

VITOR HUGO FARINA

**EFEITOS DA *Calcareo phosphorica* 6CH E DO
ALENDRONATO NA REPARAÇÃO DE LESÃO ÓSSEA EM
RATAS OVARIECTOMIZADAS**



2010

VITOR HUGO FARINA

EFEITOS DA *Calcareo phosphorica* 6CH E DO ALENDRONATO NA REPARAÇÃO DE LESÃO ÓSSEA EM RATAS OVARIECTOMIZADAS

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão

São José dos Campos

2010

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2008

F226a Farina, Vitor Hugo.
Efeitos da Calcarea phosphorica 6CH e do alendronato na reparação da
lesão óssea em ratas ovariectomizadas / Vitor Hugo Farina. __ São José
dos Campos : [s.n.], 2010
140f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de
São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2010.
Orientador: Prof. Dr. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão

1. Osteoporose. 2. Difosfonatos. 3. Alendronato. 4. Calcarea phosphorica. 5.
Alopatia. 6. Homeopatia. I. Brandão, Adriana Aigotti Haberbeck. II.
Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos
Campos. III. Título

tD12

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 12 de Maio de 2010 .

Assinatura :

E-mail: odontofarina@uol.com.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Profa. Dra. Janete Dias Almeida

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Profa. Dra. Juliana Mazzonetto Teófilo

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo - USP

Profa. Dra. Giselle Segnini Senra

Profa. Dra. Ana Lia Anbinder

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

São José dos Campos, 20 de julho de 2010

DEDICATÓRIA

À minha família e a todas as pessoas de meu relacionamento, parentes, amigos, colegas, professores, que durante estes anos me acompanharam de perto, ou às vezes à distância, dando apoio, aconselhando e incentivando.

Que todo o empenho dedicado a este estudo seja mais um passo em busca do conhecimento e possa trazer alguma contribuição ao desenvolvimento da ciência.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Agradeço de modo muito especial à minha orientadora, Professora Doutora Adriana Aigotti Haberbeck Brandão, por ter sido agraciado com sua orientação, agora pela segunda vez. Seu acolhimento sempre carinhoso foi fundamental e serviu como novo estímulo para seguir em frente. Sua competência profissional aliada a uma disponibilidade quase ilimitada em todas as fases do curso certamente ficarão em minha lembrança. Para mim estes anos de convivência foram muito agradáveis e positivamente marcantes. Por isso eu desejo externar o meu **MUITO OBRIGADO** e que Deus a abençoe sempre.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do Diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Professor Adjunto José Roberto Rodrigues e do vice-diretor Professor Doutor Carlos Augusto Pavanelli.

Ao Professor Adjunto Luiz Antonio Guimarães Cabral, que ao longo destes anos de mestrado e doutorado, sempre se mostrou interessado em transmitir sua experiência e conhecimento. Sua figura marcante certamente deixará saudades. Muito obrigado.

À Professora Adjunta Janete Dias Almeida, sempre presente desde meu ingresso no mestrado, por sua espontaneidade e alegria no relacionamento e por seu apoio nos momentos difíceis.

À Professora Titular Yasmín Rodarte Carvalho, pela paciência com que transmite seus conhecimentos, procurando tornar simples o que é complexo.

Ao Professor Titular Luiz Cesar de Moraes, e a toda equipe da disciplina de radiologia que gentilmente disponibilizaram os equipamentos radiológicos durante a fase experimental deste trabalho.

À minha colega e companheira de biotério Ana Lourdes da Silva Machado, pela amizade, por sua ajuda e pelo agradável convívio durante toda a fase experimental deste trabalho.

À colega de pós-graduação Ana Paula de Lima, por sua dedicação e inestimável ajuda na elaboração da análise estatística desta tese.

À Doutora Giselle Segnini Senra, pela disponibilidade, paciência e interesse em transmitir seus conhecimentos de forma tão didática.

Ao Professor Assistente Ivan Balducci, pelo valioso apoio e orientação durante a elaboração da análise estatística.

À Diretora Técnica de Serviços de Biblioteca e Documentação Silvana Alvarez, pela competência e presteza na revisão normativa, e a todos os funcionários da biblioteca que pacientemente colaboraram com o levantamento bibliográfico deste trabalho.

Aos funcionários do biotério Lourival Jacob, Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos e Marco Antônio Corrêa Alfredo, pelo profissionalismo e colaboração na fase experimental desta pesquisa.

Aos colegas de pós-graduação Celina Faig Lima e Luis Felipe das Chagas e Silva de Carvalho, pelos laços de amizade e coleguismo que se fortaleceram durante estes anos e a todos os colegas que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho. O meu muito obrigado.

Aos animais experimentais que tiveram suas vidas sacrificadas em benefício da ciência. Aprendi a admirá-los e respeitá-los ainda mais.

E intencionalmente por último, a Deus, a quem devo tudo. Ele me deu força, coragem e proporcionou esta enorme riqueza de experiências. Muito obrigado!

EPÍGRAFE

“Deus é o invisível evidente.”

Victor Hugo

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	16
INTRODUÇÃO.....	17
REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Tecido ósseo.....	19
2.2 Remodelação óssea.....	21
2.3 Osteoporose.....	26
2.4 Reparo ósseo.....	31
2.5 Bisfosfonatos.....	34
2.6 Alendronato.....	38
2.7 Homeopatia.....	42
2.8 <i>Calcarea phosphorica</i>	46
3 PROPOSIÇÃO.....	50
4 MATERIAL E MÉTODO.....	51
4.1 Manuseio geral dos animais.....	51
4.2 Anestesia.....	52
4.3 Ovariectomia.....	52
4.4 Execução da lesão óssea e tratamento.....	54
4.5 Sacrifício dos animais.....	57
4.6 Comprovação da ovariectomia.....	57
4.7 Avaliação da densidade óptica das tíbias.....	57
4.8 Análise histológica.....	59
4.9 Avaliação histomorfométrica das tíbias.....	60
4.10 Análise estatística.....	64

5 RESULTADO	66
6 DISCUSSÃO	106
7 CONCLUSÃO	122
8 REFERÊNCIAS	123
ANEXO A	138
ANEXO B	139
ABSTRACT	140

Farina VH. Efeitos da *Calcarea phosphorica* 6CH e do alendronato na reparação de lesão óssea em ratas ovariectomizadas [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2010.

RESUMO

A osteoporose é uma das doenças mais prevalentes entre os idosos. Há na literatura poucos relatos sobre a ação de medicamentos homeopáticos no tratamento da osteoporose e na reparação óssea na vigência desta doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do medicamento homeopático *Calcarea phosphorica* 6CH (CP) em comparação ao medicamento alopático alendronato (A) na reparação óssea em ratas ovariectomizadas. Foram utilizados quatro grupos de 30 ratas, sendo três grupos submetidos à ovariectomia (OVZ) e um à cirurgia *sham*. Após 60 dias foi realizada uma lesão monocortical nas tíbias de todas as ratas e iniciados os tratamentos: I- OVZ/tratado com A (1,2 mg/ml, três vezes por semana/animal), II- OVZ/tratado com CP (2 glóbulos/1 ml água/dia/animal), III- OVZ/tratado com água (1 ml/dia/animal) e IV- *sham* tratado com água (1 ml/dia/animal). Os animais (n= 6) foram sacrificados após 3, 6, 10, 17 e 28 dias da confecção da lesão óssea. As tíbias foram fixadas em formol 10%, submetidas à análise radiográfica, descalcificadas e submetidas à análise histológica/histomorfométrica. Os resultados mostraram que CP estimulou proliferação tecidual intensa com formação de calo mais volumoso que os demais grupos nas fases iniciais da reparação, no entanto este calo mostrou grande quantidade de tecido mole que foi rapidamente remodelado. A quantidade proporcional de tecido ósseo no calo variou entre os diferentes tratamentos, mas a quantidade de osso ao final do experimento foi semelhante entre os grupos. Enquanto com A formou-se inicialmente bastante osso que mostrou resistência à remodelação, com CP houve pouca formação óssea inicial, que aumentou até o final do experimento. Concluiu-se que a *Calcarea phosphorica* estimulou a reparação óssea por um mecanismo de ação diferente do alendronato e que o alendronato foi a melhor opção para tratar lesões ósseas sendo a *Calcarea phosphorica* melhor que a ausência de tratamento.

Palavras-chave: Osteoporose. Difosfonatos. Alendronato. *Calcarea phosphorica*. Alopátia. Homeopatia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Sequência cirúrgica da ovariectomia	54
Figura 2 -	Sequência cirúrgica do defeito ósseo.....	56
Figura 3 -	Tomada radiográfica da tíbia.....	58
Figura 4 -	Delimitação da área A.....	61
Figura 5 -	Delimitação da área B.....	61
Figura 6 -	Seleção das trabéculas.....	62
Figura 7 -	Trabéculas isoladas.....	63
Figura 8 -	Gráfico de densidade óptica dos grupos S e O.....	68
Figura 9 -	Gráfico densidade óptica dos grupos A, O e CP.....	72
Figura 10 -	Gráfico da área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos S e O.....	77
Figura 11 -	Gráfico da área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos A, O e CP.....	81
Figura 12 -	Gráfico da área de osso neoformado na área de preenchimento dos defeitos ósseos dos grupos S e O ..	85
Figura 13 -	Gráfico da área de osso neoformado na área de preenchimento dos defeitos ósseos dos grupos A, O e CP.....	89
Figura 14 -	Aspecto da área da lesão 3 dias após a confecção do defeito ósseo.....	92
Figura 15 -	Aspecto da área da lesão 6 dias após a confecção do defeito ósseo.	95
Figura 16 -	Aspecto da área da lesão 10 dias após a confecção do defeito ósseo.....	98
Figura 17 -	Aspecto da área da lesão 10 dias após a confecção do defeito ósseo (maior aumento).....	99

Figura 18 -	Aspecto da área da lesão 17 dias após a confecção do defeito ósseo.....	102
Figura 19 -	Aspecto da área da lesão 17 dias após a confecção do defeito ósseo (maior aumento).....	103
Figura 20 -	Aspecto da área da lesão 28 dias após a confecção do defeito ósseo.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estatística descritiva dos valores de densidade óptica dos grupos O e S.....	67
Tabela 2 -	Resultado da análise ANOVA para os dados de densidade óptica dos grupos O e S.....	69
Tabela 3 -	Formação de grupos homogêneos para densidade óptica dos grupos O e S.....	70
Tabela 4 -	Estatística descritiva dos valores de densidade óptica dos grupos A, CP e O.....	71
Tabela 5 -	Resultado da análise ANOVA para os dados de densidade óptica dos grupos A, CP e O.....	73
Tabela 6 -	Formação de grupos homogêneos para densidade óptica dos grupos A, CP e O.....	74
Tabela 7 -	Estatística descritiva dos valores de área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos O e S.....	76
Tabela 8 -	Resultado da análise ANOVA para os dados de área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos O e S.....	78
Tabela 9 -	Formação de grupos homogêneos para a área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos O e S.....	79
Tabela 10 -	Estatística descritiva dos valores de área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos A, CP e O.....	80
Tabela 11 -	Resultado da análise ANOVA para os dados de área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos A, CP e O.....	82

Tabela 12 -	Formação de grupos homogêneos para a área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos A, CP e O.....	83
Tabela 13 -	Estatística descritiva dos valores de área de osso neoformado na área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos O e S.....	84
Tabela 14 -	Resultado da análise ANOVA para os dados de área de osso neoformado na área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos O e S.....	86
Tabela 15 -	Formação de grupos homogêneos para área de osso neoformado na área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos O e S.....	87
Tabela 16 -	Estatística descritiva dos valores área de osso neoformado na área de preenchimento dos defeitos ósseos dos grupos A, CP e O	88
Tabela 17 -	Formação de grupos homogêneos para a área de osso neoformado na área de preenchimento dos grupos A, CP e O.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BMU = Unidade multicelular básica
- IFN- γ = Interferon-gama
- IGF-II = fator 2 de crescimento símile a insulina
- IL-1 = Interleucina 1
- IL-3 = Interleucina 3
- IL-4 = Interleucina 4
- IL-6 = Interleucina 6
- IL-10 = interleucina 10
- IL-11 = Interleucina 11
- IL-18 = Interleucina 18
- GM-CSF = Fator estimulador de colônias de granulócitos macrófagos
- M-CSF = Fator estimulador de colônias de macrófagos
- OPG = Osteoprotegerina
- OVZ = Ovariectomia
- PDGF = Fator de crescimento derivado de plaquetas
- PGE₂ = Prostaglandina E₂
- PTH = Hormônio paratireoídiano
- RANK = Receptor ativador de fator nuclear kappa β
- RANKL = RANK ligante
- SHAM = Grupo de ratas falso ovariectomizadas
- TGF- β = Fator transformador de crescimento beta
- TNF = Fator de necrose tumoral
- TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa
- TNF- β = Fator de necrose tumoral beta
- TNFR = Receptor de fator de necrose tumoral
- 1,25(OH)₂D₃ = 1,25-dihidroxitamina D₃

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida da população mundial enfatiza a necessidade de medidas de prevenção contra os males do envelhecimento. Os estudos de novos tratamentos que proporcionem melhor qualidade de vida ao idoso representam uma preocupação atual, sobretudo por parte dos profissionais de saúde.

Entre os males do envelhecimento destaca-se a osteoporose, que é uma doença metabólica óssea frequentemente associada a custos econômicos significativos relacionados à hospitalização, cuidados ambulatoriais, institucionalização, incapacidades e mortes prematuras. Como complicação comum resultante desta doença, podemos citar as fraturas decorrentes da perda de massa óssea.

A OMS estima que a osteoporose afete cerca de 200 milhões de mulheres em todo o mundo, sendo a doença óssea metabólica de maior prevalência na população mundial. No Brasil, dadas as dificuldades que cercam a realização de estudos epidemiológicos, ainda não existem números confiáveis sobre a prevalência da osteoporose. Atualmente, em nosso país, a população idosa acima dos 60 anos representa cerca de 9% do total, com tendência ao crescimento.

Existem diversos tratamentos alopáticos para a osteoporose como a reposição hormonal, o uso de cálcio, vitamina D, calcitonina e os bisfosfonatos, tais como o risedronato e o alendronato. Apesar da eficácia comprovada destes medicamentos, em tratamentos prolongados alguns podem apresentar efeitos colaterais por vezes graves, como esofagite, gastrite, úlcera gástrica, osteonecrose de maxilares, entre outros.

Terapias alternativas como a homeopatia e a fitoterapia são amplamente utilizadas para tratar várias doenças devido a seus efeitos terapêuticos e, também, por se acreditar que apresentem menos efeitos colaterais. Seu uso em doenças ósseas ainda é limitado. Entre as medicações homeopáticas podemos encontrar indicações terapêuticas para reparação tecidual, osteoporose e para fraturas, como a *Calendula officinalis*, *Calcarea carbonica*, *Calcarea fluorica*, e *Calcarea phosphorica*, entre outras.

A *Calcarea phosphorica*, objeto deste estudo, atua no equilíbrio cálcio-fósforo, sendo essencial para nutrição, crescimento e reparação óssea. É importante para a diferenciação, multiplicação de células ósseas e deposição de cálcio, necessários na formação do calo ósseo adequado, além de apresentar tropismo pela matriz óssea.

Segundo Werkman et al. (2005), a *Calcarea phosphorica* 6CH apresentou-se mais eficaz nas fases iniciais do processo de reparo ósseo em lesões em tibia de ratos castrados do que o risedronato. Porém, estudos avaliando os mecanismos de atuação da *Calcarea phosphorica* no tecido ósseo ainda são escassos na literatura.

Partindo da hipótese de que a *Calcarea phosphorica* atua na reparação óssea, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial deste medicamento como terapia alternativa para as complicações da osteoporose.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tecido ósseo

O osso é um tecido mineralizado e um dos mais resistentes e rígidos do corpo humano, com múltiplas funções (Harada et al., 2003; Allori et al., 2008a). Apresenta grande potencial de regeneração de forma e função após traumas e é caracterizado por ser metabolicamente ativo e dinâmico, apresentando constante remodelação (Carvalho; Ponzoni, 2002; Diniz et al., 2005).

É um tecido conjuntivo especializado, composto por células e material intercelular calcificado, organizado para desempenhar o papel de estrutura e sustentação do corpo. Serve como alavanca para a musculatura, proteção para órgãos internos e medula óssea, além de armazenar 95% do cálcio encontrado no organismo. A porção celular é constituída por células osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. A porção inorgânica é composta fundamentalmente por cristais de hidroxiapatita (Yong et al., 2007).

O esqueleto adulto é constituído em 80% por osso cortical compacto, formando a parte externa das estruturas esqueléticas e 20% por osso esponjoso ou trabecular, encontrado na porção interna dos ossos longos, corpos vertebrais e pelve. O osso trabecular apresenta um metabolismo mais ativo do que o osso cortical, fornecendo suprimento inicial nos estados de deficiência mineral, sendo perdido rapidamente na osteoporose. O tecido ósseo compacto maduro é composto por cerca de 70% de sais inorgânicos e 30% de matriz orgânica. O colágeno forma

mais de 90% do componente orgânico, sendo o restante formado por proteoglicanos da substância fundamental e por um grupo de moléculas não colagênicas envolvidas na regulação da mineralização óssea (Yong et al., 2007).

Existem cerca de 20 tipos diferentes de colágeno nos vários tecidos; nos ossos predomina quase exclusivamente o tipo I, embora o tipo III, V, XI e XIII podem estar presentes. O colágeno é crítico na reparação óssea facilitando a formação precoce de espículas nas áreas de fraturas (Allori et al., 2008b).

As superfícies internas e externas dos ossos são revestidas por células osteoprogenitoras e tecido conjuntivo, que formam o endóstio e o perióstio respectivamente. Estas células têm morfologia semelhante à dos fibroblastos, se transformando muito facilmente em osteoblastos quando estimuladas, sendo importantes na nutrição e crescimento dos ossos, bem como na reparação das fraturas (Yong et al., 2007; Junqueira; Carneiro, 2008).

O que define o osso como um tecido mineralizado é a deposição de cálcio e fosfato. Os osteoblastos são extremamente sensíveis ao ambiente bioquímico ao seu redor e controlam os movimentos de cálcio, fosfato e outros íons dentro e fora da matriz (Allori et al., 2008b).

O tecido ósseo se apresenta sob duas formas principais: tecido ósseo imaturo ou primário e o tecido ósseo maduro, também conhecido como secundário ou lamelar. O tecido ósseo imaturo não é somente o primeiro tecido ósseo a ser formado durante o desenvolvimento do esqueleto, mas é também o primeiro tecido ósseo a ser depositado nas reparações ósseas (Yong et al., 2007; Junqueira; Carneiro, 2008).

