

# Efeito do Verapamil na Reparação Óssea Alveolar em ratos Diabéticos induzidos por Aloxano: estudo histomorfométrico

## *Histomorphometric Analysis of Verapamil Effects on Alveolar Socket Repair on Diabetic Alloxan-Induced Rats*

**José Benedito Oliveira AMORIM**

Prof. Assistente Doutor do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil

**Sabrina S. TEIXEIRA**

**Giovana Vigário NEGRATO**

Cirurgião Dentista – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil

**Maria das Graças VILELA-GOULART**

Doutora e Pesquisadora – CEBAPE – Centro de Biociências Aplicado a Pacientes com Necessidades Especiais – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil

**Mônica Fernandes GOMES**

Profa. Adjunta do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal e Coordenadora do CEBAPE - Centro de Biociências Aplicado a Pacientes com Necessidades Especiais - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil

---

### RESUMO

**Objetivos:** Avaliamos o efeito crônico do Verapamil (agente bloqueador de canais para cálcio) sobre o processo de reparação tecidual em ratos diabéticos.

**Material e Métodos:** Foram utilizados 36 ratos albinos Wistar, subdivididos em três grupos: Controle(C), Diabético (D); Diabético tratado com verapamil IP 10 mg/Kg peso corpóreo/dia (DVe). A indução do diabetes foi promovida pela administração de aloxano (40mg/Kg peso corpóreo) e confirmada através de análise plasmática de glicose (glucosímetro). Todos os animais foram sacrificados nos períodos de 15, 30, 45 e 60 dias após cirurgia do incisivo central superior, e submetidos a análises histológicas e histomorfométricas.

**Resultados:** Observamos variações significativas nos valores de formação da matriz óssea nos Grupos D e DVe em todos os períodos avaliados.

**Conclusões:** O uso crônico do verapamil (grupo Dve) alterou significativamente a matriz óssea neoformada ( $p<0.01$ ) quando comparado ao grupo Diabético. A qualidade da estrutura óssea nos grupos induzidos a condição diabética foram semelhantes. A velocidade do processo de reparação tecidual foi maior no grupo Dve comparado ao grupo D ( $p<0.01$ ).

### UNITERMOS

Reparação óssea; verapamil; diabetes; aloxano.

---

### INTRODUÇÃO

O Diabetes mellitus é uma doença metabólica caracterizada por anormalidades metabólicas de carboidratos, lipídios e proteínas e resultante da deficiência parcial ou total de insulina, bem como decorrente de alteração de seus efeitos nos tecidos dependentes

deste hormônio<sup>22</sup>. Alguns autores descreveram que a homeostasia osteo-mineral, a formação óssea e a ação da vitamina D apresentam modificações fisiológicas significativas no diabetes experimental<sup>9,14,20</sup>. As complicações específicas desta morbidade foram

relacionadas com o aumento da glicemia e também com os produtos metabólicos formados a partir da glicose, denominados AGES (Advanced Glycation End-products), as quais modulam a atividade de inúmeros fenótipos celulares e assim dos tecidos do organismo<sup>9,15</sup>.

O processo de reparação alveolar em feridas de extração dentária é frequentemente retardado em pacientes diabéticos descompensados, o qual pode estar associado a focos de infecção. Diante deste fato, foram encontradas alterações no metabolismo do colágeno, formação do endotélio, espessura da membrana basal capilar e quantidade de tecido de granulação em pacientes diabéticos<sup>8</sup>.

Para obtenção de modelo experimental, tem sido utilizado o Aloxano por via intravenosa citotóxica em diversos tipos de animais. Este fármaco causa a destruição das células  $\beta$  das ilhotas de Langherans, promovendo uma elevação significativa dos níveis glicêmicos em animais submetidos ao tratamento com Aloxano<sup>14</sup>. Em adição, o Verapamil, clássico bloqueador de canais para cálcio, amplamente utilizado no tratamento da hipertensão arterial essencial, nas arritmias cardíacas e na angina de peito, é frequentemente indicado para indivíduos diabéticos. Esta droga promove a inibição dos canais tipo-L para cálcio, dependentes de voltagem, reduzindo a entrada deste cátion nas células que expressam este tipo de proteína<sup>5,21</sup>. Embora o mecanismo de ação deste agente farmacológico seja específico para a musculatura lisa vascular e para o sistema de condução no coração, é possível também que interfira com o metabolismo dos tecidos mineralizados<sup>3,19</sup>.

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que o verapamil poderia influenciar no processo de formação do tecido ósseo através da inibição da atividade do hormônio paratireoideano (PTH) e/ou do ajuste direto da atividade das células osteoclásticas<sup>6,18,19,23</sup>.

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos do Verapamil no processo de reparação óssea de alvéolos dentários cruentos em ratos diabéticos induzidos por Aloxano.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados trinta e seis ratos machos (Wistar, *Rattus norvegicus albinus*), com 100 dias de idade, divididos em três grupos: controle ratos (controle), ratos diabéticos (D) e de ratos diabéticos tratados com verapamil (DVe). Estes animais foram observados (em grupos de três) por 2 meses, mantidos em gaiolas e

alimentados *ad libitum*. Os animais utilizados deste presente pesquisa estiveram em conformidade com os critérios do Conselho Nacional de Investigação, bem como aprovado pelo Comitê para uso animal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP.

A indução de Diabetes mellitus foi promovida pela injeção endovenosa na veia do pênis com aloxano (Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo) em soro fisiológico na dose de 40mg/kg de peso corporal<sup>14,15</sup>. Usando um dispositivo para mensuração da glicemia; *Advantage II* (Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos SA, São Paulo, Brasil), o nível de glicose no sangue foi monitorado 14 dias pós-tratamento e durante todo o período do estudo, para determinar o estado hiperglicêmico dos animais. A maioria dos animais desenvolveu evidência clínica de diabetes dentro de duas semanas após a injeção de aloxano. Os animais que não conseguiram desenvolver uma média de concentração de glicose no sangue superior a 250mg/dl, neste período, foram excluídos do estudo. Os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de xilazin (pré-anestésico, Rompum, Bayer SA - São Paulo, Brasil) e ketamina (anestésico, Dopalen Agribands Saúde Animal, São Paulo, Brasil). Estas drogas foram administradas numa dose de 4mg/kg e 10mg/kg, respectivamente.

