

## ULTRA-ESTRUTURA DAS ALTERAÇÕES ÓSSEAS NA INTOXICAÇÃO EXPERIMENTAL POR *Solanum malacoxylon* EM COELHOS<sup>1</sup>

Severo Sales de Barros<sup>2</sup>, Denise Russowski<sup>3</sup> e Silvia M. Grando<sup>3</sup>

**ABSTRACT.-** Barros S.S., Russowski D. & Grando S.M. 1996. [**Ultrastructural alterations of bone cells in the experimental *Solanum malacoxylon* poisoning in rabbits.**]

Ultra-estrutura das alterações ósseas na intoxicação experimental por *Solanum malacoxylon* em coelhos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 16(2/3):81-86. Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97119-900 Santa Maria, RS, Brazil.

The ultrastructure of bone cells of mid-diaphysis of the humerus of young rabbits that received by gastric tube a water extract of *Solanum malacoxylon* corresponding to 100 mg/kg of body weight is described. Atrophic, degenerated and necrotic osteocytes and mineralization of perilacunar osteoid were the main lesions. Osteoblasts were atrophic with diminution of synthetic organel.

Osteoclasts exhibited a ruffle border in close contact with the non eroded mineralized matrix, poorly developed vesicular region and absent clear zone. Macrophages in fusion forming multinucleated giant cells were seen in some resorption cavities. It is suggested that the 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> present in the plant is responsible for the cell changes, inhibition of osteoclastic and osteocytic resorption and osteopetrosis.

**INDEX TERMS:** Bone pathology, osteocyte, osteoblast, osteoclast, ultrastructure, *Solanum malacoxylon*, calcitriol, rabbit.

**SINOPSE.-** É descrita a ultra-estrutura das células ósseas da cortical da diáfise do úmero de coelhos jovens que receberam, diariamente, via sonda gástrica, um extrato aquoso de *Solanum malacoxylon* correspondente a 100mg da planta seca por quilograma de peso corporal e foram sacrificados 96 horas após o início do experimento. Osteócitos mostravam diversos graus de atrofia e necrose. Lacunas osteocíticas com restos celulares ou vazias foram vistas com frequência. Mineralização do tecido osteóide perilacunar foi constantemente observada. Os osteoblastos mostravam atrofia, diminuição das organelas de síntese e, em algumas oportunidades, exibiam núcleos picnóticos e estavam livres nos canais de Havers. Os osteoclastos mostravam borda

pregueada em íntimo contato com a matriz mineralizada não erodida, região vesicular pouco desenvolvida e ausência da zona clara na periferia da borda pregueada. Em alguns canais de Havers, foram identificados macrófagos em processo de fusão para formarem células gigantes. Sugere-se que a osteopetrose descrita na intoxicação por *S. malacoxylon* seja decorrente de inibição das atividades de reabsorção osteocítica e osteoblástica, por efeito direto da ação de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Patologia óssea, osteócito, osteoblasto, osteoclasto, ultra-estrutura, *Solanum malacoxylon*, calcitriol, coelho.

### INTRODUÇÃO

As alterações ósseas no curso das calcinose expontâneas e experimentais, induzidas por plantas calcinogênicas, têm sido amplamente relatadas: existem opiniões conflitantes sobre os efeitos dessas plantas no tecido ósseo, e os resultados são discrepantes quanto á patogenia, havendo, no entanto concordância em que o princípio ativo dessas plantas, o 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> é o fator determinante.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 21 de junho de 1996.

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

<sup>2</sup> Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97119-900 Santa Maria, RS; Bolsista pesquisador do CNPq.

<sup>3</sup> Departamento de Patologia, UFSM; Bolsista de apoio técnico do CNPq.

