias. Loja cirúrgica ocupada por trabéculas ósseas bem organizadas. (H.E. - 63X)</i>	53
<i>Fig. 17. Grupo tratado. 21 dias. Maior aumento da figura anterior, mostrando as trabéculas ósseas bem organizadas. (H.E. - 160X)</i>	53
<i>Fig. 18. Grupo controle. 28 dias. Loja cirúrgica, mostrando a presença de trabéculas ósseas espessas e bem definidas. (H.E. - 63X)</i>	54
<i>Fig. 19. Grupo controle. 28 dias. Detalhe da figura anterior, mostrando trabéculas ósseas bem desenvolvidas. (H.E. - 160X)</i>	54
<i>Fig. 20. Grupo tratado. 28 dias. Loja cirúrgica totalmente preenchida por tecido ósseo bem desenvolvido, com canais medulares definidos. (H.E. - 63X)</i>	55
<i>Fig. 21. Grupo tratado. 28 dias. Maior aumento da figura anterior, evidenciando tecido ósseo bem desenvolvido. (H.E. - 160X)</i>	55

RESUMO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, histológica e radiograficamente, o efeito da calcitonina de salmão sobre a cicatrização de defeitos ósseos circunscritos, criados cirurgicamente em fêmur de coelhos saudáveis. Estes foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle (n=12) e tratado (n=12). O grupo controle não recebeu qualquer substância durante o experimento, enquanto que no grupo tratado foi aplicada dose diária de 2 UI/kg de calcitonina por via intramuscular. Os animais foram sacrificados nos períodos de 7, 14, 21 ou 28 dias após a criação dos defeitos ósseos. As áreas radiolúcidas destes foram medidas, em mm², através de um programa de computador denominado Auto-Cad, demonstrando que estas, em média, foram menores no grupo tratado, mas estatisticamente significantes apenas nos períodos intermediários de 14 e 21 dias.

Histologicamente, aos 7 dias, os defeitos ósseos do grupo tratado apresentaram uma maior neoformação óssea. Aos 28 dias, houve a formação de um osso menos compacto no grupo controle. No entanto, aos 14 e 21 dias, os resultados foram semelhantes entre os dois grupos. Os resultados obtidos neste trabalho possibilitaram inferir que a calcitonina de salmão acelerou o processo de cicatrização óssea em defeitos circunscritos, baseados nas análises radiográficas e histológicas realizadas.

Palavras-chaves: ossos-defeitos - coelho como animal de laboratório - calcitonina de salmão - ossos-regeneração

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O objetivo ideal da terapêutica periodontal é a regeneração das estruturas perdidas pela doença periodontal, preconizando formação de novo cimento, novo ligamento e novo osso alveolar^{46, 74}.

Têm sido preconizadas para o tratamento local das perdas ósseas as seguintes terapêuticas periodontais: curetagem dos defeitos, descontaminação radicular e enxertos ósseos^{13,21,88} associados ou não ao uso de membranas^{14,71,98} e utilização de biomateriais, como hidroxiapatita, tricálcio fosfato e cerâmicas⁴⁰. Mas, devido a resultados controvertidos sobre a eficácia dessas técnicas reconstrutivas^{14,110}, outros recursos vêm sendo utilizados para aumentar a capacidade indutora dos tecidos de suporte, acelerando a proliferação celular e síntese de matriz óssea, como os fatores de crescimento, difosfanatos e calcitonina^{50,57,88}.

A calcitonina, conhecida há mais de trinta anos, consiste em um hormônio polipeptídico secretado pelas células parafoliculares tiroideanas em mamíferos, que causa hipofosfatemia e hipocalcemia^{73,79,103}. É utilizada no tratamento de distúrbios associados à grande reabsorção óssea, como a doença de Paget, osteoporose pós-menopausa e hipercalcemia maligna^{4,10,55,77,98}. A calcitonina pode ser natural ou sintética e os seus meios de aplicação podem ser subcutâneo, retal, nasal e intramuscular, sendo estes dois últimos os mais efetivos^{15,55,76,80,98,102}.

Sua ação consiste na união aos receptores dos osteoclastos, alterando suas estruturas responsáveis diretamente pela reabsorção óssea, as zonas clara e de borda em escova^{53,74}. Seu efeito hipocalcêmico está relacionado à redução do número de osteoclastos e às alterações funcionais nas células clásticas, como redução da motilidade plasmática e interferência nos processos de endocitose, enocitose e interdigitação celular^{8,72,79}. Alguns autores também relataram um efeito anabólico da calcitonina, relacionado ao aumento da atividade osteoblástica e da mineralização do tecido osteóide^{8,28,74,97,115}.

Em vista disto, alguns estudos "in vivo" foram realizados com o objetivo de se avaliar o efeito da calcitonina sobre defeitos ósseos circunscritos, apresentando resultados conflitantes. ZIEGLER & DELLING (1969)¹¹⁴ observaram aumento da osteogênese após aplicação sistêmica de calcitonina, concordando com os achados de outros autores^{20,39,51,114}. Por outro lado, outros autores como FOSTER & KRONMAN (1974)³¹, Mc DAVID et al. (1977)⁵⁶, UBIOS et al. (1991)¹⁰³ e mais recentemente NOCITI Jr. (1997)⁶⁵, não encontraram efeitos significantes quando da utilização do hormônio.

Pelos resultados controversos apresentados na literatura em relação ao potencial osteogênico da calcitonina e pela possibilidade da utilização clínica deste hormônio no tratamento periodontal regenerativo, este trabalho objetiva verificar o efeito anabólico da calcitonina em defeitos ósseos circunscritos.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

Este capítulo tem por objetivo descrever, inicialmente, os fenômenos biológicos da remodelação óssea. Os últimos três tópicos abordam as características farmacológicas do medicamento e a sua ação no metabolismo ósseo, através de uma revisão de estudos em humanos e laboratoriais “in vitro” e “in vivo”.

I) REMODELAÇÃO ÓSSEA

Apesar de sua aparente forma sólida e inerte, o osso é provavelmente o mais dinâmico e complexo dos tecidos conjuntivos do corpo, possuindo, junto com a cartilagem, três funções básicas: suporte mecânico e muscular para locomoção, proteção para órgãos vitais e medula óssea, e reserva metabólica de íons cálcio e fósforo para o organismo⁵⁸.

Cerca de 80% da massa esquelética consiste de osso cortical e 20% de osso trabecular ou medular, tendo este uma área de superfície cinco vezes maior, o que é importante caso se considerem a dinâmica do cálcio e a renovação do osso. A parte orgânica do tecido ósseo é constituída de colágeno tipo I, proteoglicanos, sialoproteína, fosfatase alcalina, osteonectina e osteocalcina, sendo o componente inorgânico formado principalmente pela hidroxiapatita^{9,58}.

Em cortes histológicos do osso, identificam-se três tipos principais de células: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Os dois primeiros surgem de células primitivas no interior do tecido conjuntivo do mesênquima, denominadas células osteoprogenitoras e os osteoclastos são formados a partir de células da medula hematopoiética, os mesmos precursores dos monócitos e macrófagos^{9,61}.

Durante toda a vida, a massa óssea sofre renovação contínua por processos celulares bem regulados de formação e reabsorção, realizados em unidades microscópicas individuais, os osteons. Num certo tempo, estes processos cessam simultaneamente e a condição do tecido ósseo representa o resultado de um balanço

entre eles. Este fenômeno é chamado de “coupling” (emparelhamento) de formação e reabsorção^{9,58,61}.

A reabsorção é a remoção dos componentes minerais e orgânicos da matriz extracelular pela ação direta dos osteoclastos, reguladas por mediadores fisiológicos, patológicos ou farmacológicos, envolvendo basicamente quatro etapas^{9,58,61}.

1) formação de osteoclastos progenitores no tecido hematopoiético, disseminação vascular destas células e geração de pré-osteoclastos restantes e osteoclastos no tecido ósseo.

2) ativação dos osteoclastos na superfície do osso mineralizado. Embora os osteoclastos sejam as principais células reabsortivas, é o osteoblasto que contém os receptores para os principais agentes de reabsorção (paratormônio, eicosanóides, 1,25 dihidroxivitamina D₃ e citoquinas), facilitando o acesso dos osteoclastos na superfície óssea, sintetizando collagenase e plasminogênio que atuam na exposição da matriz mineralizada, e degradando a matriz desmineralizada quando exposta pelos osteoclastos.

3) osteoclastos ativados reabsorvendo o osso e criando cavidades, as lacunas de HOWSHIP, por mecanismos moleculares e bioquímicos complexos, como polarização celular, desenvolvimento de projeções da membrana celular (borda em escova) e produção de enzimas proteolíticas.

4) desativação dos osteoclastos. O período de reabsorção osteoclástica leva cerca de 10 dias. Então, os osteoclastos desaparecem das lacunas, que são ocupadas por células mononucleares, originadas de suas fissões. Os mecanismos responsáveis pela desativação englobam a liberação de fatores de crescimento e íons cálcio e fosfato.

A formação do osso é um processo prolongado que leva meses para ser efetuado através de eventos celulares, incluindo proliferação de precursores dos osteoblastos, ativação quimiotática dos osteoblastos para os sítios do defeito e síntese de colágeno e outras proteínas. As fibrilas de colágeno dispõem-se regularmente e produzem uma

matriz orgânica, denominada tecido osteóide, no interior da qual depositam-se massas amorfas de fosfato de cálcio. Posteriormente, os íons hidróxido e bicarbonato são acrescidos à fase mineral, formando cristais maduros de hidroxiapatita. À medida que o osso completamente mineralizado acumula-se e envolve o osteoblasto, este diminui sua atividade e transforma-se em osteócito. Portanto, a atividade osteoblástica é apenas observada ao longo das superfícies do osso, sejam elas lamelas concêntricas de osso cortical ou lamelas lineares das trabéculas inferiores^{9,61}.

A formação óssea pode ocorrer por ossificação intramembranosa, através do desenvolvimento direto do osso de células mesenquimais ou por ossificação endocondral, através da proliferação de células mesenquimais, condrócitos, hipertrofia e calcificação; a cartilagem calcificada é repostada por osso, que é, então, remodelado. Porém, os tecidos ósseos resultantes são semelhantes, independente do mecanismo de formação⁶¹.

ID)CALCITONINA - COMPORTAMENTO QUÍMICO-BIOLÓGICO

Em 1958, foi evidenciado um hormônio que controlava a hipercalcemia. No entanto, a existência da calcitonina foi reconhecida somente em 1962, quando Copp et al. demonstraram a liberação de uma substância que diminuía o nível plasmático de cálcio após perfusão das glândulas paratireoideanas de cão com sangue hipercalcêmico¹⁹.

A calcitonina é um hormônio polipeptídico circulante secretado a partir de um pré-pró-hormônio de 17.000 daltons nas células parafoliculares ou "C" da tireóide dos mamíferos e nas glândulas ultimobranquiais de pequenos vertebrados. De cadeia simples, a calcitonina é constituída de 32 aminoácidos e tem peso molecular de 3500 daltons. Sua configuração bioquímica consiste de um anel dissulfeto no N-terminal e prolineamida no C-terminal^{1,9,32,58,79,103,109}.

A parte biologicamente ativa da molécula provavelmente reside na sua porção central, embora evidências indiquem a necessidade de toda a cadeia peptídica^{9,103}. A estrutura molecular da atividade da calcitonina ainda não é completamente compreendida, mas parece que a conformação de α -hélix e flexibilidade conformacional são importantes para a atividade do hormônio⁹¹.

A calcitonina endógena circula no plasma em concentrações de 10 a 100 pg/ml e aumenta de 2 a 10 vezes após elevação aguda de apenas 1mg/dl do nível sérico de cálcio. Sua meia-vida é de menos de 1 hora, sendo degradada e depurada pelo rim e excretada via urina⁹.

O papel preciso da calcitonina endógena no metabolismo ósseo ainda não é estabelecido¹⁰⁹. Apesar das incertezas a respeito do seu papel no ser humano, ela é provavelmente um importante regulador do cálcio plasmático nos animais inferiores aquáticos⁹. Nos vertebrados inferiores e nos mamíferos, é possível que a calcitonina desempenhe papel em diversos processos relacionados ao cálcio, como lactação, produção de cascas de ovos e proteção do esqueleto contra a redução de cálcio ocasionada pela gravidez. Portanto, não se pode desprezar a possibilidade da calcitonina participar significativamente da homeostase esquelética, através da regulação do processo de remodelação óssea, estabilizando ou aumentando o conteúdo mineral no osso cortical e medular^{9,82,108}. A elevação dos níveis plasmáticos de cálcio é o principal estímulo para a secreção da calcitonina, no entanto, o grau de resposta observado em diferentes espécies está relacionado à sua necessidade de evitar o desenvolvimento de hipercalcemia⁹.

A massa óssea diminui em pacientes com deficiência de calcitonina congênita ou adquirida, sugerindo uma participação do hormônio na conservação óssea. A calcitonina endógena torna-se importante quando o esqueleto é exposto a fatores que aumentam a reabsorção óssea, tais como excesso de paratormônio no hiperparatireoidismo primário¹⁰⁹; daí, conclui-se que a calcitonina é um antagonista

fisiológico do paratormônio em relação ao cálcio, pois causa hipocalcemia. No entanto, em relação ao fosfato, possui o mesmo efeito hipofosfatêmico, independente da queda de cálcio. O fosfato que abandona o líquido extracelular provavelmente penetra no osso^{9,103,109,115}. Estes efeitos são devidos à inibição óssea osteoclástica e influência na função renal, causando natriúria, fosfatúria e calciúria⁶¹.

A calcitonina tem sido encontrada em mais de 15 espécies de animais, mas somente quatro tipos e um análogo são usados clinicamente: tireoideanas (porcina e humana), sintetizadas em 1968; salmão, sintetizada em 1969; enguia e um análogo, sintetizado em 1975^{79,91}. Em cada espécie ocorre variação considerável da estrutura conformacional, embora a extensão peptídica seja semelhante^{2,9}. A calcitonina de salmão é a forma mais largamente utilizada na terapêutica por ser de 50 a 100 vezes mais potente que a dos mamíferos e por ser ativa no homem^{9,79,91}. A alta efetividade da calcitonina de salmão em relação a do mamífero ocorre por sua meia-vida longa e resistência à degradação pelo plasma e a alta afinidade aparente da calcitonina de salmão para receptores teciduais específicos deve contribuir importantemente para a alta potência do hormônio "in vivo"⁵⁴. Após injeção intramuscular ou subcutânea, a biodisponibilidade da calcitonina de salmão é cerca de 70% e as concentrações plasmáticas máximas são obtidas em uma hora. A meia-vida de eliminação é de 70 a 90 minutos, sendo seus metabólitos excretados até 95% via renal³.

Aprovada como um agente antiresorptivo pela FDA, em 1985, a calcitonina de salmão possui uma sequência de aminoácidos diferente em relação à porcina e à humana, portanto anticorpos específicos desenvolvem-se em proporção significativa de pacientes tratados. Mas controvérsias permanecem na importância funcional destes; alguns autores acreditam que possam causar resistência à calcitonina, enquanto outros afirmam que não há esta relação, pois a resistência à calcitonina ocorre também em pacientes tratados com a calcitonina humana, que não é antigênica^{68,78}.

Por ser rapidamente degradada pelos sucos gástricos, a calcitonina é usualmente administrada por via parenteral, como subcutânea, endovenosa e intramuscular^{3,67}. Estas vias podem propiciar o surgimento de efeitos adversos como náuseas, alergia, ruborização, poliúria, calafrios, reações de hipersensibilidade, taquicardia, hipotensão e colapso após administração a longo prazo e repetidamente. Segundo O'DOHERTY et al. (1990)⁶⁷, estes efeitos desagradáveis, mas suaves e passageiros, apareceram em 77% dos pacientes, sendo severos o suficiente para interromper o tratamento apenas em 15% deles. Mas, segundo WALLACH (1994)¹⁰⁶, exceto pela ocorrência rara de urticária ou reação anafilática, nenhuma toxicidade orgânica de qualquer espécie de calcitonina tem sido relatada.

O surgimento desses efeitos adversos tem limitado o uso da calcitonina por longo tempo, surgindo, portanto, vias alternativas como supositório retal e spray nasal. Como vantagens desta última, temos: a eliminação do desconforto de repetidas injeções, menores reações adversas, efeito analgésico, menor tempo de repouso e manutenção do potencial terapêutico. Alguns autores relataram que a administração nasal melhora consideravelmente a tolerância e aceitação da droga^{11,78,79}, apesar de WIMALAWANSA (1993)¹⁰⁸ afirmar que o grau de absorção pela mucosa nasal para a circulação é variável e o benefício pequeno. No entanto, REGINSTER (1993)⁸¹ demonstrou a geração de anticorpos anti-calcitonina de salmão no plasma e aumentos significantes nos níveis plasmáticos do hormônio após o spray nasal, comprovando sua absorção.