O Incisivo superior esquerdo de todos os grupos experimentais foi extraído com instrumentos especialmente adaptados para o procedimento cirúrgico. Posteriormente as bordas gengivais foram aproximadas e suturadas com fio de nylon 5,0 vicryl (Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil). A seguir, os animais foram sacrificados por overdose do anestésico em 15, 30, 45, e 60 dias após a cirurgia.

A maxila e calvária foram removidas, fixadas em formalina neutra 10% por 72 horas, descalcificadas em solução de Plank-Rychlo, embebidos em parafina e cera. Foram realizados cortes semi-seriados longitudinais, com 6  $\mu$ m de espessura, cortadas em intervalos de 70  $\mu$ m, a seguir, foram corados com HE, e analisados por microscopia óptica. O processo de reparo do alvéolo da maxila esquerda foi avaliado histomorfometricamente e submetidos a análise estatística, comparando-se os diversos grupos experimentais.

Os animais do grupo DVe receberam tratamento com verapamil® (KNOLL Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda.), em dose única de 10mg/kg peso corpóreo injetado no peritônio imediatamente após o procedimento, até o dia de sacrifício.

## ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICAS

Para a realização da análise histomorfométrica foi utilizado o método estereológico, que consiste em determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes histológicos por meio da geometria e estatística. Os dados da referida análise foram tratados e submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de *Tukey*, sendo o nível de significância adotado de  $p \leq 0,05$ .

Os métodos estereológicos basearam-se no princípio geométrico-estatístico, derivado da probabilidade das imagens dos perfis da estrutura na secção histológica coincidir com um sistema-teste apropriado<sup>4</sup>. Deste modo, o ponto central nesses métodos esteve na casualização das amostras, ou seja, na aleatoriedade desde a escolha dos animais, seleção dos blocos histológicos, lâminas, cortes e, principalmente, dos campos microscópicos que foram utilizados nas quantificações.

Para este estudo, foram utilizadas a objetiva 40x e a ocular KLP 8x do microscópio de luz Olympus CH-2. A objetiva mostrará um retículo ou grade de integração II Zeiss de 100 pontos (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) correspondente a 7840  $\mu^2$ , para mensuração da área de tecido ósseo.

O retículo A II Zeiss foi sobreposto à ocular de compensação kpl 8X Zeiss para avaliação da densidade óssea (DO). A imagem do retículo foi superposta aos campos histológicos desejados. Os pontos do retículo (Pi) e o número total de pontos (P) sobre o defeito ósseo foram quantificados. A densidade óssea foi calculada pela fórmula:

$$DO = \frac{\text{número de pontos sobre a estrutura (Pi)}}{\text{n número total de pontos sobre o defeito ósseo (P)}}$$

A referida objetiva apresenta um retículo de 100 pontos, onde foram mensuradas as seguintes variações histológicas:

1- Coágulo Sangüíneo (CS) 2- Tecido Conjuntivo (TC) 3- Tecido Ósseo (TO)

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Histomorfométricos Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste *Tukey* com o auxílio do software *GraphPad Instat 3,00* versão para Windows 95 (*GraphPad Software*, San Diego, Califórnia). O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Análise microscópica 15 dias

**Controle.** O terço cervical da raiz dentária foi preenchido por tecido conjuntivo osteogênico e discreto número de osso imaturo Trabéculas irregularmente distribuídos no campo. O osso trabecular mostrou-se muito celular muito vascularizada, mostrando fibrilas de colágeno irregularmente distribuídas. No terço mediano o alvéolo foi preenchido por tecido ósseo imaturo e uma moderada quantidade de tecido osteogênico, no entanto, no terceiro apical, o osso trabecular já estava maduro com osteócitos e matriz mineral em torno deles. Na periferia do osso trabecular apresentou-se mais maduro, em comparação com a porção central do alvéolo dental. Observaram-se tecido osteogênico entre as Trabéculas (Fig 1a). A cortical alveolar com proximidade de normalidade ao redor do alvéolo, parcialmente coberto por epitélio estratificado e queratinizado.

**Grupo D.** O terço cervical mostrou um tecido conjuntivo osteogênico com muitas células osteoprecursoras e exibiram um difuso e moderado infiltrado de células inflamatórias mononucleares. Observamos trabéculas ósseas imaturas e delicadas perto da cortical alveolar. Verificamos também áreas de sangue coagulado e hemorragia intersticial nesta região. Na superfície deste terço, constatou-se um epitélio estratificado e queratinizado e as zonas ricas em neutrófilos formando microabscessos. No terço mediano observamos tecido conjuntivo osteogênico irregular, com estruturas trabeculares e coágulo sanguíneo na organização. O terço apical apresentou extensas áreas de coágulo sanguíneo, células de tecido osteogênico e ossos trabeculares imaturos. Tais trabéculas apresentaram se finas e irregulares localizadas principalmente nas extremidades do alvéolo dentário, com o sangue coagulado na porção central. Havia ainda muitos capilares e alguns vasos sanguíneos com diferentes diâmetros e hemorragia intersticial sem células inflamatórias (Fig 1b).

**Grupo DVe.** O terço cervical foi preenchido por tecido conjuntivo frouxo, pequena quantidade de ossos finos, discretos e trabéculas imaturas, com presença de coágulo sanguíneo e granulação tecidual. Na superfície do alvéolo observou-se numerosos vasos sanguíneos com

diversos diâmetros e infiltrado inflamatório de células mononucleares e PMNs, bem como as áreas de edema. No terço médio, o trabeculado ósseo foram distribuídos entre as trabéculas osteogênicas do tecido conjuntivo, com tecido de granulação na porção central da referida área. Além do que foram observadas mais trabéculas, quando comparados com o terço anterior descrito. O terceiro apical mostrou osso imaturo com diferente forma e tamanho de células de linhagem osteogênicas, rodeado por tecido conjuntivo. Na região central, constatou-se tecido de granulação e regiões com coágulo sanguíneo (Fig 1c). Observamos também um grande número de vasos sanguíneos e hemorragia intersticial foram perto da cortical alveolar.