Quanto à ossificação, o osso pode ser formado por ossificação endocondral ou ossificação intramembranosa. O mecanismo

de deposição de matriz óssea nos dois tipos de ossificação é o mesmo. Uma rede trabecular ou esponjosa primária é inicialmente depositada e depois transformada em osso maduro. Na ossificação intramembranosa as células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos formando o blastema ósseo, no interior dos quais os osteócitos se interconectam através de processos celulares e os osteoblastos permanecem na superfície. Na ossificação endocondral os moldes de cartilagem hialina são substituídos por matriz óssea. A ossificação inclui o crescimento, a modelagem e a remodelação do osso, processos mediados pelos osteoblastos e osteoclastos sob controle do hormônio da paratireóide e da vit. D. (Kierszenbaum, 2004; Young, 2007).

2.2 Remodelação óssea

Uma vez que o esqueleto tenha alcançado a maturidade, a regeneração continua na forma de substituição periódica de osso velho por osso novo. Este processo é chamado de remodelação e é responsável pela completa renovação do esqueleto adulto a cada 10 anos. A remodelação provavelmente serve para reparar os danos por fadiga e para prevenir as conseqüências da idade avançada. No esqueleto em crescimento a remodelação tem o objetivo de expandir a cavidade medular, enquanto aumenta a espessura das trabéculas (Bandeira et al.; Manolagas, 2000).

A massa esquelética total e sua densidade permanecem relativamente constantes após o término do crescimento, até a idade de aproximadamente 50 anos. A partir desta idade, e especialmente em idosos do sexo feminino, ocorre uma rápida perda de massa durante os primeiros 5 a 10 anos após a menopausa, em virtude da deficiência de

estrógeno. Nesta fase, a reabsorção prevalece sobre a aposição, levando a uma gradual perda de massa óssea (Vasconcelos et al., 2002; Kanis et al., 2008).

A remodelação óssea se dá pela clássica sequência ativação-reabsorção-formação. Após a ativação, os osteoclastos formam a lacuna de reabsorção. Uma vez terminada essa fase, os pré-osteoblastos migram para a cavidade, diferenciam-se em osteoblastos e iniciam a formação da matriz óssea. A mineralização da matriz ocorre após vários dias - nesta fase sais de fosfato de cálcio amorfos (não cristalinos) começam a se precipitar nas zonas ocas das fibrilas colágenas. Estes focos de mineralização se expandem e coalescem em cristais de hidroxiapatita por remodelação adicional. Contudo, 20% ou mais do componente mineral permanecem na forma amorfa, fornecendo um tampão disponível para a homeostasia do cálcio do corpo todo. A deposição de cálcio parece estar associada às vesículas revestidas por membrana derivadas da membrana plasmática do osteoblasto, chamadas de vesículas da matriz; estas contêm fosfatase alcalina e outras fosfatases, as quais podem neutralizar o efeito inibitório do pirofosfato na deposição espontânea de sais de cálcio. Durante esse processo, alguns osteoblastos são enclausurados, transformando-se em osteócitos. A esse conjunto de células ósseas e osso novo formado dá-se o nome de unidade multicelular básica (BMU) (Carvalho et al., 2000; Young, 2007).

No esqueleto adulto todos os osteoclastos e osteoblastos pertencem às BMU, que medem cerca de 2 mm de comprimento e 0,2 mm de largura, com um grupamento de osteoclastos na frente, um grupamento de osteoblastos atrás, um sistema vascular capilar central, um suprimento nervoso e tecido conjuntivo associado. Em humanos adultos saudáveis, cerca de 3 a 4 milhões de BMUs são iniciadas por ano e cerca de 1 milhão estão em ação em qualquer época. Os osteoclastos se aderem ao osso e, em seguida, o removem por acidificação e digestão

proteolítica. À medida que cada BMU avança, os osteoclastos deixam o sítio de reabsorção e os osteoblastos se movem em direção à área escavada. Inicia-se o processo de nova formação óssea pela secreção de osteóide, que é finalmente mineralizado em novo osso. O tempo de vida das BMUs é de 6 a 12 meses; muito mais do que as células que a compõem; por isso é necessário um suprimento contínuo de osteoclastos e osteoblastos vindos da medula (Parfitt AM, 1994; Boonen et al., 2004; Nagae et al., 2006).

A fase de reabsorção dura em torno de duas semanas e é realizada pelos osteoclastos derivados de células-mãe hematopoiéticas, que possuem fosfatases ácidas expressas nas suas membranas celulares. Os osteoclastos subsistem em massas pequenas e concentradas que se ligam à superfície óssea e liberam enzimas proteolíticas, além de diversos ácidos como o ácido cítrico e ácido láctico, liberados de vesículas secretoras. As enzimas digerem ou dissolvem a matriz orgânica do osso, enquanto os ácidos dissolvem os sais ósseos, levando à criação de um túnel com diâmetro entre 0,2 a 1 milímetro a alguns milímetros de comprimento. No término desse período, os osteoclastos desaparecem, o túnel é invadido pelos osteoblastos e em seguida se inicia o desenvolvimento de um novo tecido ósseo. O que encerra esta fase ainda não está claro, mas um elevado nível de cálcio local ou substâncias liberadas pela matriz parecem estar envolvidos (Bandeira et al., 2000; Guyton; Hall, 2006).

A fase de formação óssea se prolonga por até quatro meses, até que o osso reabsorvido seja completamente substituído. A formação é iniciada pelos osteoblastos, células cuboidais com citoplasma basófilo, com alto desenvolvimento do retículo endoplasmático rugoso, característico de células com alta capacidade de síntese protéica. O aparelho de Golgi também é evoluído, fator relevante no processamento do colágeno e de sua extrusão. Quando os osteoblastos são inativos, sua

aparência é mais semelhante à dos fibroblastos, achatados e alongados. O colágeno e outros constituintes da matriz orgânica são sintetizados por ribossomos associados ao retículo endoplasmático granular dos osteoblastos. Estes ficam armazenados no aparelho de Golgi e são secretados na superfície celular resultando na produção de osteóide. Os osteoblastos sintetizam colágeno tipo I e proteínas como a osteocalcina, a osteopontina e sialoproteínas. As proteínas produzidas pelos osteoblastos são depositadas na superfície óssea, de forma organizada, formando a matriz osteóide, onde a mineralização ocorre subsequentemente durante vários dias (Bandeira et al., 2000; Douglas; Douglas, 2006; Guyton; Hall, 2006; Young et al., 2007).

A ação entre osteoblastos e os osteoclastos se dá em múltiplos focos e ocorre de tal forma que a reabsorção em um local é equilibrada pela formação em outro, sem enfraquecimento do esqueleto. Considera-se o osteoclasto como a célula diretamente envolvida nesse processo. É altamente móvel e pode migrar ao longo das superfícies ósseas sendo localizado em áreas a serem reabsorvidas. Nessas áreas, passam a secretar enzimas hidrolíticas que dissolvem o tecido ósseo formando lacunas de reabsorção. O osteoclasto tem a função de limpar a superfície óssea permitindo o depósito de tecido ósseo pelos osteoblastos (Carvalho; Ponzoni, 2002).

Um grande número de citocinas e fatores estimuladores de colônia estão envolvidos na remodelação. Como fatores promotores de reabsorção podemos citar a interleucina 1 (IL-1), interleucina 3 (IL-3), interleucina 6 (IL-6), interleucina 11 (IL-11), fator de necrose tumoral (TNF) e fator estimulador de colônias de granulócitos macrófagos (GM-CSF). Se opondo às citocinas citadas, existem a interleucina 4 (IL-4), interleucina 18 (IL-18) e o interferon-gama (IFN- γ), que inibem o desenvolvimento de osteoclastos (Kimble et al., 1995; Udagawa et al., 1997; Bandeira et al., 2000).

A IL-6 desempenha um papel importante em várias doenças caracterizadas pelo remodelamento ósseo acelerado e excessiva reabsorção óssea focal ou sistêmica. Ela é produzida, em altos níveis, por células estromais derivadas da medula óssea e por osteoblastos, como resposta ao estímulo por uma variedade de outras citocinas e fatores de crescimento tais como IL-1, TNF, fator de necrose tumoral beta (TNF- β) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Na presença de estrógeno sua produção é inibida (Girasole et al., 1992; Franchimont, 1999).

Só, ou em conjunto com outros agentes, a IL-6 estimula a osteoclastogênese e promove a reabsorção óssea. O estímulo depende de um sinal mediado por osteoblastos, que possuem receptores para IL-6, os quais se ligam a ela e induzem a diferenciação do osteoclasto (Udagawa, 1995).

Hormônios também participam do processo de remodelação. Os dois principais hormônios do sistema homeostático do cálcio, principalmente o hormônio paratireoidiano (PTH) e o metabólito ativo da vitamina D, a 1,25-dihidroxitamina D₃ [1,25-(OH)₂D₃], são potentes estimuladores da formação osteoclástica, pois estimulam a produção de IL-6 e IL-11 por osteoblastos. Eles possuem habilidade para estimular o desenvolvimento de osteoclastos e regular a absorção de cálcio e excreção pelo intestino e rins, sendo elementos chave na homeostase extracelular de cálcio. A calcitonina, o terceiro hormônio clássico de regulação óssea, inibe o desenvolvimento de osteoclastos, promovendo a apoptose destes. Muitos outros hormônios, incluindo estrógeno, andrógeno, glicocorticóides, TSH e T4 exercem potentes influências no desenvolvimento de osteoclastos e osteoblastos pela regulação da produção e/ou ação de várias citocinas (Bandeira et al., 2000; Guyton; Hall, 2006; Sampath et al., 2007).

Estímulos mecânicos são considerados incentivadores do modelamento e remodelamento ósseo. Um conceito interessante é que os osteócitos podem funcionar como mecanosensores através de canalículos de comunicação com células da medula. Estímulos mecânicos benéficos podem ser adquiridos mais frequentemente a partir de contrações da musculatura esquelética, por compressão de impacto, ou pelo atrito (Diniz et al., 2005; Marie, 2009).

A formação e a reabsorção óssea são equilibradas no indivíduo adulto, mas em determinadas condições há prevalência da reabsorção e diminuição da formação óssea, podendo resultar em osteoporose.

2.3 Osteoporose

Devido ao aumento na expectativa de vida das populações, a osteoporose é atualmente reconhecida como importante questão em termos de saúde pública. Afeta sobretudo mulheres na pós-menopausa e se desenvolve como decorrência de uma desordem no *turnover* ósseo (processo de remodelação óssea), havendo maior reabsorção em relação à formação, resultando em diminuição da resistência e da massa óssea (Gali, 2001; Orwoll, 2003). Esta diminuição pode ser agravada pelo insuficiente acúmulo de tecido ósseo anterior à maturação do esqueleto (Guy et al., 1993). A idade e o hipostrogenismo influenciam muito na osteoporose, sendo o processo controlado por uma complexa inter-relação de hormônios sistêmicos, força mecânica, citocinas, prostaglandinas e fatores locais de crescimento (Gali, 2001; Radominski et al., 2002).

A osteoporose é a doença óssea metabólica mais comum, sendo caracterizada por redução da massa esquelética, com deterioração de sua microarquitetura, resultando em maior fragilidade óssea e, conseqüentemente, em aumento no risco de fraturas (Manolagas, 2000; Namkung-Matthai et al., 2001; Nakamura, 2004; Astácio et al., 2007; Kanis et al., 2008).

Nos EUA, ocorrem cerca de 1,5 milhões de fraturas osteoporóticas por ano e as fraturas de vértebras são as mais frequentes, somando cerca de 750 mil. As fraturas da bacia são as mais sérias e cerca de 10 a 20% dos 250 mil casos anuais, resultam em morte no primeiro ano após a fratura; sendo que aproximadamente 30% dos sobreviventes tornam-se dependentes de cuidados de enfermeiro permanente e somente metade consegue levar vida normal e independente (Cauley et al., 2000; Watts, 2004a).

É importante distinguir a osteoporose da perda óssea pós-menopausa, pois embora todas as mulheres percam osso após o término das menstruações, nem todas desenvolvem a síndrome osteoporótica que é caracterizada pelo colapso dos corpos vertebrais e por ossos longos mais susceptíveis a fraturas. A perda óssea resulta em osteoporose quando o osso se torna propenso à fraturas por traumas leves (Kalu, 1991).

A osteoporose pode ser primária ou secundária, sendo a primária classificada em dois tipos: I – pós-menopausa e II – senil. A do tipo I ocorre na mulher, no período logo em seguida à menopausa e apresenta rápida perda óssea. Predominantemente atinge o osso trabecular e está associada à fratura de vértebras e do rádio distal. A do tipo II, ou senil, é relacionada ao envelhecimento e aparece por deficiência crônica de cálcio, aumento da atividade do paratormônio e diminuição da formação óssea (Gali, 2001).

A osteoporose secundária ocorre como consequência de diversos processos patológicos, entre eles artrite reumatóide, hipertireoidismo, hiperparatireoidismo, distúrbios renais e mieloma múltiplo, além de outras condições, tais como alcoolismo crônico, tabagismo, imobilização, terapia prolongada com heparina, glicocorticóides, uso de anticonvulsivantes e hipovitaminose A (O'Mahony, 1999; Bandeira et al.; Manolagas, 2000; Gali, 2001; El-Husseini et al.; Watts, 2004b; Jacobs et al., 2007).

A osteoporose tipo I é o tipo mais comum e está associada à deficiência de estrógeno (Kalu et al., 1989; Kalu, 1991, Namkung-Matthai et al., 2001). O mecanismo pelo qual a ausência de estrógeno resulta em perda óssea é complexo e ainda não totalmente compreendido (Kalu et al., 1989; Lorenzo et al., 1998; Manolagas, 2000). Sabe-se que o estrógeno age, por exemplo, inibindo a produção de IL-6, um potente estimulador de osteoclastos, e como modulador do efeito de reabsorção do PTH (Allori et al., 2008a).

Nos pacientes afetados pela osteoporose, se observa uma redução na quantidade de osso presente, com perda maior de osso trabecular em relação ao osso compacto (Radominski et al., 2002). Isto resulta nas características primárias da doença, ou seja, fraturas do colo do fêmur, da porção distal do rádio e achatamento de corpos vertebrais (Francis, 1998).

O aumento da reabsorção óssea na osteoporose está associado ao aumento do número e da atividade de osteoclastos, bem como à diminuição da incidência de apoptose nestas células. Paralelamente, observa-se diminuição da meia vida dos osteoblastos e incapacidade de reparação adequada dos defeitos causados pela reabsorção osteoclástica (Manolagas; Riggs, 2000).

A redução do estrógeno é o fator mais importante responsável pela gênese da osteoporose pós-menopausa, como também na osteoporose do homem (Bandeira et al., 2000; Harada; Rodan, 2003).

A diminuição dos níveis de estrogênios circulantes leva a uma ativação nos ciclos de remodelação óssea, com predomínio das fases de reabsorção em relação à formação, devido ao aumento do número de osteoclastos na superfície dos ossos trabeculares. Também se sugere que os osteoclastos se tornam mais ativos, possivelmente pela diminuição nas taxas de apoptose ao final da fase de reabsorção, o que resulta em grandes cavidades que são parcialmente reparadas pela atividade dos osteoblastos. Os estrogênios atuam direta e indiretamente no osso. A maneira direta é via receptores e a indireta é mediada por citocinas e fatores locais de crescimento. A perda óssea decorrente da menopausa é caracteristicamente associada à excessiva atividade dos osteoclastos, enquanto a perda óssea associada ao envelhecimento é mais relacionada à diminuição no número de osteoblastos (Riggs, 2000; Radominski et al., 2002).

Os primeiros estudos do papel do estrógeno no metabolismo ósseo focaram as citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator estimulador de colônias de macrófagos granulócitos (GM-CSF), fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e prostaglandina E₂ (PGE₂). Estes fatores aumentam a reabsorção óssea, principalmente pelo aumento do tamanho do pool de pré-osteoclastos na medula óssea e são inibidos pelo estrógeno (Riggs, 2000).

A IL-1, IL-6, e TNF- α são as principais citocinas envolvidas na osteoclastogênese, ao passo que a interleucina IL-4 possui um efeito inibidor sobre a atividade de osteoclastos (Lorenzo et al., 1998; Bandeira et al., 2000).

A IL-1, um produto produzido predominantemente por

monócitos/macrófagos, estimula a síntese e a liberação de PGE_2 , de proteases e colagenases (Goldring; Krane, 1987). Estudos em camundongos que não expressam o receptor de IL-1 mostraram que a ovariectomia não resultou em perda óssea (Lorenzo et al., 1998). A IL-6 induz reabsorção por osteoclastos e é produzida por osteoblastos. Estudos mostram que o estrógeno previne a secreção de IL-6 pelos osteoblastos (Allori et al., 2008a).

A deficiência de hormônios ovarianos leva à diminuição de $1,25-(OH)_2D_3$ e à queda da absorção de cálcio intestinal sem alterar o metabolismo da vitamina D (Kalu et al., 1989). A absorção intestinal do cálcio varia também com a idade, com os níveis de vitamina D e do hormônio da paratireóide (PTH), podendo ainda ser influenciada por nutrientes da dieta (Martini, 2000). Ela ocorre primariamente no duodeno e jejuno e, até o momento, a $1,25(OH)_2D_3$ é o único hormônio capaz de controlar a absorção de cálcio. Na ausência dele somente 7% da ingestão normal de cálcio é absorvida (Heilkberg, 2000).

A ativação e a diferenciação dos osteoclastos envolvem uma família de proteínas biologicamente relacionadas que são receptores de fator de necrose tumoral (TNFR). São a osteoprotegerina (OPG), o receptor ativador de fator nuclear (RANK) e o RANK ligante (RANKL). Eles juntos regulam a função osteoclástica. O RANK é expresso em progenitores hematopoiéticos de osteoclastos, enquanto o RANKL é expresso em células pré-osteoblásticas e linfócitos T. O RANKL se liga ao RANK com alta afinidade e esta afinidade é essencial para a osteoclastogênese. A OPG age como um receptor decodificador bloqueando a ligação de RANKL ao seu receptor RANK. (Manolagas, 2000; Boyle et al., 2003).

Estudos têm demonstrado que o estrógeno inibe a reabsorção óssea pela indução de mudanças sutis, porém cumulativas,

em múltiplos fatores reguladores estrógenos dependentes; entre eles estão o TNF- α TGF- β e o sistema OPG/RANKL/RANK (Riggs, 2000).

2.4 Reparo ósseo

Uma característica marcante do tecido ósseo é sua enorme capacidade de reparação após lesões. Esta reparação se faz a partir do tecido de granulação. As células indiferenciadas e jovens do tecido de granulação se diferenciam em células ósseas maduras, que produzem matriz extracelular que será mineralizada (Consolaro, 2009).