O efeito hipocalcêmico aparece, em média, seis horas após a administração da droga, mas dosagens continuadas diminuem seu efeito, tornando a utilidade clínica da calcitonina limitada porque os pacientes tornam-se refratários ao hormônio após muitos dias, caracterizado pela perda de efetividade da droga. Este fato tem sido denominado "fenômeno de escape" e é atribuído ao hiperparatireoidismo secundário e formação de anticorpos, que neutralizariam a calcitonina^{26,99}; outra atribuição a este

fenômeno está relacionada à saturação dos sítios de ligação da calcitonina na superfície dos osteoclastos, pela diminuição do número e sensibilidade destes receptores^{3,34}. Com frequência, observa-se este “fenômeno de escape” após 12 horas de administração da droga e uma resistência ao hormônio deve ocorrer após 12-18 meses de tratamento continuado⁹. Para atrasar ou evitar esta resistência, foram instituídos esquemas de administração cíclica ou descontinuada³⁴, onde os dias subsequentes da não aplicação da droga devem ser suficientes para recuperar a sensibilidade dos receptores à calcitonina⁷⁸.

A calcitonina age principalmente na prevenção da reabsorção óssea, mas a descoberta da presença de calcitonina em vários locais do corpo, como hipotálamo e em células derivadas da crista neural, que contém aminas neurotransmissoras, levantou a possibilidade dela possuir propriedades analgésicas independentes dos efeitos periféricos no osso^{9,11,32,47}. Estudos afirmam que a calcitonina aumenta os níveis de β -endorfina no plasma, agindo a nível hipotalâmico e/ou pituitário, mas nem sempre esta liberação de endorfina é observada, parecendo haver uma implicação de sexo e/ou dose empregada³².

O principal fator relatado com a atividade hipocalcêmica da calcitonina está diretamente relacionado à sua capacidade de se unir aos receptores localizados na superfície das células reabsortivas, os osteoclastos⁷⁴.

A ligação da calcitonina aos receptores na membrana plasmática é seguida por elevação do nível intracelular de AMPc, o qual funcionaria como 2º mensageiro, iniciando uma parte da ação da calcitonina. Os processos intracelulares subsequentes permanecem obscuros, mas parece que o seqüestro de cálcio nas mitocôndrias com conseqüente redução de sua concentração no citoplasma age como mecanismo para reduzir o efluxo de cálcio das células ósseas para o líquido extracelular⁹. Isto sugere que o AMPc e o cálcio intracelular agem como segundos mensageiros por inibição funcional induzida pela calcitonina^{1,45}.

A ação da calcitonina nos osteoclastos refere-se a alterações morfológicas, quimiotáticas e funcionais. Segundo REGINSTER (1991)⁷⁹, após 30 minutos de administração da droga, a calcitonina, agindo sobre as projeções citoplasmáticas denominadas de bordas em escova e secundariamente na zona clara, faz com que os osteoclastos movam-se em direção contrária e distante da superfície óssea.

A calcitonina possui dois efeitos no comportamento dos osteoclastos, que são distintos e mediados por ativação de sítios separados na membrana dos osteoclastos: efeito "Q" e efeito "R". O efeito "Q", chamado quiescente, dura em média 15 minutos e causa diminuição gradual da motilidade citoplasmática (endocitose, enocitose enzimática e interdigitação celular), enrugamento da margem, migração celular e diminuição da liberação de enzimas pelo movimento granular. O efeito "R", com tempo médio de ação de 27 minutos, causa retração gradual dos pseudópodes, gerando uma redução absoluta da superfície da área para 60% da original, minimizando a superfície de contato entre a célula osteoclástica e o osso^{1,74,79,105,111}. Segundo ZAIDI et al. (1990)¹¹¹, a motilidade e preservação da área de contato são essenciais para a reabsorção óssea.

A calcitonina também reduz o número de osteoclastos por bloqueio da fusão de células mononucleares da medula, progenitoras dos osteoclastos⁷⁹ e causa fissão dos osteoclastos, transformando-os em células mononucleares⁵⁸. No entanto, algumas células mononucleares são reabsortivas¹⁰⁵ e a redução do número de osteoclastos não necessariamente corresponde à diminuição do nível de reabsorção óssea, pois outros potentes inibidores da reabsorção óssea, como os bifosfanatos, aumentam o número destas células, mas estas não são ativas⁷².

Como consequência dessas alterações, possivelmente ocorre interrupção da reabsorção óssea, podendo ocasionar alguma remineralização da superfície exposta, surgindo um osso mais denso com menor número de cavidades de reabsorção^{9,36}. Além

da ação sobre os osteoclastos, a calcitonina parece também estimular a atividade osteoblástica e aumentar a remineralização do tecido osteóide^{97,115}.

III) CALCITONINA - ESTUDOS EM HUMANOS

Administrada primeiramente em humanos no ano de 1966, a calcitonina, por suas propriedades antiosteoclásticas, antiinflamatórias e analgésicas, tem sido amplamente empregada nestes últimos trinta anos para tratamento de distúrbios clínicos e biológicos caracterizados por excessiva remodelação óssea, como osteoporose pós-menopausa, doença de Paget e hipercalcemia maligna^{6,17,47,67,78,79,83,86,104}. Também é um agente ideal para tratamento de outras doenças metabólicas, como mieloma múltiplo, perda óssea provocada por imobilização, distúrbios neurodistróficos e pancreatite aguda^{3,105}, melhorando as anormalidades bioquímicas e histopatológicas⁹⁷.

Dentro do complexo de reabsorção óssea, a calcitonina contrapõe-se à osteólise, mas muitos dos achados do mecanismo de ação foram observados em alto "turnover" ósseo, ou seja, com alto grau de remodelação óssea¹¹⁵. Realmente, segundo GENNARI et al. (1994)³⁵, a calcitonina age mais eficazmente em pacientes com alto "turnover", correspondendo a mais ou menos 30% das pessoas tratadas, ocasionando aumento da massa óssea por 1,5 a 2 anos. Mas, em pacientes saudáveis, onde o "turnover" é balanceado com igual quantidade de formação e reabsorção, estimou-se aumento de osso de 9,1 mg/UI nas primeiras 24 horas, após administração de uma dose única de 50 UI de calcitonina de salmão³⁵. Resultado não compartilhado por THAMSBORG et al. (1993)¹⁰⁰ que, utilizando dose única de 200 UI de calcitonina de salmão, via nasal, não observaram alterações positivas na formação óssea.

O interesse clínico pela calcitonina, principalmente a de salmão, iniciou-se em 1972, quando este peptídeo foi mostrado ser efetivo no tratamento da doença de Paget⁹². Também denominada osteíte deformante, esta doença é uma condição

osteodistrófica comum, caracterizada por osteólise progressiva, seguida por cicatrização óssea desorganizada, classificada radiograficamente como osteoporose circunscrita. A calcitonina de salmão, utilizada no pré-operatório, pode reduzir a vascularidade e a atividade da doença do osso afetado, reduzindo o "turnover" ósseo⁶³ e, durante tratamento crônico, os pacientes adquirem efeitos benéficos, como alívio da dor e reversão de deficiências neurológicas⁹⁵. No entanto, após 06 meses, o hormônio tende a perder sua efetividade em 75% dos pacientes¹⁰¹.

MURPHY & HADDAD (1980)⁶² trataram pacientes com osteíte deformante com doses de 0,5 mg/dia de calcitonina humana por 10 a 45 meses. Análises radiográficas e bioquímicas demonstraram eficiência do hormônio na cicatrização da fase osteolítica da doença.

Em 1982, SPINKS et al.⁹⁶, após acompanhamento por 05 anos de pacientes com doença de Paget tratados com doses diárias de até 10 UI de calcitonina humana sintética, constataram que não houve correlação da redução do grau de "turnover" ósseo com o aumento da massa óssea.

Pacientes com doença de Paget foram tratados com doses únicas de 400 UI, via nasal e 1, 10 ou 1000 UI, via subcutânea. O'DOHERTY et al. (1990)⁶⁷ concluíram que as pequenas doses tiveram efeitos significantes, principalmente em pacientes com pequenos graus de "turnover" ósseo.

NUNZIATA et al. (1993)⁶⁶, tratando 15 pacientes com doença de Paget com calcitonina por três meses, notaram uma redução de 50% na excreção de hidroxiprolina, um dos marcadores bioquímicos de reabsorção óssea e aumento significativo nos níveis de vitamina D.

Pelo fato da calcitonina plasmática ser mais baixa na mulher e declinar com a idade, HEATH & SIZEMORE (1977)⁴² propuseram que este hormônio teria papel-chave na patofisiologia da osteoporose, a qual é estimada ocorrer em 15% das mulheres na fase pós-menopausa; e em 1985, após a publicação de um estudo feito por

WALLACH et al. (1977)¹⁰⁴, a calcitonina foi aprovada pela FDA, nos Estados Unidos, como droga efetiva no tratamento da síndrome osteoporótica. Mas foi no ano de 1992 que houve uma repercussão favorável pela calcitonina como agente terapêutico em distúrbios ósseos, pois vendas mundiais do produto excederam 900 milhões de dólares, sendo 85% destinados a tratamento da osteoporose pós-menopausa¹⁹.

MAZZUOLI et al. (1986)⁵⁵, utilizando injeções intramusculares diárias de 100 UI de calcitonina de salmão no tratamento de mulheres com osteoporose, observaram aumento significativo no conteúdo ósseo. Além do efeito inibidor da reabsorção óssea, acreditou-se na possível estimulação osteoblástica pela calcitonina. REGINSTER (1991)⁷⁹, tratando pacientes osteoporóticos com doses maiores de calcitonina diária (5000 UI) durante dois anos, notou redução da perda óssea lombar. No entanto, apesar da sua propriedade em aumentar ou estabilizar o conteúdo mineral do osso cortical e medular, evitando fraturas vertebrais e de outras regiões, o efeito na formação óssea ocorre temporariamente^{5,11,61}.

OVERGAARD et al. (1993)⁶⁹, em um estudo duplo-cego, analisaram a resposta de diferentes doses de calcitonina de salmão, via intra-nasal, em mulheres osteoporóticas, através de parâmetros de massa óssea e índice de fratura. Houve uma redução deste e também uma resposta dose-dependente relacionada ao hormônio, representada por aumento de 1% no conteúdo ósseo mineral para cada 100 UI de calcitonina.

HODSMAN et al. (1993)⁴³ não encontraram nenhuma alteração nos marcadores bioquímicos de formação (fosfatase alcalina, osteocalcina e procolágeno 1) e somente uma modesta atenuação da reabsorção óssea em pacientes osteoporóticos tratados com calcitonina na dose diária de 75 UI.

Tratamento da osteoporose com pequenas doses intermitentes de calcitonina de salmão (500 mg/dia) mais cálcio durante 36 meses foi preconizado por REGINSTER et al. (1994)⁸³, repercutindo em um aumento da densidade óssea mineral.

REGINSTER et al. (1995)⁸⁴, usando doses cíclicas de 100 ou 200 UI, via retal, em pacientes osteoporóticas, durante 12 meses, inferiram que este tipo de tratamento possibilitou a prevenção da perda óssea pós-menopausa. No mesmo ano, RICO⁸⁵, comparando pacientes osteoporóticos tratados com calcitonina mais cálcio ou cálcio somente, durante 12 meses, concluiu, por densitometria óssea, a efetividade da calcitonina na remodelação óssea cortical e medular.

IV) CALCITONINA - ESTUDOS LABORATORIAIS "IN VITRO"

O mecanismo da reabsorção óssea tem sido extensivamente estudado "in vitro", através de métodos de cultura orgânica de osso fetal e embrião de roedores ou por metodologia mais especializada de isolamento de osteoclastos do tecido ósseo³⁰; esta propicia a análise das células clásticas sem a influência do microambiente do osso, tornando-se um modelo experimental apreciável no estudo da resposta dos osteoclastos a variados estímulos^{30,111}.

Neste tipo de preparação, os osteoclastos permanecem dispersos sobre um substrato plástico ou ósseo. Com esta técnica, CHAMBERS (1982)¹⁸ comprovou uma ação direta da calcitonina no osteoclasto, visualizando um efeito agudo do hormônio. A adição de concentrações de calcitonina de salmão em populações isoladas de osteoclastos de ratos foi seguida de uma transformação no comportamento e características morfológicas destas células. A motilidade cessou, o citoplasma contraiu-se gradualmente e as células adquiriram uma aparência neuronal. Em osteoclastos humanos, a calcitonina, após 30 minutos de administração, também causou alterações morfológicas nos osteoclastos, evidenciadas pela retração da borda em escova, diminuindo a área de contato das células clásticas com o tecido ósseo⁹³.

Outros estudos também comprovaram a ação da calcitonina sobre a redução no número de osteoclastos^{30,63} e na motilidade celular, reduzindo a capacidade reabsortiva destas células^{38,94,105,113}. No entanto, TAKAHASHI et al. (1995)⁹⁹ notaram que as células osteoclásticas recobram sua motilidade citoplasmática e função reabsortiva após 4 a 8 horas de administração do hormônio.

Estudos bioquímicos sobre o efeito da calcitonina sobre o microambiente ósseo também foram realizados, analisando-se a produção de AMPc, o fluxo de cálcio e alterações enzimáticas. Nesse aspecto, vários autores comprovaram o aumento da produção de AMPc pela ação da calcitonina, intensificando, assim, a inibição do processo reabsortivo^{37,64,111}.

O influxo de cálcio com conseqüente aumento de sua concentração no interior dos osteoclastos é responsável pela retração destas células e subseqüente desadaptação da superfície do osso, inibindo o processo de reabsorção^{1,105}. O cálcio extracelular, provocado pelo efluxo de cálcio, também é responsável por suprimir a reabsorção, e por ativar a entrada de cálcio para o interior das células clásticas através da abertura dos canais de cálcio¹⁰⁵. Sob este enfoque, HARELL & EILAM (1979)⁴¹ e EILAM et al. (1980)²² notaram aumento no influxo de cálcio nas células osteoclásticas após administração de calcitonina, reduzindo-se o potencial reabsortivo destas células; resultado também encontrado por outros autores^{1,90}.

No compartimento criado entre o tecido ósseo e as protrusões da borda em escova dos osteoclastos ocorrem processos enzimáticos imprescindíveis para a atividade reabsortiva¹¹². Alguns estudos feitos neste sentido notaram a redução destas enzimas pela ação da calcitonina^{45,112}.

Como pôde ser observado, há uma evidência comprovada da ação inibitória da calcitonina sobre a reabsorção óssea, agindo nas células osteoclásticas. Mas, o papel anabólico da calcitonina é controverso, pois ainda não se definiu sua ação sobre as células formativas, como os fibroblastos e osteoblastos⁶⁴. No entanto, RAO et al.

(1981)⁷⁵ têm reportado que algumas regiões das células osteoblásticas possuem receptores específicos para a calcitonina, sugerindo ação direta parcial nos osteoblastos. Segundo ITO et al. (1987)⁴⁴, a estimulação da formação óssea ocorre quando a calcitonina é administrada antes do início da osteogênese, provocando um aumento no número de células osteoblásticas, que é o determinante primário do grau de formação óssea.

Em 1979, EKELAND & ENGESAETER²³, analisando a influência da calcitonina de salmão na cicatrização de microfraturas em coelhos, observaram 20% a mais de formação óssea em relação ao grupo controle. Mas em 1984, EKELAND et al.²⁴, analisando a influência da dose diária de 3 UI/kg de calcitonina de salmão no metabolismo do colágeno da pele em camundongos, notaram redução na síntese de colágeno após 20 dias de ação do hormônio.

Em 1987, ITO et al.⁴⁴ utilizaram calcitonina em linhagens celulares com capacidade para diferenciarem-se em osteoblastos "in vitro", obtidas de camundongos recém-nascidos. A calcitonina causou um aumento na atividade de fosfatase alcalina, o qual é um marcador enzimático bem conhecido dos osteoblastos, sugerindo que o hormônio estimulou a diferenciação osteoblástica.

FARLEY et al (1989)²⁷ analisaram a ação da calcitonina sobre células osteoblásticas de camundongos, observando efeitos anabólicos induzidos pelo hormônio, como aumento da proliferação osteoblástica e da fosfatase alcalina. Em 1991, este mesmo autor e seus colaboradores demonstraram efeitos similares, agora em células osteoblásticas humanas²⁸.

WALLACH (1990)¹⁰⁵, após ação diária de calcitonina de salmão sobre fragmentos ósseos desmineralizados implantados subcutaneamente em ratos, notou aumento da quantidade de cartilagem e de tecido ósseo formado, bem como remineralização dos fragmentos desmineralizados.

BADURSKI et al. (1991)⁶ observaram crescimento de fibroblastos e formação de colágeno em coelhos, após doses diárias de 2 UI/kg/dia, similar à dose terapêutica humana (1 a 2 UI/kg/dia). Resultados semelhantes foram obtidos por LUPULESCU (1973)⁴⁸ e LUPULESCU & HABOWSKY (1978)⁴⁹, com uma concentração de 64 UI de calcitonina agindo sobre fibroblastos e formação de colágeno em coelhos, e por BUCSI & ASHTON (1994)¹⁶, que também constataram estimulação fibroblástica pelo hormônio.

Em síntese, a diminuição da reabsorção óssea causada pela calcitonina através da ação direta nos osteoclastos causa uma proporcional redução na formação óssea, principalmente em regimes diários prolongados de administração do hormônio²⁹. Porém, em contraste com estas observações, estudos "in vitro" e "in vivo" relatados anteriormente têm mostrado que a calcitonina estimula o crescimento do colágeno e dos tecidos cartilagenoso e ósseo^{6,16,105}. Juntos, estes achados paradoxais sugerem as seguintes hipóteses. A calcitonina exerce duas categorias de efeitos na formação óssea: uma inibição a longo prazo, causada indiretamente pela diminuição da reabsorção óssea e um efeito anabólico direto nas células osteoblásticas²⁹.