### 30 dias

**Controle.** O terço cervical foi preenchido por tecido conjuntivo osteogênico e trabeculado imaturos. Houve também discreto infiltrado de células inflamatórias, principalmente próximas à superfície e de numerosos vasos sanguíneos associados com extensas áreas de hemorragia intersticial. As trabéculas ósseas eram irregulares e apresentaram-se em maior quantidade na periferia do alvéolo do que na porção central. Em alguns cortes histológicos a superfície do alvéolo estava coberta por epitélio estratificado e queratinizado. O terço médio e apical foram preenchidos por osso imaturo irregular entre o tecido conjuntivo osteogênico, mostrando fibras colágenas, fibroblastos e fibrócitos, sem a capacidade de diferenciar em tecido ósseo. Hemorragia intersticial foi localizada na porção central do alvéolo dental com tecido de granulação (Figura 2a).

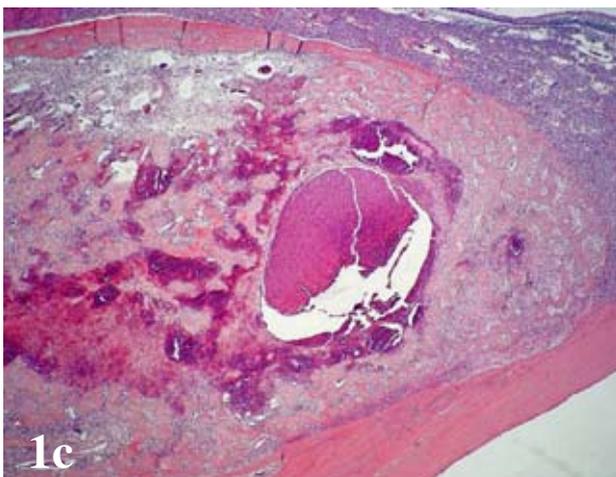
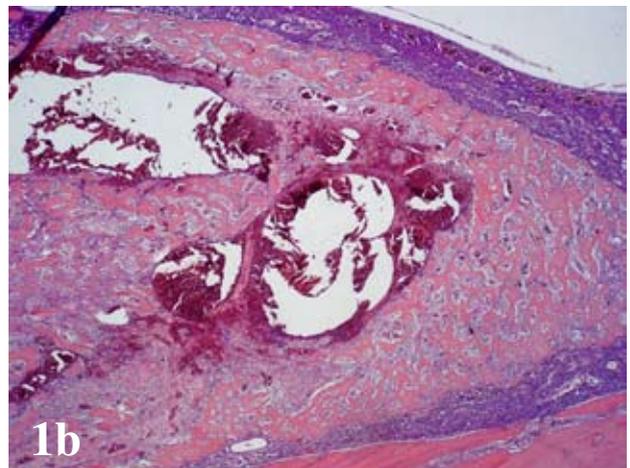
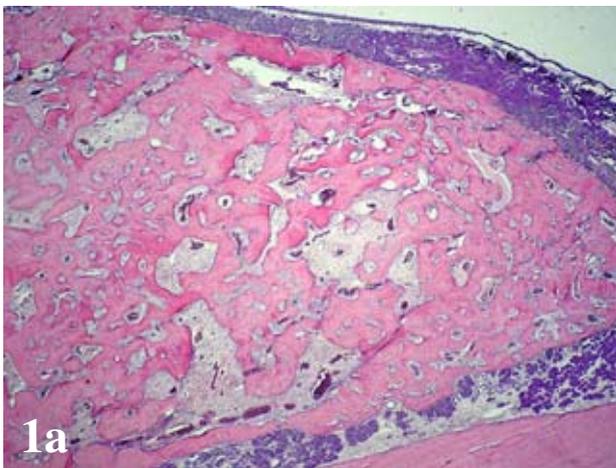


Figure 1. 15 dias. Fotomicrografia do terço apical (a) Grupo Controle, (b) Grupo Diabético e (c) Grupo Diabético tratado com Verapamil 10mg/kg peso corpóreo, exibindo matriz óssea neoformada (HE; 50X)

**Grupo D.** O terço cervical também mostrou tecido conjuntivo osteogênico e trabeculado ósseo imaturo. Houve um moderado infiltrado de células inflamatórias mononucleares principalmente na superfície do alvéolo, juntamente com muitos vasos sanguíneos congestionados de diferentes diâmetros. O osso Trabecular era irregular e constituído por vários tipos celulares, em maior quantidade perto da cortical alveolar. Os terços médios e apicais foram preenchidos por osso imaturo, tecido conjuntivo osteogênico e tecido conjuntivo frouxo (Fig. 2b).

**Grupo DVe.** O terço cervical mostrou um tecido conjuntivo osteogênico com ossos trabeculares imaturos e infiltrado por células inflamatórias mononucleares e uma moderada quantidade

de vasos sanguíneos congestionados. Observou-se número maior de ossos trabeculares, sendo mais compactos na periferia do que na área central, no entanto, em ambos os grupos diabéticos que estavam no mesmo montante. No terço médio as trabéculas estavam entre os osteogênico do tecido conjuntivo, eram mais espessas, com muitas células e irregularmente distribuída. O tecido conjuntivo mostrou numerosas células, vasos sanguíneos congestionados e hemorragia intersticial. O terço apical foi preenchido com tecido conjuntivo osteogênico e trabéculas imaturas. Houve menor quantidade de hemorragia intersticial, quando comparado com o terço descrito anteriormente (Fig. 2c).