Nos relatos das alterações dos ossos nas calcinose espontâneas e experimentais é descrita osteopetrose, com aumento da massa óssea bem mineralizada. Essa alteração é atribuída ora a maior aposição óssea (Carrillo 1973, Dämmrich et al. 1970, 1995, Norrdin et al. 1975), ora a inibição da reabsorção osteocítica (Krook et al. 1975a,b, Santos et al. 1976, Gimeno 1980, Riet-Correa et al. 1987). Frequentemente têm sido descritas degeneração e necrose dos osteócitos, sugerindo que o princípio ativo de *Solanum malacoxylon* (SM), o 1,25-diidroxicolecalciferol, pelo menos nas concentrações utilizadas, seria tóxico para essas células, resultando em diminuição da reabsorção óssea acompanhada de osteopetrose e finalmente osteonecrose (Krook et al. 1975 a,b, Santos, et al. 1976, Gimeno 1980). Atrofia e necrose de osteócitos foram também relatadas na intoxicação pela vitamina D em suínos (Haschek et al. 1977).

Apesar das excelentes descrições histológicas e histoquímicas dessas alterações ósseas, não há relato de uma análise ultra-estrutural das modificações das células ósseas no curso das calcinose induzidas por plantas calcinogênicas. Este experimento foi programado para estudar as alterações ultra-estruturais dos osteócitos, osteoblastos e osteoclastos na intoxicação experimental por SM em coelhos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Quatro coelhos da raça Nova Zelândia, com aproximadamente dois meses, foram alojados em gaiolas metálicas e alimentados com ração comercial<sup>4</sup> e água *ad libitum*. Três deles receberam diariamente, via sonda gástrica, extrato aquoso de *Solanum malacoxylon* (SM), correspondente a 100mg da planta por quilograma de peso. Um animal não recebeu o extrato e serviu como controle.

O extrato da planta foi preparado colocando-se 20g de folhas secas e moidas em 400 ml de água destilada por 24 horas no refrigerador a 4°C. Após, a suspensão foi tamisada em gaze e estocada em refrigerador.

Os três animais que receberam o extrato foram sacrificados por sangria, com prévia narcose por eter, 96 horas após receberem a primeira dose e, na mesma oportunidade, foi também sacrificado o coelho controle. Pequenos fragmentos da cortical da diáfise do úmero de todos os animais foram fixados imediatamente após o sacrifício, em solução de glutaraldeído 2%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão e incluídos em Epon. Os blocos foram cortados com navalha de diamante e os cortes foram duplamente contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados ao microscópio eletrônico de transmissão.

## RESULTADOS

Os osteócitos exibiam diversos graus de atrofia e degeneração e muito deles encontravam-se necróticos. A alteração mais precoce observada foi uma dilatação do retículo endoplasmático e de forma muito acentuada da cisterna perinuclear. As mitocôndrias apareciam em pequeno número e o sistema de Golgi, na maior parte das células, era pouco evidente. Os núcleos estavam diminuídos de tama-

no, com contornos irregulares e cromatina condensada. O citoplasma exibia notável diminuição de volume, adquirindo formas bizarras e liberando fragmentos recobertos por membrana os quais sofriam mineralização e foram interpretados como vesículas matriciais (Fig. 1 e 2). As alterações atróficas e degenerativas dos osteócitos foram vistas na maioria das células, incluindo osteócitos jovens próximos aos canais de Havers (Fig.3). As lacunas osteocíticas geralmente mostravam acentuada diminuição do tecido osteoide perilacunar substituído por osteoplasia caracterizada por mineralizações do osteoide na borda da lacuna. Esses depósitos minerais apareciam sob a forma granular ou cristalina, esta última de aspecto acicular ou como um emaranhado fibrilar (Janela na Fig.1). As lacunas com osteócitos atróficos ou degenerados eram preenchidas por material de aspecto finalmente flocular (Fig. 2). Algumas lacunas exibiam restos celulares em meio a material flocular, ou estavam vazias (Fig.4), com discreta quantidade de tecido osteoide perilacunar parcial ou totalmente mineralizado.

Os osteoblastos, particularmente aqueles nos canais de Havers, mostravam-se achatados, atróficos, com escassas cisternas do retículo endoplasmático, as quais geralmente estavam dilatadas. O sistema de Golgi era pouco evidente. O citoplasma exibia prolongamentos e projeções irregulares, e, em grande parte, as células perdiam o contato umas com as outras, e algumas se encontravam livres no espaço dos canais.