V) CALCITONINA - ESTUDOS LABORATORIAIS "IN VIVO"

Em 1967, WASE et al.¹⁰⁷, utilizando altas doses diárias de calcitonina, via subcutânea, por períodos de tempo relativamente longos (até 25 dias), observaram um aumento do desenvolvimento do osso cortical em ossos longos de ratos e coelhos normais, ou seja, sem quaisquer alterações sistêmicas; e MARX et al. (1972)⁵⁴ especularam a possibilidade de estimulação osteoblástica por este hormônio. Outra explicação mais detalhada foi dada por BARON & SAFFAR (1977)⁷ após analisarem a ação da calcitonina sistêmica nas doses de 5 UI/kg/dia em hamsters adultos normais. Constataram, histologicamente, diminuição do números de lacunas de reabsorção não ocupadas pelos osteoclastos, o que caracteriza a chamada fase reversa, transitória entre

a reabsorção e a formação ativa. Conseqüentemente, com a redução desta fase, o período de formação óssea iniciaria mais rapidamente.

A partir destes trabalhos iniciais, vários outros foram conduzidos com o propósito de elucidar a ação da calcitonina no tecido ósseo. Para tal, utilizou-se de diferentes modelos animais e diferentes metodologias: indução de fraturas, imobilização e confecção de defeitos ou ação indireta, por indução de alterações hormonais e medicamentosas^{51,97,109,112}.

Como o presente trabalho baseia-se no estudo da ação da calcitonina sobre defeito ósseo provocado, a revisão deste tópico será enfatizada por investigações desta natureza.

BOURNE (1944)¹² e MELCHER & IRVING (1964)⁵⁹ foram os primeiros autores a introduzirem a metodologia de perfurações ósseas definidas para o estudo da reparação óssea. BOURNE (1944)¹² estudou o reparo de um defeito de 1 mm que abrangia a cavidade medular. A seqüência histológica durante os 14 dias de cicatrização foi marcada pela presença de hemorragia, organização do coágulo, deposição de colágeno, trabeculado osteóide na camada proliferativa do periósteo, fechamento periosteal do defeito e preenchimento deste com osso trabecular.

MELCHER & IRVING (1964)⁵⁹ descreveram um modelo de reparo de um defeito ósseo de 1-2 mm de profundidade, que se comunicava com a cavidade medular. As observações histológicas incluíram a formação de calo subperiosteal, nova formação óssea, calo endosteal para selar o defeito no lado medular, preenchimento do defeito com calo fibroso. O calo subperiosteal foi remodelado e transformado em osso compacto. Os autores não delimitaram o tempo em que estes fenômenos ocorreram.

PALLASCH (1968)⁷⁰ já afirmava que este modelo de defeito circunscrito era ideal para o estudo de diferentes substâncias no curso da cicatrização óssea, pois elimina a interferência de fatores mecânicos, como o deslocamento de fragmentos ósseos. Para tal, este autor provocou um defeito de 2,5 mm de profundidade e 1 mm de

largura pela introdução de uma broca tronco de cone invertido na diáfise da face lateral do fêmur de ratos, até atingir a cavidade medular. Os cortes histológicos analisados microscopicamente demonstraram o preenchimento completo do defeito com calo fibroso no período de 7-14 dias. Este, aos 21 dias, transformou-se em um pequeno e discreto foco de tecido mole. Na 3^a semana o foco coalesceu para formar 2 ou 3 focos largos. No período entre a 6^a e a 12^a semana, os focos transformaram-se em uma cavidade localizada centralmente preenchida com tecido mole e delimitada por um periósteo espesso e uma fina camada endosteal. O reparo ainda é incompleto após 12 semanas, quando se inicia a deposição de osso lamelar.

ZIEGLER & DELLING (1969)¹¹⁴ induziram defeitos ósseos de 0,8 mm de diâmetro no fêmur de ratos tratados com 50 UI de calcitonina, sistemicamente, durante 6 semanas. Os resultados histológicos demonstraram aumento do processo de osteogênese.

MANTZAVINOS & LISTGARTEN (1970)⁵² estudaram o efeito do implante de 0,5 mg/ml (7,2 UI/ml) de calcitonina impregnada com 5% de gelatina. A proposta desta é possibilitar uma liberação lenta do hormônio, estendendo sua ação por um tempo mais longo. Este implante foi colocado na calvaria de ratos normais. Os animais foram sacrificados aos 7, 14, 30 e 60 dias pós-operatório. A análise histológica inferiu transformações significantes no grupo tratado, baseadas na formação de novo osso, depositado sobre o osso lamelar pré-existente e separado deste por uma linha aposicional basofílica distinta. O novo osso apresentava estrutura mais irregular, porém altamente celularizada. Aos 7 dias, numerosos osteoblastos alinhavam-se sobre a superfície óssea, principalmente na região imediatamente abaixo do implante. Aos 14 dias, a atividade osteoblástica aumentada persistiu, resultando, nos períodos finais de 30 e 60 dias, em uma quantidade maior de osso formado no grupo tratado com implante. Como resultado geral, os autores concluíram que a aplicação tópica de

calcitonina possibilitou a estimulação do crescimento ósseo "in vivo", principalmente na periferia do implante.

DELLING & GLUECKSELIG (1971)²⁰ analisaram o potencial osteogênico de 100 UI de calcitonina porcina, via subcutânea, injetada diariamente, no reparo de defeitos ósseos circunscritos de 1,5 mm de diâmetro na tíbia de ratos. Os aspectos histológicos demonstraram uma aceleração da regeneração dos defeitos corticais, representado pela formação de osso trabecular na primeira semana e diminuição dos osteoclastos na superfície periosteal do calo neoformado. Na terceira semana, 76,2% do defeito estava preenchido com calo ósseo no grupo tratado com calcitonina. Após 6 semanas havia osso neoformado nos grupos tratado e controle.

ZIEGLER & DELLING (1972)¹¹⁵, utilizando-se de uma broca dental, confeccionaram defeitos ósseos circunscritos de 1,8 mm de diâmetro na tíbia de ratos, até atingir-se a porção medular. Após administração subcutânea diária de 100 UI de calcitonina porcina, notou-se, histologicamente, que no período de três semanas o preenchimento com calo ósseo (osso esponjoso) foi duas vezes maior em relação ao grupo controle. No período final de seis semanas, o calo ósseo reduziu nos grupos tratado e controle, não havendo diferença histológica entre eles, concluindo que o efeito da calcitonina somente é observada no período crítico de 3-4 semanas.

FOSTER & KRONMAN (1974)³¹ foram os primeiros estudiosos a analisarem o potencial de reparo da calcitonina tópica em alvéolos pós-extração, verificando se o hormônio promoveria ou não uma formação óssea mais acelerada. Para tal, utilizaram lojas cirúrgicas das regiões dos terceiros pré-molares extraídos, em cães, como sítios teste. Estes foram preenchidos com esponja de colágeno embebida em calcitonina (0,8 mg/ml-7,2UI/ml). Cada animal serviu como seu próprio controle, sendo a região do quarto pré-molar designada para tal. Os espécimes foram removidos aos 30 e 60 dias para análise microscópica. Histologicamente, no 30º dia o sítio controle demonstrou presença maior de osso mais maduro e estruturas mais organizadas e numa visão mais

detalhada, osteoblastos e osteócitos e quantidade considerável de tecido osteóide foram observadas. O grupo tratado exibiu proliferação acelerada de osso imaturo com a presença de um número maior de células, porém menos diferenciadas em relação ao grupo controle. Aos 60 dias, os sítios experimentais apresentaram-se altamente trabeculados, fracamente organizados e com mais colágeno em relação ao controle. Portanto, nos sítios teste houve proliferação óssea, mas os sítios controle demonstraram maior quantidade de tecido osteóide e apreciável grau de organização.

Mc DAVID et al. (1977)⁵⁷ avaliaram o efeito da calcitonina aplicada localmente em defeitos ósseos provocados na tíbia de ratos com brocas montadas em alta rotação. Os defeitos, estendidos até a porção medular, foram preenchidos com esponjas de gelfoam embebidas em 0,4 UI de calcitonina de salmão. Após sacrifício aos 2, 4, 8 e 12 semanas, a análise histológica não demonstrou efeito apreciável na cicatrização óssea quando da utilização do hormônio.

GURKAN et al. (1983)³⁹ observaram a ação de injeções diárias de 0,5 UI/kg de calcitonina de salmão, aplicadas subcutaneamente durante 14 e 28 dias, no processo de reparo de alvéolos pós-extração em ratos. As lojas cirúrgicas cicatrizaram-se em 4 semanas nos grupos tratado e controle, não demonstrando participação do hormônio na aceleração do grau de mineralização.

UBIOS et al. (1991)¹⁰³, também em alvéolos pós-extração de ratos, estudaram os efeitos da aplicação intraperitoneal diária de 0,14 UI/100g durante 14 dias, sendo a primeira dose dada logo após a cirurgia. Após o período experimental, as mandíbulas foram analisadas radiograficamente, observando-se uma radiopacidade de quase todo o alvéolo nos grupos tratado e controle. Os defeitos ósseos no grupo tratado com calcitonina foram ocupados por osso trabecular, mas em menor grau em relação ao controle. Este autor concluiu, por parâmetros mais sofisticados, que apesar da calcitonina não estimular a formação óssea, acelerou o processo de cicatrização por estimular a remodelação do tecido ósseo.

NOCITI Jr. (1997) avaliou, histomorfometricamente, o efeito da calcitonina de salmão no processo de reparo de defeitos ósseos provocados em fêmur de coelhos, após a colocação de um implante dental de titânio. Os resultados histológicos foram semelhantes entre os grupos controle e tratado em todos os períodos analisados (7, 14, 21, 28 e 42 dias). Por outro lado, os dados histométricos de neoformação óssea foram significantes para o grupo controle nos períodos de 7 e 14 dias ($p < 0,01$) e aos 42 dias para o grupo tratado ($p < 0,01$).

A periodontite é caracterizada por aumento na reabsorção óssea e decréscimo na formação do tecido ósseo, por estender a duração da fase reversa, que é a intermediária entre a reabsorção e formação, inibindo ou bloqueando a atividade osteoblástica⁸⁷. Partindo-se deste princípio, surgiram, praticamente no final dos anos 70 e início dos anos 80, alguns trabalhos com a finalidade de se estudar a ação da calcitonina na doença periodontal, uma vez que foi postulado que este hormônio poderia retardar a perda óssea, diminuindo a fase reversa²⁵.

EL-KAFRAWY & MITCHEL (1976)²⁵ avaliaram a ação de doses de 0,8 UI/kg de calcitonina porcina em ratos com doença periodontal induzida. As doses foram aplicadas durante um mês, sendo injetadas subcutaneamente apenas durante cinco dias consecutivos de uma mesma semana, preservando, então, um intervalo de dois dias entre cada período. A análise histológica não demonstrou qualquer efeito significativo do hormônio na histomorfologia dos tecidos periodontais e não interferiu positivamente no progresso da doença periodontal, apesar de constatação de seu efeito hipocalcêmico.

Subsequentemente, SHAMASH (1977)⁸⁹ comparou o grau de nova formação óssea na cicatrização de defeitos ósseos após cirurgia periodontal com e sem a aplicação de calcitonina. Para tal, foram criados, cirurgicamente, defeitos ósseos de uma parede na região de pré-molares e molares em macacos Rhesus. Após oito semanas, em cada defeito de um quadrante foi implantado colágeno microcristalino

impregnado com solução gelatinosa de calcitonina porcina (0,36 UI). Nos outros quadrantes, os defeitos foram preenchidos com implante sem calcitonina ou não receberam o implante ou foram controle. Aos 4, 8, 12 e 16 semanas pós-operatório, foi medida a altura do defeito ósseo, a partir da junção cimento-esmalte. Nas 8, 12 e 16 semanas, os tecidos foram analisados microscopicamente. O aspecto histológico demonstrou maior número de osteoblastos e formação de tecido osteóide nos defeitos tratados com calcitonina; no entanto, clinicamente, não houve diferença significativa na altura dos defeitos ósseos entre os grupos controle e tratado com a calcitonina.

Já em 1984, SAFFAR & LASFARGUES⁸⁷ analisaram o efeito da calcitonina de salmão em hamsters, aplicada intraperitonealmente (3,5 UI/kg) durante seis semanas, em um modelo de periodontite induzida. A calcitonina não reduziu significativamente a extensão da reabsorção óssea, mas diminuiu a extensão da fase reversa em 75% ($p < 0,02$), provocando aumento significativo na formação do osso em 400% ($p < 0,03$) em relação ao grupo com periodontite não tratada e em 90 %, comparando-se com o grupo controle (NS).

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, histológica e radiograficamente, a ação da calcitonina de salmão sobre a cicatrização de defeitos ósseos circunscritos, criados cirurgicamente em fêmur de coelhos saudáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

I) SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Para este estudo foram utilizados 24 coelhos fêmeas adultos jovens Nova Zelândia, com 4 meses de idade e peso médio de 2500 g, mantidos em gaiolas com água e ração balanceada à vontade[#], em temperatura ambiente. Os animais foram diferenciados através de demarcações numéricas na parte interna da orelha e divididos aleatoriamente em dois grupos (controle e tratado), sendo cada um deles subdividido em quatro subgrupos de três animais, de acordo com o período previsto para o sacrifício (7, 14, 21 e 28 dias).

II) FASE CIRÚRGICA

Os animais de ambos os grupos foram pesados e de acordo com seus pesos corpóreos, sedados com injeção endovenosa de Urethane* (25%) a 0,8 g/kg. Para tal, após pequena tricotomia na região dorsal da orelha, aplicou-se xilol topicamente com o propósito de dilatação da veia auricular e, através de um dispositivo asséptico conectado a uma seringa descartável, injetou-se lentamente o anestésico.

Após a sedação, procedeu-se à tricotomia da região lateral da coxa, antissepsia com álcool iodado e, com auxílio de um campo fenestrado autoclavado, expôs-se a área a ser operada. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15, fez-se a incisão de aproximadamente 5 cm de extensão no sentido longitudinal do fêmur até a exposição do tecido muscular que, divulsionado, expôs o tecido ósseo. Durante todo o ato cirúrgico, o músculo foi cuidadosamente afastado para proporcionar livre acesso à superfície óssea (Fig. 1).

[#]Purina – São Paulo/SP

*Sigma Chemical - MO - USA

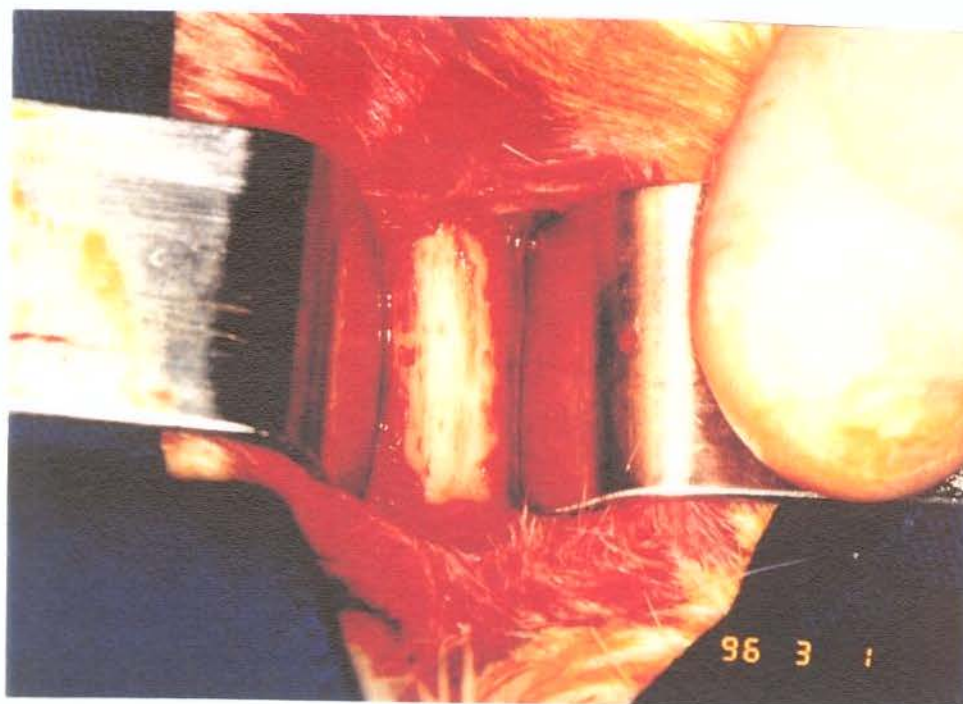


Fig. 1. Exposição da superfície óssea do fêmur, após divulsão e afastamento cuidadoso do tecido muscular.

Utilizando-se de uma broca esférica de aço nº 06 de 1,5 mm de diâmetro, montada em um motor elétrico* de baixa rotação programado para 1500 rpm (Fig. 2), foram realizadas três perfurações em cada fêmur até que a ponta ativa da broca atingisse a cavidade medular (Fig. 3). Durante todo o ato e após a cirurgia, irrigou-se abundantemente a região com soro fisiológico à temperatura ambiente (Fig. 2).