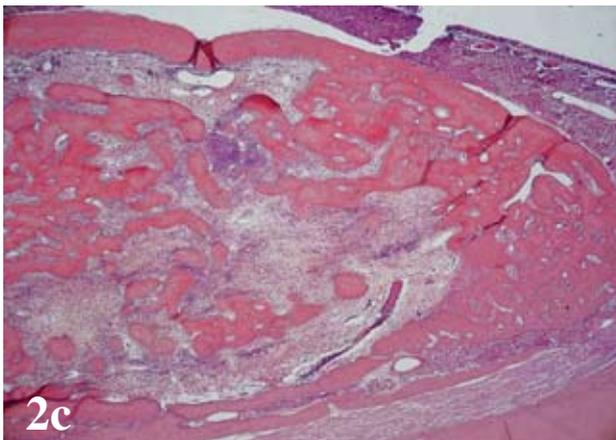
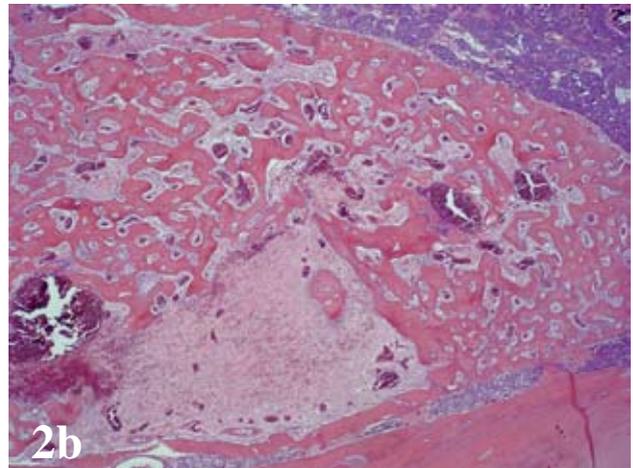
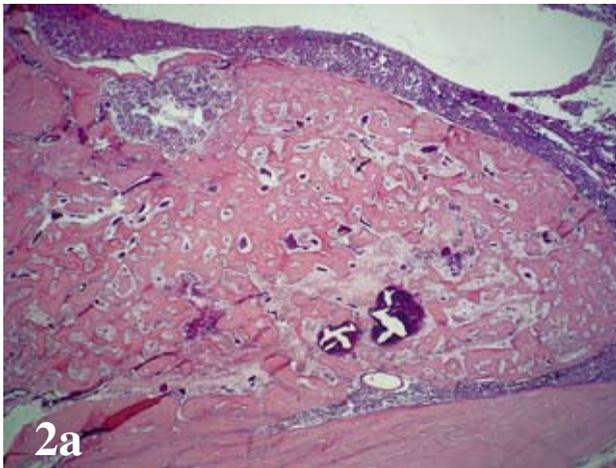


Figure 2. 30 dias. Fotomicrografia do terço apical (a) Grupo Controle, (b) Grupo Diabético e (c) Grupo Diabético tratado com Verapamil 10mg/kg peso corpóreo, exibindo matriz óssea neoformada no alvéolo dentário (HE; 50X).

#### 45 dias

**Controle.** Todos os três terços da ferida de extração dental foram completamente preenchidos com ossos imaturos trabecular, osteogênico e / ou tecido conjuntivo frouxo. O terço cervical mostrou menor quantidade de tecido ósseo, quando comparado com o terceiro mediano e apical. Observamos que o tecido conjuntivo frouxo estava em menor quantidade e poucas células inflamatórias estavam presentes (Fig. 3a). Na superfície do alvéolo apresentou um epitélio estratificado e queratinizado.

**Grupo D.** Todos os três terços do alvéolo apresentaram tecido ósseo ou áreas de tecido conjuntivo osteogênico (Fig. 3b). A quantidade de tecido conjuntivo osteogênico foi maior no controle e ratos tratados com verapamil. No terço cervical, foi observado tecido conjuntivo frouxo com

algumas células inflamatórias mononucleares.

**Grupo DVe.** Todos os três terços da cicatrização óssea apresentaram trabéculas imaturas. Houve menor quantidade de tecido conjuntivo quando comparado com o grupo D., vasos sanguíneos congestos de diâmetro pequeno e discretas áreas de hemorragia intersticial (Fig. 3c).

#### 60 dias

**Controle.** Nos três terços do alvéolo dental haviam tecido ósseo medular com o espaço preenchido com tecido conjuntivo frouxo. A matriz óssea era espessa e irregular em áreas maduras e imaturas. O tecido conjuntivo frouxo evidenciou presença de fibroblastos, fibrócitos e de fibras colágenas paralelas entre si. Ao lado, observaram-se numerosos vasos sanguíneos com diâmetros variáveis e não há presença de

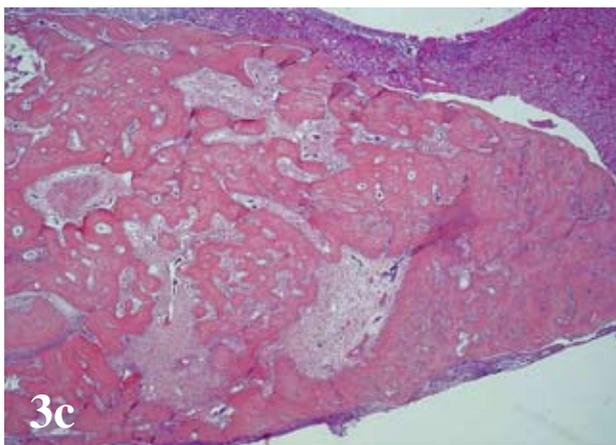
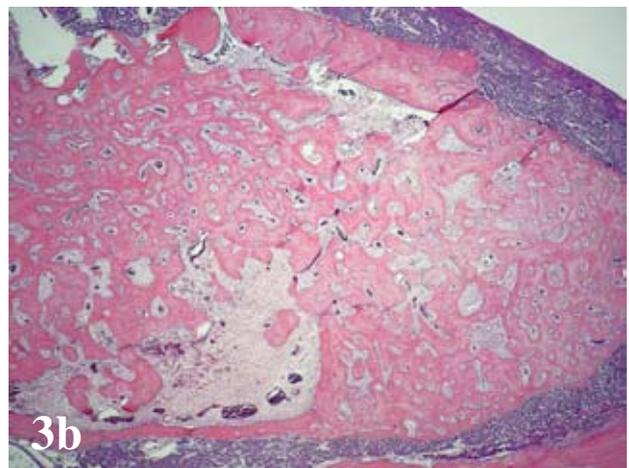
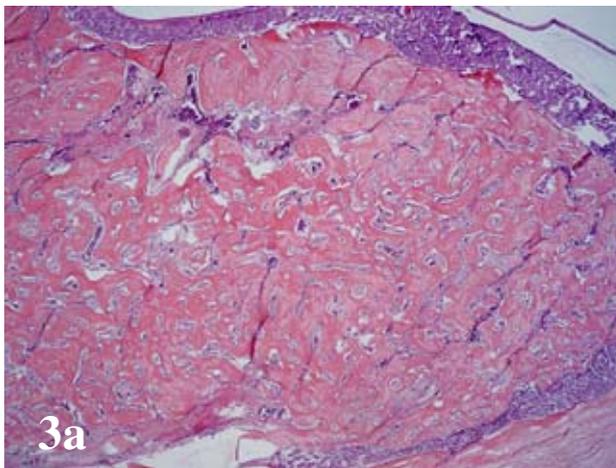