Em cavidades de reabsorção, puderam ser vistos osteoclastos aparentemente inativos, com borda pregueada em íntimo contato com a matriz óssea mineralizada a qual não exibia sinais de erosão (Fig.6). A zona clara, na periferia da borda pregueada, não foi observada. As mitocôndrias na região basal estavam dilatadas com matriz eletrolúcida e cristas rompidas. A região vesicular estava pouco desenvolvida e constituída por pequenos vacúolos medindo entre 150nm e 1,4µm.

O sistema de Golgi era pouco proeminente e nem sempre observado em todas as células. No sistema de Havers, foram identificados macrófagos em processo de fusão para constituírem células gigantes multinucleadas em íntimo contato com a matriz óssea mineralizada, exibindo retículo endoplasmático pouco desenvolvido, o sistema de Golgi não evidente, numerosas mitocôndrias e alguns pequenos vacúolos (Fig.8).

No coelho controle não foram encontradas alterações ultra-estruturais nas células ósseas.

## DISCUSSÃO

As alterações ultra-estruturais dos osteócitos estão de acordo com as observações em microscopia ótica que relatam degeneração e necrose dessas células nas calcinose espontâneas e experimentais induzidas por plantas calcinogênicas (Krook et al. 1975a,b, Santos et al. 1976, Gimeno 1980, Riet-Correa et al. 1987) e na intoxicação por vitamina D<sub>3</sub> (Haschek et al. 1977).

<sup>4</sup>Ração Guabi para coelhos.

