

# CONIC·SEMESP

## 13º Congresso Nacional de Iniciação Científica

Anais do Conic-Semesp. Volume 1, 2013 - Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. ISSN 2357-8904

**TÍTULO:** AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO TIREOIDEANO (T3) TÓPICO EM DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS DE CALVÁRIA DE RATOS WISTAR

**CATEGORIA:** CONCLUÍDO

**ÁREA:** CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

**SUBÁREA:** ODONTOLOGIA

**INSTITUIÇÃO:** UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

**AUTOR(ES):** LUCIANA APARECIDA CALEGARI ROMANI

**ORIENTADOR(ES):** PATRICIA PINTO SARAIVA

**COLABORADOR(ES):** HELOISA HELENA VIEIRA ZANETTI

Realização:



Apoio:



## **AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO HORMÔNIO TIREOIDEANO (T3) TÓPICO EM DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS DE CALVÁRIA DE RATOS WISTAR**

### **1. RESUMO**

O objetivo deste estudo foi avaliar o reparo ósseo produzido pelo hormônio tireoidiano (T3) tópico em defeitos de calvária de ratos. Foram utilizados 30 ratos Wistar machos, divididos em três grupos: controle (defeito ósseo preenchido com um placebo constituído por base de pomada), grupo 1 (defeito ósseo preenchido com T3 em pomada, na concentração de 0,03%) e grupo 2 (defeito ósseo preenchido com T3 em pomada, na concentração de 3%), analisados aos 30 e 60 dias (10 animais por grupo). Foram realizados defeitos ósseos críticos de 8mm na calota craniana dos animais, preenchidos por 0,35ml da pomada, e analisados nos períodos propostos. Foram realizadas análises histológicas e morfométricas. Aos 30 dias, o controle mostrou formação óssea de  $672,25 \pm 89,10\text{mm}^2$ , enquanto no grupo tratado com T3 a de 0,03% ocorreu maior formação de osso ( $1640,5 \pm 215,52\text{mm}^2$ ), estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ). Já o grupo tratado com 3% de T3 não foi diferente dos demais grupos ( $1006 \pm 302,72\text{mm}^2$ ) ( $p > 0,05$ ). Aos 60 dias, a formação óssea no grupo controle foi de  $927 \pm 81,5\text{mm}^2$ , enquanto no grupo tratado com T3 a 0,03% foi de  $1176,25 \pm 220,65\text{mm}^2$ , semelhante aos demais grupos ( $p > 0,05$ ). A formação de  $1065 \pm 13,29\text{mm}^2$  de osso no tratamento com T3 a 3% foi maior que o controle ( $p < 0,05$ ), mas semelhante ao tratamento com 0,03% de T3 ( $p > 0,05$ ). Concluímos que a pomada contendo T3 auxilia o reparo ósseo no período de 30 dias, promovendo maior formação óssea, na concentração de 0,03%.

### **2. INTRODUÇÃO**

O osso é um tecido metabolicamente ativo que está em constante renovação. Isso mantém sua integridade estrutural e a homeostasia mineral, ambas dependentes do equilíbrio entre os processos anabólico e catabólico. Este dinamismo permite o processo de remodelação, ou seja, a modificação da arquitetura óssea.

Apesar de sofrer a influência da dieta, dos estímulos físicos e de fatores genéticos, o controle do metabolismo ósseo é feito por hormônios, fatores de crescimento, citocinas e pela comunicação celular. O paratormônio (PTH), a calcitonina (CT) e a vitamina D são os principais reguladores da homeostasia

mineral, enquanto o estrógeno, os andrógenos, a tiroxina e a triiodotironina influenciam o metabolismo ósseo, controlando, de forma diferenciada, a reabsorção e a aposição ósseas. Desta forma, a tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3) exercem profunda influência no metabolismo ósseo. A presença de receptores nucleares nos osteoblastos, osteócitos e osteoclastos sugere que a ação dos hormônios tireoidianos sobre o osso é direta, embora eles possam agir indiretamente, já que estimulam a síntese de fatores de crescimento, citocinas e outros hormônios. Além disso, há também receptores para os hormônios tireoidianos nas células da medula óssea, precursoras da linhagem osteoblástica.