Figura 3. 45 dias. Fotomicrografia do terço apical (a) Grupo Controle, (b) Grupo Diabético e (c) Grupo Diabético tratado com Verapamil 10mg/kg peso corpóreo, exibindo matriz óssea neoformada no alvéolo dentário (HE; 50X).

células inflamatórias. O terço médio e apical exibiram uma maior maturidade da matriz óssea, quando comparado com o terceiro cervical (Fig. 4a).

**Grupo D.** O terço cervical foi preenchido por trabéculas ósseas maduras e imaturas com tecido osteogênico e / ou tecido conjuntivo frouxo. Houve menor quantidade de matriz óssea, neste terceiro quando comparado com os outros dois terços. Foi observado um moderado infiltrado de células inflamatórias mononucleares e, em alguns cortes histológicos uma membrana serofibrinosa foi detectada, mostrando pequenas áreas de necrose tecidual. Os terços médio e apical foram preenchidos com osso maduro e no espaço entre elas tecido osteogênico. Na área

central havia ainda trabeculado ósseo imaturo, com osteócitos e de fibras colágenas, por vezes, mostrando uma distribuição desordenada (Fig. 4b).

**Grupo DVe.** Todos os três terços apresentaram maturidade do trabeculado ósseo, tecido conjuntivo frouxo e uma pequena quantidade de tecido osteogênico. O montante da matriz óssea parecia ser em quantidade maior do que era nos ratos diabéticos (Fig. 4c). Na observação de todos os tempos dos três grupos estudados, verificou-se que toda a cortical alveolar do alvéolo dental eram próximos aos observados do grupo controle. Houve apenas alguns sinais de infecção no terço cervical dos grupos diabéticos e diabéticos tratados com verapamil.

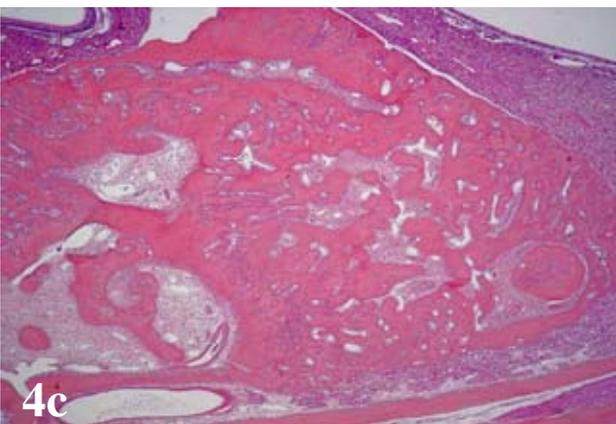
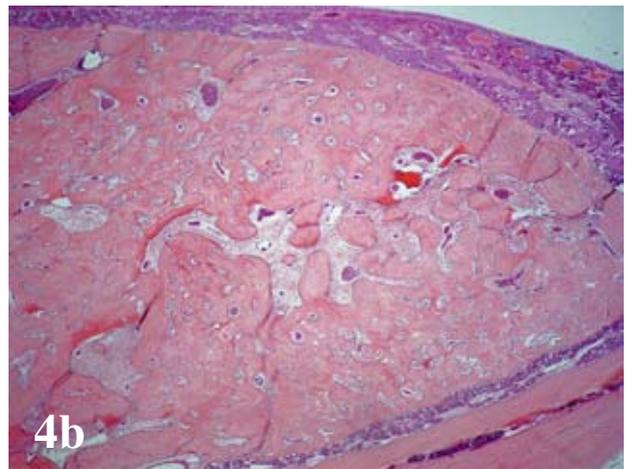
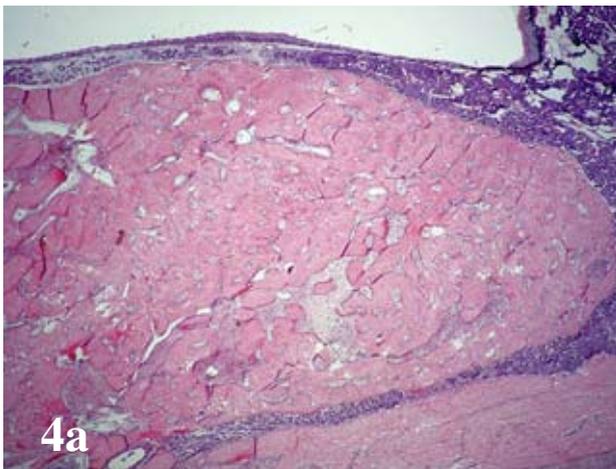


Figura 4. 60 dias. Fotomicrografia do terço apical (a) Grupo Controle, (b) Grupo Diabético e (c) Grupo Diabético tratado com Verapamil 10mg/kg peso corpóreo, exibindo matriz óssea neoformada no alvéolo dentário (HE; 50X).