A hemorragia resultante de trauma, leva à formação de coágulo sanguíneo e de fibrina, durante poucos dias. Além do coágulo sanguíneo, dois outros mecanismos contribuem para hemostasia: primeiramente uma vasoconstrição que faz diminuir o sangramento e, depois, uma retração do coágulo com redução do tamanho do sítio da ferida. A retração é causada pelas forças tracionais de plaquetas ativadas, resultando em condensação de fibrina no coágulo. A liberação de citocinas e de fatores de crescimento das plaquetas, no coágulo sanguíneo, tem um efeito estimulador na regeneração de fraturas. Fatores de crescimento derivados de plaquetas têm efeitos mitogênicos para fibroblastos e para células ósseas, além disso, TGF- β promove a formação de colágeno tipo I (Carvalho; Ponzoni, 2002).

Como consequência da hemostasia, a circulação sanguínea retorna a partir de vasos obliterados danificados que se anastomosam com partes intactas de outros vasos. No osso, isso ocorre através dos canais de Volkmann, distribuídos de forma esparsa. O término da circulação das bordas fraturadas causa isquemia local e necrose, comumente observada em secções histológicas como lacunas

vazias, ou células em picnose (núcleos com cromatina muito condensada). A necrose é causada pela falta de oxigenação dos osteócitos, que em osso vivo não estão mais do que a 0,1mm de um capilar intacto. A diapedese de leucócitos no coágulo a partir de veias pré-capilares é causada por fatores que aumentam a adesão de células inflamatórias às células endoteliais, como os leucotrienos e os quimioatrativos. A maioria desses fatores é liberada por plaquetas ativadas e células endoteliais, bem como pelos próprios leucócitos. A trombina e os produtos da degradação dos tecidos também servem como atrativos químicos para leucócitos. Inicialmente, os neutrófilos são os mais numerosos, mas macrófagos rapidamente começam a predominar. Ambos os tipos de células estão envolvidos na destruição do coágulo e do tecido necrótico por meio da digestão intra e extracelulares. A formação do tecido de granulação é caracterizada por uma fase de destruição dos tecidos necróticos, associada a uma intensa proliferação celular e formação de vasos, além da síntese de matriz rica em fibronectina, proteoglicanos, ácido hialurônico e colágeno, principalmente dos tipos III e I (Carvalho; Ponzoni, 2002).

Em seguida, o tecido de granulação vai se tornando mais fibroso e células mesenquimais se diferenciam em condroblastos e progressivamente substituem o tecido de granulação fibroso por cartilagem hialina. Essa ponte firme, porém flexível é conhecida como calo provisório. O calo provisório é, em seguida, reforçado pelo depósito de sais de cálcio na matriz cartilaginosa. Ao mesmo tempo o perióstio e o endóstio, próximos a área lesada, respondem com uma intensa proliferação, formando um tecido muito rico em células osteoprogenitoras. Os osteoblastos se formam a partir destas células, que correspondem às células tronco, localizadas no tecido superficial de revestimento ósseo. Estas células osteoprogenitoras do endóstio e perióstio são ativadas e depositam uma malha de tecido ósseo entrelaçado dentro e em torno do

calo provisório, se transformando então em calo ósseo (Guyton; Hall, 2006; Young et al., 2007, Junqueira; Carneiro, 2008).

O colágeno desempenha um papel básico no processo de mineralização, pois oferece espaços suficientemente grandes para acomodar a fase mineral, favorecendo a disposição dos cristais que seguem a topografia das fibras colágenas. O processo de mineralização se inicia pela ligação do cálcio, ou fosfato, ou ambos, nas cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos do colágeno. Uma vez iniciada a mineralização da matriz óssea, esta prossegue rapidamente de forma que no período de seis a doze horas, 60% a 70% da quantidade final de mineral já estão depositados (fase primária de mineralização). A mineralização subsequente ocorre muito mais lentamente e só se completa depois de um ou dois meses (fase da mineralização secundária) (Douglas; Douglas, 2006).

A união óssea é alcançada quando o local da fratura é completamente obliterado por tecido ósseo entrelaçado. Sob a influência dos estresses funcionais, o calo vai sendo lentamente remodelado, de modo a formar o tecido ósseo lamelar maduro (Guyton; Hall, 2006; Young et al., 2007; Junqueira; Carneiro, 2008).

O ambiente mecânico também influencia no reparo ósseo e independente da origem embriológica do osso, num ambiente onde há estabilidade mecânica ocorre favorecimento da ossificação intramembranosa, enquanto que num ambiente não estável a reparação se dá através de ossificação endocondral (Leucht et al., 2008).

2.5 Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos, também chamados de difosfonatos, são conhecidos na indústria química desde 1865, quando o primeiro foi sintetizado na Alemanha, sendo o etidronato sintetizado em 1897. Foram primeiramente usados na indústria como anticorrosivos e atualmente são uma classe de compostos conhecidos por sua habilidade para prevenir reabsorção óssea mediada por osteoclastos. São recomendados para o tratamento de várias doenças que provocam aumento da reabsorção óssea, incluindo osteoporose pós-menopausa, doença de Paget e metástase óssea osteolítica (Nishikawa et al., 1996; Rodan; Fleisch, 1996; Fleisch, 1997; Fleisch, 2003; Castro et al., 2004, Íseri et al., 2005).

São análogos do pirofosfato, no qual a ponte de oxigênio é substituída por um átomo de carbono e modificada por cadeias laterais de comprimentos e configurações variáveis. A presença de um átomo de carbono ligando os dois grupos fosfato proporciona resistência à hidrólise enzimática. Por outro lado, o pirofosfato, produto normal do metabolismo, é rapidamente degradado in vivo. As duas metades fosfóricas dos bisfosfonatos ligam-se fortemente à superfície de cristais de hidroxiapatita, especialmente nos pontos de remodelamento ósseo ativo. Possuem grande afinidade por cristais de fosfato de cálcio e inibem seu crescimento, sua agregação e dissolução. Sua afinidade por hidroxiapatita cálcica é a base para seu uso como inibidores da reabsorção óssea (Fleisch, 1997; Bandeira et al., 2000; Fleisch, 2003).

Estruturalmente são compostos caracterizados por duas ligações C-P. Se as duas ligações estiverem localizadas no mesmo átomo de carbono, os compostos são chamados de bisfosfonatos geminais e são análogos ao pirofosfato, que contém um oxigênio no lugar do carbono. Somente os bisfosfonatos geminais parecem ter uma forte

atividade no esqueleto. A estrutura P-C-P permite um grande número de variações possíveis, especialmente pela mudança nas duas cadeias laterais no carbono, o que originou os diferentes tipos comercializados: etidronato, clodronato, alendronato, risedronato, entre outros (Fleisch, 1997).

Cada bisfosfonato possui seu próprio perfil de atividade, determinado pela cadeia lateral ligada ao átomo de carbono. Após os resultados promissores mostrados pelo etidronato e clodronato, novos bisfosfonatos foram sintetizados contendo um átomo de nitrogênio primário em uma cadeia alquila (pamidronato, alendronato). Isto aumentou a potência anti-reabsorção em mais de cem vezes (Martin; Grill, 2000).

Embora o mecanismo de ação dos bisfosfonatos não esteja completamente elucidado, está claro que no tecido os bisfosfonatos inibem a reabsorção óssea, o *turnover* ósseo, e assim, a perda óssea. O efeito se deve à diminuição da geração de novas unidades de remodelação óssea e a uma diminuição da profundidade da erosão cavitária. Na célula, eles induzem o desaparecimento da borda em escova dos osteoclastos, inibem a diferenciação da linhagem celular macrocítica, que leva à formação de osteoclastos, promovem um encurtamento do ciclo de vida dos osteoclastos e aumentam a sobrevivência de osteoblastos (Nishikawa et al., 1996; Rodan; Fleisch, 1996; Plotkin et al., 1999; Bandeira et al., 2000).

Em nível molecular, os bisfosfonatos que contém nitrogênio em sua estrutura química, agem provavelmente pela inibição de enzimas da via colesterol/mevalonato e pela perda de proteínas da prenilação, uma vez que os efeitos dos bisfosfonatos nos macrófagos e osteoclastos podem ser superados pela adição de intermediários desta via (Luckman et al., 1998). Estas enzimas são proteínas sinalizadoras que regulam alguns processos celulares tais como a ondulação da membrana,

organização do citoesqueleto e transporte de vesículas necessárias para a função do osteoclasto (Martin; Grill, 2000). Os bisfosfonatos inibem a reabsorção óssea mais por efeito celular nos osteoclastos, do que simplesmente por mecanismo físico-químico (Russel et al., 1999; Nancollas et al., 2006).

Um estudo que avaliou os efeitos dos bisfosfonatos sobre a formação de osso periosteal em animais controle e em animais com deficiência de estrógeno mostrou que os bisfosfonatos não inibem a formação óssea periosteal na ausência de estrógeno e são capazes de permitir estímulo normal do osso periosteal em resposta a estímulo anabólico de carga mecânica. Ficou claro que a redução da taxa de remodelamento ósseo produzida pelos bisfosfonatos se dá nos envelopes endocortical e intra-cortical (Feher et al., 2009).

O depósito dos bisfosfonatos nos ossos ocorre onde o mineral ósseo está exposto aos fluidos circundantes, especialmente onde o osso é formado e reabsorvido. Após o depósito, há uma interrupção na atividade dos osteoclastos por interferência na ação da enzima farnesil pirofosfato sintase. Acredita-se, também, que os bisfosfonatos promovem apoptose de osteoclastos maduros. O resultado é um *turnover* ósseo mais lento, com benefícios para a integridade trabecular. Estudos demonstrando maior espessura trabecular após tratamentos prolongados sugerem que os bisfosfonatos podem também ter efeitos positivos no número de osteoblastos, mais provavelmente por inibir apoptose em osteoblastos e osteócitos. Ainda existem algumas evidências indicando que os bisfosfonatos podem inibir reabsorção, por indução de um fator inibidor de osteoclastos, pelos osteoblastos. Os bisfosfonatos se acumulam nos ossos, mas se tornam inativos, submersos na matriz. Foi demonstrado que a meia vida dos bisfosfonatos no osso, em humanos, é de mais de dez anos. Não oferecem benefícios extra-esqueléticos e estão algumas vezes associados com efeitos colaterais como esofagite e/ou

irritação gastrointestinal após sua ingestão (Fleisch, 2003; Boonen et al.; Roughead et al., 2004).

A liberação dos bisfosfonatos ocorre por conta da longa meia vida que possuem, principalmente quando o osso onde eles estão depositados é reabsorvido novamente. O fato de o grupo P-C-P ser resistente à hidrólise enzimática, explica porque os bisfosfonatos não são metabolizados no corpo e são excretados inalterados. Desta forma, os bisfosfonatos liberados durante a remodelação óssea podem ser farmacologicamente ativos, sendo que a quantidade lançada diariamente na circulação após 10 anos de tratamento é estimada em cerca de 25% da quantidade absorvida em uma dose diária e depende da localização no esqueleto. Será maior para o osso esponjoso e menor para o osso compacto. A carga e o peso do grupo bisfosfonato limita sua penetração na membrana celular, o que explica a pouca absorção intestinal (1 a 10%), que é provavelmente paracelular. São rapidamente excretados pelos rins, em parte por um processo de secreção tubular ativo (Martin; Grill, 2000).

O tratamento com bisfosfonatos causa uma imediata redução na reabsorção óssea, levando a uma diminuição no cálcio sérico, que conduz a um aumento do PTH (Jacobs et al., 2007).

Os bisfosfonatos são considerados a primeira linha de terapia para a prevenção e tratamento da osteoporose, sendo o alendronato um importante representante desta classe, demonstrando eficácia na prevenção de fraturas osteoporóticas em vários locais do esqueleto (Watts et al., 2004b).

2.6 Alendronato

O alendronato é um aminobisfosfonato primário e atualmente é o bisfosfonato mais amplamente utilizado para a osteoporose (Bandeira et al., 2000; Iseri et al., 2005). Faz parte do grupo de bisfosfonatos que contém nitrogênio em sua estrutura, o que explica seu efeito de redução da atividade de remodelamento ósseo normal em maior extensão (Astrand; Aspenberg, 2002).

A porção bisfosfonato da molécula do alendronato lhe confere importantes características, como a baixa penetração pelas membranas celulares, o que limita sua ação na maioria das células do corpo, além de uma localização preferencial no osso limitando a exposição de tecidos não esqueléticos à droga (Hayes, 1999).

Após a administração, o alendronato se liga à superfície exposta de hidroxiapatita. A acidificação do meio provocada pelos osteoclastos nos sítios de reabsorção causa a liberação do alendronato dentro do espaço definido por zona clara, aumentando sua concentração local, interferindo com a função de membrana do osteoclasto e em sua borda em escova, o que resulta na interrupção da reabsorção óssea (Sato et al., 1991).

Nos Estados Unidos, o alendronato foi aprovado tanto para prevenção quanto para o tratamento da osteoporose (Bandeira et al., 2000). Ele reduz o risco de novas fraturas de quadril e pulso em mulheres com fraturas já presentes e reduz o risco de todas as principais fraturas em mulheres com osteoporose (Black et al., 2000). Possui grande seletividade para inibir a reabsorção óssea, sem afetar a formação (Volpon et al., 2008).

A dose de alendronato recomendada para o tratamento da osteoporose em humanos é de 10 mg/dia, por via oral, podendo ser também administrado semanalmente em doses de 70 mg/dia (Astrand; Aspemberg, 2002; Fleisch, 2003)

O alendronato administrado durante o crescimento, maturação e envelhecimento em ratos machos e fêmeas, resultou em melhores propriedades mecânicas em vértebras e fêmur. Os autores do estudo atribuíram estes achados à influencia da inibição da reabsorção óssea durante o crescimento ósseo, resultando em maior massa na maturidade e à atenuação da reabsorção óssea durante o período em que normalmente ocorre a perda óssea relacionada com a idade (Guy et al., 1993).

Um estudo realizado em animais de laboratório sobre a absorção e disposição do alendronato no organismo, revelou que após a administração por via oral, a absorção intestinal da droga foi muito pobre, sendo detectado no osso cerca de 0,9% no rato, 1,8% no cão e 1,7% no macaco. A presença de alimento no estômago causou um decréscimo de absorção de 6 a 7 vezes, quando comparado com animais em jejum. Cerca de 30% da dose foi absorvida pelo osso nos primeiros 5 minutos. A meia vida da droga no osso do rato foi de 30 dias, para um período de análise de 11- 40 dias e de 200 dias para um período de análise de 40-80 dias (Lin et al., 1991).

O alendronato possui alta afinidade pelo tecido ósseo e, em doses normais, não é encontrado em tecidos não calcificados. Contudo, quando a dose é muito elevada, algum acúmulo pode ocorrer em tecidos não calcificados, principalmente nos rins; além disso, em altas doses, ele passa a agir inibindo calcificação (Lin et al., 1992; Russel et al., 1999).

Em 2008, Volpon et al. investigaram por meio de estudos histomorfométricos em ratas normais e osteopênicas, os efeitos do

alendronato de sódio, quando administrado preventivamente em situações que provocam osteopenia. Foi realizada imobilização da região lombar, pelve e do membro posterior direito com aparelho gessado, com o intuito de gerar osteopenia nos animais. O alendronato foi administrado por via subcutânea na dose de 0,7mg/kg, uma vez por semana, durante 28 dias. Os autores concluíram que a dose semanal de 0,7mg/kg foi eficaz para aumentar o volume ósseo e o número de trabéculas. Além disso, o alendronato foi capaz de aumentar os parâmetros morfométricos dos animais osteopênicos e, também dos animais normais.

Um estudo comparando alendronato com risedronato examinou as diferenças de resposta esquelética de ratas OVZ frente à suspensão do tratamento. Os dados deste estudo mostraram que o *turnover* ósseo trabecular normal tende a ser restabelecido mais rapidamente em animais tratados com risedronato do que naqueles tratados com alendronato. As taxas de formação óssea permaneceram mais baixas no osso trabecular das tíbias e espinha em ratas tratadas com alendronato, quando comparadas com ratas não tratadas, controle, 16 semanas após a suspensão do tratamento. Em contraste, os grupos tratados com risedronato mostraram uma recuperação gradual de formação de osso normal. Isto mostrou que após a interrupção do tratamento, em níveis de dose clínica, o alendronato parece ter um efeito mais persistente na supressão de *turnover* ósseo do que o risedronato (Fuchs et al., 2008).

Roschger et al. (2001) avaliaram a qualidade da matriz óssea da crista ilíaca de mulheres com osteoporose, tratadas com alendronato, durante um período de 2 a 3 anos. Os resultados mostraram que o alendronato inibiu a reabsorção óssea osteoclástica, reduziu o *turnover* ósseo, diminuiu a porosidade cortical e aumentou a uniformidade da mineralização. Concluíram que uma melhoria na

qualidade mecânica da matriz mineralizada, causada por mudanças estruturais, como menor porosidade cortical, associada a um positivo balanço ósseo, podem ser os principais fatores contribuintes da efetividade antifratura do alendronato.

Estudo semelhante com pacientes que receberam placebo ou 5 e 10 mg/dia de alendronato, durante um período de dois a três anos, utilizou medidas de tomografia micro computadorizada de três dimensões e histomorfometria para avaliar amostras de osso ilíaco. Participaram mulheres de 45 a 80 anos, que já estavam na menopausa há pelo menos 5 anos e com osteoporose confirmada por exame de densitometria óssea. Uma biópsia de ilíaco de 7,5 mm foi obtida de cada participante. Os resultados mostraram valores superiores para o grupo tratado com alendronato, tanto na tomografia micro computadorizada, quanto na histomorfometria. Os autores atribuem esses resultados a um efeito de espessamento das trabéculas já existentes associada à diminuição da perda trabecular, uma vez que o alendronato reduz a reabsorção óssea reduzindo os sítios de remodelamento por unidade de superfície de área, assim, ocorrem menos locais de afinamento trabecular e as trabéculas presentes acabam sofrendo um espessamento passivo (Recker et al., 2005).

Em um estudo que avaliou um total de 3658 mulheres com osteoporose, com e sem fraturas, tratadas com alendronato por um período mínimo de três anos, foi observado efeito positivo marcante sobre o risco de fraturas entre 12 a 18 meses após o início do tratamento. Já, a partir dos 6 meses após o início do tratamento, uma diminuição no risco de fraturas vertebrais pode ser observada (Black et al., 2000).

Apesar dos efeitos positivos sobre a reabsorção óssea, de um modo geral, a administração oral dos bisfosfonatos, tem sido associada a efeitos adversos, como osteonecrose dos maxilares (Marx et al., 2007), além de efeitos gastrintestinais, incluindo gastrite, úlcera

gástrica e esofagite erosiva. Tem sido demonstrado que os bisfosfonatos diferem em seu potencial de dano sobre a mucosa gastroesofágica, sendo o alendronato um dos mais nocivos (Graham, 1999, Thomson et al., 2002; Roughead et al., 2004; Íseri et al., 2005).

2.7 Homeopatia

A Homeopatia surgiu em 1796, idealizada pelo médico alemão Samuel Hahnemann, que viveu de 1755 a 1843 e publicou várias obras. Combateu o uso indiscriminado de alguns tipos de terapia usados em sua época e formou inúmeros discípulos (Correa, 1997; Correa, 2006).