Apesar de haver receptores para os hormônios tireoidianos nos osteoclastos, a reabsorção óssea estimulada por T3 parece ser indireta e mediada por mecanismos que ainda não foram totalmente elucidados. No entanto, ainda se conhece pouco sobre os mecanismos envolvidos na ação catabólica dos hormônios tireoidianos sobre o osso. A deficiência dos hormônios tireoidianos reduz o metabolismo geral e afeta diretamente o recrutamento, a diferenciação, a maturação e o metabolismo das células responsáveis pela aposição, mineralização e reabsorção óssea.

A redução da aposição óssea, no hipotireoidismo, se dá por interferência direta já que T3 e T4 estimulam a expressão de genes nos osteoblastos para a produção de colágeno e osteocalcina, importantes na aposição óssea.

No hipertireoidismo, há estímulo tanto da aposição quanto da reabsorção óssea, mas a diminuição da massa óssea advém da supremacia do processo catabólico frente ao anabólico.

É conhecido que os hormônios tireoidianos direta ou indiretamente aceleram o *turnover* ósseo, encurtando o ciclo de remodelação, mas os mecanismos ainda não foram totalmente elucidados.

Embora os efeitos sistêmicos das modificações da concentração de T3 sobre o osso estejam bem estabelecidos, as consequências do emprego do T3 tópico no metabolismo ósseo ainda não é conhecido. Desta forma, o presente estudo propôs estudar a ação tópica do T3 em defeitos ósseos em calota de ratos *Wistar*.

### **3. OBJETIVOS**

Avaliar, por meio da histomorfometria, a influência do hormônio tireoideano (T3) tóxico, em diferentes concentrações, em defeitos ósseos críticos de calvária de ratos Wistar.

#### 4. METODOLOGIA

As análises histológicas e histométricas foram realizadas por um único examinador, em esquema cego, para o tipo de tratamento realizado. Imagens das características estruturais do tecido ósseo foram adquiridas utilizando microscopia óptica de luz (Microscópio Nikon, Eclipse 80i, Japão), com aumento de 40 vezes. Medidas dos parâmetros morfométricos foram realizadas usando o software Image PRO PLUS para Windows 5.0 (Media Cybernetics, Inc, Silver Spring, MD, USA).

Para esta análise, empregou-se a metodologia por contagem de pontos. A imagem capturada em uma resolução de 300 dpi foi observada no Programa Microsoft Office Power Point®. O retículo foi posicionado sobre a imagem (Fig.1) e a realização da contagem se deu por meio do aplicativo Imag PRO PLUS para Windows 5.0, considerando-se que cada traço tem 9mm de largura e espaçamento de 9mm entre cada ponto. Após a contagem foi realizado o cálculo da área de formação óssea. Foram avaliados três campos para cada corte histológico, sendo dois deles adquiridos nas margens do defeito ósseo e um centralmente ao defeito

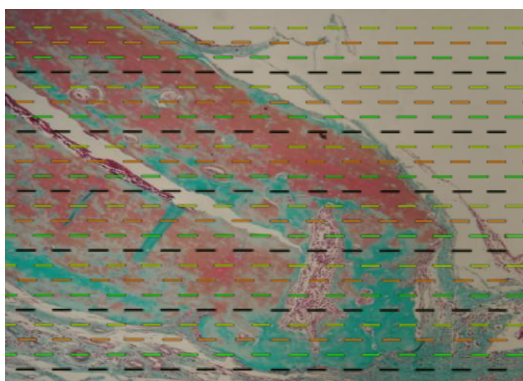


Figura 1 - Retículo utilizado para a análise morfométrica do tecido ósseo neoformado.

#### 5. DESENVOLVIMENTO

Este estudo foi realizado as normas do SBCAL / COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), tendo aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Odontologia de Bauru- Universidade de São Paulo (FOB-USP) sob o protocolo de número 011/2012.

Para o presente estudo foram utilizados 30 ratos *Wistar*, machos, com peso entre 450 e 500 gramas provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG.

Os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos, com dois tempos de análise (30 e 60 dias pós operatório):

- Grupo controle (10 animais): o defeito ósseo foi preenchido com 0,35 ml de placebo constituído por glicerina, sem o hormônio;
- Grupo 1 (10 animais): o defeito ósseo foi preenchido com 0,35 ml do hormônio T3 (3,3',5 Triiodothyronine (T3) – Sigma-Aldrich) diluído em glicerina, na concentração de 0,03%;
- Grupo 2 (10 animais): o defeito ósseo foi preenchido com 0,35 ml do hormônio T3 (3,3',5 Triiodothyronine (T3) – Sigma-Aldrich) diluído em glicerina, na concentração de 3%.