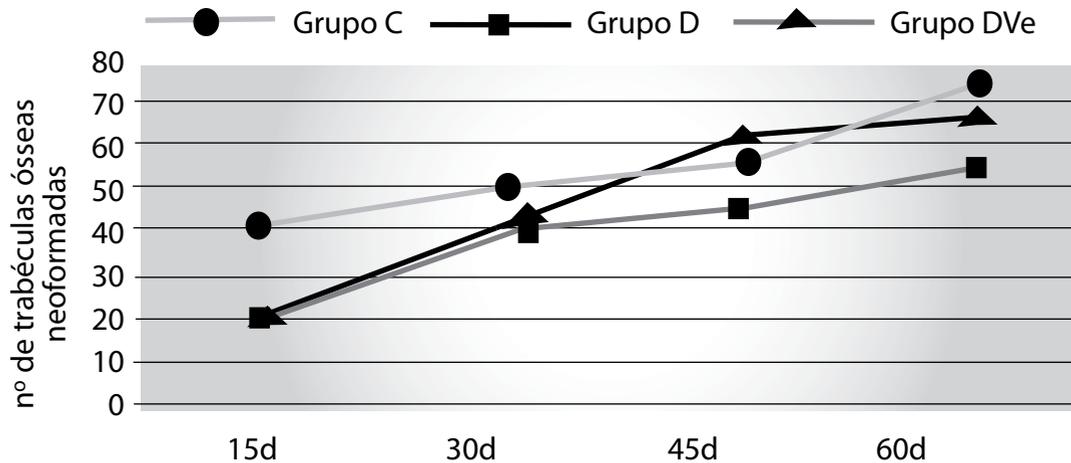


Figura 5. Representação esquemática da evolução do tecido ósseo neoformado observado nos Grupo C, D e DVe, respectivamente.

### Histomorfométricos e análises estatísticas

A análise histomorfométrica revelou quantidades variáveis de tecido ósseo recém-formado em todos os grupos de estudo. Verificou-se que os grupos C e D foram significativamente diferentes em todos os tempos-observações. Em 15 e 30 dias, foram observadas diferenças significativas entre os grupos C e DVe ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$ ). Houve uma diferença significativa em termos de quantidade de matriz óssea recém-formada, apenas nos períodos 45 e 60 dias, entre os grupos D e DVe comparados ao grupo controle ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,05$ , respectivamente). Verificou-se que a formação óssea foi progressiva e uniforme, considerando o valor médio da matriz óssea neoformada em todos os grupos e tempos estudados. Foi observado que, em 45 dias, a quantidade de matriz óssea neoformada no grupo diabético tratado com verapamil foi significativamente maior do que o grupo diabético ( $p < 0,001$ ) (Tab 1). A Figura 5 mostra que o montante da matriz óssea foi maior no grupo de controle do que no grupo diabético e diabético tratado com verapamil nos períodos de 15, 30 e 60 dias. Ainda, em 45 dias, a quantidade de matriz óssea foi maior no grupo DVe do que no grupo D.

### DISCUSSÃO

O cálcio intracelular possui um papel central na atividade de inúmeros tipos celulares, o qual atua como segundo mensageiro de vários agentes hormonais, participa dos processos de diferenciação e proliferação celular, da atividade contrátil dos músculos lisos e estriados, da transmissão do impulso nervoso pelas células do sistema nervoso central e periférico, entre outras<sup>7,11</sup>. Dessa forma, agentes que interferem no fluxo deste cátion através da membrana celular assumem grande relevância científica para o conhecimento e desenvolvimento de novas terapias para tratamento dos pacientes, especialmente daqueles que são portadores de doença sistêmica crônica. Katsumata et al<sup>12</sup> demonstraram que a inibição da entrada de cálcio nas células  $\beta$  do pâncreas poderia proteger a ocorrência de diabetes mellitus induzido por aloxano. Segundo os autores, a administração de Verapamil (12.5mg/kg) 60 minutos antes aloxano evitou completamente o desenvolvimento de hiperglicemia, mas, quando administrados em conjunto, decresceram os níveis sanguíneos de glicose, mas não os efeitos da indução do diabetes decorrentes do uso do aloxano. Afzal et al<sup>1</sup> relataram uma sobrecarga de cálcio nas células do músculo cardíaco nos pacientes

**Tabela 1. Comparação das Diferenças Médias de neoformação óssea entre os Grupos Controle, Diabético e Diabético Tratados com Verapamil (10 mg/Kg).**

Período/Grupo Experimental	Média	P
15 dias		
C vs D	-18.633	<.001
C vs DVe	-19.133	<.01
D vs DVe	-0.5000	NS
30 dias		
C vs D	-13.700	<.01
C vs DVe	-11.900	<.05
D vs DVe	1.800	NS
45 dias		
C vs D	-12.300	<.05
C vs DVe	6.700	NS
D vs DVe	19.000	< 0.001
60 dias		
C vs D	-16.967	< 0.01
C vs DVe	-6.733	NS
D vs DVe	10.233	<.05

NS = não significante; p>0.05.

diabéticos, tornando possível o desenvolvimento de cardiomiopatias. O aumento da concentração de cálcio intracelular poderia ser uma complicação adicional do miocárdio ou isquemia, em consequência de hipóxia. Os autores verificaram que o verapamil nas doses de 2, 4 e 8mg/Kg/dia administrado a ratos diabéticos, é capaz de promover diversas alterações funcionais nos parâmetros fisiológicos, no metabolismo e na ultra-estrutura cardíaca, sem alterar a glicemia em animais.

O retardamento da cicatrização de feridas de extração dentária observado em pacientes com diabetes mellitus mal-controlado está frequentemente associada com inflamação grave, o qual foi semelhante às observadas e descritos no presente estudo. Além disso, o diabetes não controlado envolve distúrbios metabólicos ligados ao cálcio e ao fosfato, levando a diminuição da atividade osteoblásticas, causando atrasos e inibição da formação da matriz óssea que contribuem para a perda de minerais pelo esqueleto ósseo<sup>10, 16</sup>.