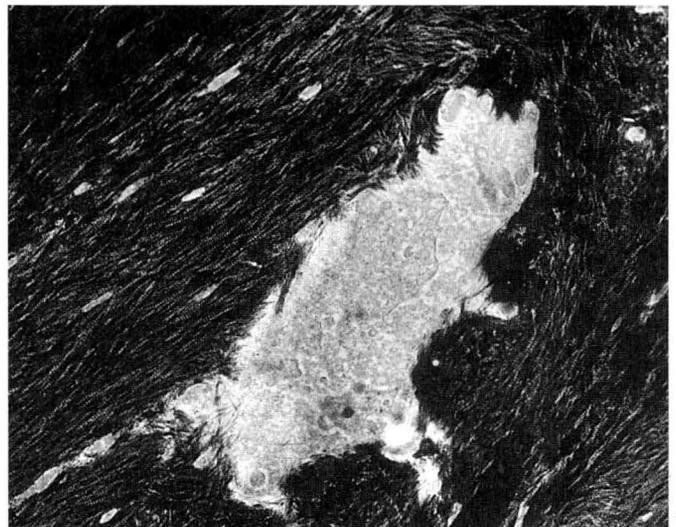
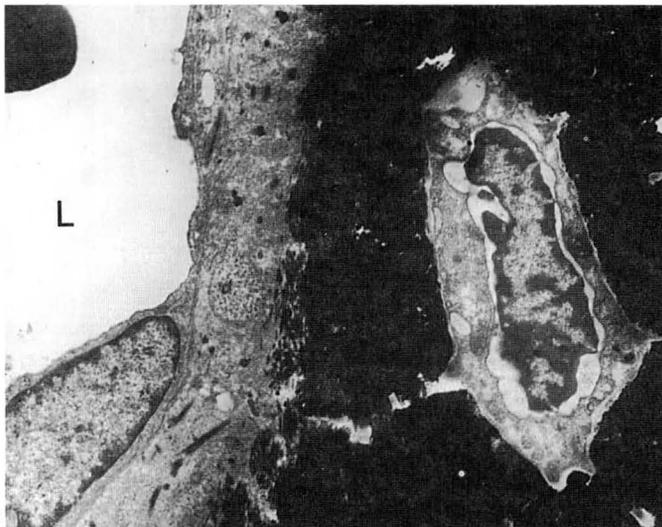
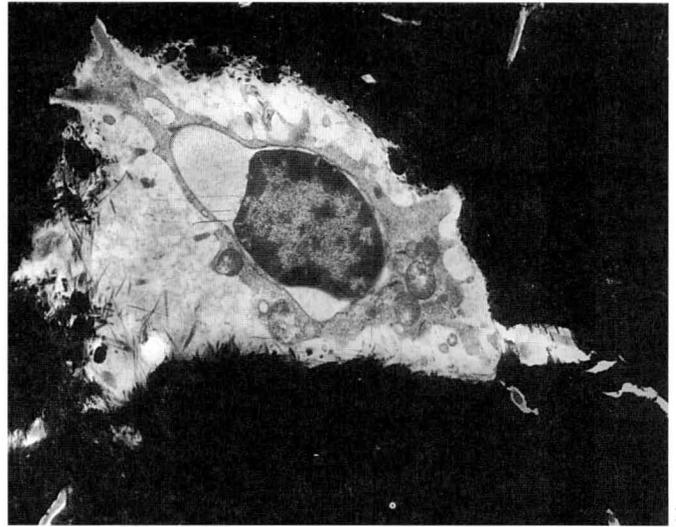
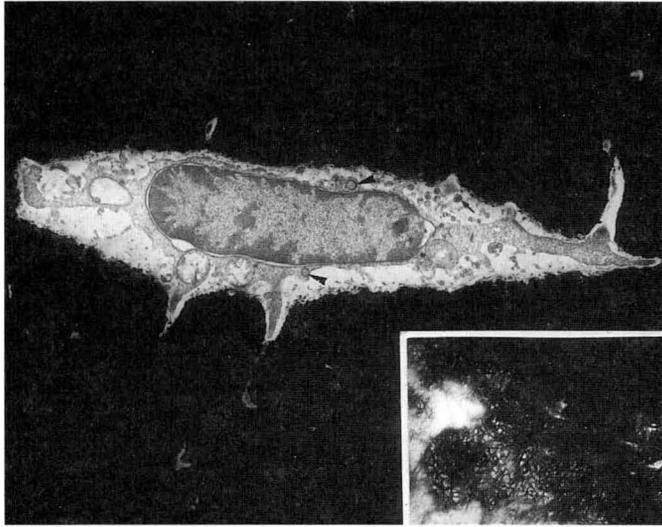


Fig. 1. Osteócito exibindo retração do citoplasma, poucos lisossomos (ponta de seta), raras cisternas do retículo endoplasmático e discreta dilatação da cisterna perinuclear. No espaço lacunar observam-se numerosos fragmentos citoplasmáticos recobertos por membrana e interpretadas como vesículas matriciais (seta). A borda da lacuna apresenta contorno irregular e mineralização do osteóide perilacunar sob a forma de agulhas ou de um emaranhado fibrilar. 56.000x.

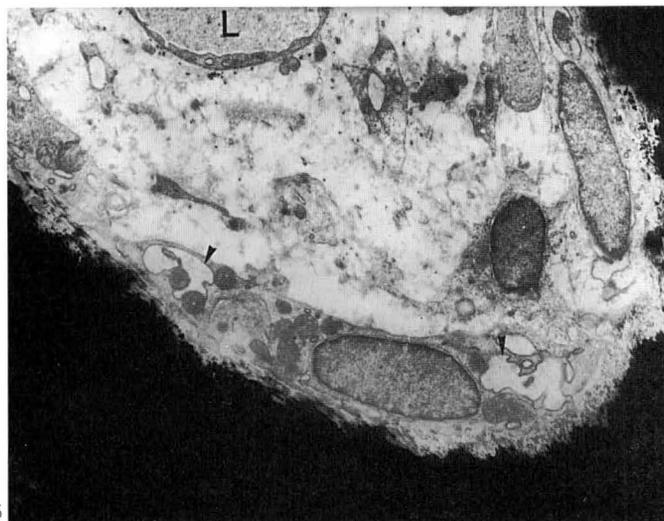
Fig. 2. Osteócito atrófico, núcleo picnótico, dilatação acentuada da cisterna perinuclear e presença de poucos lisossomos. Espaço perinuclear aumentado mostrando matriz finamente flocular, vesículas matriciais. O osteóide perilacunar exhibe mineralização, a lacuna está diminuída e a borda é irregular. 9.500x.