Após o preenchimento dos defeitos com coágulo, o tecido muscular foi recolocado sobre a área operada e suturado em massa com fio de algodão[§] através de sutura contínua. A incisão cutânea foi suturada com pontos interrompidos simples com o mesmo tipo de fio para, então, realizar-se nova antisepsia da área operada com álcool iodado.

*Dentec 405 N

§Sutupark-Ethicon 4-0

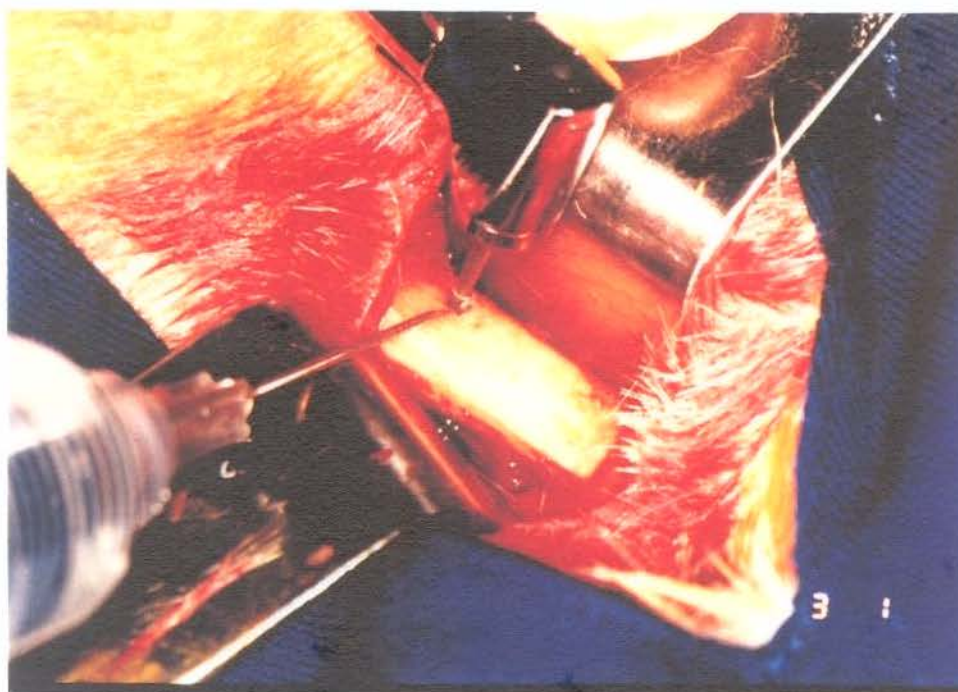


Fig. 2. Início da criação dos defeitos ósseos com broca esférica de aço nº 6, irrigada diretamente com soro fisiológico.

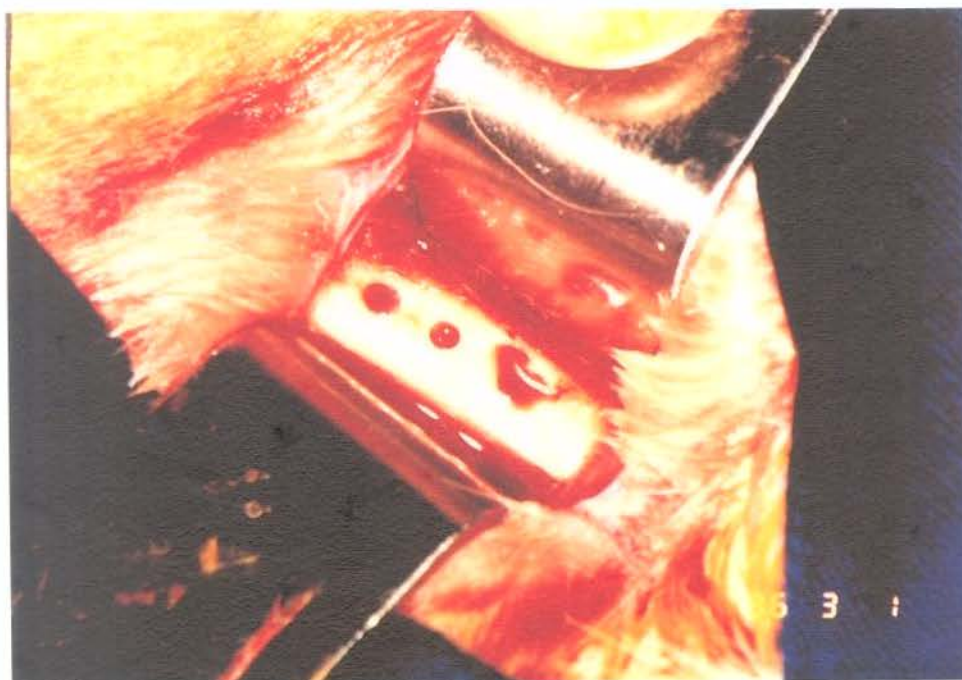


Fig. 3. Observação clínica dos defeitos ósseos circunscritos, após o preenchimento natural com coágulo sangüíneo.

III)DOSAGEM E APLICAÇÃO DA CALCITONINA

Os coelhos do grupo tratado receberam doses diárias de 2 UI/kg de calcitonina de salmão[#], via intramuscular, por até 21 dias, sendo que a primeira dose foi aplicada logo após a cirurgia e as doses subseqüentes ministradas preferencialmente no mesmo horário. Os animais do grupo controle não receberam aplicação de qualquer substância.

IV)OBTENÇÃO DAS PEÇAS E FIXAÇÃO

Os animais foram sacrificados por inalação de éter sulfúrico aos 7, 14, 21 ou 28 dias. Os fêmures foram removidos, seccionando-se as articulações do joelho e quadril, dissecados e mantidos em frascos com formol a 10% durante 24 horas.

V)OBTENÇÃO DAS RADIOGRAFIAS

Após o período inicial de fixação, os espécimes foram radiografados com o feixe de raios-x* incidindo perpendicularmente aos defeitos, mantendo-se uma distância foco-filme[§] de 15 cm, com tempo de exposição de 0,3 segundos. As radiografias foram processadas automaticamente.

VI)PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após serem radiografados, os espécimes foram recolocados na solução fixadora por mais 24 horas, descalcificados em um recipiente contendo uma solução de proporções iguais de ácido fórmico a 50% e citrato de sódio a 20% durante 2 meses, trocando-se a solução a cada quatro dias. Efetuados os procedimentos laboratoriais de rotina, cortes semi-seriados de 6 µm de espessura, seguindo-se o longo eixo do defeito ósseo foram obtidos, corados com H.E. e tricrômico de Masson para, posteriormente, serem analisados por microscopia óptica comum**, com aumentos de 63 X e 160 X .

[#]MIACALCIC - Laboratório Sandoz/SA.

*FUNK RX 10 - 10 mA e 60 KV

[§]KODAK - ultra-speed

**ZEISS, West Germany

VII) AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

A avaliação histológica limitou-se à descrição dos eventos ocorridos nos defeitos ósseos, comparando-se os resultados entre os grupos controle e tratado por período de sacrifício (7, 14, 21 e 28 dias).

VIII) PROCESSAMENTO DAS IMAGENS RADIOGRÁFICAS

As radiografias obtidas foram lidas por um scanner[#] com adaptador para transparência - 2400 DPI, sendo as imagens devidamente identificadas e arquivadas em disquete, com uma ampliação de 4 vezes.

IX) QUANTIFICAÇÃO DAS IMAGENS RADIOGRÁFICAS

As leituras das imagens radiográficas foram feitas em 08 radiografias de cada grupo (controle e tratado), sendo 02 para cada período de sacrifício (7, 14, 21 e 28 dias), num total de 06 defeitos analisados por período. Para tal foi utilizado um computador*, em “software” Auto-Cad[§]. Em cada imagem foi demarcado um ponto fixo, aproximadamente no centro do defeito; a partir deste centro, estendeu-se uma linha reta correspondente ao raio até encontrar uma faixa radiopaca bem definida (Fig. 4). Em seguida, era traçado um círculo, o qual delimitava a área radiolúcida em mm², como observado na Figura 5.

As medidas foram realizadas quatro vezes em cada defeito, a partir de um mesmo ponto fixo pré-determinado, traçando-se o raio em quatro direções: acima, abaixo, direita e esquerda. Destas 4 medidas, obteve-se uma média aritmética da área de cada defeito. Com um total de 06 defeitos medidos para cada período, em ambos os grupos, obtivemos, então, as médias correspondentes por período que foram comparadas entre os grupos controle e tratado.

X) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e aplicado o teste de Tukey para

[#]UMAX UC 1260

^{*}DX4 - 100 Mhz, 16 MB RAM, HARD DISK 850 MB

[§]R12, for DOS, Cad OVERLAY, GSX 4.1

comparação das médias das leituras radiográficas entre os grupos controle e tratado, verificando-se o nível de significância em 5% (vide apêndice).

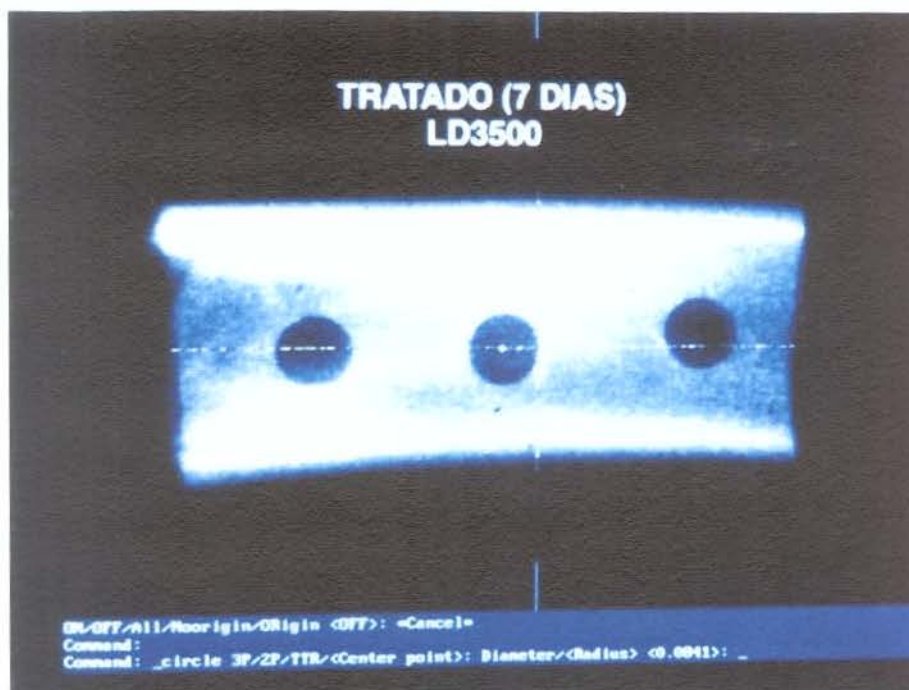


Fig. 4. Traçado do raio lateral direito a partir do centro do defeito até a faixa radiopaca bem definida.



Fig. 5. Delimitação e quantificação (em mm^2) da área radiolúcida do defeito ósseo circunscrito, realizadas pelo sistema Auto-Cad.

RESULTADOS

RESULTADOS

I)ASPECTOS GERAIS

A)Observações Clínicas:

Dos 12 animais do grupo controle, 03 morreram antes do período de sacrifício pré-determinado e 01 foi inutilizado por apresentar fratura nos dois fêmures. No grupo tratado, apenas 01 coelho foi sacrificado antes do período pré-determinado, também pela presença de fratura. Como não houve reposição, o experimento permaneceu com 08 animais no grupo controle e 11 no grupo tratado. Esta distribuição desigual não interferiu com análise estatística dos dados radiográficos, uma vez que os defeitos previamente selecionados foram divididos equitativamente entre os dois grupos.

B)Peso dos animais:

Os valores médios entre os pesos final e inicial dos animais do grupo controle não variou nos períodos de 14 e 28 dias, onde os animais mantiveram seus pesos corpóreos. No entanto, aos 7 e 21 dias, os animais deste grupo apresentaram, em média, perda de peso (Tab. 1). Os animais do grupo tratado, em média, ganharam peso durante os períodos de 21 e 28 dias, permanecendo inalterados os pesos no período de 7 dias, enquanto no de 14 dias houve uma pequena redução (Tab. 1).

Fazendo-se uma análise comparativa da variação média de peso entre os animais dos dois grupos em cada período experimental (Gráficos 1 e 2), podemos notar que houve perda de peso considerável no grupo controle no período de 7 dias, diferentemente da invariabilidade ocorrida no grupo tratado. No período de 14 dias, o peso manteve-se constante no grupo controle, enquanto que no grupo tratado, houve redução praticamente insignificante do peso corpóreo. Aos 21 dias, os animais do grupo tratado ganharam peso, contrariamente à queda considerável deste observada no grupo controle. Finalmente, no período de 28 dias, os animais do grupo tratado ganharam peso, embora em menor grau em relação ao período anterior, ao passo que nos do grupo controle não houve variação de peso.

Tab. 1. Valores médios dos pesos inicial e final (em g) dos animais dos grupos controle e tratado obtidos em cada período experimental.

<i>período</i>	<i>Grupo controle</i>		<i>Grupo tratado</i>	
	<i>peso inicial</i>	<i>peso final</i>	<i>peso inicial</i>	<i>peso final</i>
7 dias	2350 g	2200 g	2733 g	2733 g
14 dias	2350 g	2350 g	2666 g	2633 g
21 dias	2400 g	2250 g	2300 g	2666 g
28 dias	2350 g	2350 g	2650 g	2800 g

Gráfico A. Comparação entre os valores médios dos pesos final e inicial (em g) dos animais do grupo controle, durante o período experimental de 28 dias.

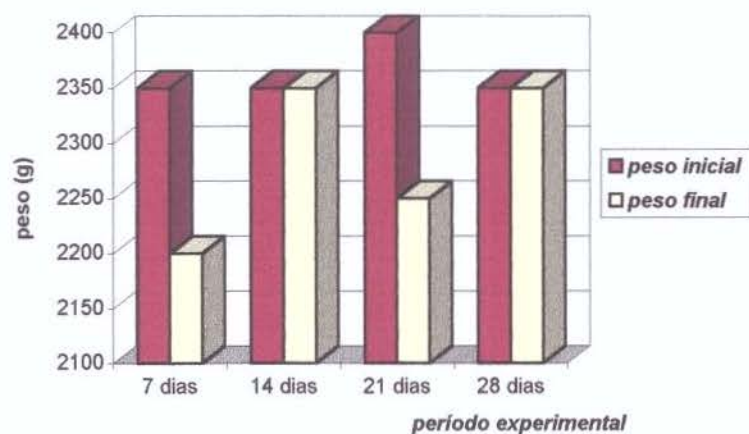
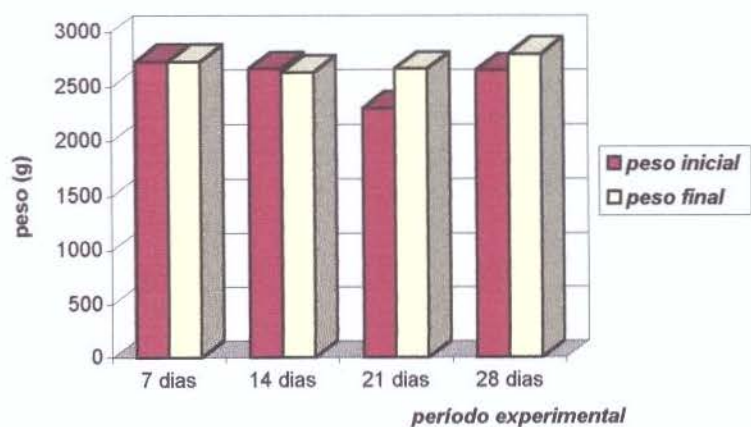


Gráfico 2. Comparação entre os valores médios dos pesos final e inicial (em g) dos animais do grupo tratado, durante o período experimental de 28 dias.



II) RESULTADOS RADIOGRÁFICOS

Fazendo-se uma análise das médias das áreas radiolúcidas (em mm²) dos grupos controle e tratado (Tab. 2), podemos notar que houve uma redução destas do período de 7 para o de 28 dias em ambos os grupos, com picos de área radiolúcida no período intermediário de 14 dias.

Comparando-se os grupos entre si, pôde-se observar que, nos quatro períodos estudados, as médias aritméticas das áreas radiolúcidas do grupo tratado foram sempre menores em relação ao grupo controle. No entanto, esta diferença foi estatisticamente significativa apenas para o período de 14 e 21 dias ($p < 0,05$).

Tab. 2. Médias finais das áreas radiolúcidas (em mm²) dos defeitos ósseos dos animais dos grupos controle e tratado, obtidas nos quatro períodos experimentais.