Algumas hipóteses têm sido propostas que poderiam explicar o atraso na reparação óssea, tais como: redução da produção de colágeno, redução na liberação de insulina, inativação de osteoblastos seguida

pela diminuição da atividade dos osteoclastos. Outros achados descrevem a supressão da remodelação óssea, a redução da síntese protéica e da atividade de fosfatase alcalina (ALP), enzima ligada a atividade osteogênica pelas células osteoblásticas<sup>8,15,24</sup>. A osteogênese no processo de reparo ósseo de animais diabéticos pode ser alterada devido a mudanças no metabolismo ósseo e de matriz extracelular componentes causados por AGEs. Estas estruturas se acumulam ao longo do período de um ano, na superfície extracelular ou no compartimento intracelular, causando alterações quantitativas e qualitativas na composição da matriz orgânica dos tecidos mineralizados tais como: colágeno, proteoglicanos, laminina, e vitronectina. Estas alterações na matriz extracelular acabam por modificar tanto a formação óssea quanto o processo de remodelação óssea<sup>9, 15</sup>.

Alguns trabalhos mostraram que os bloqueadores dos canais de cálcio, como verapamil, influenciaram o equilíbrio cálcio nos tecidos mineralizados<sup>23,25</sup>. Aparentemente o verapamil *in vivo* modifica a ação de hormônios calcitropicos alterando o efeito regulador endócrino sobre o processo de *turn over* ósseo, ou ainda atua diretamente na inibição da reabsorção óssea modulando a atividade dos osteoclastos<sup>17,18,23</sup>. O verapamil também inibe influxo de  $Ca^{+2}$  em diversos tipos celulares como células de linhagem osteoclásticas modificando o processo de reparação ossea<sup>12,18,25</sup>. Li et al<sup>13</sup> relataram que o rápido aumento da concentração do cálcio intracelular nos osteoblastos estimula a produção de IGF-I, TGF e prostaglandinas, as quais são responsáveis pela ativação dos osteoclastos.

Em nossos experimentos, verificamos que o grupo tratado com verapamil apresentou resultados satisfatórios na cicatrização de feridas dos alvéolos dentários, estando de acordo com os resultados encontrados por Amorim<sup>2</sup>. É possível que o verapamil, utilizado na forma crônica e na concentração de 10mg/Kg, inibiram a atividade dos osteoclastos ou com a liberação de fatores locais, os quais são produzidos por osteoblastos que por sua vez são necessários para ativação da linhagem osteoclásticas, resultando no aumento da matriz óssea. A densidade óssea no grupo D e DVe foi menos intenso, quando comparado ao grupo controle após 15 e 30 dias e mais intenso no Grupo DVe após 30 dias, sugerindo que verapamil poderia alterar parcialmente os efeitos adversos da diabetes no processo de reparação óssea alveolar. O grupo D exibiu extensas áreas de coágulo sanguíneo após longo período de observação, quando comparado com os outros grupos estudados. Portanto, o processo de reparação óssea foi retardado na presença

de disfunção metabólica crônica.

Considerando a ação do verapamil em células da linhagem osteoblásticas, observamos aumentos significativos na neoformação óssea a partir de 45 dias de tratamento quando comparados aos ratos do Grupo D. No grupo DVe, foi observado um aumento constante da formação da matriz óssea, durante todos os períodos de tempo. Tal achado pode estar relacionado à ação inibitória deste agente que por sua vez inibe indiretamente a função macrofágica dos osteoclastos. A qualidade da estrutura óssea dos grupos estudados revelou razoável semelhança em todos os animais experimentais.

Não observamos diferença estatística significativa no grupo DVe em comparação com o grupo controle, o que por um lado demonstra uma melhora do processo de reparação óssea destes animais, porém, por outro lado não evidenciou-se um aumento significativo na qualidade e quantidade do osso neoformado quando confrontado com o grupo controle. Entretanto, constatamos maior quantidade de matriz óssea do grupo DVe em 45 dias. A administração crônica de verapamil foi também utilizada por Samnegard et al<sup>13</sup>. Os autores administraram verapamil (0.75mg/mL) em doze semanas, e observaram um aumento significativo da formação óssea periosteal nos ossos da tíbia e do fêmur quando comparados com o grupo controle.

Dessa forma acreditamos que o efeito positivo dos bloqueadores dos canais de cálcio sobre o reparo em feridas de extração dentária esteja ligada à ação deste agente farmacológico sobre as células de linhagem osteogênicas, necessitando de novos estudos que esclareçam qual o fenótipo e/ou mecanismo de ação estaria envolvidos no efeito do verapamil no processo de reparação óssea, sobretudo nos casos de morbidade crônica. Por outro lado, o modelo experimental utilizado neste estudo pode fornecer uma ferramenta útil para o entendimento dos processos de resolução tecidual

na existência de morbidade crônica de alta incidência como representa o diabetes. Por exemplo, podem-se avaliar os efeitos de alguns medicamentos terapêuticos na reparação óssea ou nos tecidos que respondem a diversos agentes farmacológicos como o verapamil.

## CONCLUSÃO

Concluiu-se que verapamil (10mg/kg) promoveu uma progressiva melhora do tecido ósseo neoformado no grupo DVe quando comparado com o grupo D, após 30 dias de tratamento com a droga. Não houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) na quantidade de tecido ósseo no grupo de controle, quando comparado ao grupo DVe. A qualidade da estrutura óssea grupo DVe e do grupo D com este fármaco foi semelhante. No entanto, não houve diferença significativa ( $p < 0,01$ ) na velocidade do processo de reparação entre os grupos Dve e D em 45 e 60 dias à hora de observação.

## AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi apoiada por uma bolsa da “Fundação de Amparo uma Pesquisa do Estado de São Paulo”-FAPESP (processo número 2002/07081-1 concessão e 2002/07082-8). Os autores gostariam de agradecer à professora Maria Nadir Gasparoto Mancini do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, por ajudar na preparação do modelo experimental, Domingos Gonçalves Pontes e Ana Lourdes da Silva Machado por colaborar nos procedimentos cirúrgicos e procedimentos laboratoriais. Também gostaríamos de agradecer a Honório Roberto Correa (Director, Quality Assurance & Compliance, MD & D LA-Manufacturing Company Brasil, Johnson & Johnson, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) para a doação de materiais.

---

## ABSTRACT

**Background:** The purpose of this experimental research work was to evaluate histomorphometrically the chronic effect of verapamil on dental sockets bone repair of diabetic alloxan induced rats.