Fig. 3. Osteócito jovem próximo a canal de Havers mostrando retração do núcleo, retículo endoplasmático pouco desenvolvido e dilatação da cisterna perinuclear. A borda da lacuna aparece lisa. Lúmen do capilar (L) no canal de Havers. Note a ausência de osteoblastos junto à borda do canal. 10.080x.

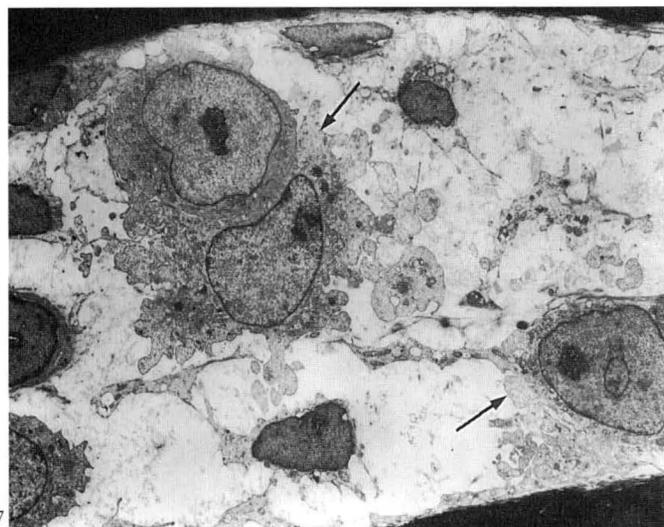
Fig. 4. Lacuna osteocítica com restos necróticos mergulhados em matriz finamente flocular. 9.500x.

Alterações dos osteócitos e deposição de minerais nas margens da parede lacunar foram descritas após uma injeção de calcitonina (Talmage et al. 1975, Baud & Boivin 1978). Dessa forma, a curto prazo, a calcitonina causa um decréscimo no tamanho da lacuna periosteocítica. A ad-

ministração de calcitonina diminui o número de osteoclastos e os transforma em um estágio de inatividade (Lucht 1980) como o observado no nosso trabalho. O hipercalcitoninismo foi considerado a causa de osteopetrose em cavalos intoxicados pela planta