### **Procedimento Cirúrgico**

Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (6mg/kg) e quetamina (70mg/kg). Foi realizada tricotomia fronto-parietal da calvária dos animais, antissepsia com polivinilpirrolidona-iodado (PVPI) a 10% com 1% de iodo ativo (Rio Química, SP, Brasil). Com uma lâmina de bisturi nº15, foi realizada uma incisão em “U”, na calvária do rato.

O defeito crítico foi realizado na calvária do rato com broca trefina de 8mm de diâmetro (3i) (Nobel Biocare®, Gothenburg, Sweden).

Nos animais do grupo controle, o defeito cirúrgico foi preenchido com 0,35ml da base utilizada para o preparo da pomada. Nos animais dos grupos tratados, o defeito cirúrgico foi preenchido com 0,35ml do T3 diluído em glicerina, nas duas concentrações propostas. Depois de preenchidos os defeitos, os tecidos moles foram reposicionados e realizadas suturas interrompidas simples com fio de seda preto nº 3-0 (Ethicon – Johnson & Johnson). Os animais sofreram eutanásia aos 30 e 60 dias pós-operatório, por inalação de CO<sub>2</sub>.

### **Processamento das Peças**

As peças obtidas foram processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados no sentido longitudinal da peça com 6µm de espessura,

iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram corados pelas técnicas da Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Goldner para análise com microscopia de luz.

Os cortes histológicos corados por HE foram avaliados qualitativamente em microscopia ótica, observando o tipo e qualidade do tecido formado na região do defeito cirúrgico.

A análise estatística dos dados da histomorfometria do tecido ósseo foi realizada pelo software GraphPad InStat 3. A análise intergrupo foi realizada pelo teste não pareado de Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Dunn. A análise dentro do mesmo grupo de tratamento e diferentes tempos foi realizada pelo Teste T não pareado, corrigido pelo Teste de Welch. O nível de probabilidade de erro foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ).

## 6. RESULTADOS

### Análise Histológica

Aos 30 dias, no grupo controle, nota-se regiões de encapsulamento de material, rodeadas pela formação de tecido ósseo em neorformação. A matriz formada apresenta-se revestida por uma camada de osteoblastos, e existe a presença de linhas de reversão, indicando atividade de remodelamento tecidual

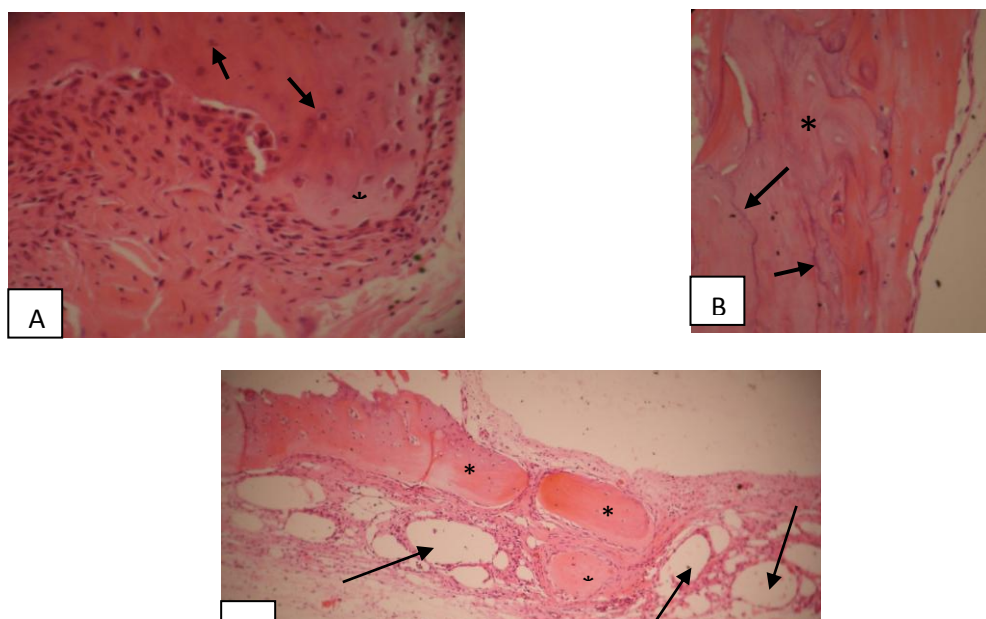


Figura 2 - Grupo controle 30 dias. Em A, presença de osteócitos (setas) espalhados pela matriz óssea (\*); B, presença de linhas de reversão (setas) na matriz óssea (\*); C, tecido ósseo neoformado (\*) e a presença de material encapsulado (setas). HE, aumento de 40x em A e B e 10x em C.