A homeopatia é uma modalidade terapêutica para o tratamento de pessoas e animais e se baseia no princípio do semelhante, na terapia individualizada, baseada na definição ampla dos sintomas, e em doses infinitesimais. A palavra homeopatia é derivada das palavras gregas *homoios*, que significa igual ou semelhante, e *pathos*, que significa sofrimento (Boyd, 1993; Johnson; Boon, 2007).

Na homeopatia, diferentemente da medicina alopática, o processo de diagnóstico é centrado no doente e não na doença. Esses preceitos já eram conhecidos por muitos médicos, desde Hipócrates até Hahnemann, sendo que vários deles os utilizavam - principalmente o dos semelhantes - em seus tratamentos e observações. Vale ressaltar, que as concepções hahnemannianas reviveram muito da tradição hipocrática como atenção ao regime alimentar, importância dos fatores climáticos, ecológicos, psicológicos e à existência de energia vital. Hahnemann postulou a existência de uma energia vital, a qual possibilita ao organismo

o estabelecimento de reações aos mais variados estímulos ambientais. O homem é compreendido como uma unidade composta por corpo, alma e consciência, capaz de se manter são quando todas as sensações e reações se equilibram de forma harmônica. Quando há algum desequilíbrio dessa energia vital, ocorre uma disfunção orgânica que faz o homem adoecer (Correa 1997; Correa, 2006).

Na homeopatia, o princípio da cura tem como base a “Lei dos Semelhantes”: Os sintomas ou síndromes que uma substância animal, vegetal ou mineral causa experimentalmente, em doses farmacológicas ou tóxicas, são os mesmos que ela poderá curar clinicamente quando administrada após preparo especial, em doses extremamente baixas, em indivíduos que apresentam esses sintomas. A prática da terapia individualizada baseada em sintomas é apoiada na premissa de que cada paciente tem uma personalidade única e um padrão de sintomas da doença, o que significa que a mesma doença se manifesta de formas sutilmente diferentes em cada pessoa (Johnson; Boon, 2007).

A ciência ainda não tem uma explicação coerente a respeito do mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos (Poitevin, 1992). Pode-se afirmar que a água, após os procedimentos de preparo preconizados pela medicina homeopática tais como as diluições de solutos seguidas por sucussão, torna-se diferente da água inicial. Testes feitos com calorimetria de fluxo, microscopia eletrônica, conductometria e medição de pH mostraram tais indícios (Coghlan, 2001; Elia et al., 2004; Elia et al., 2007).

O conceito de que o estímulo do remédio desencadeia uma resposta que restaura o equilíbrio biológico parece ser uma explicação razoável à luz da observação clínica. Este estímulo pode ser farmacológico em potências mais baixas, mas, parece ser de algum outro tipo, possivelmente eletromagnético, nas mais altas diluições.

Hahnemann considerava a ação do remédio vinculada à produção de uma doença artificial semelhante à doença do paciente. Esta doença artificial estimula uma reação do corpo, que por sua vez cura a doença. O estímulo deve ser correto e a resposta depende do estado inicial do organismo. A terapia homeopática tem atraído a atenção pelo fato de buscar uma reação geral do organismo visando curar internamente, isto é, o próprio organismo é estimulado a promover a cura. De forma inversa, a alopatia trabalha curando externamente e eliminando de maneira radical o agente patogênico, bloqueando algumas respostas de defesa do organismo (Boyd, 1993).

Em relação à origem, os medicamentos homeopáticos são preparados a partir de produtos de três reinos da natureza: vegetal, mineral e animal, segundo técnica própria que inclui diluições sucessivas em escalas geralmente centesimais e succussões ritmadas para dinamizar e liberar o potencial energético do medicamento (Eizayaga, 1972; Boyd, 1993).

O uso de diluições é importante porque frequentemente as substâncias usadas para fazer os remédios são tóxicas em concentrações mais elevadas. O processo de diluição envolve succussão, uma vigorosa agitação da substância original com álcool ou água, que ativa e potencializa o remédio. Os produtos homeopáticos são frequentemente tão diluídos que a farmacologia convencional nos diz que nenhuma molécula da substância original permanece no produto final (Johnson, Boon, 2007).

Proposta por Hahnemann, a escala centesimal, que é indicada pela letra C, significa que o medicamento foi diluído na proporção de 1:99 (Ullman, 1988).

Thompson e Weiss (2006) realizaram um estudo com 18 pacientes, avaliando a ação de ingredientes ativos indicados para tratamentos complexos. Três condições foram avaliadas: síndrome do

intestino irritado, síndrome da fadiga crônica e dermatite atópica da infância. De todos os casos, 7 apresentaram grande mudança no quadro de saúde, 6 alguma mudança e 5, nenhuma mudança durante os 8 meses de tratamento. Os dados mostraram que a precisão da indicação reflete o resultado da terapia, ou seja, a correta compreensão da situação do paciente se reflete na precisão da escolha do remédio. Os autores concluem que a homeopatia pode, justificadamente, ser considerada uma intervenção complexa e que isso deveria ser levado em conta nas avaliações experimentais clínicas no campo da pesquisa, a fim de caracterizar os efeitos específicos e não específicos dos medicamentos.

Na Europa, a homeopatia tem tido boa reputação como alternativa efetiva em terapias veterinárias (Rajkumar et al., 2006). Nesta especialidade, o emprego de medicamentos diluídos e dinamizados obedece às mesmas razões da medicina humana, dentro das mesmas regras (Kossak-Romanach, 1984)

Segundo Teixeira (2007a), a prática médica homeopática contribui para a humanização da medicina, por utilizar visão antropológica e abordagem semiológica holísticas. Procura-se valorizar os múltiplos aspectos da individualidade humana no processo de adoecimento e na escolha da substância curativa, priorizando a escuta de todas as queixas do enfermo. Eleva-se, assim, a qualidade da relação médico-paciente, fator indispensável para uma medicina humanizada.

No Brasil a Homeopatia foi introduzida em 1840, pelo grande homeopata francês Benoit Mure. Foi reconhecida como especialidade médica em 1979 e em 1980 deu-se o referendo definitivo pelo Conselho Federal de Medicina, deixando, assim, de ser uma terapia alternativa (Correa 1997; Correa, 2006).

Embora seja uma especialidade médica, a homeopatia não está presente na maioria das escolas de medicina do Brasil e os

fundamentos da prática homeopática não são conhecidos pela grande maioria dos profissionais de saúde (Salles, 2008).

Apesar desta dificuldade, o resultado de uma pesquisa realizada com estudantes de medicina revelou que os acadêmicos se mostraram interessados em aprender os fundamentos da homeopatia, posicionando-se favoravelmente à inclusão da disciplina no currículo dos cursos de graduação (Teixeira, 2007b).

2.8 *Calcarea phosphorica*

O cálcio desempenha um papel fundamental em muitos processos fisiológicos, incluindo a coagulação sanguínea, a transmissão de impulsos nervosos, a contração dos músculos esqueléticos, lisos e cardíaco, citando apenas alguns deles. Apenas 0,1% do cálcio total se encontra no líquido extracelular, 1% está nas células e o restante fica armazenado nos ossos (Guyton; Hall, 2006).

O íon fosfato é também crucialmente importante para todos os sistemas biológicos. Dentro das células, o fosfato é um ânion que equilibra os cátions potássio e magnésio e é um importante constituinte da estrutura cristalina do osso e dos dentes. Aproximadamente 85% do fosfato corpóreo se encontra armazenado nos ossos, 14% a 15% nas células, e menos de 1% no líquido extracelular (Higdon, 2003; Berne et al., 2004; Guyton; Hall, 2006).

As concentrações extracelulares de fosfato e cálcio são muito baixas para que ocorra precipitação espontânea nos tecidos não mineralizados, mas são altas o suficiente para permitir deposição de hidroxiapatita em ambientes especializados de matriz óssea não mineralizada (Heilkberg, 2000).

O fosfato de cálcio, também conhecido por hidroxiapatita, é o principal componente estrutural da matriz óssea e compreende cerca de 85% do fosfato do corpo (Young et al., 2007). A fórmula da hidroxiapatita é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e tem o formato de uma placa achatada e longa. Os cristais de hidroxiapatita situam-se adjacentes a cada segmento de fibra colágena, unidos hermeticamente a ela. Os segmentos de fibras se justapõem uns sobre os outros, provocando também a sobreposição dos cristais de hidroxiapatita como espécies de tijolos empilhados em um muro (Guyton; Hall, 2006).

O fosfato de cálcio é um dos materiais usados clinicamente para o reparo de defeitos ósseos. Tem sido estudado extensivamente do decorrer da última década devido à sua estreita semelhança com os tecidos mineralizados do corpo humano e por sua excelente biocompatibilidade (Zhou et al., 2007; Arisan et al., 2008).

A ação homeopática do fosfato de cálcio (*Calcarea phosphorica*) cura várias doenças relacionadas com a formação e remodelação óssea, sendo prescrito para casos de formação tardia de calo ósseo, problemas com a união de fraturas, crescimento ósseo deficiente e anormal e dores ósseas e articulares na tíbia (Tyler, 1992; Vijnovsky, 1992)

A *Calcarea phosphorica* atua no equilíbrio cálcio-fósforo. Tal equilíbrio é importante para uma deposição de cálcio e formação do calo ósseo desejável (Freitas; Castro, 1995). Além disso, possui tropismo sobre matriz óssea, podendo ser administrada em condições de saúde variadas como na fase de erupção dentária em bebês e também na condromalácia (Ullman, 1988; Esquivel et al., 1996).

Poucos são os relatos na literatura científica sobre o uso de medicamentos homeopáticos como indutores de nova formação óssea.

Balducci-Rosindo et al. (1999) avaliaram a ação de *Symphytum officinale* e *Calendula officinalis*, e sua capacidade específica

de promover a reparação óssea após exodontia em camundongos. Os resultados obtidos através de análise histológica comparativa mostraram que os animais tratados apresentaram uma aceleração na maturação do tecido ósseo neoformado, quando comparado com o grupo controle.

Almeida et al. (2009) estudaram a reparação de defeitos ósseos em mandíbulas de ratos utilizando *Plumbum metallicum* 30CH e compararam com ratos controle e ratos tratados com calcitonina. O completo preenchimento do defeito cirúrgico, por toda a extensão, foi somente observado no grupo tratado com *Plumbum metallicum*. Neste estudo as análises morfológica e histomorfométrica, mostraram níveis mais baixos de formação óssea nos animais tratados com calcitonina em comparação com os outros grupos. O estudo demonstrou que para a reparação de defeito ósseo guiado em mandíbula de ratos machos, o grupo tratado com homeopatia e o grupo controle produziram resultados similares.

Igualmente, raros são os estudos que utilizaram a *Calcareo phosphorica* para a avaliação da osteoporose e reparação óssea. Esquivel et al. (1996), realizaram um estudo de um ano de duração com 20 mulheres portadoras de osteoporose pós-menopausa devidamente diagnosticada. A avaliação da mineralização óssea foi feita por densitometria, com 3 tomadas do colo do fêmur e da diáfise femural, a fim de avaliar o osso cortical e trabecular. Os controles foram feitos no começo, aos seis meses e aos doze meses do início do tratamento. A *Calcareo phosphorica* foi associada a outras substâncias e ao final do experimento os autores verificaram eficácia do tratamento homeopático proposto, obtendo uma melhoria importante na densidade mineral óssea.

Werkman et al. (2006) compararam o efeito do risedronato sódico com *Calcareo phosphorica* no reparo ósseo de ratos machos castrados por meio de análise histológica, histomorfométrica e de densidade óptica. Observaram que a *Calcareo phosphorica* 6CH se

mostrou mais eficaz nas fases iniciais do processo de reparo do que o risedronato. O tratamento com risedronato influenciou a reparação, levando a uma maior quantidade de osso em comparação com *Calcareo phosphorica*. Contudo, o osso formado sob ação do risedronato mostrou resistência a reabsorção, mantendo seu aspecto trabecular, enquanto a *Calcareo phosphorica* mostrou uma remodelação de osso inicialmente trabecular para um osso lamelar no fim do experimento.

Nos últimos anos, tem havido um aumento no número de estudos pré-clínicos *in vitro* e em animais objetivando avaliar a atividade farmacológica ou eficácia de medicamentos homeopáticos em condições de reproduzir os testes (Conforti et al., 2007).

No entanto, ainda há poucos relatos da avaliação qualitativa e quantitativa dos efeitos da *Calcareo phosphorica* na reparação óssea. Estudos mais aprofundados deste medicamento devem ser realizados visando ampliar a sua utilização terapêutica e a melhoria da qualidade de vida de pacientes com alto risco de fraturas ósseas, como observado na osteoporose em homens e mulheres.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial do medicamento homeopático *Calcarea phosphorica* 6CH na reparação de lesão óssea em ratas ovariectomizadas, comparando com os efeitos do medicamento alopático alendronato.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Manuseio geral dos animais

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 120 ratas (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*, *Wistar*) com 90 dias de idade e peso aproximado de 320g, mantidas em gaiolas com seis animais cada, temperatura média de 22°C, média de 12 horas na presença de luz e 12 horas no escuro, alimentadas com ração Guabi Nutrilabor e água *ad libitum*, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

Este experimento foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) submetido ao comitê de ética para experimentação em animais da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP (nº 045/2007-PA/CEP). Todas as medidas possíveis foram tomadas para evitar sofrimento desnecessário dos animais, bem como para reduzir o número de animais utilizados e as perdas durante o trans e pós-operatório.

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

- a) Grupo A - ratas ovariectomizadas e tratadas com alendronato (Terapêutica – São José dos Campos, SP) 3,75 mg/Kg dissolvidos em 1 ml de água/animal/ 3 vezes por semana, por via oral (gavagem);

- b) Grupo CP - ratas ovariectomizadas e tratadas com *Calcarea phosphorica* 6CH (Pharmaciantiga – São José dos Campos, SP) via oral, dois glóbulos dissolvidos em 1 ml de água/animal/dia, por via oral (gavagem);
- c) Grupo O - ratas ovariectomizadas e tratadas com placebo (1 ml de água/animal/dia) por via oral (gavagem);
- d) Grupo S - ratas com cirurgia *sham* tratadas com placebo (1 ml de água/animal/dia) por via oral (gavagem).

4.2 Anestesia

Para todos os procedimentos cirúrgicos os animais receberam anestesia geral com solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3 tiazina (Anasedan® - Bayer, São Paulo, SP, Brasil), substância sedativa e relaxante muscular, associada à ketamina base (Dopalen® - Agribrands do Brasil Ltda), anestésico geral, na proporção de 0,8:0,5 ml e administrados por via intramuscular na dose de 0,1 ml/100 g de peso dos animais.

4.3 Ovariectomia

Após a depilação manual e anti-sepsia feita com álcool iodado da região correspondente ao ovário a ser removido, a ovariectomia foi realizada cirurgicamente. Com o animal posicionado lateralmente, o

acesso aos ovários se deu aproximadamente a 1cm de distância da coluna vertebral e a 1cm abaixo da última costela. Com uma lâmina de bisturi nº 15 realizou-se uma incisão de 1,5cm na pele nesta região, paralelamente ao longo eixo do animal, seguindo-se por incisão e divulsão dos tecidos subjacentes até a exposição do ovário. Foi feita uma ligadura logo abaixo desse, com fio de algodão estéril e em seguida a remoção do ovário. O útero e os demais tecidos foram reposicionados e a sutura feita em planos com fios de seda 4.0 (Ethicon, Brasil). No local foi feita nova antissepsia com álcool iodado. Procedimento similar foi realizado no ovário contralateral do animal na mesma sessão cirúrgica. Após a cirurgia os animais não receberam antibiótico e permaneceram em gaiolas (n= 6/gaiola) recebendo ração e água *ad libitum* durante 60 dias, tempo preconizado neste experimento para a indução da osteoporose.

A cirurgia *sham*, ou falsa ovariectomia, foi realizada seguindo os mesmos passos da cirurgia de ovariectomia acima descrita, com exceção da ligadura do ovário e de sua remoção. Assim, após sua exposição, os ovários foram reposicionados cuidadosamente na cavidade abdominal e a sutura realizada em planos.

A sequência de procedimentos cirúrgicos da ovariectomia pode ser visualizada na Figura 1.

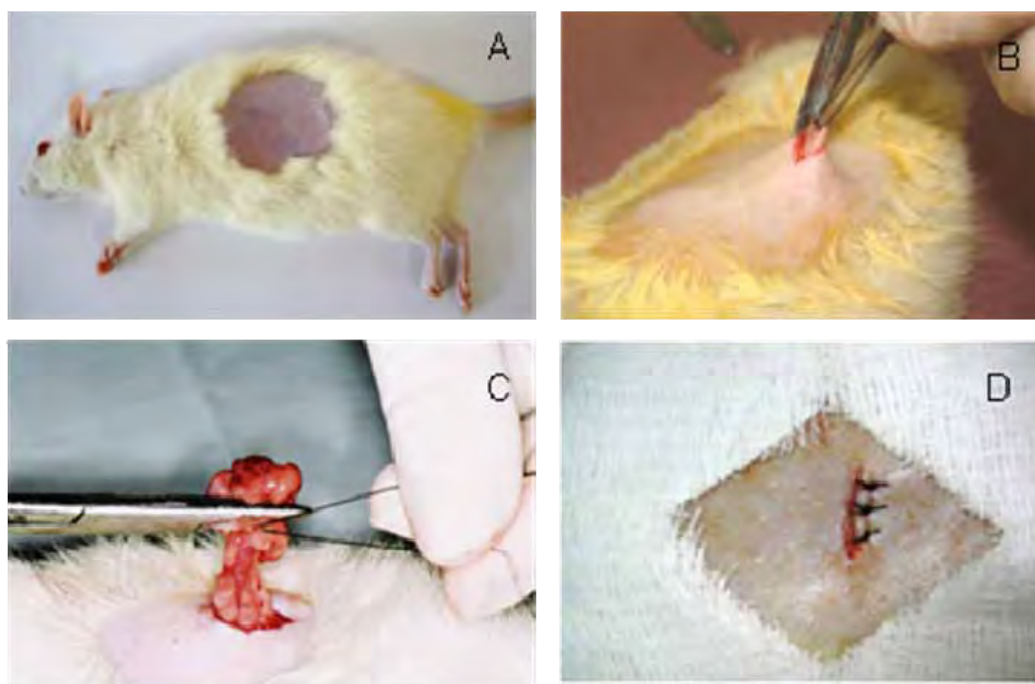


Figura 1 - a) animal anestesiado e depilado para a cirurgia de ovariectomia; b) incisão da pele e camada muscular; c) amarração e excisão do ovário; d) aspecto final após a sutura da camada muscular e pele.