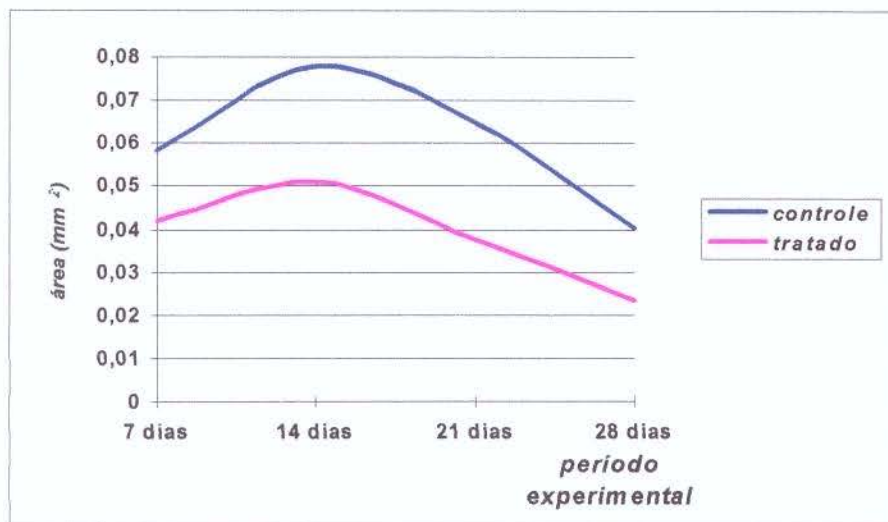
período	grupo controle	grupo tratado
7 dias	0,0582*	0,0421*
14 dias	0,0779**	0,0510**
21 dias	0,0648**	0,0375**
28 dias	0,0401*	0,0234*

*N.S.

** $p < 0,05$

Visualizando-se o gráfico de linhas, relacionando a área radiolúcida (em mm²) com os períodos de sacrifício, observa-se uma curva de redução da área radiolúcida semelhante entre os grupos controle e tratado. No entanto, no período compreendido entre os 7 e 14 dias, a tendência de aumento da área radiolúcida foi menor no grupo tratado, configurando uma curva menos acentuada. Por outro lado, no intervalo compreendido entre os 14 e 21 dias, o grau de redução da área radiolúcida foi maior no grupo controle, o qual pode ser visualizado pelo desenho de uma curva descendente mais acentuada. Esta tendência perdurou até o período final de 28 dias.

Gráfico 3. Comparação entre as curvas de redução da área radiolúcida (em mm²) dos defeitos ósseos dos animais dos grupos controle e tratado durante o período experimental de 28 dias.



III) RESULTADOS HISTOLÓGICOS

PERÍODO DE 7 DIAS

1) Grupo controle:

A loja cirúrgica encontra-se praticamente ocupada por tecido conjuntivo neoformado bem vascularizado e rico em fibroblastos. Pequenas espículas ósseas neoformadas podem ser observadas ao longo das paredes laterais e fundo da loja cirúrgica (Fig. 6), exibindo numerosos osteoblastos em suas bordas (Fig. 7). Nas áreas mais externas, a loja cirúrgica mostra tecido conjuntivo sem diferenciação óssea.

2) Grupo tratado:

A totalidade da loja cirúrgica encontra-se preenchida por tecido conjuntivo neoformado. Ao longo de toda a extensão da loja cirúrgica evidenciam-se delgadas trabéculas ósseas neoformadas (Fig. 8), exibindo numerosos osteoblastos em suas bordas (Fig. 9). Em alguns espécimes, podem ser observadas pequenas áreas junto à superfície externa com tecido conjuntivo sem diferenciação óssea.

PERÍODO DE 14 DIAS

1)Grupo controle:

A totalidade da loja cirúrgica acha-se preenchida por trabéculas ósseas, geralmente delgadas, deixando amplo espaço intertrabecular ocupado por tecido conjuntivo bem vascularizado e rico em fibroblastos (Fig. 10). As trabéculas ósseas mostram em suas bordas numerosos osteoblastos (Fig. 11). Em outros espécimes observam-se, junto às paredes laterais ou fundo da loja cirúrgica, trabéculas ósseas mais desenvolvidas. Entretanto, em alguns espécimes, há presença de poucas trabéculas ósseas junto às paredes laterais da loja cirúrgica.

2)Grupo tratado:

Em sua totalidade, a loja cirúrgica encontra-se ocupada por trabéculas ósseas delgadas, porém mais organizadas em relação àquelas observadas no grupo controle (Figs. 12 e 13). Junto às paredes laterais podem ser observadas, na maioria dos casos, trabéculas ósseas espessas e bem organizadas.

PERÍODO DE 21 DIAS

1)Grupo controle:

A loja cirúrgica encontra-se, na maioria dos casos, totalmente preenchida por trabéculas ósseas bem organizadas (Figs. 14 e 15). Em alguns espécimes, trabéculas ósseas delgadas são observadas junto à área mais superficial, mostrando amplo espaço intertrabecular ocupado por tecido conjuntivo bem desenvolvido.

2)Grupo tratado:

A totalidade da loja cirúrgica acha-se preenchida por trabéculas ósseas bem organizadas (Figs. 16 e 17), mostrando, praticamente, as mesmas características observados no grupo controle. Em alguns casos, no entanto, observam-se ao longo da loja cirúrgica, trabéculas ósseas mais espessas com canais medulares reduzidos.

PERÍODO DE 28 DIAS

1)Grupo controle:

A loja cirúrgica acha-se, em sua totalidade, preenchida por trabéculas ósseas espessas e bem definidas (Figs. 18 e 19). Em alguns pontos, no entanto, podem ser observadas áreas ocupadas por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea, notadamente próxima à superfície externa.

2)Grupo tratado:

Em todos os espécimes observam-se as lojas cirúrgicas totalmente preenchidas por trabéculas ósseas bem desenvolvidas e com canais medulares definidos apresentando, entretanto, aspecto ósseo mais compacto em relação ao grupo controle (Figs. 20 e 21).



Fig.6. Grupo Controle. 7 dias. Pequenas espículas ósseas neoformadas (E) junto à parede lateral (P) da loja cirúrgica (H.E. - 63X).

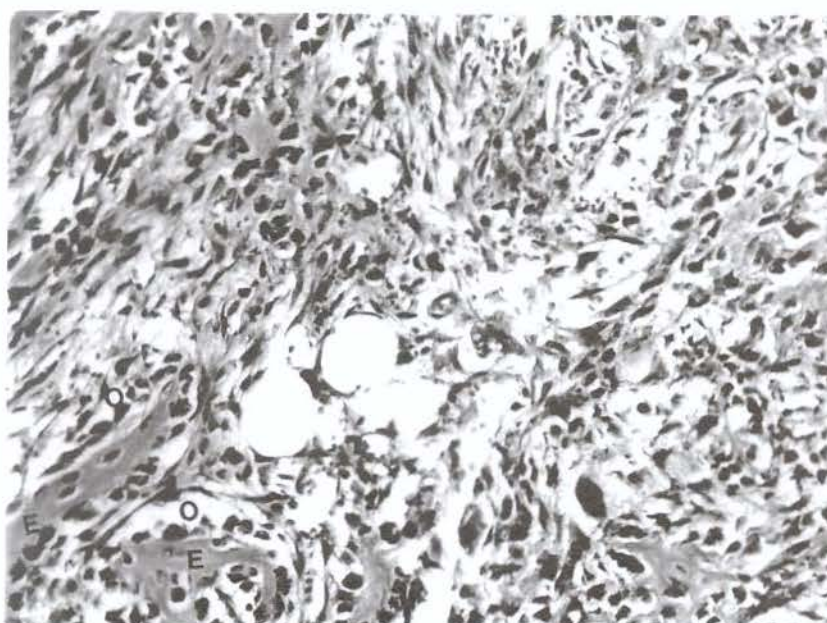


Fig.7. Grupo Controle. 7 dias. Presença de osteoblastos (O) nas bordas das espículas ósseas neoformadas (E). (H.E. - 160X)



Fig.8. Grupo Tratado. 7 dias. Delgadas trabéculas ósseas (T), deixando amplo espaço intertrabecular (I). (H.E. - 63X)

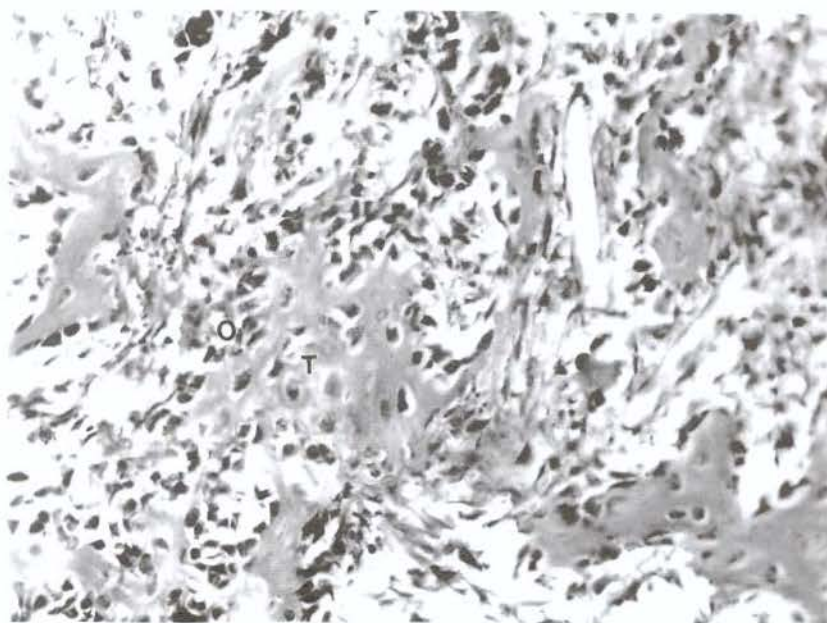


Fig. 9. Grupo Tratado. 7 dias. Trabéculas ósseas (T) exibindo em suas bordas numerosos osteoblastos (O). (H.E. - 160X)



Fig. 10. Grupo Controle. 14 dias. Trabéculas ósseas delgadas (T) e presença de tecido conjuntivo (C) bem vascularizado e rico em fibroblastos. (H.E. - 63X)

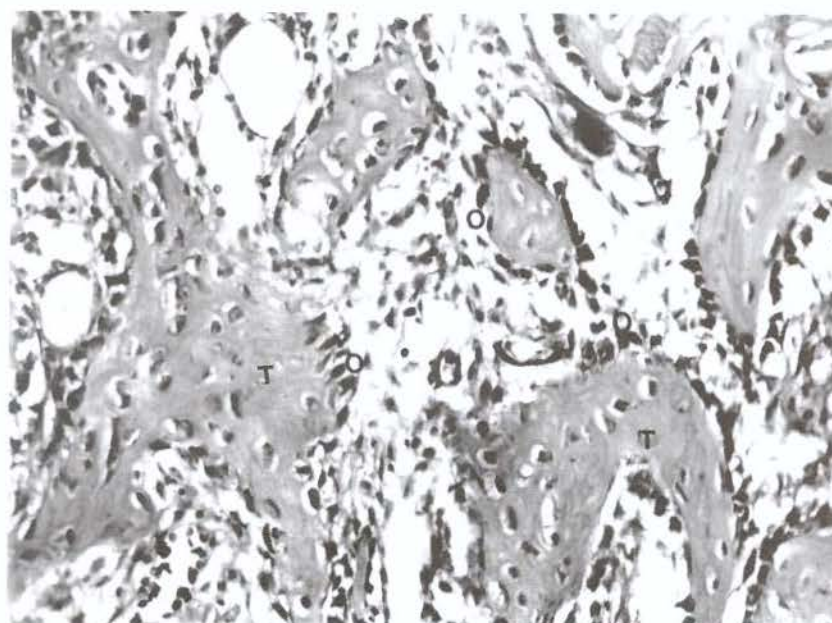


Fig. 11. Grupo Controle. 14 dias. Trabéculas ósseas (T), exibindo numerosos osteoblastos (O) em suas bordas (H.E. - 160X)

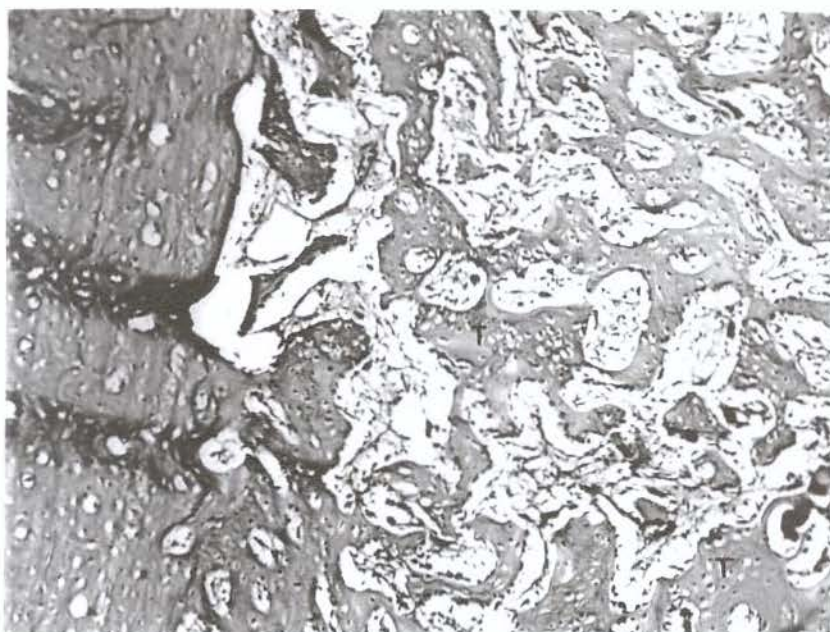


Fig. 12 . Grupo Tratado. 14 dias. Trabéculas ósseas delgadas (T), porém bem organizadas, ocupando a loja cirúrgica.(H.E. - 63X)



Fig. 13. Grupo Tratado. 14 dias. Detalhe da figura anterior, mostrando as trabéculas ósseas bem organizadas (T). (H. E. - 160X)

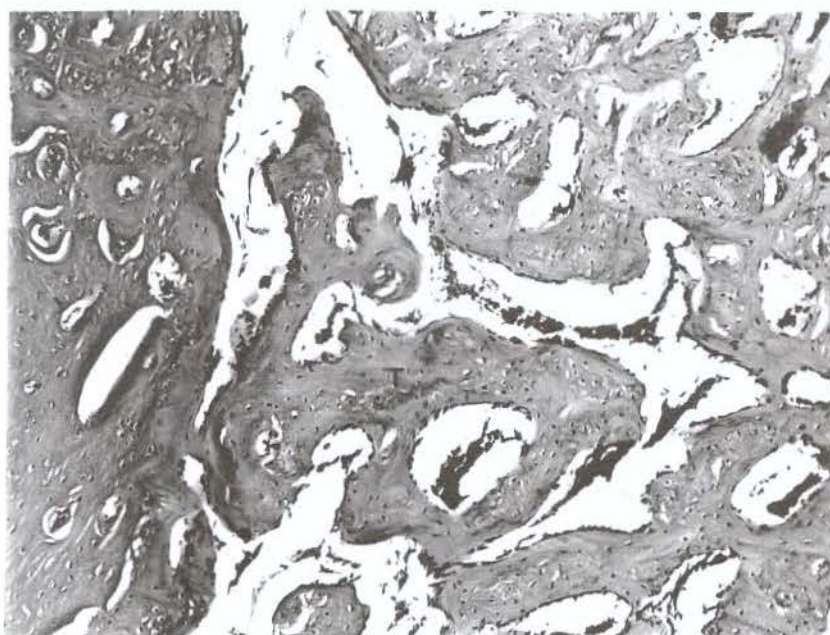


Fig. 14. Grupo Controle. 21 dias. Loja cirúrgica ocupada por trabéculas ósseas espessas (T). (H.E. - 63X)



Fig. 15. Grupo Controle. 21 dias. Detalhe da figura anterior, mostrando as trabéculas ósseas espessas (T). (H.E. - 160X)

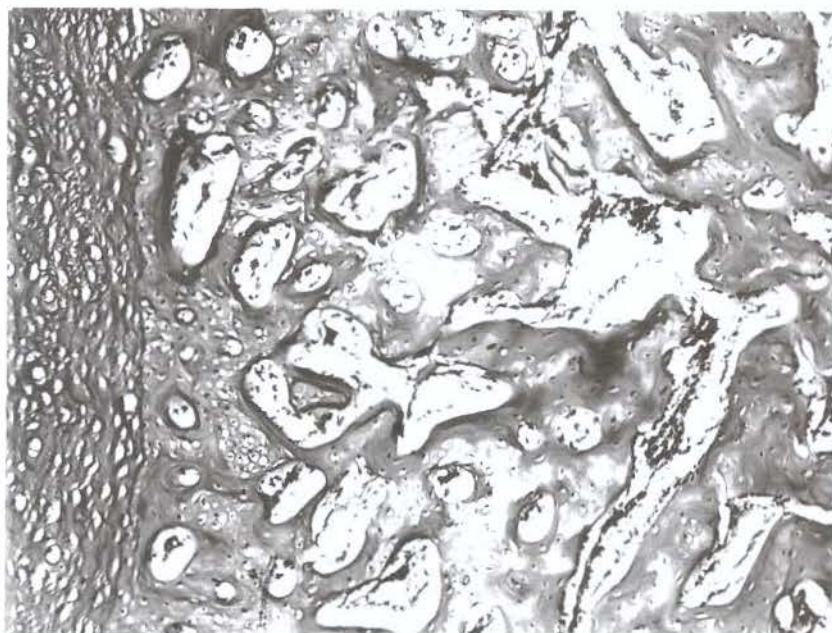


Fig. 16. Grupo Tratado. 21 dias. Loja cirúrgica ocupada por trabéculas ósseas bem organizadas (t). (H.E. - 63X)