5

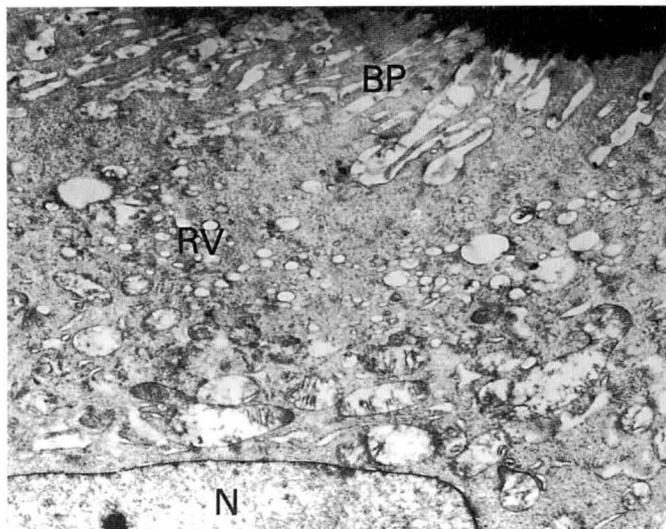


7

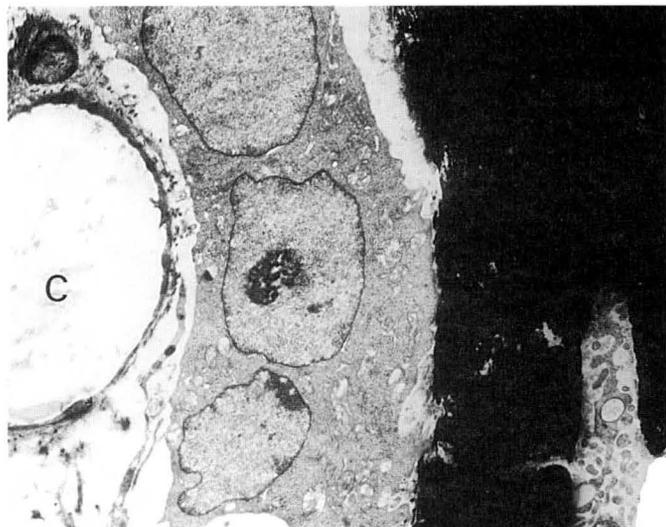
Fig. 5. Osteoblastos atróficos em canal de Havers, exibindo retículo endoplasmático pouco desenvolvido e dilatado (ponta de seta). Algumas células estão livres no espaço do canal. Capilar (L). 6.930x.

Fig. 7. Macrófagos (seta) em fusão para formar célula gigante multinucleada em cavidade de reabsorção. 2.880x.

calcínogênica *Cestrum diurnum* (Krook et al. 1975). Esse mecanismo poderia estar envolvido na osteoplasia observada nos nossos casos, mas Santos et al. (1976) não encontraram hipercalcemia em coelhos que receberam altas doses de SM, o que parece indicar que não houve hipercalcitoninismo. Haschek et al. (1978), estudando o efeito tóxico da vitamina D em suínos, sugerem que o efeito negativo inicial sobre os osteócitos, condrócitos e osteoblastos deve ser atribuído ao efeito tóxico direto de um excesso de vitamina D<sub>3</sub> alimentar, pois o hipercalcitoninismo que ocorre secundariamente à hipercalcemia não seria suficiente para o rápido aparecimento deste efeito, nem é conhecido como causa de morte osteocitária.



6



8

Fig. 6. Osteoclasto em cavidade de reabsorção mostrando borda pregueada (BP) em íntimo contato com matriz óssea mineralizada não erodida. Região vesicular (RV) pouco desenvolvida e vesículas pequenas. Núcleo (N). 8.500x.

Fig. 8. Célula gigante multinucleada no sistema de Havers. No canto inferior direito, lacuna osteocítica com processos citoplasmáticos de um osteócito atrófico. Capilar (C). 6.500x.

Por outro lado, não foi verificada a atividade de nucleação de cristais de apatita nas mitocôndrias dos osteócitos, como as descritas por Zichner (1970) em ratos em crescimento submetidos a injeções repetidas de calcitonina.

Gimeno (1980), estudando ossos de ratos carentes de vitamina D e intoxicados por SM, encontrou um efeito positivo inicial na atividade osteocitária, seguida, após duas semanas, de necrose da grande maioria dessas células e decréscimo na osteólise osteocítica. Nos nossos casos, as alterações dos osteócitos, aparentemente induzidas pelo 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> contido na planta, associadas à liberação de vesículas matriciais e à inibição da reabsorção osteocítica, como tem sido frequentemente sugerido (Krook et al. 1975a,

Santos et al. 1976, Haschek et al. 1978, Riet-Correa et al. 1987), são responsáveis pela mineralização do osteóide perilacunar. Embora a ação osteolítica dos osteócitos não tenha aceitação geral (Cormack 1991), existem evidências de que osteócitos maduros são capazes de reabsorver substância mineral (Baylink et al. 1973) assim como matriz orgânica de suas áreas pericelulares e podem também formar novas camadas de matriz calcificada nas paredes de suas lacunas (Baud 1968, 1978, Jande 1970).

Os osteoblastos exibiam sinais de diminuição da sua atividade sintética, traduzida por células atroficas, achatadas, citoplasma relativamente escasso e retículo endoplasmático pouco desenvolvido parcialmente dilatado. Essa inatividade osteoblástica já foi mencionada na intoxicação experimental em coelhos por plantas calcinogênicas (Santos et al. 1976) e na intoxicação de suínos por vitamina D (Haschek et al. 1978).