4.4 Execução da lesão óssea e tratamento

Em todos os animais foram realizados defeitos ósseos monocorticais na tíbia direita, após 60 dias da castração. Os ratos foram novamente anestesiados com associação de solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6dihidro-4H-1,3 tiazina (Anasedan® - Bayer, São Paulo, SP, Brasil), substância sedativa e relaxante muscular e cloridrato de ketamina 10% (Dopalen® – Agribands do Brasil,Ltda), anestésico geral, na proporção de 0,8:0,5 ml e administrados por via intramuscular na dose de 0,1 ml/100 g de peso dos animais.

Na face interna da perna foi realizada depilação manual e após antissepsia local, com álcool iodado, foi realizada uma incisão de aproximadamente 1,5cm na pele e músculo na região do terço proximal tibiano com lâmina de bisturi nº 15. Em seguida à exposição da face interna da tíbia, o periósteo e os tecidos moles foram afastados com espátula 7. Com o auxílio de uma broca esférica nº8, em motor de baixa rotação, sob irrigação constante de solução de NaCl 0,9%, foi realizada uma lesão monocortical de 2,5 mm de diâmetro até o limite da medula óssea. Após estabilização do coágulo sanguíneo sobre a lesão, a região foi suturada, em planos, com fio de seda 4.0 (Ethicon, Brasil).

A sequência de procedimentos cirúrgicos da lesão óssea pode ser visualizada na Figura 2.

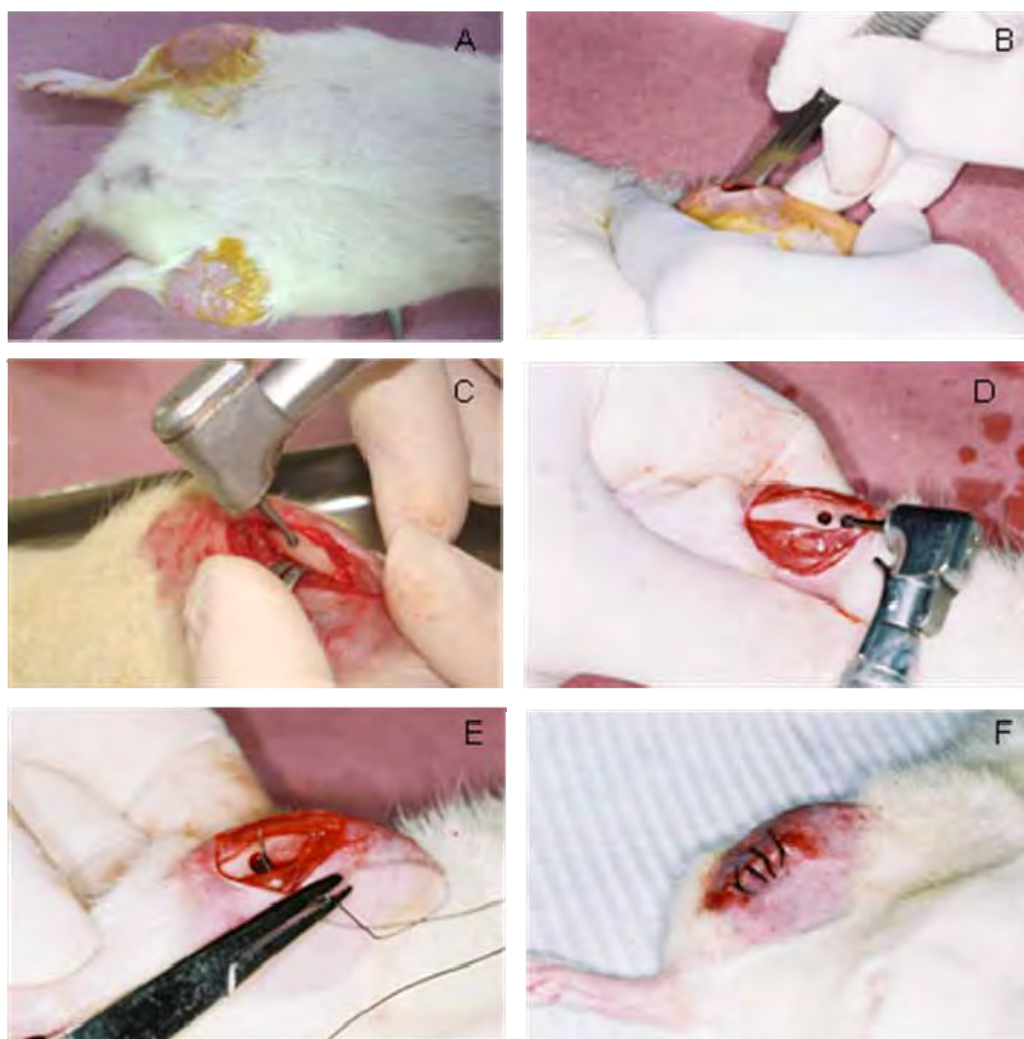


Figura 2 - a) animal anestesiado e depilado para a cirurgia de defeito ósseo; b) incisão da pele e camada muscular; c) tíbia exposta para a confecção da lesão; d) aspecto da lesão monocortical, e) sutura da camada muscular; f) aspecto final após a sutura da camada muscular e pele.

Os animais não receberam antiinflamatório e antibiótico no pós-operatório para evitar uma possível interação medicamentosa, especialmente com o medicamento homeopático. Além disso, estudos têm demonstrado que os antiinflamatórios podem atrasar o processo de reparação óssea (O'Connor; Lysz, 2008).

Após a realização da lesão, os animais foram tratados com os respectivos medicamentos propostos para cada grupo: *Calcareá phosphórica*, alendronato ou água. A medicação foi iniciada no dia seguinte ao da cirurgia de lesão óssea.

4.5 Sacrifício dos animais

Todas as ratas foram sacrificadas, em grupos de seis animais, após 3, 6, 10, 17 e 28 dias a partir do início do tratamento. Para a realização do sacrifício foi utilizada anestesia geral seguida de secção aórtica. As tíbias foram retiradas e conservadas em solução de formol a 10%, onde permaneceram por 3 dias antes das tomadas radiográficas.

4.6 Comprovação da ovariectomia

A comprovação da eficácia do procedimento de ovariectomia foi realizada por meio de avaliação macroscópica da atrofia dos cornos uterinos.

4.7 Avaliação da densidade óptica das tíbias

As tíbias foram radiografadas pelo Sistema de Radiografia Digital Direta Intrabucal Visualix (*Dentsply-Gendex, Milano-Italy*). O equipamento é dotado de um dispositivo de carga acoplada CCD (*charged-coupled device*) para captura direta de imagem, constituído de

um sistema ligado por cabo ao microcomputador. O aparelho de raios X utilizado foi o Gendex 765DC (*Gendex Dental Systems, Dentsply International, Chicago, IL, USA*) de corrente contínua 65kVp e 7mA com filtração de 2mm/Al, ponto focal efetivo de 0,4mm² e área focal de 6cm.

As tíbias foram posicionadas sobre o sensor fixado em uma mesa, com a face da lesão óssea centralizada na área ativa de 30x20mm, e voltada para o cilindro, de forma a não ser observada sobreposição das corticais na imagem radiográfica da lesão. As tomadas radiográficas, com tempo de exposição de 0,05 s e com o cilindro posicionado com distância focal de 40 cm foram realizadas pela técnica do paralelismo. Figura 3



Figura 3 – Tomada radiográfica mostrando a tíbia posicionada sobre o sensor e a respectiva imagem radiográfica evidenciando a região do defeito ósseo (seta).

As imagens radiográficas foram obtidas com resolução de 600 dpi, salvas em formato *TIFF* e a densidade óptica analisada pelo

programa UTHSCSA *Image Tool*, versão 3.00 (*University of Texas Health Sciences Center, San Antonio, Texas, USA*). A densidade óptica foi medida em uma região selecionada por um círculo delimitando toda a área do defeito criado, demonstrada pelo programa em uma escala de 256 níveis de cinza onde o preto correspondia ao valor zero e o branco ao valor 255.

4.8 Análise histológica

Após a realização das tomadas radiográficas, as tíbias foram submetidas à descalcificação com ácido etilendiaminotetracético (EDTA 10%), em temperatura ambiente e sob agitação periódica.

Após a descalcificação completa, as tíbias foram seccionadas transversalmente em região adjacente ao limite distal do defeito ósseo. O fragmento contendo a lesão foi incluído no sentido da superfície de corte em bloco de parafina e submetido a processamento histológico de rotina com obtenção de cortes semi-seriados. Os cortes foram obtidos com aproximadamente 5 a 6 μm de espessura e aprofundamento de 100 μm em cada nível, somando um total de vinte lâminas em cada bloco. Para cada nível foram confeccionadas duas lâminas, uma corada com Hematoxilina e Eosina (HE – *Merck & Co, Inc.*) e a outra com Tricrômio de Masson (*SIGMA Diagnostics – St. Louis, MO, USA*).

Os cortes mais centrais do defeito foram selecionados e submetidos à análise, com o auxílio de microscopia de luz, avaliando-se os aspectos morfológicos da reparação óssea, analisando o desenvolvimento, substituição, maturação e remodelação das diversas estruturas que se formaram nas fases sequenciais do reparo ósseo: coágulo sanguíneo, tecido de granulação, aparecimento de células

osteogênicas, trabéculas ósseas neoformadas (matriz osteóide e matriz mineralizada), trabéculas ósseas maduras e a remodelação das mesmas.

4.9 Avaliação histomorfométrica das tíbias

Para a realização da análise histomorfométrica, as lâminas foram fotografadas em microscópio de luz Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) que as transmite para o programa computacional AxioVision Release 4.7.2. As imagens digitais (formato JPEG) de três lâminas por animal, da região mais central do defeito, foram usadas para análise quantitativa do tecido ósseo neoformado.

Inicialmente, as imagens foram analisadas com o programa NIH *Image J* (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA - <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), versão 1.31 para *Windows*.

Primeiramente foi calculada a área em $pixels^2$ de uma região delimitada abrangendo todo o defeito criado e o canal medular adjacente, chamada de área A. Figura 4.



Figura 4 - Delimitação da área abrangendo todo o defeito criado e o canal medular adjacente (área A).

Posteriormente foi também calculada uma segunda área formada pela delimitação de toda a área preenchida por osso e tecido intertrabecular, chamada de área B. Figura 5.

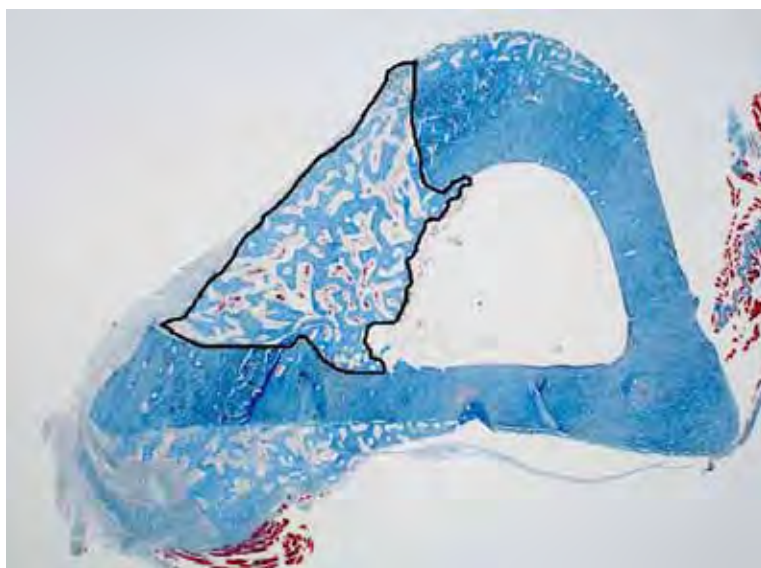


Figura 5 - Delimitação da área preenchida por osso e tecido intertrabecular (área B).

Usando os valores obtidos, para cada corte analisado, foi calculada a proporção de área preenchida por osso e tecido intertrabecular (área de preenchimento) em relação à área total seguindo a equação:

$$\text{(\% de Preenchimento)} = \text{Área B} \times 100 / \text{Área A}$$

Na etapa seguinte, foi utilizada a ferramenta *magic wand* do programa *Adobe Photoshop*, versão 7.0, com tolerância de 60, para selecionar somente as trabéculas ósseas neoformadas presentes na área B. Figura 6.



Figura 6 – Seleção das trabéculas neoformadas presentes na área B utilizando a ferramenta *magic wand* do programa *Adobe Photoshop*.

Essas trabéculas foram copiadas e salvas como uma nova imagem que foi analisada pelo programa *Image J* para cálculo da área dessas trabéculas através dos seguintes passos:

a) *Process* → *Binary* → *Make Binary*;

b) medição da área: *Analyze* → *Analyze Particles*

Com esses passos a área analisada (trabéculas) foi medida automaticamente em *pixels*². Figura 7.



Figura 7 – Em azul observam-se as trabéculas ósseas neoformadas presentes na área B após a seleção realizada com a ferramenta *magic wand* do programa *Adobe Photoshop*. Em preto, observa-se a imagem transformada que foi analisada pelo programa *Image J* para o cálculo da área dessas trabéculas.

A proporção de osso neoformado (área trabecular) foi então calculada através da relação entre a área ocupada somente pelas trabéculas ósseas neoformadas (área C) e a área preenchida por osso e tecido intertrabecular (área B) segundo a equação:

$$\text{(\% de Osso neoformado)} = \frac{\text{Área C} \times 100}{\text{Área B}}$$

Esse cálculo permitiu o conhecimento da proporção entre trabéculas ósseas e espaço intertrabecular.

Os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística. Para cada animal, o valor da porcentagem de área de preenchimento, bem como a porcentagem de osso neoformado contida dentro da área de preenchimento corresponderam à média dos valores obtidos nas três lâminas analisadas.

4.10 Análise estatística

Os dados obtidos nas análises de densidade óptica e histomorfométrica da tíbia foram submetidos à estatística descritiva e a teste estatístico. Os testes utilizados, dependendo das condições de cada grupo foram: análise de variância ANOVA paramétrica, ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis, testes de Tukey e de comparação múltipla de Dunn. O nível de significância (p) adotado foi o valor de 5%. Os gráficos e todos os testes foram efetuados usando o programa computacional MINITAB® Release 14.12.0, Statistix 8.0 e GraphPad Prism 5.00 for Windows, Pensylvania USA.

A análise estatística foi elaborada para cada um dos métodos de avaliação utilizados neste estudo como descrito a seguir.

Para a análise de densidade óptica, primeiramente foram comparados os animais tratados com placebo (*sham* e ovariectomizados), tendo como variáveis independentes a presença ou ausência de ovários e os períodos de 3, 6, 10, 17 e 28 dias. Como variável dependente ou variável resposta a densidade óptica. Esquema fatorial 2X5. Posteriormente foram comparadas as densidades ópticas entre os animais ovariectomizados, submetidos aos diferentes tratamentos, tendo como variáveis independentes os tratamentos com alendronato, *Calcareo phosphorica*, placebo e os períodos de 3, 6, 10, 17 e 28 dias. Como

variável dependente ou variável resposta a densidade óptica. Esquema fatorial 3X5.

Para a análise da área de preenchimento do defeito ósseo primeiramente foram comparados os animais tratados com placebo (*sham* e ovariectomizados), tendo como variáveis independentes a presença ou ausência de ovários e os períodos de 6, 10, 17 e 28 dias. Como variável dependente ou variável resposta o percentual de área de preenchimento por osso. Esquema fatorial 2X4. Posteriormente foram comparados os animais ovariectomizados submetidos aos diferentes tratamentos, tendo como variáveis independentes os tratamentos com alendronato, *Calcareo phosphorica*, placebo e os períodos de 6, 10, 17 e 28 dias. Como variável dependente ou variável resposta o percentual de área de preenchimento do defeito. Esquema fatorial 3X4.

Para a análise da área de osso neoformado presente na área de preenchimento do defeito ósseo primeiramente foram comparados os animais tratados com placebo (*sham* e ovariectomizados), tendo como variáveis independentes a presença ou ausência de ovários e os períodos de 6, 10, 17 e 28 dias. Como variável dependente ou variável resposta o percentual de osso neoformado. Esquema fatorial 2X4. Posteriormente foram comparados os animais ovariectomizados submetidos aos diferentes tratamentos, tendo como variáveis independentes os tratamentos com alendronato, *Calcareo phosphorica*, placebo e os períodos de 6, 10, 17 e 28 dias. Como variável dependente ou variável resposta o percentual de osso neoformado. Esquema fatorial 3X4.

5 RESULTADO

Os resultados obtidos serão apresentados em partes nas quais serão analisadas respectivamente os dados referentes à; 5.1 - análise de densidade óptica; 5.2 - análise histomorfométrica e 5.3 - análise histológica descritiva. Cada análise focou um diferente aspecto da evolução da reparação óssea nos diferentes grupos.

Para as análises quantitativas - de densidade óptica e histomorfométrica - os dados obtidos foram divididos e analisados em duas partes. Na primeira, foram analisados os grupos de animais que receberam tratamento placebo, comparando-os entre si: animais submetidos à cirurgia *sham* (S) e aqueles ovariectomizados (O). Na segunda, foram analisados e comparados entre si os grupos de animais ovariectomizados e tratados com: alendronato (A), placebo e *Calcareo phosphorica* (CP).

5.1 Densidade óptica

5.1.1 Análise de densidade óptica dos grupos S e O

Os dados de densidade óptica foram obtidos após a realização de radiografias digitais das tíbias, levando em consideração a região dos defeitos ósseos.

As variações de densidade óptica nos grupos S e O estão expressas na Tabela 1, considerando as variáveis tempo de reparação óssea e presença/ausência de ovários.

Tabela 1 - Estatística descritiva dos valores médios (\pm desvio padrão) de densidade óptica dos grupos *sham* (S) e ovariectomizado (O), considerando os diferentes tempos de reparação óssea

Tempo de reparo (dias)	n	Presença/Ausência Ovários (m \pm dp)	
		S	O
3	6	49,25 \pm 6,15	50,00 \pm 9,39
6	6	58,50 \pm 11,35	47,50 \pm 10,03
10	6	62,58 \pm 12,89	63,83 \pm 11,84
17	6	68,83 \pm 6,99	63,08 \pm 10,21
28	6	76,33 \pm 12,13	61,00 \pm 5,79

n = tamanho da amostra

S = *sham* + placebo

O = ovariectomizado + placebo

Por meio da Tabela 1 nota-se que o grupo S apresenta um aumento gradual e constante dos valores de densidade óptica, do início ao fim do período de observação, terminando aos 28 dias com valores superiores aos do grupo O. Por outro lado, o grupo O exibe um ligeiro declínio dos valores de densidade óptica no período de 3 a 6 dias, sofre um aumento no período de 6 a 10 dias, apresentando, a partir daí, valores praticamente constantes até o final do período. Os dados da Tabela 1 estão representados em gráfico de colunas na Figura 8.