Aos 60 dias, o controle continua apresentando linhas de reversão e presença de osteoblastos recobrendo a matriz óssea. Ainda são observadas regiões de material encapsulado.

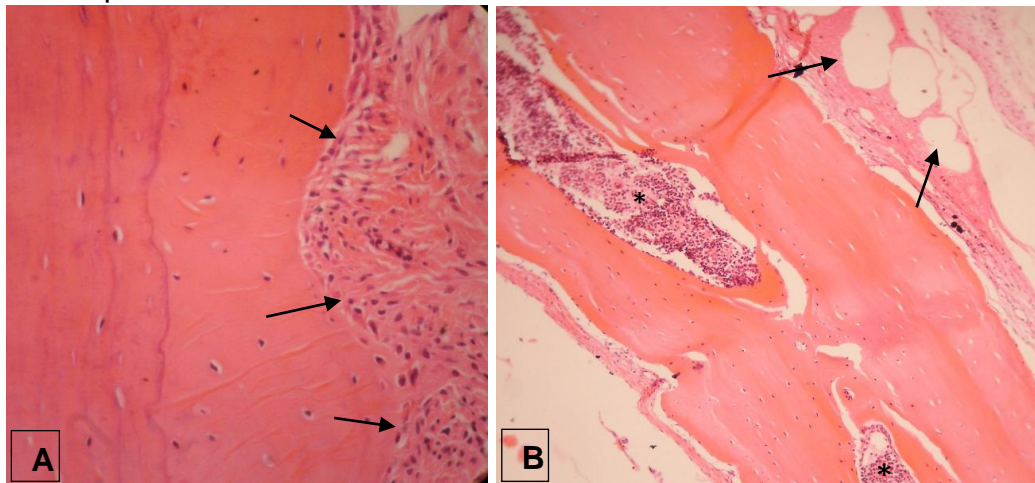


Figura 3 – Grupo controle 60 dias. Em A, presença de linhas de reversão (\*) na matriz óssea, e margeando a matriz, uma camada de células osteoblásticas (setas). Em B, regiões medulares (\*) e permanência de pequenas regiões de material encapsulado (setas). HE, aumento de 40x e 10x, respectivamente.

Aos 30 dias, no grupo tratado com T3 em uma concentração de 0,03% também é observado o material encapsulado por uma camada fina de tecido conjuntivo, rodeado por um infiltrado inflamatório. A matriz apresenta-se organizada, com a formação de canais de Havers e ainda nota-se a presença de linhas de reversão.