Fig. 17. Grupo Tratado. 21 dias. Maior aumento da figura anterior, mostrando as trabéculas ósseas bem organizadas (t). (H.E. - 160X)



Fig. 18. Grupo Controle. 28 dias. Loja cirúrgica, mostrando a presença de trabéculas ósseas espessas e bem definidas (t). (H.E. - 63X)



Fig. 19. Grupo Controle. 28 dias. Detalhe da figura anterior, mostrando trabéculas ósseas bem desenvolvidas (t). (H.E. - 160X)



Fig. 20. Grupo Tratado. 28 dias. Loja cirúrgica totalmente preenchida por tecido ósseo bem desenvolvido (**W**), com canais medulares definidos (**m**). (H. E. - 63X)

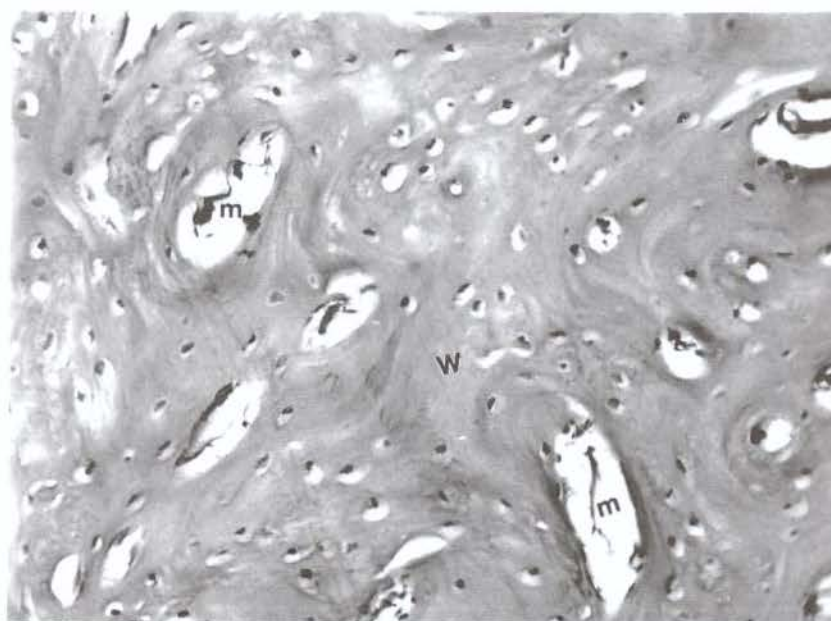


Fig. 21. Grupo Tratado. 28 dias. Maior aumento da figura anterior, evidenciando tecido ósseo bem desenvolvido (**W**) e a presença de canais medulares definidos (**m**). (H.E. - 160X)

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A calcitonina é encontrada em diversas espécies, mas a de salmão é a mais utilizada⁹¹ devido a algumas características que a tornam altamente potente: meia-vida longa, resistência à degradação plasmática e grande afinidade para receptores específicos^{9,54,79,91}.

As vias e os tempos de administração da calcitonina, bem como as doses utilizadas ainda são controversos na literatura.

De acordo com O'DOHERTY et al. (1990)⁶⁷, devido à degradação plasmática da calcitonina pela ação dos sucos gástricos, ela é administrada via parenteral: subcutânea, endovenosa ou intramuscular. Apesar de efeitos adversos como náuseas, calafrios, alergia e ruborização terem sido relatados^{2,3,67}, WALLACH (1994)¹⁰⁶ afirma que não ocorre toxicidade orgânica após administração da calcitonina, mas apenas raras reações de hipersensibilidade, que estão mais diretamente veiculadas à administração endovenosa². Por estas razões, alguns autores sugerem o uso da calcitonina na forma de "spray" nasal, o que melhoraria a tolerância orgânica à droga^{11,80}, apesar de WIMALAWANSA (1993)¹⁰⁸ afirmar que a administração nasal reduz o potencial terapêutico da droga. No presente trabalho esses efeitos adversos não foram notados.

No presente trabalho utilizamos a calcitonina de salmão, via intramuscular, pela facilidade de aplicação da droga e melhor controle da dosagem, uma vez que a leitura da mesma era realizada diretamente na seringa para insulina. Outro fator relevante na escolha da via de administração seria a dificuldade de se realizar a aplicação via nasal em animais.

Com relação à dosagem diária de calcitonina administrada em coelhos, por via intramuscular, há divergências entre os autores. REGINSTER et al. (1992)⁸⁰ fizeram uso de 1 UI/kg; LUPULESCU (1973)⁴⁸ e LUPULESCU & HABOWSKY (1978)⁴⁹ administraram 64 UI/kg, BADURSKI et al. (1991)⁶ e NOCITI Jr. (1997)⁶⁵ utilizaram a

dosagem de 2 UI/kg. No presente trabalho, seguiu-se a dose preconizada por BADURSKI et al. (1991)⁶ de 2 UI/kg, via intramuscular, o que corresponde à dosagem terapêutica em humanos.

Com relação ao tempo de administração da droga, alguns autores relataram perda de efetividade da calcitonina após dosagens continuadas devido ao chamado “fenômeno de escape”^{26,99}, causado pelo hiperparatireoidismo secundário, formação de anticorpos⁹⁹ e saturação dos sítios de ligação da calcitonina na superfície dos osteoclastos³⁴.

REGINSTER et al. (1992)⁸⁰, utilizando doses diárias de calcitonina em coelhos durante seis semanas, observaram a produção de anticorpos específicos contra a calcitonina, mas estes não diminuíram o efeito do hormônio. Em nosso estudo, como aplicamos a calcitonina por um período de até 21 dias, como proposto por LUPULESCU (1973)⁴⁸, acreditamos que não tenha ocorrido resistência à droga ou perda de sua efetividade pela ação de anticorpos, pois segundo BERNE & LEVY (1990)⁹, essa resistência à calcitonina deve ocorrer somente após 12 a 18 meses de tratamento continuado.

FREED et al. (1979)³³ afirmaram que a calcitonina causa perda de apetite durante 24 horas em animais. E, realmente, para NOCITI Jr. (1997)⁶⁵, os coelhos que receberam calcitonina de salmão perderam peso durante o experimento e esta redução foi estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Entretanto, estes resultados discordam dos encontrados por EL-KAFRAWY & MITCHEL (1976)²⁵ e GURKAN et al. (1983)³⁹, que não verificaram perda de peso em animais que receberam a droga e, sim, ganho de peso durante o experimento. Concordando com estes autores, a maioria dos coelhos tratados com a calcitonina neste estudo, ganharam peso durante o período experimental, sendo observado perda de peso em apenas um animal. Este fato talvez possa ser explicado pelos efeitos analgésicos da calcitonina, relatados por alguns autores, como BERNE & LEVY (1990)⁹, FRANCESCHINI et al.

(1993)³², BODY (1994)¹¹ e KUSHIDA (1994)⁴⁷, o que pode ter favorecido a alimentação dos animais, por apresentarem um pós-operatório mais favorável.

Esse fato pode ser explicado também a partir dos relatos de FREED et al. (1979)³³ que, avaliando os efeitos de diferentes intervalos de tempo de administração da calcitonina sobre a alimentação, concluíram que o ponto máximo de anorexia ocorria quando as aplicações eram dadas de 4 a 8 horas antes da alimentação dos animais. Ou seja, os horários próximos à alimentação não eram afetados. Neste trabalho, cremos que não houve este efeito adverso, uma vez que a ração era sempre complementada duas vezes ao dia e as aplicações feitas sempre no mesmo horário.

As limitações das imagens radiográficas não nos possibilitam afirmar com exatidão os resultados histológicos, mas nos dão idéias dos fatos histologicamente correlacionados. Algumas das limitações na análise dos resultados radiográficos baseiam-se na sua característica bidimensional, não possibilitando a observação do fechamento vertical do defeito criado, limitando-nos à avaliação da redução horizontal da área radiolúcida.

Outro fato a ser explorado é o método de medição utilizado. O programa de computador Auto-Cad possibilita a medição de uma área circular regular e bem delimitada. No período inicial de 7 dias, o defeito ainda apresentava-se radiolúcido, com formato circular e nitidamente demarcado, o que favoreceu uma medição mais precisa. Por outro lado, a partir do 14º dia até o período final de 28 dias, as limitações deste método foram crescentes, uma vez que a área radiolúcida tornava-se mais irregular.

Portanto, para minimizar o erro de medição intra-examinador, propusemos medir quatro vezes cada defeito, traçando-se os raios nos sentidos horizontal (esquerdo e direito) e vertical (acima e abaixo). O raio era traçado partindo-se do centro do defeito, previamente estabelecido pelo examinador e seguia uma das direções

anteriormente citadas até que encontrasse uma faixa radiopaca bem delimitada. Isto feito, a área circular radiolúcida era determinada pelo computador em mm^2 .

Incontestavelmente, neste método de medição, áreas radiopacas e radiolúcidas eram desprezadas ou incluídas, principalmente nos defeitos mais tardios e irregulares, onde pontos radiopacos estavam presentes na área central. Acreditamos que as medições com diferentes raios minimizaram os erros de medida, decorrentes das limitações do sistema utilizado, embora este seja relativamente novo na Odontologia, não havendo, portanto, trabalhos relatados na literatura que possam comprovar a sua eficiência. Mas, com o aperfeiçoamento deste programa, ajustando-o ao objetivo da pesquisa proposta, talvez possibilite uma precisão maior na mensuração da perda óssea radiográfica, substituindo aparelhos de medição mais mecânicos, como o planímetro polar. Por outro lado, dentro das limitações propostas pelo sistema Auto-Cad, pudemos perceber resultados radiográficos estatísticos significantes no grupo tratado em relação ao controle, no que diz respeito à redução da área radiolúcida, nos períodos intermediários de 14 e 21 dias.

Os resultados histológicos deste trabalho basearam-se na análise qualitativa da cicatrização de um defeito ósseo circunscrito provocado, semelhante à metodologia introduzida por BOURNE (1944)¹² e MELCHER & IRVING (1964)⁵⁹. E, segundo PALLASCH (1968)⁷⁰, este tipo de defeito é ideal para o estudo da ação de diferentes substâncias no processo de cicatrização óssea, pois a manutenção do coágulo sanguíneo torna-se um parâmetro confiável para a comparação com os grupos teste.

Em relação ao grupo controle, os aspectos histológicos descritos seguiram as características normais de cicatrização óssea em defeitos circunscritos, como descrito por diversos autores, dentre eles BOURNE (1944)¹², MELCHER & IRVING (1964)⁶⁰, PALLASCH (1968)⁷⁰ e ZIEGLER & DELIING (1972)¹¹⁶.

Comparando-se os resultados entre os grupos controle e tratado no período de 7 dias, pudemos notar uma diferença na quantidade de tecido ósseo neoformado, onde o

número de trabéculas ósseas foi maior no grupo que recebeu a calcitonina em relação ao pequeno número de espículas ósseas neoformadas encontradas no grupo controle. Estes achados estão de acordo com os relatos de DELLING & GLUECKSELIG (1971)²⁰, que demonstraram a formação de grandes quantidades de osso trabecular, já na primeira semana, em defeitos ósseos circunscritos no fêmur de ratos, que receberam injeção diária de calcitonina. Uma hipótese para a aceleração da neoformação óssea é dada por BARON & SAFFAR (1977)⁷, que relataram ser a inibição da fase reversa pela calcitonina responsável pelo início mais rápido da fase formativa. Por outro lado, NOCITI Jr. (1997)⁶⁵, analisando a influência da calcitonina de salmão no processo de reparo de defeitos ósseos, em fêmur de coelhos, após a colocação de um implante de titânio, não constatou efeito favorável do hormônio.

Aos 14 dias, os defeitos do grupo controle estavam preenchidos totalmente por trabéculas ósseas delgadas, porém menos organizadas em relação ao grupo tratado, contradizendo os resultados de UBIOS et al. (1991)¹⁰³, onde a quantidade de osso trabecular foi maior no grupo que não recebeu a calcitonina. Ainda em relação a este período, os relatos de Mc DAVID et al. (1977)⁵⁶ e de GURKAN et al. (1983)³⁹ não encontraram resultados positivos no grau de cicatrização óssea após a administração do hormônio.

Já no período de 21 dias, os resultados histológicos dos grupos controle e tratado assemelharam-se, ou seja, ambos apresentaram um trabeculado ósseo espesso e bem organizado, preenchendo totalmente a loja cirúrgica. No entanto, para ZIEGLER & DELLING (1972)¹¹⁵, a administração subcutânea diária de 100 UI de calcitonina em ratos ocasionou, ao final de 21 dias, um preenchimento ósseo do defeito duas vezes maior em relação ao do grupo controle.

No período final de 28 dias, a semelhança histológica entre os dois grupos foi evidente, onde toda a loja cirúrgica foi preenchida com um trabeculado ósseo espesso, organizado e bem desenvolvido. Entretanto, FOSTER & KRONMAN (1974)³¹

observaram que a aplicação tópica de calcitonina em alvéolos pós-extração em cães resultou, ao final de 30 dias, em um osso imaturo, mais celularizado e menos organizado, discordando dos relatos de MANTZAVINOS & LISTGARTEN (1970)⁵², os quais concluíram que a aplicação do hormônio estimulou a formação de uma quantidade maior de tecido ósseo.

Ainda com relação ao período final de 28 dias, vale ressaltar que o grupo tratado apresentou um tecido ósseo mais compacto, com menos canais medulares. Esta maior densidade óssea pode ser explicada pelos relatos de GIDEON & MARTIN (1981)³⁶ e BERNE & LEVY (1990)⁹, baseando-se no princípio de que a ação inibitória da calcitonina sobre osteoclastos concorreria para a formação de um osso com menos cavidades de reabsorção e, conseqüentemente, mais denso.

Fazendo-se uma análise da ação da calcitonina de salmão sobre os defeitos ósseos dentro de todo o período experimental, podemos ressaltar que o efeito do hormônio ocorreu principalmente no período inicial de 7 dias, apresentando uma maior neoformação óssea em relação ao grupo controle, possibilitando a formação de um tecido ósseo mais compacto no período final de 28 dias. Por outro lado, nos períodos intermediários de 14 e 21 dias, praticamente não houve diferença qualitativa entre os grupos. Isto nos leva a crer que a ação do hormônio ocorreu na primeira semana, onde há maior grau de remodelação óssea, concordando com os resultados de diversos autores, que relataram ser a efetividade do hormônio proporcional ao grau de "turnover" ósseo^{6,17,35,47,78,79,115}. Nos períodos mais tardios, a efetividade do hormônio pode ter sido reduzida, corroborando com os resultados de outros autores^{26,34,99}.

A definição sobre a efetividade da calcitonina na cicatrização óssea é limitada pois os estudos divergem em relação à metodologia, variando o modelo experimental, as doses empregadas, bem como a via e o tempo de administração da droga. No entanto, tomando-se como base os trabalhos "in vitro" e "in vivo" citados anteriormente, podemos admitir que a calcitonina exerce, por um tempo limitado, um

efeito anabólico direta ou indiretamente sobre o tecido ósseo, uma vez que sua ação reside comprovadamente sobre os osteoclastos^{30,38,63,94,105,113} e, em menor grau, sobre os osteoblastos^{27,45,75}.

Partindo-se desse princípio, parece lícito afirmar que estudos sobre substâncias que estimulem o crescimento do tecido ósseo devem ser testadas cientificamente, pois parece ser o de menor expectativa de neoformação quando do emprego de técnicas periodontais regenerativas^{14,110}. Poucos estudos sobre o ação da calcitonina em defeitos periodontais foram realizados^{25,87,89}, não propiciando uma conclusão efetiva. Talvez estudos mais controlados do uso da calcitonina associado às técnicas regenerativas que permitam a manutenção do coágulo sanguíneo no defeito, possam aumentar as perspectivas de regeneração periodontal.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1) Os defeitos ósseos dos coelhos tratados com a calcitonina apresentaram, em média, uma menor área radiolúcida, com resultados estatísticos significantes nos períodos de 14 e 21 dias ($p < 0,05$).

2) Os defeitos ósseos dos coelhos tratados com a calcitonina demonstraram uma maior neoformação óssea no período de 7 dias, com semelhança histológica entre os grupos nos períodos de 14, 21 e 28 dias.

3) Os defeitos ósseos dos coelhos tratados com a calcitonina, embora semelhantes aos do grupo controle, mostraram um osso mais compacto, caracterizado pela presença de canais medulares reduzidos, ao final do período de 28 dias.

APÊNDICE

APÊNDICE

Tab. 3. Grupo controle. Distribuição dos animais por períodos de sacrifício e valores dos pesos (em g) no início e final do experimento.

nº C	identificação	grupo	peso inicial	peso final
1	G2-or.esq./dir.	7 dias	2400 g	2100 g
2	G2-or.esq.	7 dias	2300 g	2300 g
3	G2	14 dias	2300 g	2500 g
4	G2-or.dir.	14 dias	2400 g	2200 g
5	G1-or.dir.	21 dias	2400 g	2200 g
6	G1	21 dias	2400 g	2300 g
7	G1-or.esq.	28 dias	2300 g	2200 g
8	Focinho preto	28 dias	2400 g	2500 g

Tab. 4. Grupo tratado. Distribuição dos animais por períodos de sacrifício e valores dos pesos (em g) no início e final do experimento.

nº C	identificação	grupo	peso inicial	peso final
1	LD 3500	7 dias	2800	2800
2	B 1376	7 dias	2700	2700
3	D 1385	7 dias	2700	2700
4	LD 1616	14 dias	2500	2600
5	LD 1602	14 dias	2500	2500
6	B 1402	14 dias	3000	2800
7	LD 1606	21 dias	2400	2900
8	LD 1643	21 dias	2200	2600
9	LD 1605	21 dias	2300	2500
10	LD 1621	28 dias	2400	2500
11	LD 085	28 dias	2900	3100

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA I - GRUPO CONTROLE

Tab. 5. Grupo controle. Média aritmética das quatro medidas da área radiolúcida, realizadas nas radiografias do defeito ósseo nº 1, de dois animais por período.