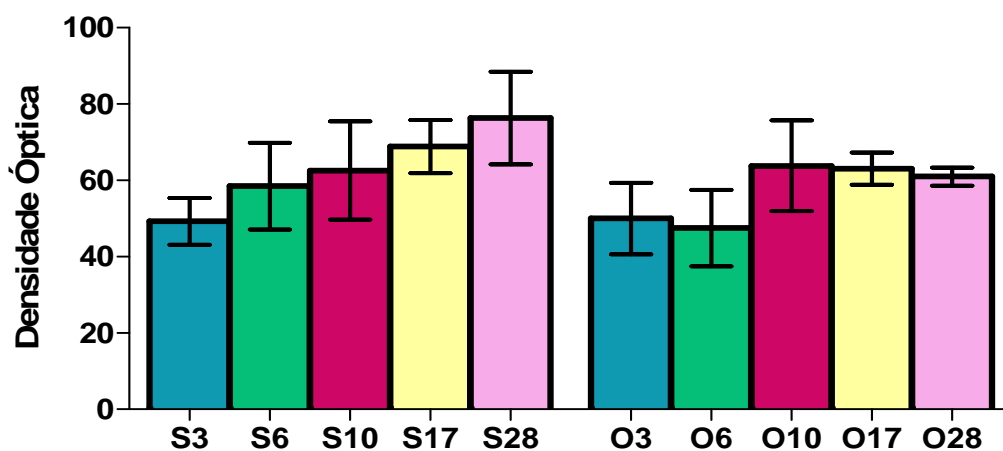


Figura 8 - Gráfico de colunas dos valores médios (\pm desvio padrão) referentes aos valores de densidade óptica dos grupos S e O, considerando os diferentes tempos de reparação óssea.

Para avaliar a influência dos efeitos presença/ausência de ovários e tempo sobre a densidade óptica foi realizada uma análise por meio do teste ANOVA 2 fatores. Os resultados estão na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultado da análise ANOVA para os dados de densidade óptica dos grupos S e O

Fonte de variação	gl	SQ	QM	F	p
Presença/ausência ovários	1	543,00	543,004	5,45	0,0236*
Tempo	4	3330,06	832,515	8,36	0,0000*
Presença/ausência ovários x Tempo	4	630,89	157,723	1,58	0,1931
Resíduo	50	4978,79	99,576		
Total	59	9482,75			

*p<0,05

Verificou-se por meio da tabela 2, que o efeito interação tempo versus presença/ausência de ovários não foi estatisticamente significativa. Verificou-se, ainda, que os efeitos principais presença/ausência de ovários e tempo foram estatisticamente significantes.

A ausência de ovários resultou em menores valores de densidade óptica com diferença estatisticamente significativa entre os grupos S (média 63,09) e O (média 57,08). Quanto ao efeito tempo, por meio do teste de Tukey, pode-se observar que os valores de densidade óptica foram crescentes com o passar do tempo com diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 28 e 17 dias em relação aos períodos de 6 e 3 dias. O período de 10 dias apresentou valor estatisticamente diferente apenas do de 3 dias (Tabela 3).

Tabela 3 - Formação de grupos homogêneos por meio do teste de Tukey (5%). Valores médios de densidade óptica dos grupos S e O, considerando os diferentes tempos de reparação óssea.

Tempo de reparo (dias)	Média	Grupos Homogêneos
28	68,667	A
17	65,958	A
10	63,208	AB
6	53,000	BC
3	49,625	C

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente

5.1.2 Análise de densidade óptica dos grupos A, O e CP

Da mesma forma que no item anterior, os dados de densidade óptica foram obtidos após a realização das radiografias digitais das tíbias, levando em consideração a região dos defeitos ósseos. As variações de densidade óptica nos grupos A, O e CP estão expressas na Tabela 4, considerando as variáveis tempo de reparação óssea e tratamento.

Tabela 4 - Estatística descritiva dos valores médios (\pm desvio padrão) de densidade óptica dos grupos A, O e CP, considerando os diferentes tempos de reparação óssea

Tempo de reparo (dias)	n	Tratamentos (m \pm dp)		
		A	O	CP
3	6	40,58	50,00	44,42
		$\pm 2,48$	$\pm 9,39$	$\pm 6,33$
6	6	52,42	47,50	59,67
		$\pm 9,36$	$\pm 10,03$	$\pm 8,94$
10	6	69,58	63,83	60,50
		$\pm 7,03$	$\pm 11,84$	$\pm 7,86$
17	6	69,92	63,08	72,83
		$\pm 8,03$	$\pm 10,21$	$\pm 5,89$
28	6	90,33	61,00	61,92
		$\pm 17,94$	$\pm 5,78$	$\pm 6,45$

n = tamanho da amostra

A = ovariectomizado + alendronato

O = ovariectomizado + placebo

CP = ovariectomizado + *Calcareia phosphorica*

Por meio da tabela 4 observa-se um aumento gradual e constante dos valores de densidade óptica para o grupo A nos intervalos de tempo de 3, 6 e 10 dias. Entre os tempos de 10 e 17 dias há pouca alteração e no intervalo de 17 a 28 dias um aumento mais significativo é observado. O grupo O apresenta um ligeiro decréscimo no intervalo de 3 a 6 dias, um aumento mais significativo dos 6 aos 10 dias e a partir daí se mantém praticamente estável até o final do período de avaliação. O grupo CP mostra um aumento no período de 3 a 6 dias, que se mantém estável até os 10 dias, sofrendo um aumento mais significativo aos 17 dias e voltando a cair aos 28 dias. Os dados da Tabela 4 estão representados em gráfico de colunas na Figura 9.

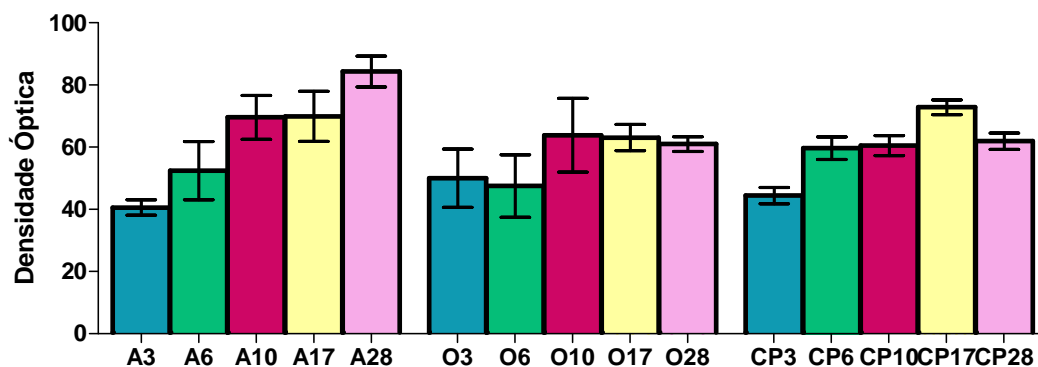


Figura 9 - Gráfico de colunas dos valores médios (\pm desvio padrão) referentes aos valores de densidade óptica dos grupos A, O e CP, considerando os diferentes tempos de reparação óssea.

Para avaliar a influência das variáveis tempo e tratamento sobre a densidade óptica foi efetuada uma análise comparativa entre os animais ovariectomizados tratados com alendronato, placebo e *Calcareia phosphorica* por meio do teste ANOVA (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultado da análise ANOVA para os dados de densidade óptica dos grupos A, O e CP

Fonte de variação	gl	SQ	MQ	F	p
Tempo	4	0,50002	0,12500	32,85	0,0001*
Tratamento	2	0,02747	0,01373	3,61	0,0319*
Tempo x Tratamento	8	0,15829	0,01979	5,20	0,0001*
Resíduo	75	0,28542	0,00381		
Total	89	0,97120			

*p<0,05

Verificou-se por meio da Tabela 5 que houve diferença estatisticamente significativa nos efeitos da interação tempo versus tratamento e também para os efeitos principais tempo e tratamento.

Quando aplicado o teste de Tukey, pôde-se observar que o grupo A28 apresentou o maior valor de densidade óptica, seguido por CP17, com valores estatisticamente iguais entre si. Os valores mais baixos foram dos grupos CP3 e A3, com valores estatisticamente diferentes do grupo A28, porém iguais entre si. Foi realizada a análise estatística com os valores transformados na escala logarítmica decimal pelo fato de não ocorrer a mesma dispersão dos valores de desvio padrão em cada grupo, suposição do modelo ANOVA paramétrico (Tabela 6).

Tabela 6 - Formação de grupos homogêneos por meio do teste de Tukey (5%). Valores médios de densidade óptica (em logarítimo) dos grupos A, O e CP, considerando os diferentes tempos de reparação óssea.

Tempo de reparo (dias)	Tratamento	Média	Grupos Homogêneos
28	A	1,949	A
17	CP	1,861	AB
17	A	1,842	AB
10	A	1,840	AB
10	O	1,799	BC
17	O	1,795	BC
28	CP	1,789	BCD
28	O	1,783	BCD
10	CP	1,776	BCD
6	CP	1,771	BCD
6	A	1,714	CDE
3	O	1,693	CDE
6	O	1,669	DE
3	CP	1,644	E
3	A	1,607	E

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente

5.2 Análise histomorfométrica

Pela análise histomorfométrica foram realizadas duas medidas e os resultados serão apresentados em sequência.

Primeiramente foi medida a área formada pelo total de tecido de preenchimento do defeito ósseo. Posteriormente foi medida a área de osso neoformado dentro da área de preenchimento do defeito.

Para esta análise, os grupos de animais de 3 dias foram excluídos, pois nesta fase inicial da reparação não foi possível, pelo

método empregado, identificar e mensurar, em nenhum grupo, formação óssea nas áreas dos defeitos.

5.2.1 Análise da área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos S e O

Considerou-se como área de preenchimento do defeito ósseo, toda a área de preenchimento do defeito e espaço medular por tecido neoformado (tecido ósseo mais tecido mole intertrabecular).

A estatística descritiva dos valores em porcentagem de preenchimento do defeito ósseo dos grupos S e O, em função do tempo estão expressos na Tabela 7.

Tabela 7 - Estatística descritiva dos valores médios (\pm desvio padrão) de área de preenchimento do defeito ósseo (%) dos grupos *sham* (S) e ovariectomizado (O), considerando os diferentes tempos de reparação óssea

Tempo de reparo (dias)	n	Presença/Ausência Ovários (m \pm dp)	
		S	O
6	6	40,76 \pm 15,81	23,30 \pm 9,12
10	6	52,62 \pm 8,62	65,99 \pm 13,19
17	6	64,41 \pm 11,39	39,33 \pm 21,49
28	6	52,08 \pm 10,53	38,74 \pm 12,98

n = tamanho da amostra

S = *sham* + placebo

O = ovariectomizado + placebo

Verificou-se por meio da Tabela 7 que o grupo S apresenta um aumento gradual e constante entre os períodos de 6 a 17 dias, sofrendo queda entre os 17 e 28 dias. O grupo O apresenta um aumento brusco nos valores de área de preenchimento entre os períodos de 6 a 10 dias, sofrendo queda entre os períodos de 10 e 17 dias, mantendo os valores estáveis até o período de 28 dias. Os dados da Tabela 7 estão representados em gráfico de colunas na Figura 10.

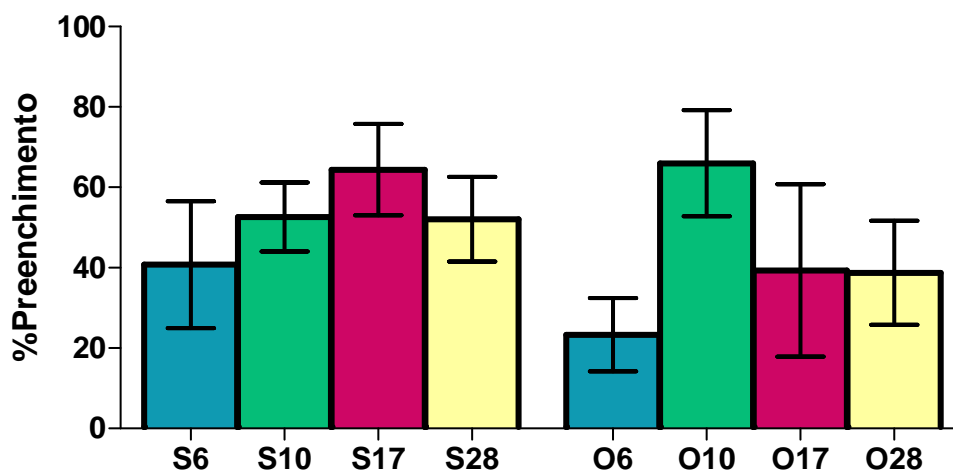


Figura 10 - Gráfico de colunas dos valores médios (\pm desvio padrão) de área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos S e O, considerando os diferentes tempos de reparação óssea.

Para avaliar a influência das variáveis tempo e presença/ausência de ovários na área de preenchimento do defeito ósseo, foi realizada uma análise comparativa entre os animais com presença ou ausência de ovários para os períodos de 6, 10, 17 e 28 dias, sendo os dados submetidos ao modelo estatístico ANOVA (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultado da análise ANOVA para os dados de área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos S e O

Fonte de variação	gl	SQ	QM	F	p
Presença/Ausência Ovários	1	1355,5	1355,55	7,47	0,0093*
Tempo	3	4821,0	1606,99	8,85	0,0001*
Presença/Ausência Ovários x Tempo	3	2515,4	838,46	4,62	0,0073*
Resíduo	40	7262,7	181,57		
Total	47	15954,7			

*p<0,05

Verificou-se por meio da Tabela 8 que houve diferença estatisticamente significativa para o efeito interação presença/ausência de ovários versus tempo e também dos efeitos principais tempo e presença/ausência de ovários.

Quando aplicado o teste de Tukey, os resultados mostram que o maior valor de área de preenchimento ficou com o grupo O10, seguido pelo grupo S17, com valores estatisticamente iguais entre si. Os menores valores ficaram com os grupos O6 e O28 com resultados estatisticamente iguais entre si, porém diferentes de O10 e S17 (Tabela 9).

Tabela 9 - Formação de grupos homogêneos por meio do teste de Tukey (5%). Valores médios de área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos S e O considerando os diferentes tempos de reparação óssea.

Tempo de reparo (dias)	Presença/Ausência Ovários	Média	Grupos Homogêneos
10	O	65,99	A
17	S	64,40	AB
10	S	52,62	ABC
28	S	52,07	ABC
6	S	40,76	BCD
17	O	39,33	CD
28	O	38,73	CD
6	O	23,29	D

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente

5.2.2 Análise da área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos A, O e CP

A estatística descritiva dos valores de área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos de animais ovariectomizados tratados com alendronato, placebo e *Calcareia phosphorica*, em função do tempo estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10 - Estatística descritiva dos valores médios (\pm desvio padrão) de área de preenchimento do defeito ósseo (%) dos grupos A, O e CP, considerando os diferentes tempos de reparação óssea

Tempo de reparo (dias)	n	Tratamentos (m \pm dp)		
		A	O	CP
6	6	53,48	23,30	27,21
		$\pm 11,67$	$\pm 9,12$	$\pm 11,22$
10	6	54,87	65,99	72,97
		$\pm 6,50$	$\pm 13,19$	$\pm 16,17$
17	6	55,11	39,33	56,33
		$\pm 6,31$	$\pm 21,49$	$\pm 16,33$
28	6	65,71	38,74	49,50
		$\pm 14,71$	$\pm 12,98$	$\pm 8,79$

n = tamanho da amostra

A = ovariectomizado + alendronato

O = ovariectomizado + placebo

CP = ovariectomizado + *Calcareea phosphorica*

Observa-se por meio da Tabela 10 que o grupo A apresentou valores iniciais e finais maiores do que os valores dos grupos CP e O. Manteve valores estáveis entre os períodos de 6 a 17 dias e obteve um aumento entre o período de 17 a 28 dias. O grupo O também apresentou grande aumento no período de 6 a 10 dias, sofrendo queda no período de 10 a 17 dias e se manteve estável no período de 17 a 28 dias. O grupo CP apresentou um grande aumento no período de 6 a 10 dias, sofrendo queda gradual no período de 10 a 28 dias. Os dados da Tabela 10 estão representados em gráfico de colunas na Figura 11.

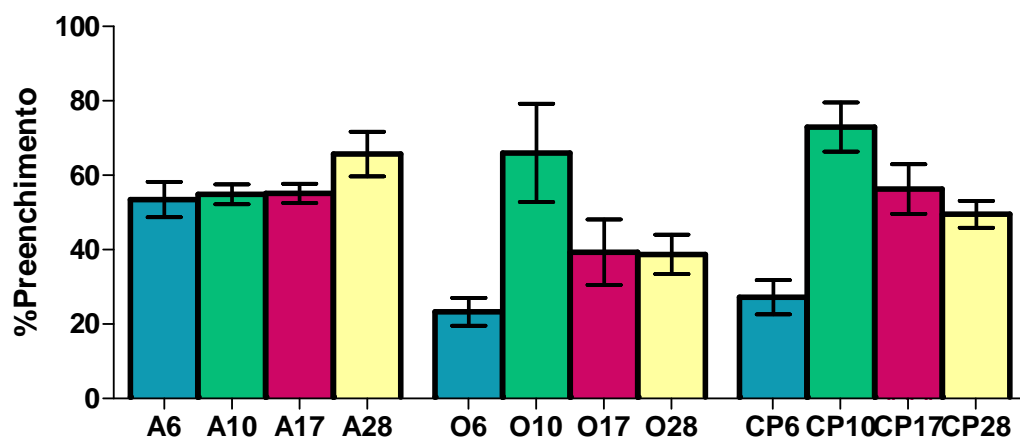


Figura 11 - Gráfico de colunas dos valores médios (\pm desvio padrão) de percentual de área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos A, O e CP, considerando os diferentes tempos de reparação óssea.

Para avaliar a influência das variáveis tempo e tratamento na formação da área de preenchimento do defeito ósseo, foi realizada uma análise comparativa entre os animais ovariectomizados tratados com alendronato, placebo e *Calcareia phosphorica* para os períodos de 6, 10, 17 e 28 dias, sendo os dados submetidos ao modelo estatístico ANOVA (Tabela 11).

Tabela 11 - Resultado da análise ANOVA para os dados de área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos A, O e CP

Fonte de variação	gl	SQ	QM	F	p
Tempo	3	8105,8	2701,92	15,79	0,0000*
Tratamento	2	2925,4	1462,70	8,55	0,0005*
Tempo x Tratamento	6	4598,6	766,43	4,48	0,0008*
Resíduo	60	10268,0	171,13		
Total	71	25897,8			

*p<0,05

Pode-se observar por meio da Tabela 11, que o efeito da interação tempo versus tratamento apresentou significância estatística, assim como os dois efeitos principais tempo e tratamento.