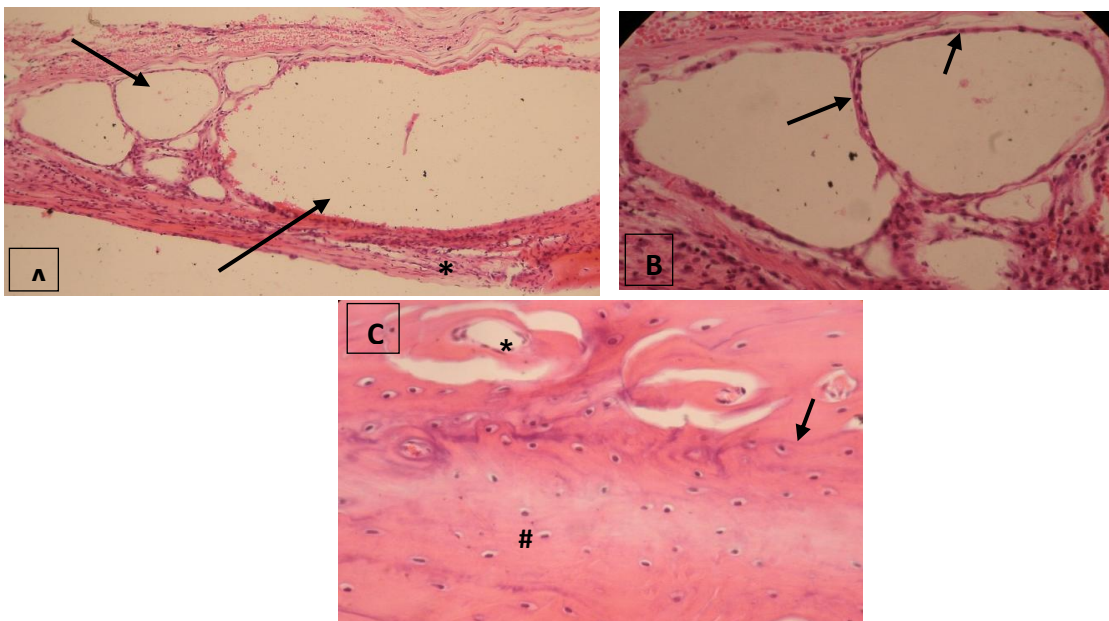


Figura 4 - Grupo T3 0,03% 30 dias. Em A, presença de várias áreas encapsuladas na região central do defeito (setas), rodeadas por infiltrado inflamatório (\*); B, as regiões de encapsulamento são delimitadas por uma fina camada de tecido conjuntivo (setas); C, matriz óssea apresentando linhas de reversão (setas), presença de osteócitos espalhados pela matriz (#) e a formação dos canais de Haver's (\*). HE, aumento de 10x em A e 40x em B e C.

Aos 60 dias de tratamento com T3 a 0,03% observa-se uma diminuição em número e tamanho das regiões de encapsulamento, dando lugar a um tecido ósseo em neoformação. A matriz óssea apresenta-se organizada, com presença de fracas linhas de reversão.

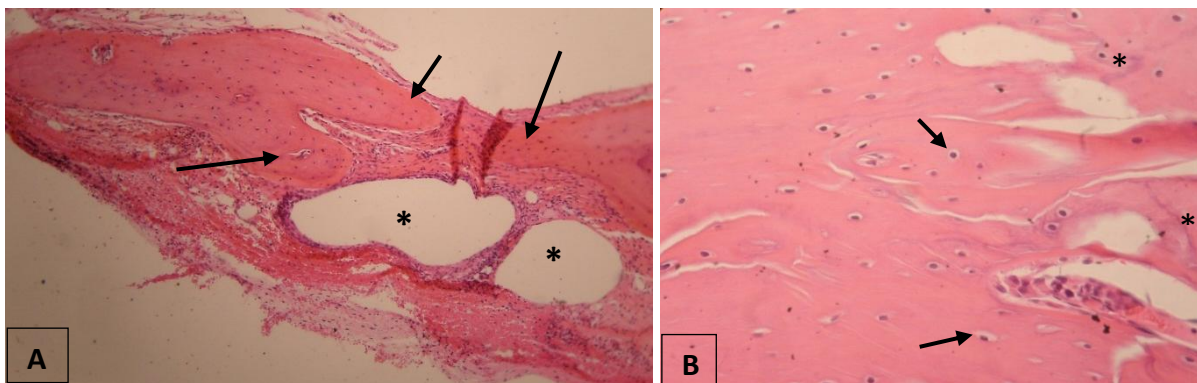


Figura 5 - Grupo T3 0,03% 60 dias. Em A, presença de matriz óssea em formação (setas) e áreas de material encapsulado (\*); B, presença de osteócitos espalhados pela matriz óssea (setas) e linhas de reversão (\*). HE aumento de 10x e 40x, respectivamente.

O grupo tratado com T3 a 3% apresentou aos 30 dias, a mesma área de encapsulamento e observa-se a presença de células gigantes na área de infiltrado inflamatório. A matriz óssea é revestida por uma camada de osteoblastos.