**Methods:** Thirty-six albino rats were divided into three groups: control (C), diabetic rats (D), and diabetic rats treated with verapamil (DVe). They were sacrificed after 15, 30, 45 and 60 days post-operatively, and the dental sockets were examined histologically and statistically through histomorphometric analysis. The diabetic rats groups received an endovenous injection of alloxan monohydrate solution 40mg/Kg, and the DVe group received daily one intraperitoneal application of verapamil (10mg/Kg).

**Results:** It was observed that in all studied periods of time there was significant variance in the values of bone matrix formation when groups C and D were compared.

**Conclusions:** The chronic use of verapamil changed the density of the newly formed bone matrix. There was significative difference ( $p < 0.01$ ) in the amount of bone tissue formation in group C when compared to group D. The structural bone quality of the DVe and D groups was similar. There was significative difference ( $p < 0.01$ ) in the speed of the bone repair process between the diabetic rats treated with verapamil and diabetic rats not treated with verapamil.

## UNITERMS

Bone repair; verapamil; diabetes mellitus; dental socket; alloxan.

---

## REFERÊNCIAS

1. Afzal N, Ganguly PK, Dhalla KS, Pierce GN, Singal PK, Dhalla NS. Beneficial effects of verapamil in diabetic cardiomyopathy. *Diabetes*. 1988;37:936-42.
2. Amorim JBO. Efeito da Isradipina, agente bloqueador de canais para cálcio sobre a reparação de feridas de extração dentária [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 1995.
3. Bode HP, Yule DI, Fehmann HC, Goke B, Williams JA. Spontaneous calcium oscillations in clonal endocrine pancreatic glucagon-secreting cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;205:435-40.
4. Claro FA, Lima JRS, Salgado MAC, Gomes MF. Porous polyethylene for tissue engineering applications in diabetic rats treated with calcitonin: histomorphometric analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:211-9.
5. Cognard C, Lazdunski M, Romey G. Different types of  $Ca^{+2}$  channels in mammalian skeletal muscle cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:517-21.
6. Datta KH, MacIntyre I, Zaidi M. Intracellular calcium in the control of osteoclast function. I. Voltage - insensitivity and lack of effect of nifedipine, Bayk 8644 and diltiazem. *Bioch Biophys Res Commun*. 1990;167:183-8.
7. Dawson AP. Regulation of intracellular  $Ca^{2+}$ . *Essays Biochem*. 1990;25:1-37.
8. Devlin H, Garland H, Sloan P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996;54:1087-91.
9. Fiorellini JP, Nevins ML, Norkin A, Weber HP, Karimbux NY. The effect of insulin therapy on osseointegration in a diabetic rat model. *Clin Oral Impl Res*. 1999;10:362-8.
10. Gunczler P, Lanes R, Paoli M, Martinis R, Villaroel O, Weisinger JR. Decreased bone mineral density and bone formation markers shortly after diagnosis of clinical type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2001;14:525-8.
11. Hughes PB, Milton SE, Barritt JG, Auld AM. Studies with verapamil and nifedipine provide evidence for the presence in the cell plasma membrane of two types of  $Ca^{++}$  inflow transporter which are dissimilar to potential operated  $Ca^{2+}$  channels. *Biochem Pharmacol*. 1986;35:3045-52.
12. Katsumata K, Miyao K, Katsumata Y. Verapamil induces protection of alloxan but not streptozotocin-induced diabetes in rats. *Horm Metab Res*. 1988; 20:65.
13. Li J, Duncan RL, Burr DB, Gattone VH, Turner CH. Parathyroid hormone enhances mechanically induced bone formation, possibly involving L-type voltage-sensitive calcium channels. *Endocrinology*. 2003;144:1226-33.
14. Moor P. Le diabete alloxanique: contribution a l'etude de la pathogenie du syndrome. Paris: Masson et Cie; 1953:207-8.
15. Nevins ML, Karimbux NY, Weber HP, Giannobile WV, Fiorellini JP. Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998;13:620-9.
16. Rico H, Hernandez ER, Cabranes JA, Gomez-Castresana F. Suggestion of a deficient osteoblastic function in diabetes mellitus: the possible cause of osteopenia in diabetics. *Calcif Tissue Int*. 1989;45:71-3.
17. Ritter JM, Dale MM, Rang HP. O coração. In: Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. p.226-8.
18. Samnegard E, Cullen DM, Akhter MP, Kimmel DB. No effect of verapamil on the local bone response to in vivo mechanical loading. *J Orthop Res*. 2001;19:328-36.

19. Samnegard E, Sjöden G. Verapamil induces increased bone volume and osteopenia in female rats but has the opposite effect in male rats. *Calcif Tissue* 1992;50:524-6.
20. Takeshita N, Yoshino T, Mutoh S, Yamaguchi I. Possible involvement of vitamin d3-deficiency and relatively enhanced bone resorption in the development of bone loss in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci.* 1994;55:291-9.
21. Tsien RW, Fox AP, Hess P, McCleskey E W, Nilius B, Nowycky MC, Rosenberg RL. Multiple types of calcium channel in excitable cells. *Soc Gen Physiol Ser.* 1987;41:167-87.
22. Vernillo AT. Diabetes mellitus: relevance to dental treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91:263-70.
23. Vilela-Goulart MG, Bastos-Ramos WP, Rocha RF, Salgado MAC, Ranali J. Effects of calcium channel blocker Verapamil on bone and dental germ in rats. *Arch Veter Scienc.* 1999;4:35-40.
24. Ward DT, Yau SK, Mee AP, et al. Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin-induced diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12:779-90.
25. Zaidi M, MacIntyre I, Datta H. Intracellular calcium in the control of osteoclast function. II - Paradoxical elevation of cytosolic free calcium by verapamil. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;167:807-12.

Recebido em 10/04/2008

Aprovado em 5/11/2008

Correspondência:

José Benedito Oliveira Amorim

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

Av. Eng. Francisco José Longo, 777

Cep: 12.245-000

São José dos Campos - SP

email: amorim@fosjc.unesp.br