Quando aplicado o teste de Tukey, verificou-se que o grupo CP10 apresentou o maior percentual de área de preenchimento do defeito ósseo seguido dos grupos O10 e A28. O menor valor de preenchimento ficou com o grupo O6, seguido por CP6, sendo os valores estatisticamente iguais entre si, porém diferentes de CP10 (Tabela 12).

Tabela 12 - Formação de grupos homogêneos por meio do teste de Tukey (5%). Valores médios de área de preenchimento do defeito ósseo (%) dos grupos A, O e CP, considerando os diferentes tempos de reparação óssea.

Tempo de reparo (dias)	Tratamento	Média	Grupos Homogêneos
10	CP	72,97	A
10	O	65,99	A
28	A	65,71	A
17	CP	56,32	AB
17	A	55,10	AB
10	A	54,86	AB
6	A	53,47	AB
28	CP	49,50	ABC
17	O	39,33	BCD
28	O	38,73	BCD
6	CP	27,21	CD
6	O	23,29	D

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente

5.2.3 Análise da área de osso neoformado presente na área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos S e O

Considerou-se como osso neoformado toda a matriz óssea representada por osteóide ou por osso mineralizado, presente no interior da área de preenchimento do defeito ósseo.

A estatística descritiva dos dados referentes à formação de tecido ósseo na área de preenchimento do defeito dos grupos S e O, em função das variáveis tempo e presença/ausência de ovários, estão representados na Tabela 13.

Tabela 13 - Estatística descritiva dos valores médios (\pm desvio padrão) expressos em (%) de área de osso neoformado presente na área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos S e O

Tempo de reparo (dias)	n	Presença/Ausência Ovários (m \pm dp)	
		S	O
6	6	39,98 \pm 4,32	41,31 \pm 2,52
10	6	44,51 \pm 4,96	48,21 \pm 8,31
17	6	42,01 \pm 5,09	56,41 \pm 7,26
28	6	51,28 \pm 7,12	61,45 \pm 9,58

n = tamanho da amostra

S = *sham* + placebo

O = ovariectomizado + placebo

Verificou-se por meio da Tabela 13 que o grupo S apresentou crescimento dos valores no período de 6 a 10 dias, ligeiro decréscimo no período de 10 a 17 dias e novo crescimento no período de 17 a 28 dias. O grupo O apresentou valores crescentes de área trabecular durante todo o período de avaliação, com valores superiores aos do grupo S. Os dados da tabela 13 estão representados em gráfico de colunas na Figura 12.

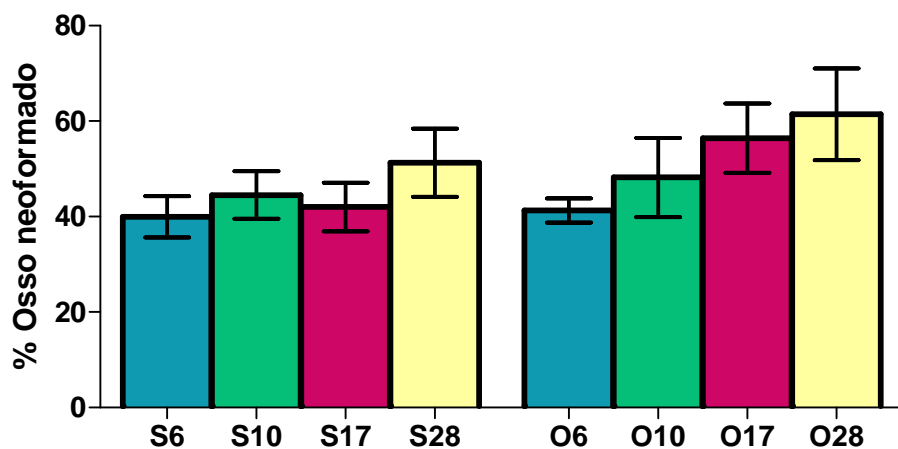


Figura 12 - Gráfico de colunas dos valores médios (\pm desvio padrão) de percentual de área de osso neoformado presente na área de preenchimento dos defeitos ósseos dos grupos S e O, considerando os diferentes tempos de reparação óssea.

Para avaliar a influência das variáveis tempo e presença/ausência de ovários na neoformação óssea na área do defeito, foi realizada uma análise comparativa entre os animais com presença ou ausência de ovários para os períodos de 6, 10, 17 e 28 dias, sendo os dados submetidos ao modelo estatístico ANOVA (Tabela 14).

Tabela 14 - Resultado da análise ANOVA para os dados de área de osso neoformado presente na área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos S e O

Fonte de variação	gl	SQ	QM	F	p
Presença/Ausência Ovários	3	0,11712	0,03904	12,25	0,0000*
Tempo	1	0,04751	0,04751	14,91	0,0004*
Presença/Ausência Ovários x Tempo	3	0,02296	0,00765	2,40	0,0819
Resíduo	40	0,12748	0,00319		
Total	47	0,31507			

*p<0,05

Pode-se verificar por meio da Tabela 14 que o efeito da interação presença/ausência de ovários versus tempo não foi estatisticamente significativo. Houve significância estatística para os dois efeitos principais tempo e presença/ausência de ovários.

A ausência de ovários resultou em maiores valores de área de osso neoformado com diferença estatisticamente significativa entre os grupos O (média 51,85) e S (média 44,45).

Quando aplicado o teste de Tukey (5%) referente ao comportamento de cada grupo em relação ao tempo, se observa diferença estatística significativa. Aos 28 dias foi observado o maior percentual de área de neoformação óssea, com valor estatisticamente igual ao tempo de 17 dias, porém diferente dos valores encontrados aos 10 e aos 6 dias. Foi realizada a análise estatística com os valores transformados na escala logarítmica decimal pelo fato de não ocorrer a

mesma dispersão dos valores de desvio padrão em cada grupo, suposição do modelo ANOVA paramétrico. A neoformação óssea em função do tempo é mostrada na Tabela 15.

Tabela 15 - Teste de Tukey (5%). Valores médios (em logarítmo) de área de osso neoformado presente na área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos S e O em relação ao tempo de tratamento.

Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos
28	1,7454	A
17	1,6844	AB
10	1,6619	BC
6	1,6076	C

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente

5.2.4 Análise da área de osso neoformado presente na área de preenchimento do defeito ósseo dos grupos A, O e CP

Para esta análise, da mesma forma que no item 5.2.3, considerou-se como osso neoformado toda a matriz óssea representada por osteóide ou por osso mineralizado presente no interior da área de preenchimento do defeito ósseo.

Para esta avaliação, foi realizado o teste não paramétrico ANOVA de Kruskal Wallis, devido à grande variabilidade dos desvios padrão em cada grupo.

A estatística descritiva dos valores em porcentagem de osso neoformado na área do defeito ósseo dos grupos de animais

ovariectomizados tratados com alendronato, placebo e *Calcareia phosphorica*, em função do tempo, estão expressos na Tabela 16.

Tabela 16 - Estatística descritiva dos valores expressos em (%) de área de osso neoformado presente na área de preenchimento dos defeitos ósseos dos grupos A, O e CP

Condições Experimentais	n	Média ±dp	Mín	Q1	Mediana	Q3	Máx
A6	6	49,14 ±7,408	41,69	42,49	47,31	56,84	59,99
A10	6	41,10 ±3,829	37,03	37,28	40,58	45,37	45,80
A17	6	49,09 ±3,681	44,00	45,24	49,81	52,02	53,84
A28	6	57,25 ±12,947	44,22	46,24	52,96	73,04	73,55
O6	6	41,31 ±2,524	38,35	39,27	40,70	43,78	45,24
O10	6	48,21 ±8,311	34,99	40,85	50,07	54,53	57,95
O17	6	56,41 ±7,262	45,96	50,73	55,47	64,16	65,50
O28	6	61,45 ±9,587	48,55	53,38	60,33	72,12	72,52
CP6	6	25,53 ±7,107	16,28	16,75	28,42	31,53	31,68
CP10	6	24,27 ±5,365	17,72	20,77	22,52	29,44	32,75
CP17	6	34,13 ±7,292	24,47	27,49	33,81	41,09	44,13
CP28	6	59,28 ±3,290	55,40	55,74	59,43	62,42	63,48

n = tamanho da amostra

A = ovariectomizado + alendronato

O = ovariectomizado + placebo

CP = ovariectomizado + *Calcareia phosphorica*

Os dados da Tabela 16 indicam que o grupo A iniciou o período de análise com o maior valor médio, quando comparado com O e CP. Apresentou queda no período de 6 a 10 dias e, dos 10 aos 28 dias apresentou aumento constante. O grupo O apresentou um crescimento médio constante dos 6 aos 28 dias, com valores médios maiores que os do grupo A aos 10, 17 e 28 dias e maiores do que os do grupo CP em todos os períodos. O grupo CP manteve a média dos valores baixos e constantes nos períodos de 6 a 10 dias, sofrendo um aumento dos 10 aos 17 dias e um grande aumento dos 17 aos 28 dias. Os valores finais dos três grupos foram estatisticamente iguais entre si. Os dados da Tabela 16 estão representados em gráfico de colunas na Figura 13.

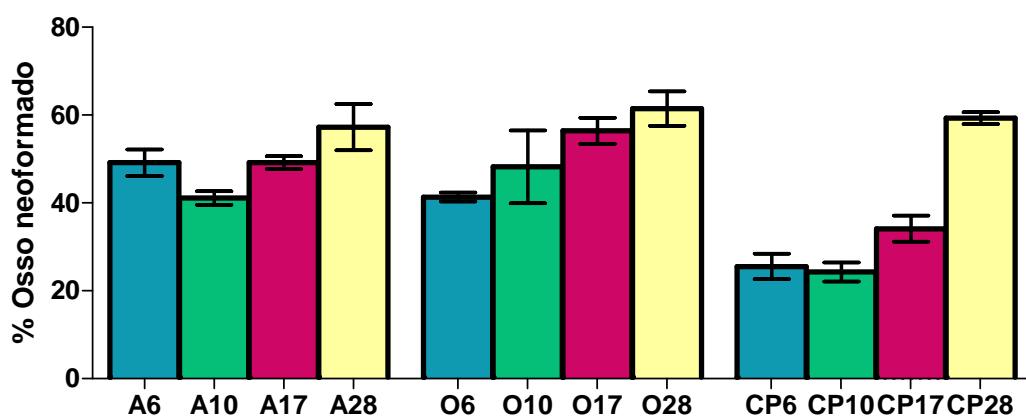


Figura 13 - Gráfico de colunas dos valores médios (\pm desvio padrão) de percentual de área de osso neoformado presente na área de preenchimento dos defeitos ósseos dos grupos A, O e CP, considerando os diferentes tempos de reparação óssea.

Após a aplicação do teste Anova não paramétrico de Kruskal-Wallis verificou-se que houve diferença estatística entre a

distribuição dos valores em cada grupo: (KW = 56.2002; GI = 11; P = 0.0001*)

Quando aplicado o teste de Dunn, os resultados mostraram que os maiores valores de porcentagem de área trabecular ficaram com os grupos CP28 e O28 com valores estatisticamente iguais entre si. Os menores valores ficaram com CP6 e CP10 com valores estatisticamente iguais entre si, porém diferentes de CP28.

Tabela 17 - Formação de grupos homogêneos por meio do teste de Dunn (5%). Valores da média dos postos (%) de osso neoformado na área de preenchimento dos grupos A, O e CP, considerando os diferentes tempos de reparação óssea.

Tempo de reparação	Tratamento	Média dos postos	Grupos Homogêneos
28	CP	61,000	A
28	O	59,500	A
17	O	55,000	AB
28	A	52,667	AB
17	A	42,833	ABC
6	A	41,833	ABC
10	O	40,833	ABC
10	A	26,333	ABC
6	O	26,167	ABC
17	CP	17,000	BC
6	CP	7,833	C
10	CP	7,000	C

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente

5.3 Análise histológica descritiva

A análise histológica permitiu a observação das várias fases da reparação do defeito ósseo em todos os grupos estudados. A seguir, serão descritas as características observadas nos cortes histológicos em cada etapa da reparação, de acordo com os tempos analisados.

5.3.1 Período de 3 dias

Aos 3 dias, o grupo A apresentou retração superficial na área do defeito ósseo, cavidade medular preenchida por tecido de granulação e coágulo. O grupo CP apresentou aspecto histológico semelhante ao grupo A. O grupo O apresentou um coágulo maior, restrito à região superficial entre as extremidades corticais, sendo que em 5/6 dos animais o tecido de granulação ocupou parcialmente o canal medular e em um animal ocupou totalmente. O grupo S apresentou aspecto homogêneo entre todos os animais com coágulo sanguíneo misturado a tecido de granulação preenchendo espaço entre as duas corticais, sem preencher totalmente o canal medular. Não havia osso formado em nenhum grupo.

As imagens histológicas desta fase da reparação óssea são mostradas na Figura 14.

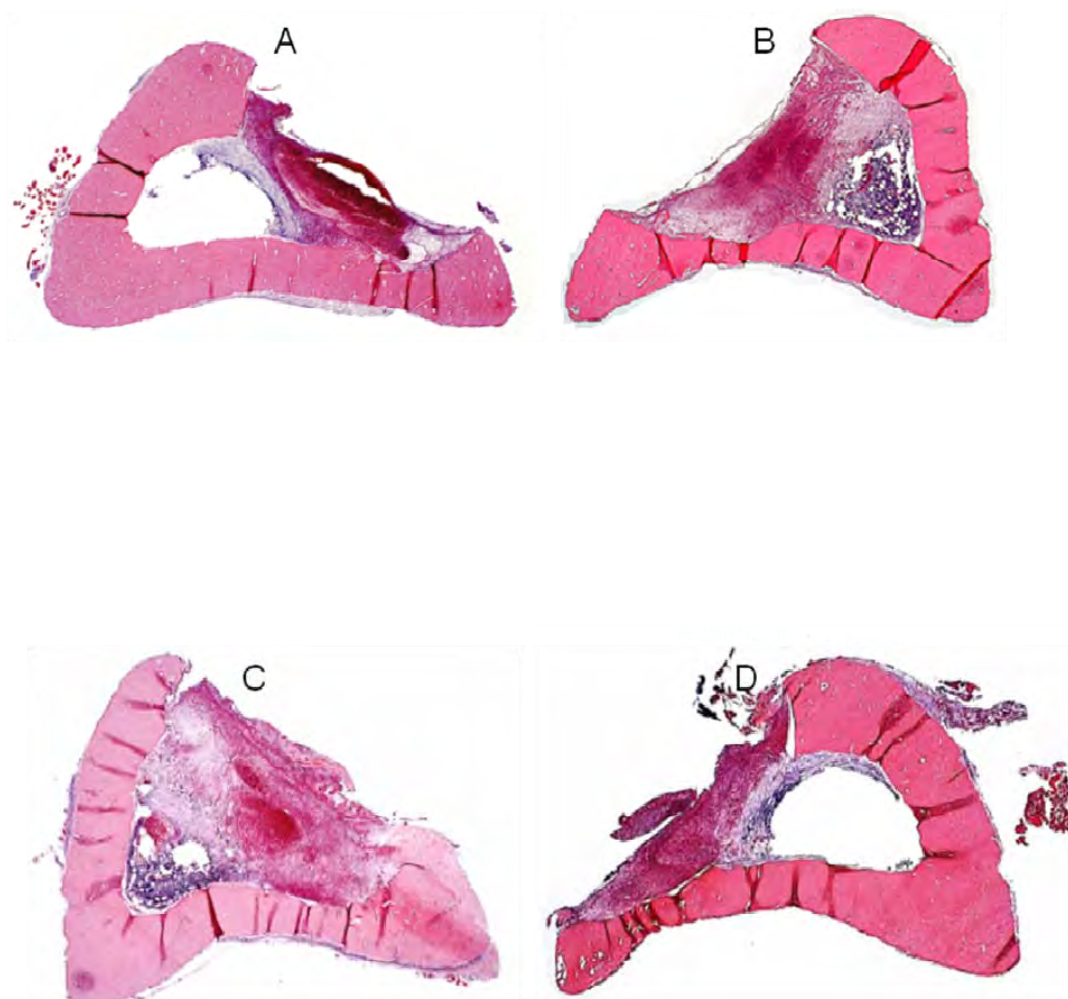


Figura 14 - Aspecto da área da lesão 3 dias após a confecção do defeito ósseo. HE 25X. a) Grupo A (ovariectomizado tratado com alendronato); b) Grupo CP (ovariectomizado tratado com *Calcareo phosphorica*); c) Grupo O (ovariectomizado tratado com placebo) d) Grupo S (*sham* tratado com placebo).

5.3.2 Período de 6 dias

Neste período, o grupo A apresentou início de formação de trabéculas ósseas a partir do endóstio das bordas laterais e fundo da lesão. As trabéculas apresentavam osteócitos aprisionados, poucos osteoblastos margeando o osteóide e raros osteoclastos. O canal medular estava parcialmente ocupado pelo calo fibroso e ósseo, havia presença de tecido conjuntivo denso na superfície e não havia mais a presença de coágulo. Observou-se a ponte de união óssea completamente formada, além de reação de neoformação óssea na superfície externa da cortical, principalmente no lado oposto ao do defeito. Por vezes esta formação externa também era observada na cortical lateral ao defeito.

O grupo CP apresentou reparo ósseo mais atrasado em relação ao grupo A. Foi observado osso trabecular neoformado originado do endóstio em todos os animais, com presença de osteoblastos margeando as trabéculas neoformadas, alguns osteócitos e raros osteoclastos. A maior parte dos animais (5/6) ainda apresentava resíduos de coágulo misturado com tecido de granulação, além de possuir calo ósseo menor que o do grupo A. A formação de osso externo foi mais exuberante neste grupo.

O grupo O apresentou dois padrões distintos. Em metade do grupo havia presença de coágulo e formação de osso trabecular a partir do endóstio, vindo da face lateral e fundo do canal medular. A outra metade não apresentava mais o coágulo sanguíneo e o osso neoformado se distribuía formando uma ponte entre as duas extremidades corticais. Em ambos os modelos havia mistura de trabéculas com tecido de granulação e foi observada formação de osso trabecular por toda a cortical externa do osso. O limite das trabéculas era mal definido com poucos osteócitos, muitos osteoblastos nas margens das trabéculas e

raros osteoclastos. O tecido entre as trabéculas apresentava alta celularidade.

O grupo S apresentou aspecto semelhante ao grupo A no que diz respeito ao volume do calo. Em dois animais foi observada a presença de coágulo. As trabéculas, com espessuras variáveis, apresentavam muitos osteócitos e poucos osteoblastos no contorno e praticamente não havia osteoclastos. O tecido entre as trabéculas era do tipo conjuntivo com alta celularidade.

As imagens histológicas desta fase da reparação óssea são mostradas na Figura 15.