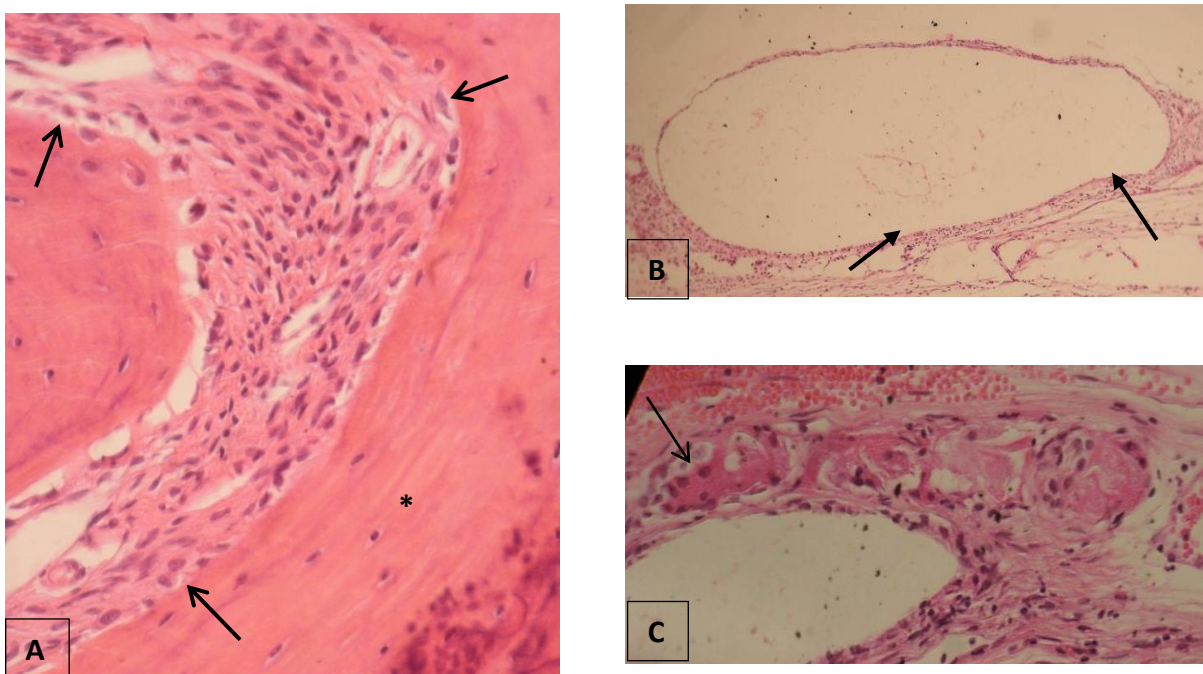


Figura 6 - Grupo T3 3% 30 dias. Em A, há presença de matriz óssea revestida por uma camada de osteoblastos (setas) e osteócitos espalhados (\*); B, região de encapsulamento de material (setas); C, em algumas áreas é possível observar a presença de células gigantes (setas). HE, aumento de 40x em A e C, e 4x em B.



Aos 60 dias, o tratamento com T3 a 3% mostra uma matriz óssea com intensas linhas de reversão e formação de canais de Haver's. Também é notada a presença de material encapsulado, rodeado por um infiltrado inflamatório intenso.

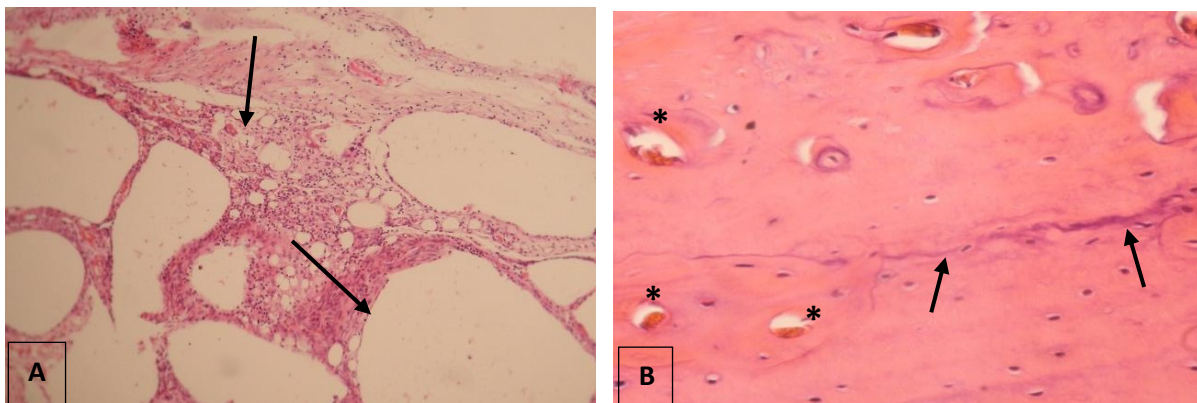


Figura 7- Grupo T3 3% 60 dias. Em A, formação de regiões encapsuladas (setas); B, presença de linhas de reversão (setas) e a formação de canais de Havers (\*) . HE, aumento de 10x em A e 40x em B.