ANIMAL	PERÍODO	DEFEITO 1				TOTAL	MÉDIA
		M1	M2	M3	M4		
G2 - OR.ESQ. (d)	7 d	0,0301	0,0351	0,0304	0,0351	0,1307	0,032675
G2 - OR.ESQ. (e)	7 d	0,0940	0,0837	0,0785	0,0646	0,3208	0,0802
G2	14 d	0,0837	0,0786	0,0837	0,0939	0,3399	0,084975
G2 - OR.DIR.	14 d	0,0887	0,0692	0,0602	0,0786	0,2967	0,074175
G1	21 d	0,0520	0,0407	0,0372	0,0223	0,1522	0,03805
G1 - OR.DIR.	21 d	0,0829	0,1091	0,0710	0,0710	0,3340	0,0835
FOCINHO PRETO	28 d	0,0707	0,0771	0,0292	0,0255	0,2025	0,050625
G1 - OR. ESQ.	28 d	0,0129	0,0115	0,0076	0,0088	0,0408	0,0102

Tab. 6. Grupo controle. Média aritmética das quatro medidas da área radiolúcida, realizadas nas radiografias do defeito ósseo nº 2, de dois animais por período.

ANIMAL	PERÍODO	DEFEITO 2				TOTAL	MÉDIA
		M1	M2	M3	M4		
G2 - OR.ESQ. (d)	7 d	0,0326	0,0304	0,0302	0,0327	0,1259	0,031475
G2 - OR.ESQ. (e)	7 d	0,0786	0,0944	0,0834	0,0837	0,3401	0,085025
G2	14 d	0,0786	0,0790	0,0785	0,0834	0,3195	0,079875
G2 - OR.DIR.	14 d	0,0837	0,0837	0,0738	0,0836	0,3248	0,0812
G1	21 d	0,0520	0,0601	0,0518	0,0443	0,2082	0,05205
G1 - OR.DIR.	21 d	0,0769	0,0954	0,0600	0,1020	0,3343	0,083575
FOCINHO PRETO	28 d	0,0767	0,0894	0,0890	0,0709	0,3260	0,0815
G1 - OR. ESQ.	28 d	0,0161	0,0236	0,0161	0,0130	0,0688	0,0172

Tab. 7. Grupo controle. Média aritmética das quatro medidas da área radiolúcida, realizadas nas radiografias do defeito ósseo nº 3, de dois animais por período.

ANIMAL	PERÍODO	DEFEITO 3				TOTAL	MÉDIA
		M1	M2	M3	M4		
G2 - OR.ESQ. (d)	7 d	0,0304	0,0351	0,0325	0,0302	0,1282	0,03205
G2 - OR.ESQ. (e)	7 d	0,0837	0,0944	0,0887	0,0837	0,3505	0,087625
G2	14 d	0,0740	0,0790	0,0837	0,0738	0,3105	0,077625
G2 - OR.DIR.	14 d	0,0602	0,0786	0,0646	0,0738	0,2772	0,0693
G1	21 d	0,0441	0,0562	0,0560	0,0441	0,2004	0,0501
G1 - OR.DIR.	21 d	0,0957	0,0829	0,0709	0,0769	0,3264	0,0816
FOCINHO PRETO	28 d	0,0771	0,0825	0,0500	0,0601	0,2697	0,067425
G1 - OR. ESQ.	28 d	0,0162	0,0161	0,0129	0,0101	0,0553	0,013825

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA I - GRUPO TRATADO

Tab. 8. Grupo tratado. Média aritmética das quatro medidas da área radiolúcida, realizadas nas radiografias do defeito ósseo nº 1, de dois animais por período.

ANIMAL	PERÍODO	DEFEITO 1				TOTAL	MÉDIA
		M1	M2	M3	M4		
LD 3500	7 d	0,0579	0,0712	0,0579	0,0497	0,2367	0,059175
D 1385	7 d	0,0259	0,0257	0,0238	0,0216	0,097	0,02425
B 1402	14 d	0,0418	0,0421	0,0351	0,0537	0,1727	0,043175
LD 1602	14 d	0,0548	0,0603	0,0502	0,0549	0,2202	0,05505
LD 1606 (e)	21 d	0,0092	0,0137	0,0114	0,0163	0,0506	0,01265
LD 1606 (d)	21 d	0,0604	0,0713	0,0550	0,0549	0,2416	0,0604
LD 085 (e)	28 d	0,0338	0,0444	0,0339	0,0339	0,146	0,0365
LD 085 (d)	28 d	0,0161	0,0197	0,0130	0,0145	0,0633	0,015825

Tab. 9. Grupo tratado. Média aritmética das quatro medidas da área radiolúcida, realizadas nas radiografias do defeito ósseo nº 2, de dois animais por período.

ANIMAL	PERÍODO	DEFEITO 2				TOTAL	MÉDIA
		M1	M2	M3	M4		
LD 3500	7 d	0,0671	0,0579	0,0537	0,0667	0,2454	0,06135
D 1385	7 d	0,0178	0,0216	0,0216	0,0216	0,0826	0,02065
B 1402	14 d	0,0535	0,0579	0,0457	0,0537	0,2108	0,0527
LD 1602	14 d	0,0548	0,0603	0,0549	0,0707	0,2407	0,060175
LD 1606 (e)	21 d	0,0139	0,0191	0,0092	0,0137	0,0559	0,013975
LD 1606 (d)	21 d	0,0653	0,0712	0,0653	0,0549	0,2567	0,064175
LD 085 (e)	28 d	0,0222	0,0373	0,0249	0,0407	0,1251	0,031275
LD 085 (d)	28 d	0,0129	0,0161	0,0115	0,0145	0,055	0,01375

Tab. 10. Grupo tratado. Média aritmética das quatro medidas da área radiolúcida, realizadas nas radiografias do defeito ósseo nº 3, de dois animais por período.

ANIMAL	PERÍODO	DEFEITO 3				TOTAL	MÉDIA
		M1	M2	M3	M4		
LD 3500	7 d	0,0538	0,0667	0,0625	0,0669	0,2499	0,062475
D 1385	7 d	0,0259	0,0280	0,0197	0,0259	0,0995	0,024875
B 1402	14 d	0,0459	0,0538	0,0286	0,0420	0,1703	0,042575
LD 1602	14 d	0,0500	0,0552	0,0454	0,0599	0,2105	0,052625
LD 1606 (e)	21 d	0,0191	0,0327	0,0290	0,0222	0,103	0,02575
LD 1606 (d)	21 d	0,0552	0,0653	0,0409	0,0328	0,1942	0,04855
LD 085 (e)	28 d	0,0250	0,0373	0,0222	0,0339	0,1184	0,0296
LD 085 (d)	28 d	0,0146	0,0161	0,0115	0,0115	0,0537	0,013425

AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA II

GRUPO CONTROLE

Tab. 11. Grupo controle. Média aritmética da soma das médias obtidas em cada período após a avaliação radiográfica I.

DEFEITO	PERÍODO			
	7d	14d	21d	28d
1	0,0327	0,0850	0,0380	0,0506
1	0,0802	0,0742	0,0835	0,0102
2	0,0315	0,0799	0,0520	0,0815
2	0,0850	0,0812	0,0836	0,0172
3	0,0320	0,0776	0,0501	0,0674
3	0,0876	0,0693	0,0816	0,0138
TOTAL	0,3490	0,4672	0,3888	0,2407
MÉDIA	0,0582	0,0779	0,0648	0,0401

GRUPO TRATADO

Tab. 12. Grupo tratado. Média aritmética da soma das médias obtidas em cada período após a avaliação radiográfica I.

DEFEITO	PERÍODO			
	7d	14d	21d	28d
1	0,0592	0,0432	0,0126	0,0365
1	0,0242	0,0550	0,0604	0,0158
2	0,0613	0,0527	0,0134	0,0313
2	0,0206	0,0602	0,0642	0,0137
3	0,0625	0,0426	0,0257	0,0296
3	0,0249	0,0526	0,0485	0,0134
TOTAL	0,2527	0,3063	0,2248	0,1403
MÉDIA	0,0421	0,0510	0,0375	0,0234

ANÁLISE ESTATÍSTICA
QUADRO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA

CAUSAS DA VARIACÃO	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
TRATAMENTO	1	0,0056681	0,0056681	13,6184	0,00097
TEMPO	3	0,0065019	0,0021673	5,2073	0,00424
TRATxTEMPO	3	0,0003435	0,0001145	0,2751	0,84423
RESÍDUO	40	0,0166482	0,0004162		
TOTAL	47	0,0166482			

MÉDIA GERAL = 0,049371

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO = 41,322%

TESTE DE TUKEY PARA MÉDIAS DE TRATAMENTO
DENTRO DE 7 DIAS DO FATOR TEMPO

NUM. ORDEM	NUM. TRAT.	NOME	NUM. REPET.	MÉDIAS	MÉDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	CONTROLE	6	0,058167	0,058167	a	A
2	2	TRATADO	6	0,042117	0,042117	a	A

TESTE DE TUKEY PARA MÉDIAS DE TRATAMENTO
DENTRO DE 14 DIAS DO FATOR TEMPO

NUM. ORDEM	NUM. TRAT.	NOME	NUM. REPET.	MÉDIAS	MÉDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	CONTROLE	6	0,077867	0,077867	a	A
2	2	TRATADO	6	0,051050	0,051050	b	A

TESTE DE TUKEY PARA MÉDIAS DE TRATAMENTO
DENTRO DE 21 DIAS DO FATOR TEMPO

NUM. ORDEM	NUM. TRAT.	NOME	NUM. REPET.	MÉDIAS	MÉDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	CONTROLE	6	0,064800	0,064800	a	A
2	2	TRATADO	6	0,037467	0,037467	b	A

TESTE DE TUKEY PARA MÉDIAS DE TRATAMENTO
DENTRO DE 28 DIAS DO FATOR TEMPO

NUM. ORDEM	NUM. TRAT.	NOME	NUM. REPET.	MÉDIAS	MÉDIAS ORIGINAIS	5%	1%
1	1	CONTROLE	6	0,040117	0,040117	a	A
2	2	TRATADO	6	0,023383	0,023383	a	A

MÉDIAS SEGUIDAS POR LETRAS DISTINTAS DIFEREM ENTRE SI AO NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA INDICADO

SUMMARY

SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate, in healthy animals, the role of salmon calcitonin in the bone healing process of circumscribed bone defects, surgically created, in the twenty-four (24) young adults rabbits femur. Twelve (12) animals were randomized to be the control and test groups (salmon calcitonin - 2 IU/kg during 21 days). The rabbits were sacrificed 7, 14, 21 and 28 days after the surgical procedures. The radiolucids areas of the bone defects was measured, in mm², by Auto-Cad software. The results showed statistical differences ($p < 0,05$) at 14 and 21 days, favoring the test group.

At 7-day, the bone defects of the test group showed more bone regeneration. Nevertheless, at 14 and 21-days, the results was similar among two groups, with the new bone more compact in the test group than control group at 28-days. Thus, this study did demonstrate the positive role of salmon calcitonin in the bone healing process of circumscribed bone defects in healthy rabbits, considering the radioagraphic and histological analysis.

Key-words: circumscribed bone defects - salmon calcitonin - bone healing process

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 01) ALAM, A.S.M.T. Further studies on the mode of action of calcitonin on isolated rat osteoclasts. Pharmacological evidence for a second site mediating intracellular Ca^{2+} mobilization and cell retraction. **Journal of Endocrinology**, London, 136: 7-15, 1993.
- 02) ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA. **Dicionário de Especialidades Farmacêuticas: Miacalcic**. Editora de Publicações Científicas, 1991/92, p. 359-360.
- 03) ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA. **Dicionário de Especialidades Farmacêuticas: Miacalcic**. Editora de Publicações Científicas, 1994/95, p. 546.
- 04) AVIOLI, L.V. Calcitonin: state-of-the-art in bone metabolism (Preface). **Calcif. Tissue Int.**, New York, 49: S1, 1991 [Supplement, 2].
- 05) _____. Osteoporosis and fractures: a review of current therapies. **Ann. Ital. Med. Int.**, 8(2): 121-128, Apr./June 1993.
- 06) BADURSKI, J.E. et al. Chondroprotective action of salmon calcitonin in experimental arthropathies. **Calcif. Tissue Int.**, New York, 49: 27-34, Mar. 1991.
- 07) BARON, R.; SAFFAR, J.L. A quantitative study of the effects of prolonged calcitonin treatment on alveolar bone remodelling in the golden hamsters. **Calcif. Tissue Res.**, New York, 22: 265-274, Mar. 1977.
- 08) _____ et al. Behaviour of osteoclasts during rapid change in their number induced by high doses of PHT hormone or calcitonin in intact rats. **Metabolism Dis. Rel. Res.**, 2: 339-346, 1981.
- 09) BERNE, R.M.; LEVY, M.N. **Fisiologia**. 2ª edição. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara, 1990, p. 698-707.

*De acordo com a NB-66, de 1978, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos de conformidade com o "World List of Scientific Periodicals".

- 10)BLOMQUIST, C. Malignant hypercalcemia A hospital survey. **Acta Med. Scand.**, **220**: 455-463, 1986.
- 11)BODY, J.J. Treatment of osteoporosis: current aspects and perspectives. **Rev. Med. Brux.**, Bruxelles, **15**(4): 282-286, July/Aug. 1994.
- 12)BOURNE, G. H. The relative importance of periosteum and endosteum in bone healing and the relationship of vitamin C to their activities. **Proc. roy. Soc. Med.**, **37**: 275-279, 1944.
- 13)BOWERS, G. et al. Histologic evaluation of new human attachment apparatus formation in humans. Part II. **J. Periodontol.**, **60**(12): 675-682, Dec. 1989.
- 14)BRUNSVOLD, M.A. & MELLONIG, J.T. Bone grafts and periodontal regeneration. **Periodontology 2000**, Munksgaard, **1**: 80-91, 1993.
- 15)BUCCIN, T. et al. The effect of rectal and nasal administration of salmon calcitonin in normal subjects. **Calcif. Tissue Int.**, **41**: 252-257, 1987.
- 16)BUCSI, L. & ASHTON, B.A. Comparative study of the in vitro effects of calcitonin; NaF and Ipriflavone in cell cultures. **Magy-Traumatol-orthop. Kekreb-plaiztikai, Seb.**, **37**(3): 257-260, 1994. [Abstract]
- 17)CARSTENS Jr., J.H & FEINBLATT, J.D. Future horizons for calcitonin: a U.S. perspective. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **49**: S2-S6, 1991. [Supplement, 2]
- 18)CHAMBERS, T.J. Osteoblasts release osteoclasts from calcitonin induced quiescence. **Journal of Cell Science**, **57**: 247-253, 1982.
- 19)COPP, D.H. et al. Evidence for calcitonin - a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. **Endocrinology**, **70**: 638-649, 1962.
- 20)DELLING, G. & GLUECKSELIG, W. The effect of calcitonin on the regeneration of circumscribed tibia defect and in mineral contents of bone in the rat. **Israel. J. Med. Sci.**, Hamburg, **7**(3): 367-378, 1971.
- 21)EGELBERG, J. Regeneration and repair of periodontal tissues. **J. Periodontol.**, **22**: 233-242, 1987.
- 22)EILAM, Y. et al. Calcitonin induced enhanced influx of Ca^{2+} into cultured bone cells: a metabolic and ultrastructural correlation. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **31**: 65, 1980. [Abstract, 54]

- 23) EKELAND, A. & ENGESAETER, L. Bone formation estimated by vital microscopy in rabbit ear chambers. Stimulating effect of calcitonin. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **27**: 10, 1979 [Abstract, 40].
- 24) _____, UNDERDAL, T.; GAUTVIK, K.M. Influence of salmon calcitonin in tensile strength and collagen metabolism of rat skin. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **36**: 18, 1984. [Abstract, 58]
- 25) EL-KAFRAWY, A.H. & MITCHELL, D.F. Dental and periodontal effects of calcitonin in hamsters. **J. Dent. Res.**, Indiana, **55**(3): 554, May/June 1976.
- 26) ETO, S.; NAKANO, Y.; OKADA, Y. Medical treatment of malignant hypercalcemia. **Gan to-Kagaku-Ryoho**, **20**(15): 2311-2318, Dec. 1993.
- 27) FARLEY, J.R.; HALL, S.L.; TARBAUX, N.M. Calcitonin (but not calcitonin gene-related peptide) increases mouse bone cell proliferation in a dose-dependent manner, and increases mouse bone formation, alone and in combination with fluoride. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **45**: 214-221, Apr. 1989.
- 28) _____ et al. Calcitonin has direct effects on ³[H]-thymidine incorporation and alkaline phosphatase activity in human osteoblast-line cells. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **48**: 297-301, May 1991.
- 29) FARLEY, J.R.; HALL, S.L. HERRING, S. TARBAUX, N.M. Two biochemical indices of mouse bone formation are increase, in vivo, in response to calcitonin. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **50**: 67-73, May 1992.
- 30) FENTON, A.J.; MARTIN, T.J.; NICHOLSON, G.C. Long-term culture of disaggregated rat osteoclasts: inhibition of bone resorption and reduction of osteoclast-like cell number by calcitonin and PTHr P[107-139]. **Journal of Cellular Physiology**, Melbourne, **55**(1): 1-7, Jan. 1993.
- 31) FOSTER, S.C. & KRONMAN, J.H. The effects of topical thyrocalcitonin on the extraction sites in the jaws of dogs. **Oral Surg.**, Texas, **38**(6): 866-873, Dec. 1974.
- 32) FRANCESCHINI, R. et al. Calcitonin an β -endorphin secretion. **Biomed. Pharmacother**, **47**(8): 305-309, Aug. 1993. [Abstract]
- 33) FREED, W.J.; PERLON, M.J.; WYATT, R.J. Calcitonin: Inhibitory effect on eating in rats. **Science**, Washington, **206**: 850-852, Nov. 1979.