Os osteoclastos mostravam borda pregueada em intimo contato com matriz óssea mineralizada não erodida, região vesicular exibindo vesículas pequenas e região basal com mitocôndrias tumefeitas, cristas rompidas e raras cisternas do retículo endoplasmático rugoso. O complexo de Golgi, tão abundante na região perinuclear de osteoclastos ativos, não foi um achado constante, e a zona clara que normalmente é encontrada na periferia da borda pregueada, não foi observada.

Células gigantes multinucleadas inativas, sem borda pregueada e sem zona vesicular foram vistas no sistema de Havers. Essa aparente inatividade osteoclástica não está de acordo com as observações de que o  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  é capaz de aumentar a reabsorção óssea osteoclástica tanto pelo incremento no número de células como de sua atividade (Grise et al. 1990). Essa discrepância poderia ser consequência das diferentes doses utilizadas. Nos nossos casos, embora não tenha sido dosado o nível de calcitriol em SM, ele certamente foi muito maior que o utilizado por Grise et al. (1990), pois SM na dosagem de 100 mg/kg de peso por dia é muito tóxica para coelhos (Santos et al. 1976, Barros et al. 1981, Moraña et al. 1994), e o  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , na quantidade de planta administrada, deve estar várias vezes acima dos níveis fisiológicos.

O achado de macrófagos em fusão para formar células gigantes sugere que esse processo é resultante da ação do  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , como já foi demonstrado *in vitro* em macrófagos alveolares de camundongos (Abe et al. 1984) e em células mielóides (Roodman et al. 1985). É importante lembrar que o efeito de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  pode diferir de um osso para o outro e até mesmo entre osso compacto e osso trabecular; assim Bikle et al. (1990) demonstraram que o osso trabecular e o osso cortical apresentam respostas diferentes à infusão de  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ . Das nossas observações, pode-se concluir que o extrato de SM, na dose administrada a coelhos jovens, inibe a ação dos osteócitos, osteoblastos e osteoclastos no osso compacto, com acentuada citotoxicidade sobre os osteócitos, conduzindo à atrofia e necrose destas células. A inibição das atividades de reabsorção osteocítica e osteoclástica aparentemente é

a responsável pela osteopetrose descrita na intoxicação por SM. Deve ser levada em conta, no entanto, a possibilidade de acentuadas variações na resposta à administração de SM, na dependência da quantidade da planta administrada, duração do experimento, sensibilidade das diferentes espécies animais frente à ação das plantas calcinogênicas assim como da resposta dos diferentes ossos e das diferentes partes de ossos examinados.