### Análise Histomorfométrica

Os resultados do presente estudo mostram que, no período de 30 dias, no grupo controle foi identificada uma formação óssea de  $672,25 \pm 89,10\text{mm}^2$ , enquanto no grupo tratado com uma concentração de 0,03% de T3 ocorreu a maior formação de tecido ósseo ( $1640,5 \pm 215,52\text{mm}^2$ ), sendo estatisticamente diferentes em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). Já o grupo tratado com 3% de T3 não apresentou diferença estatística dos demais grupos (formação de  $1006 \pm 302,72\text{mm}^2$  de tecido ósseo) (Fig.8).

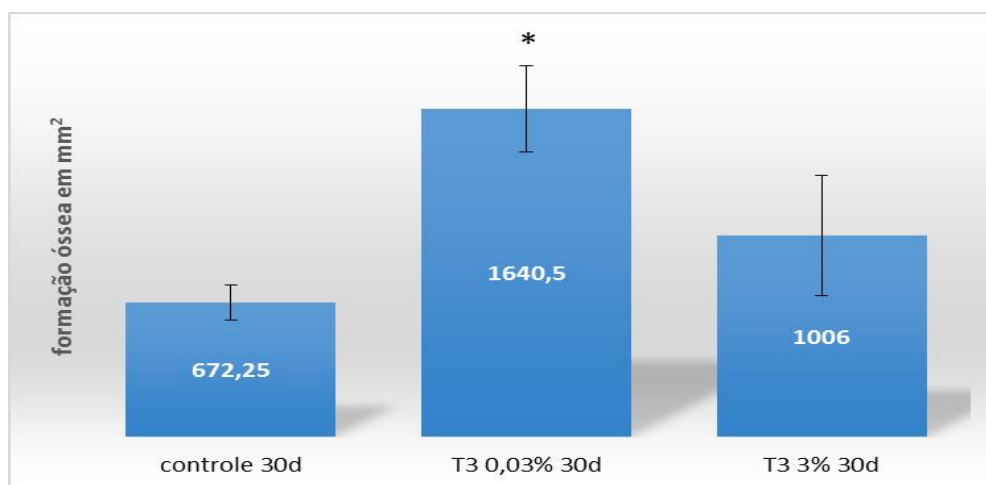


Figura 8. Formação de tecido ósseo observada aos 30 dias, nos diferentes tratamentos.

Aos 60 dias, observou-se uma formação óssea de  $927 \pm 81,5\text{mm}^2$  no controle, enquanto o grupo tratado com T3 a 0,03% continuou apresentando a maior formação de osso ( $1176,25 \pm 220,65 \text{mm}^2$ ), embora não tenha sido diferente estatisticamente dos demais grupos. A formação de  $1065 \pm 13,29\text{mm}^2$  de osso formado no grupo tratado com T3 a 3% foi estatisticamente maior que o controle, mas não mostrou diferença do tratamento realizado com 0,03% de T3 (Fig.9).

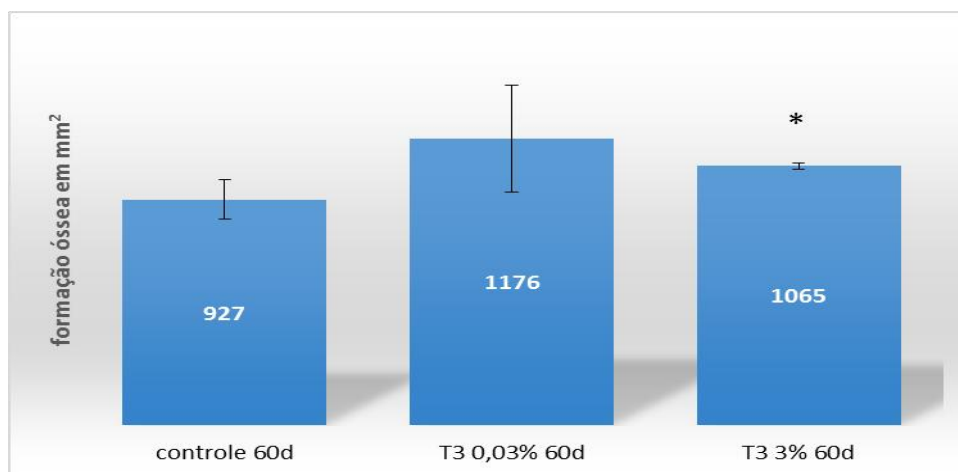


Figura 9 – Formação de tecido ósseo, em  $\text{mm}^2$ , nos diferentes tratamentos, aos 60 dias de observação.