- 34) GENNARI, C.; AGNUSDEI, D.; CAMPOREALE, A. Long-term treatment with calcitonin in osteoporosis. **Horm. Metab. Res.**, New York, **25**: 484-485, 1993.
- 35) _____ et al. Management of osteoporosis and Paget's disease on appraisal of the risks and benefits of drug treatment. **Drug. Saf.**, **11**(3): 179-195, Sept.1994. [Abstract]
- 36) GIDEON, A.R. & MARTIN, T.J. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption. A hypothesis. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **33**: 349-351, 1981.
- 37) GRANO, M. et. al. New model for bone resorption study in vitro: human osteoclast-like cells from giant cell tumor of bone. **J. Bone Miner. Res.**, **9**(7): 1013-1020, 1994. [Abstract]
- 38) GRAVEL, M.R. et. al. Platelet-activating factor induces pseudopod formation in calcitonin-treated rabbit osteoclasts. **J. Bone Miner. Res.**, **9**(11): 1769-1776, 1994. [Abstract]
- 39) GURKAN, L. et. al. Effects of salmon calcitonin on growth of teeth and on extraction socket healing in young rats. **Scand. J. Dent. Res.**, Oslo, **91**: 425-430, Aug.1983.
- 40) HAMAMOTO, N. Histological, histocytochemical and ultrastructural study on the effects of surface change on bone formation in the rabbit mandible. **Archs. Oral Biol.**, Great Britain, **40**(2): 97-106, Feb. 1995.
- 41) HARELL, A. & EILAM, Y. The effects of calcitonin on the accumulation of calcium in the mitochondria of cultured bone cells. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **27**: 57, 1979. [Abstract, 59]
- 42) HEATH, H.I. & SIZEMORE, G.W. Plasma calcitonin in normal man: differences between men and women. **J. Clin. Invest.**, **60**: 1135-1140, 1977.
- 43) HODSMAN, A.B. et. al. An evaluation of several biochemical markers for bone formation and resorption in a protocol utilizing cyclical parathyroid hormone and calcitonin therapy for osteoporosis. **J. Clin. Invest.**, Ontario, **91**: 1139-1148, Mar.1993.
- 44) ITO, N. et. al. Response of osteoblastic clonal cell line (MC 373-E1) to [Asu^{1,7}] eel calcitonin at a specific cell density or differentiation stage. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **40**: 200-205, June1987.

- 45)KAJI, H. et. al. Calcitonin inhibits osteopontin mRNA expression in isolated rabbit osteoclasts. **Endocrinology**, **135**(1): 484-487, 1994.
- 46)KUBOTA, K. et al. Overview of effects of electrical stimulation of osteogenesis on alveolar bone. **J. Periodontol.**, **66**(1): 2-6, Jan.1995.
- 47)KUSHIDA, K. Pharmacologic therapy of osteoporosis. **Nipon-Rinsho**, **52**(9): 2367-2377, 1994. [Abstract]
- 48)LUPULESCU, A. Effect of calcitonin on fibroblasts and collagen formation in rabbits: an ultrastructural and scanning electron microscopic study. **J. Morphol.**, Detroit, **142**: 447-466, 1973.
- 49)_____ & HABOWSKY, J. Effects of calcitonin on wound healing; a morphological study in rabbits. **Journal of Surgical Research**, Ontario, **25**: 260-268, Dec. 1978.
- 50)LYNCH, S.E. et al. The effects of short-term application of a combination of platelet derived and insuline-like growth factors on periodontal wound healing. **J. Periodontol.**, **62**: 458-467, 1991.
- 51)LYRITS, G.P. et. al. Calcium-regulation and bone metabolism: basic and clinical aspects. **Excerpta Medica**, Amsterdam, **9**: 576, Jan. 1987.
- 52)MANTZAVINOS, Z. & LISTGARTEN, M.A. Thyrocalcitonin stimulated bone formation by local application to rat calvaria in vivo. **J. Periodontol.**, Philadelphia, **41**: 663-666, 1970.
- 53)MARKS Jr., S.C. The origin of osteoclasts: evidence, clinical implications and investigative challenges of an extraskeletal source. **J. Oral Pathol.**, **12**: 226-256, 1983.
- 54)MARX, S.J et al. Calcitonin receptors of kidney and bone. **Science**, **178**(1): 999-1001, Dec. 1972.
- 55)MAZZUOLI, G.F. et. al. Effects of salmon calcitonin in postmenopausal osteoporosis: a controlled double-blind clinical study. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **38**: 3-8, 1986.
- 56)Mc DAVID, P.T.; EL-KAFRAWY, A.H.; MITCHELL, D.F. Lack of effect of topical calcitonin on connective tissue. **J. Dent. Res.**, New York, **56**(5): 540, May 1977.

- 57)MEFFERT, R.M. et al. Hydroxyapatite implantation: clinical and histologic analysis of a treated lesion and speculations regarding healing phenomena. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, 6(6): 61-66, 1986.
- 58)MEGHJI, S. Bone remodelling. **Br. Dent. Journal**, London, 172: 235-242, 1992.
- 59)MELCHER, A.H. & IRVING, J.T. Healing in a circumscribed defect in the rat femur. **Proceedings of the First European Symposium on bone and tooth**: 337-341, 1964.
- 60)MUFF, R. et. al. Calcitonin inhibits phosphate uptake in opossum kidney cells stably transfected with a porcine calcitonin receptor. **Endocrinology**, 134(3): 1593-1596, Mar.1994.
- 61)MUNDY, G.R. Visions for the future in osteoporosis research. **Osteoporosis Int.**, 3: 29-34, 1993 [Supplement, 2].
- 62)MURPHY, A. & HADDAD Jr., J.G. Healing of osteolytic Paget's bone disease during synthetic human calcitonin therapy. **Calcif. Tissue Int.**, New York, 31(1): 67, 1980. [Abstract]
- 63)NICHOLSON, G.C. et al. Abundant calcitonin receptor in isolated rat osteoclasts. **J. Clin. Invest.**, Victoria, 78: 355-360, Aug.1986.
- 64)_____ et al. Actions of calcitonin, parathyroid hormone and prostaglandin E₂ on cyclic AMP formation in chicken and rat osteoclasts. **Journal of Cellular Biochemistry**, Victoria, 31: 229-241, Mar. 1986.
- 65)NOCITI Jr., F.H. **Avaliação histomorfométrica da influência da calcitonina de salmão no processo de reparo frente a colocação de um implante dental de titânio**. Piracicaba, 1997,117 p. [Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas].
- 66)NUNZIATA, V. et. al. Vitamin D status in Paget's bone disease. Effects of calcitonin therapy. **Clin. Orthop.**, 293: 366-377, Aug. 1993. [Abstract]
- 67)O'DOHERTY, D.P. et. al. A comparison of the acute effects of subcutaneous and intranasal calcitonin. **Clinical Science**, 78: 215-219, 1990.
- 68)OOR, P.M. Salmon calcitonin. **Orth. Nurs.**, Tennessee, 12(5): 45-48, Sept./Oct.1993.

- 69)OVERGAARD, K. et. al. Salmon calcitonin in osteoporosis. The effects of intranasal application on bone mineral content and fracture frequency in postmenopausal women with manifest osteoporotic changes. **Uglakr. Laega**, **155**(31): 2387-2391, Aug.1993. [Abstract]
- 70)PALLASCH, T.J. The healing pattern of an experimentally-induced defect in the rat femur studied with tetracycline labeling. **Calcif. Tissue Res.**, New York, **2**: 334-42, May 1968.
- 71)PASSANEZI, E. **Estudo morfológico do comportamento de enxertos ósseos autógenos (tecido em neoformação) em cães em defeitos periodontais provocados**. Bauru, 1971, 86 p. [Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo].
- 72)PAZZAGLIA, U.E. Inhibitory effect of salmon calcitonin on bone resorption: morphological study of the tibial growth plate in rats. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **52**: 125-129, 1993.
- 73)PEARSE, A.E.G. 5-hydroxytryptophan uptake by dog thyroid "C" cells and its possible significance in polypeptide hormone production. **Nature**, **211**: 598-600, 1966.
- 74)PIERCE, A. Pathophysiological and therapeutic aspects of dentoalveolar resorption. **Aust. Dent. Journal**, **34**(5): 437-448, May1989.
- 75)RAO, L.G. et al. Immunohistochemical demonstration of calcitonin binding to specific cell types in fixed bone tissue. **Endocrinology**, **108**: 1972-1978, 1981.
- 76)REGINSTER, J.Y. One-year controlled randomization trial of prevention of early postmenopausal bone loss by intranasal calcitonin. **Lancett ii**: 1481-1483, 1987.
- 77)_____. Relationship between whole plastic calcitonin levels, calcitonin secretory capacity and plasma levels of strone in healthy women and postmenopausal osteoporosis. **J. Clin. Invest.**, **3**: 1071-1073, 1989.
- 78)_____. The effect of salmon calcitonin on blood-ionized calcium in the presence of anti-salmon calcitonin antibodies (from pagetic patients) in young rabbits. **Current Therapeutic Research**, **47**(6): 1063-1072, June1990.
- 79)_____. Effect of calcitonin on bone mass and fracture rates. **The American Journal of Medicine**, **91**: 19-22, Nov.1991.[Supplement, 5B]

- 80)_____ et al. Endogenous production of specific antibodies does not decrease hypocalcemic response to calcitonin in young rabbits. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **50**: 518-520, May 1992.
- 81)REGINSTER, J.Y. Calcitonins: newer routes of delivery. **Osteoporos. Int.**, **3**(2): 3-6, 1993. [Abstract]
- 82)REGINSTER, J.Y. et al. Long-term (3 years) prevention of trabecular postmenopausal bone loss with low-dose intermittent nasal salmon calcitonin. **J. Bone Miner. Res.**, **9**(1): 69-73, Jan. 1994.
- 83)_____. Treatment of osteoporosis: current data and prospects. **Rev. Rhum. Ed. Fr.**, **61**(10): 155-164, Dec.1994.[Abstract]
- 84)REGINSTER, J.Y. et. al. Prevention of postmenopausal bone loss by rectal calcitonin. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **56**: 539-542, 1995.
- 85)RICO, H. The use of calcitonin as antiosteolytic drug. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **37**: 105-106, 1985.
- 86)_____ et al. Total and regional bone mineral content and fracture rate in postmenopausal osteoporosis treated with salmon calcitonin: a prospective study. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **56**: 181-185, 1995.
- 87)SAFFAR, J.L. & LASFARGUES, J.J. A histometric study of the effect of indomethacin and calcitonin on bone remodelling in hamsters periodontitis. **Archs. oral Biol.**, Great Britain, **29**(7): 555-558, July 1984.
- 88)SCHALLHORN, R.G. Present status of osseous grafting procedures. **J. Periodontol.**, **48**: 570-576, 1977.
- 89)SHAMASH, D.B. Stimulation of osteogenesis by topical application of calcitonin in periodontal osseous defects. **J. Periodontol.**, Cleveland, **48**(10): 619-29, Oct. 1977.
- 90)SHLOSSMAN, M. et. al. Calcitonin effects on isolated bone cells. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **34**: 190-6, Feb.1982.
- 91)SILIGARDI, G. et. al. Correlations between biological activities and conformational properties for human, salmon, eel, porcine calcitonins and elcatonin elucidated by CD spectroscopy. **Eur. J. Biochem.**, London, **221**: 1117-1125, Jan. 1994.

- 92)SINGER, F.R. et. al. Pharmacologic effects of salmon calcitonin in man. In: Talmage, R.V., Manson, P.V. (eds.). Calcium, parathyroid hormone and calcitonin. **Excerpta Medica**, Amsterdam, p. 89, 1972.
- 93)_____. Acute effects of calcitonin on osteoclasts in man. **Clin. Endocrinol.**, **5**: 333-340, 1976. [Supplement]
- 94)SINGER, F.R.; AZRIA, M.; BEHHAR, C. Effect of subcutaneous salmon calcitonin administration on motility of subsequently isolated newborn rat osteoclasts. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **46**: A26, 1990 [Abstract, 100].
- 95)SINGER, F.R. Clinical efficacy of salmon calcitonin in Paget's disease of bone. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **49**: S7-8, 1991. [Supplement, 2]
- 96)SPINKS, T.J. et. al. Long-term measurement of skeletal and lean body mass in Paget's disease of bone treated with synthetic human calcitonin. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **34**: 459-464, 1982.
- 97)STEIN, B. et. al. Salmon calcitonin prevents cyclosporin-A induced high turnover bone loss. **Endocrinology**, Philadelphia, **129**(1): 92-98, Jan. 1991.
- 98)STEVENSON, J.C. & EVANS, I.M. Pharmacology and therapeutic use of calcitonin. **Drugs**, Texas, **21**: 257-272, 1981.
- 99)TAKAHASHI, S. et. al. Downregulation of calcitonin receptor mRNA expression by calcitonin during human osteoclast-like cell differentiation. **J. Clin. Invest.**, Texas, **95**: 167-171, Jan. 1995.
- 100)THAMSBORG, G. et. al. Acute effects of nasal salmon calcitonin on calcium and bone metabolism. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **53**: 232-236, 1993.
- 101)THOMAS, D.W. & SHEPHERD, J.P. Paget's disease of bone: current concepts in pathogenesis and treatment. **J. Oral Pathol Med.**, Munksgaard, **23**: 12-16, 1994.
- 102)TIEGS, R.D. et al. Secretion and metabolism of monomeric human calcitonin: effects of age, sex an thyroid change. **J. Bone Miner. Res.**, **1**: 339-349, 1986. [Abstract]
- 103)UBIOS, A. M.; FURNO, G.J.; GUGLIELMOTTI, M.B. Effect of calcitonin on alveolar wound healing. **J. Oral Pathol. Med.**, **20**: 322-324, Jan. 1991.
- 104)WALLACH, S. et. al. Effect of salmon calcitonin on skeletal mass in osteoporosis. **Current.Ther. Res.**, **22**: 556-572, 1977.

- 105) WALLACH, S. Calcitonin, osteoclasts and bone turnover. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **47**: 388-391, 1990.
- 106)_____. Calcitonin. History and Prospects. **Seminars in arthritis and rheumatism**, New York, **23**(4): 256-260, Feb.1994.
- 107) WASE, A.W. et al. Action of thyrocalcitonin on bone. **Nature**, New Jersey, **214**: 388-389, Apr.1967.
- 108) WIMALAWANSA, S.J. Long and short-terms side effects and safety of calcitonin in man: a prospective study. **Calcif. Tissue Int.**, New York, **52**: 90-93, 1993.
- 109) YAMAMOTO, M. et al. Endogenous calcitonin attenuates parathyroid hormone-induced cancellous bone loss in the rat. **Endocrinology**, Pennsylvania, **136**(2): 788-795, Feb. 1995.
- 110) YUKNA, R.A. Synthetic bone grafts in periodontics. **Periodontology 2000**, Munksgaard, **1**: 92-99, 1993.
- 111) ZAIDI, M. et. al. Evidence that the action of calcitonin on rat osteoclasts is mediated by two G proteins acting via separate post-receptor pathways. **Journal of Endocrinology**, Great Britain, **126**: 473- 481, 1990.
- 112) ZHENG, M.H. et.al. Carbonic anhydrase II gene transcript in cultured osteoclasts from neonatal rats: effect of calcitonin. **Cell Tissue Res.**, New York, **276**: 7-13, Mar.1994.
- 113) ZHENG, Z.G. et. al. Platelet-activating factor stimulates resorption by rabbit osteoclasts in vitro. **Endocrinology**, Ontario, **27**: 74-81, 1993.
- 114) ZIEGLER, R. & DELLING, G.. The effect of calcitonin on atrophy and new formation of bone. **7th Acta Endocrinologica Congress**, Ulm, **138**: 183, 1969. [Abstract, 183]
- 115)_____. Effect of calcitonin on the regeneration of a circumscribed bone defect (bored hole in the rat tibia). **Acta Endocrinologica**, **69**(3): 497-506, Mar. 1972.