## REFERÊNCIAS

- Abe E., Shiina Y., Miyaura C., Tanaka H., Hayashi T., Kanegasaki S., Saito M., Nishi Y., DeLuca H.F & Suda T. 1984. Activation and fusion induced by  $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  and their relation in alveolar macrophages. Proc. Natl Acad. Sci. 81:7112-7116.
- Baud C.A 1968. Submicroscopic structure and functional aspects of the osteocyte. Clin. Orthop. 56:227-236.
- Baud C.A. & Boivin G. 1978. Effects of hormone on osteocyte function and perilacunar wall structure. Clin. Orthop. 136:270-281.
- Bar-Shavit Z., Teitelbaum S.T., Reitsma P., Pegg L.E., Triel J. & Kahn A.J. 1983. Induction of monocytic differentiation and bone resorption by  $1,25$ -dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$ . Cell Biology 80:5907-5911.
- Barros S., Tabone E., Santos M.N., Andujar M. & Grimaud J.A. 1981. Histological and ultrastructural alterations in the aorta in experimental *Solanum malacoxylon* poisoning. Virchows Arch. (Cell Path.) 35:169-175.
- Baylink D., Sipe J., Wergedal J. & Whittemore O. 1973. Vitamin D-enhance osteocytic and osteoclastic bone resorption. Am. J. Physiol. 221:1343.
- Bikle D.D., Halloran P., McGalliard-Cone C. & Morey-Holton E. 1990. Different responses of trabecular and cortical bone to  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  infusion. Am. J. Physiol. 259:E716-E722.
- Carrillo B.J. 1973. Efecto de la intoxicación de *Solanum malacoxylon* en el sistema óseo. Revta Investnes Agropec., B. Aires, 10:67-77.
- Cormack D.M. 1991. Ham Histologia, cap.12. Osso, p.216-254. 9ª ed. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro.
- Dämmrich K., Dirksen G. & Plank P. 1970. Über eine enzootische "Kalzinose" beim Rind. 3. Skelettveränderungen. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 77:342-346.
- Dämmrich K., Döbereiner J., Done S.H & Tokarnia C.H. 1975. Skelettveränderungen nach Vergiftungen mit *Solanum malacoxylon* beim Rind. Zbl. Vet. Med., A, 22:313-329.
- Gimeno E.J. 1980. Estudios histopatológicos de las alteraciones óseas em ratas carenciadas em vitamina D y ratas intoxicadas con *Solanum malacoxylon*. Analecta Veterinária 12:61-108.
- Grise M.A., Marks Jr. S.C., MacKay C.A. & Popoff S.N. 1990. Effects of  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  on osteoclast number and cytochemistry in normal and osteopetrotic rabbits. Am. J. Anat. 189:261-266.
- Haschek W.M., Krook L., Kallfelz F.A & Pond W.G. 1978. Vitamin D toxicity. Initial site and mode of action. Cornell Vet.68:324-364.
- Jande S.S. 1971. Fine structural study of osteocytes and their surrounding bone matrix with respect to their age in young chicks. J. Ultrastructure Res. 37:279-300.
- Krook L., Wasserman R.H., Shively J.V., Tashjian A.H., Brokken T.D. & Morton J.F. 1975a. Hipercalcemia and calcinosis in Florida horses: Implication of the shrub *Cestrum diurnum*, as the causative agent. Cornell Vet. 65:26-56.
- Krook L., Wasserman R.H., McEntee K., Brokken T.D. & Teigland, M.B. 1975b. *Cestrum diurnum*, poisoning in Florida cattle. Cornell Vet. 65:557-575.
- Lucht U. 1980. Osteoclasts Ultrastructure and Functions, p.705-734. In: Carr J. & Daems W.T. (ed.) The Reticuloendothelial System. 1st ed. Vol. 1. Plenum Press, New York.
- Norrdin R.W., Barros C.S.L., Queille M.L., Carré M. & Miravet L. 1979.

- Acute effects of *Solanum malacoxylon* on bone formation rates in growing rats. *Calcif. Tissue Int.* 28:239-243.
- Riet-Correa F., Schild A.L., Méndez M.C., Wasserman R. & Krook L. 1987. Enzootic calcinosis in sheep caused by the ingestion of *Nierembergia veitchii*. *Pesq. Vet. Bras.* 7:85-95.
- Roodman G.D., Ibbotson K.J., McDonald B.R., Kuehl T.J. & Mundy G.R. 1985. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow. *Proc. Natl Acad. Sci.* 82:8213-8217.
- Santos M.N., Nunes V.A., Nunes I.J., Barros S.S., Wasserman R.H. & Krook L. 1976. *Solanum malacoxylon* toxicity: inhibition of bone resorption. *Cornell Vet.* 66:565-588.
- Talmage R.W., Matthews J.L., Martin J.H., Kennedy J.W., Davis W.L. & Roycroft J.H. 1975. Calcitonin, phosphate and the osteocyte-osteoblast bone cell unit. *Proc. 5th Parathyroid Conf., Excerpta Medica Int. Congress. Series* 346:284-296.
- Zichner L. 1970. Calcitonin-Wirkung auf die Osteocyten der heranwachsenden Ratte. *Klin. Wschr.* 48:1444-1448.