A comparação entre a formação óssea no grupo controle, entre os períodos de 30 e 60 dias foi estatisticamente significativa ( $P=0,0022$ ). O mesmo ocorreu quando comparamos os períodos no grupo tratado com 0,03% de T3 ( $P=0,01$ ). Já a comparação dos períodos na concentração de T3 a 3% não apresentou significância ( $P>0,05$ ) (Fig.10).

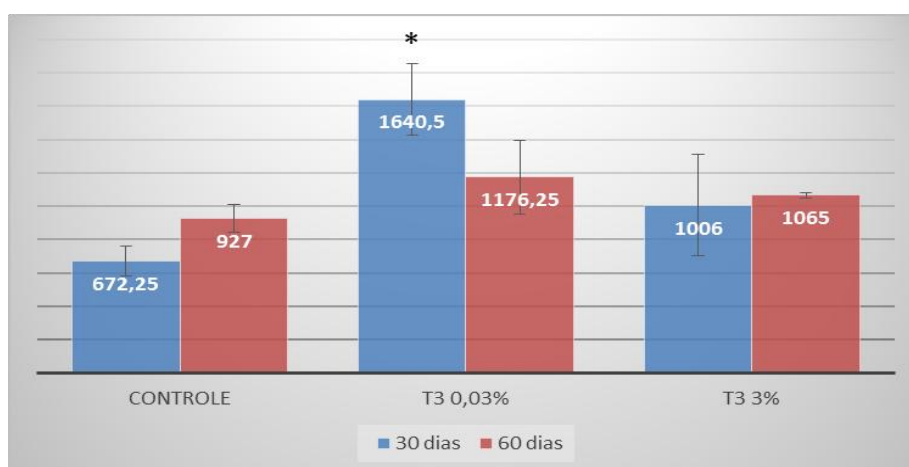


Figura 10 – Comparação da formação óssea entre os períodos de 30 e 60 dias, nos diferentes tratamentos. \* $p<0,05$ .

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseando-nos em trabalhos prévios que utilizaram a forma tópica de administração de T3, principalmente em pele, e conhecendo as modificações causadas no tecido ósseo por este hormônio, o presente estudo optou por utilizar uma forma pastosa no reparo ósseo. Esta forma apresenta consistência mole e oleosa e é destinada ao uso tópico.

Assim, notou-se que a utilização do T3 diluído em glicerina auxilia o processo de reparo ósseo em seu período inicial (30 dias), promovendo maior formação óssea, quando numa concentração de 0,03%. Aos 60 dias, embora nesta concentração a formação óssea ainda seja maior, não mostra diferença estatisticamente significativa do controle e da concentração de 3%.

O que chama a atenção neste estudo, é que, na menor concentração utilizada parece existir uma maturação acelerada do tecido ósseo, sendo esta retardada quando a concentração maior foi utilizada.

O hormônio tireóideo (T3) utilizado topicamente em defeitos ósseos de calvária promoveu a formação óssea quantitativa maior no período de 30 dias, para a concentração de 0,03% de T3, tornando-se semelhante aos demais grupos, aos 60 dias.

## 8. FONTES CONSULTADAS

Williams GR, Robson H, Shalet SM. Thyroid hormone actions on cartilage and bone: interactions with other hormones at the epiphyseal plate and effects on linear growth. *J Endocrinol.* 1998 Jun;157(3):391-403.

Safer JD, Crawford TM, Fraser LM, Hoa M, Ray S, Chen TC et al. Thyroid hormone action on skin: diverging effects of topical versus intraperitoneal administration. *Thyroid.* 2003 Feb;13(2):159-65.

Saraiva P P, Teixeira S S, Nogueira C R, Padovani, C R. Triiodothyronine (T3) does not induce Rankl expression in Rat ROS 17/2.8 cells. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008; Feb;52(1):109-13.