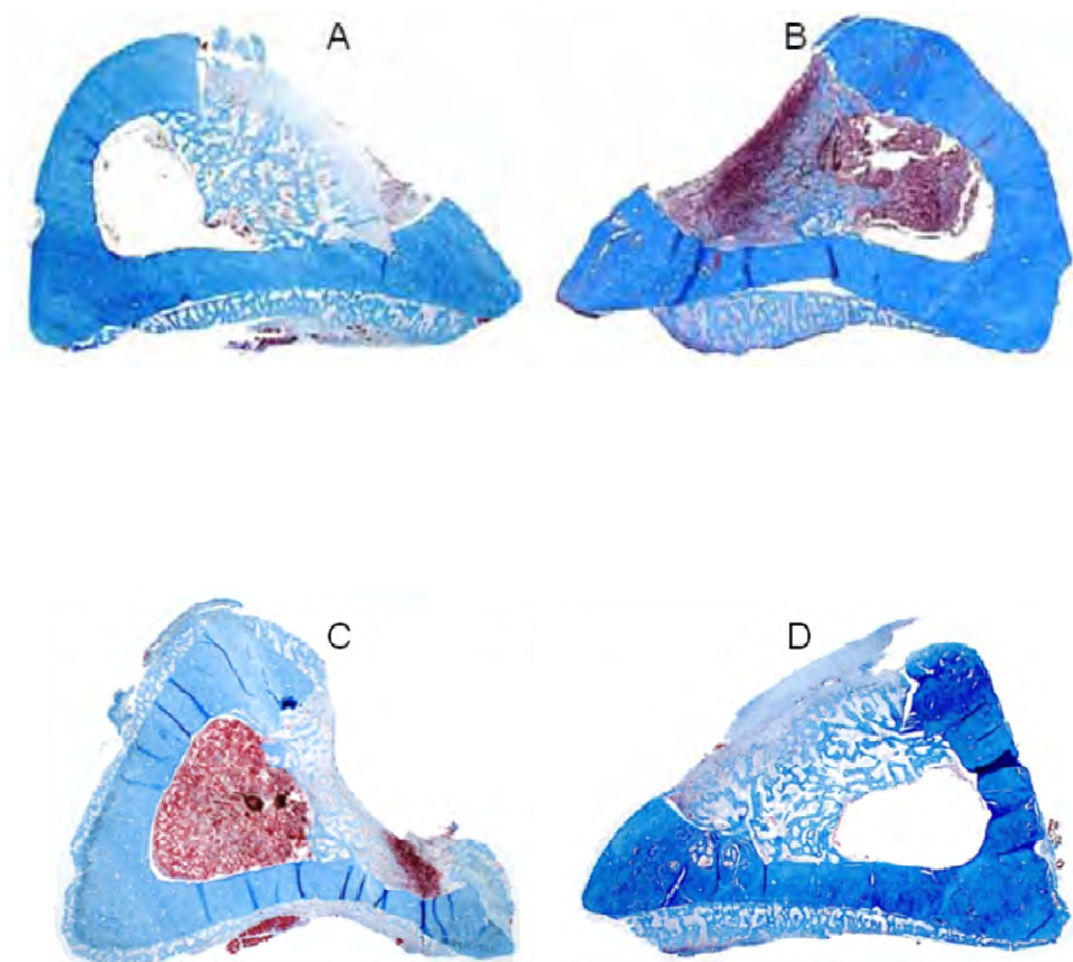


Figura 15 - Aspecto da área da lesão 6 dias após a confecção do defeito ósseo. Tricrômio de Masson 25X. a) Grupo A (ovariectomizado tratado com alendronato); b) Grupo CP (ovariectomizado tratado com *Calcareo phosphorica*); c) Grupo O (ovariectomizado tratado com placebo); d) Grupo S (*sham* tratado com placebo).

5.3.3 Período de 10 dias

O grupo A apresentou pouca variação dos 6 aos 10 dias. Houve formação maior de tecido ósseo trabecular com diminuição na quantidade de tecido conjuntivo denso fibroso na superfície. O tecido entre as trabéculas era do tipo hematopoiético e pouco celularizado. Havia osteócitos dentro das trabéculas e não foram vistos osteoclastos na região. Vários pontos de fusão do osso novo com a cortical antiga foram observados e a formação óssea do lado externo da cortical se mostrou evidente.

No grupo CP, de modo geral, o calo ósseo estava maior que no grupo A e era caracterizado por calo fibroso entremeado com tecido ósseo trabecular. A quantidade de tecido conjuntivo variou entre os animais do grupo e 2/6 dos animais ainda tinham coágulo presente. Nesta fase, as trabéculas se mostraram mais evidentes com menor número de osteoblastos delimitando-as. Foram também observados osteócitos no interior das trabéculas, porém em menor quantidade em relação ao grupo A. Houve diminuição da celularidade do tecido intertrabecular e foram observados osteoclastos na região. O calo ósseo ocupava todo o canal medular em 5/6 dos animais e em alguns animais houve grande projeção do calo externamente à superfície da tíbia. A formação óssea do lado externo, na face oposta ao defeito, continuava evidente. Houve semelhança com o grupo A em relação aos pontos de fusão do osso novo com a cortical antiga.

O grupo O apresentou o defeito coberto por tecido conjuntivo denso e osso trabecular preenchendo todo o canal medular. As trabéculas eram interligadas e mais espessas que no período anterior, com tecido intertrabecular de aspecto conjuntivo na área mais superficial e com aspecto hematopoiético na parte mais profunda. As trabéculas

apresentavam osteócitos no interior e os osteoblastos nas margens das trabéculas foram vistos em menor quantidade que no período anterior. Foram observados osteoclastos na região e a fusão do osso novo com o antigo ocorreu em pontos esparsos. A ponte óssea não se formou completamente em alguns animais. A formação de osso trabecular externamente foi observada em todos os animais, sendo que em dois animais a formação foi exuberante, superando a formação no interior da área do defeito ósseo.

O grupo S apresentou menos tecido conjuntivo que no período anterior e havia ponte de osso trabecular unindo as duas extremidades do defeito sem fusão com a cortical antiga. As trabéculas estavam mais coradas, com presença de mais osteócitos no interior e os osteoblastos e osteoclastos estavam praticamente ausentes. O tecido intertrabecular estava menos denso e com menor celularidade que no período anterior. O canal medular estava parcialmente liberado e, na superfície do defeito havia uma faixa de tecido conjuntivo denso. Externamente à cortical, no lado oposto ao defeito, havia formação de osso trabecular com trabéculas mais espessas do que no período anterior. Todos os animais apresentaram um padrão homogêneo dentro do grupo.

As imagens histológicas desta fase da reparação óssea são mostradas nas Figuras 16 e 17.

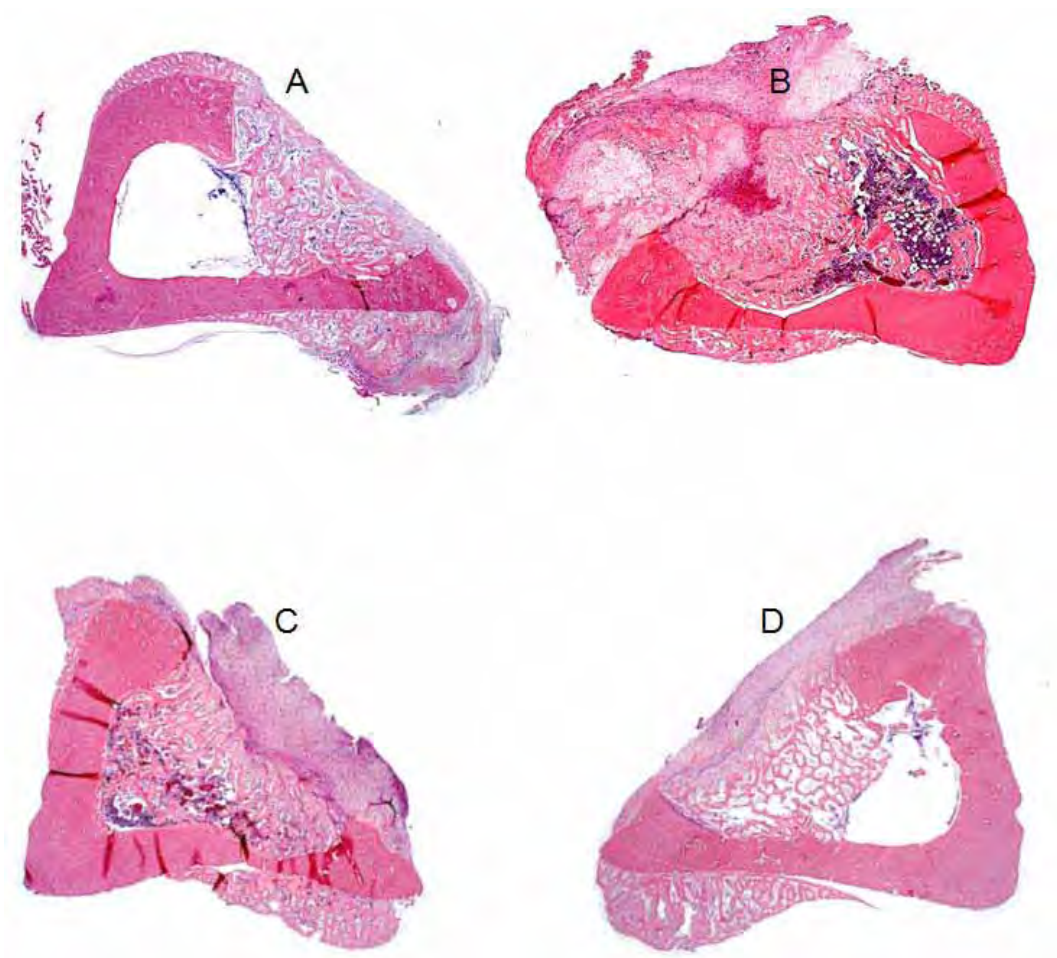


Figura 16 - Aspecto da área da lesão 10 dias após a confecção do defeito ósseo. HE 25X. a) Grupo A (ovariectomizado tratado com alendronato; b) Grupo CP (ovariectomizado tratado com *Calcareia phosphorica*); c) Grupo O (ovariectomizado tratado com placebo); d) Grupo S (*sham* tratado com placebo).

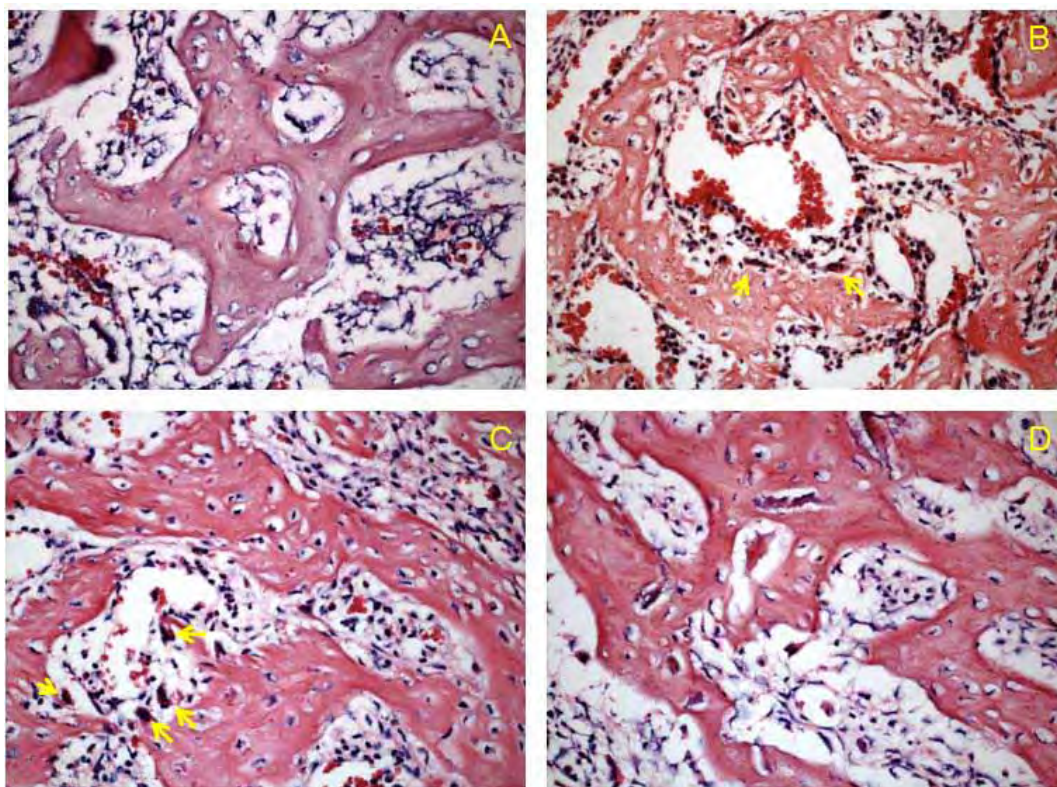


Figura 17- Aspecto da área da lesão 10 dias após a confecção do defeito ósseo. As setas indicam a presença de osteoclastos. HE 400X. a) Grupo A (ovariectomizado tratado com alendronato); b) Grupo CP (ovariectomizado tratado com *Calcareia phosphorica*); c) Grupo O (ovariectomizado tratado com placebo); d) Grupo S (*sham* tratado com placebo).

5.3.4 Período de 17 dias

O grupo A, nesta fase, apresentou uma faixa estreita de tecido conjuntivo na parte superior do calo. O canal medular estava quase todo liberado e a ponte óssea apresentou aspecto mais retilíneo e mais largo que no período anterior, superando em largura todos os outros grupos, com trabéculas espaçadas e com poucos pontos de fusão com a cortical. O tecido entre as trabéculas era mais do tipo hematopoiético. Havia presença de osteócitos, raros osteoblastos e raros osteoclastos. O osso na face externa ainda era evidente, embora em menor quantidade, com trabéculas mais largas e com sinais de remodelação.

O grupo CP aos 17 dias exibiu intensa reabsorção de osso trabecular, com liberação do canal medular. A ponte de união óssea era mais fina e delicada que a do grupo A, com uma faixa estreita de tecido conjuntivo na superfície, e fusão incompleta com a cortical, apesar de exibir vários pontos de união. Foram observados numerosos osteócitos, ausência de osteoblastos e raros osteoclastos. Ainda havia muito osso neoformado na cortical externa com presença de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos.

O grupo O apresentou reabsorção considerável das trabéculas ósseas com liberação do canal medular. A ponte óssea apresentou a menor espessura em relação aos outros grupos, com trabéculas mais largas que no período anterior. Havia vários pontos de união com as margens do defeito, sem fusão perfeita. Havia osteócitos, raros osteoclastos e ausência de osteoblastos. Na parte externa da cortical a maioria dos animais (5/6) apresentava pequena quantidade de osso trabeculado maduro com numerosos osteoclastos fazendo reabsorção. Um dos animais tinha grande quantidade de tecido cartilaginoso presente no calo.

O grupo S apresentou a ponte de união de tecido ósseo trabecular com espessura semelhante à do grupo CP, com trabéculas mais largas do que no período anterior, sem osso lamelar e sem a fusão perfeita nas extremidades do defeito. Havia osteócitos, alguns osteoblastos e raros osteoclastos. O tecido intertrabecular era principalmente do tipo hematopoiético. A remodelação com liberação do canal medular ainda era discreta e a quantidade de osso trabecular externo sofreu diminuição. Na área externa ao defeito foram vistos osteoclastos.

As imagens histológicas desta fase da reparação óssea são mostradas nas Figuras 18 e 19.

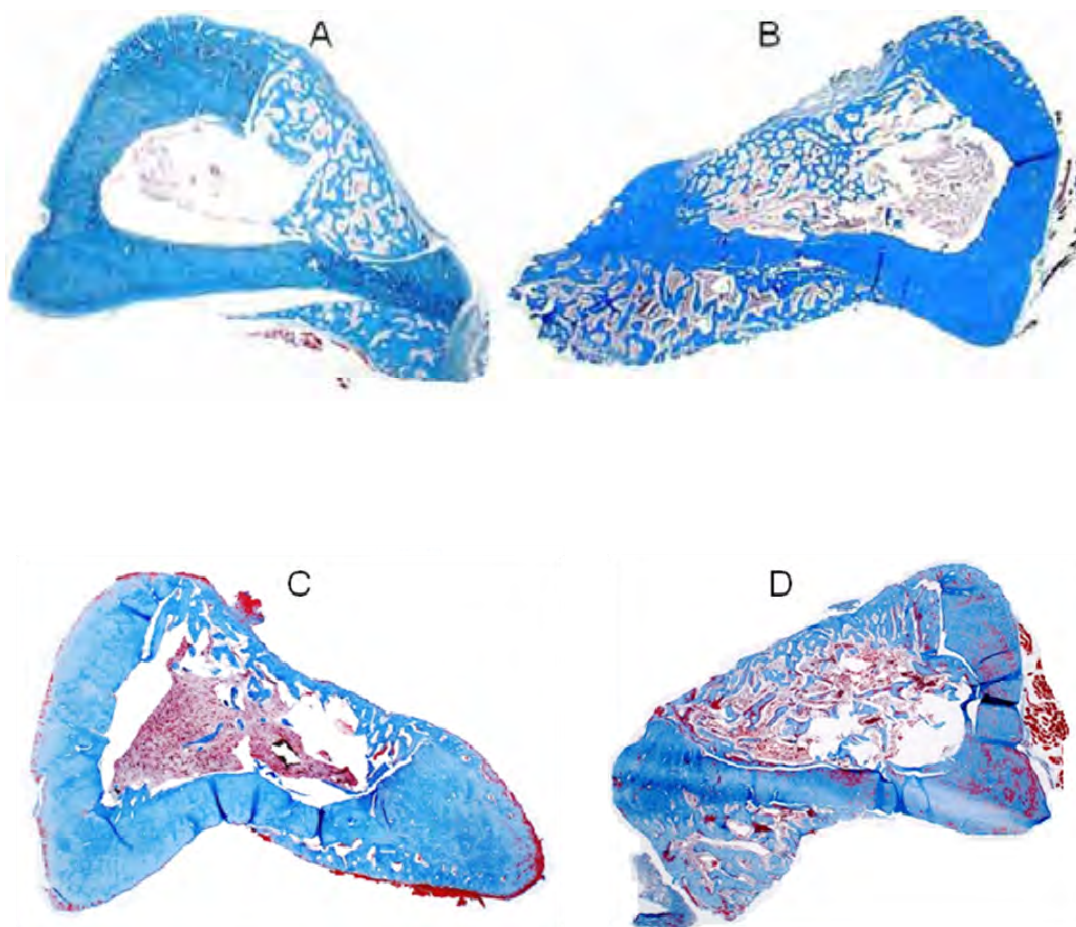


Figura 18 Aspecto da área da lesão 17 dias após a confecção do defeito ósseo. Tricrômio de Masson 25X. a) Grupo A (ovariectomizado tratado com alendronato); b) Grupo CP (ovariectomizado tratado com *Calcareia phosphorica*); c) Grupo O (ovariectomizado tratado com placebo); d) Grupo S (*sham* tratado com placebo).

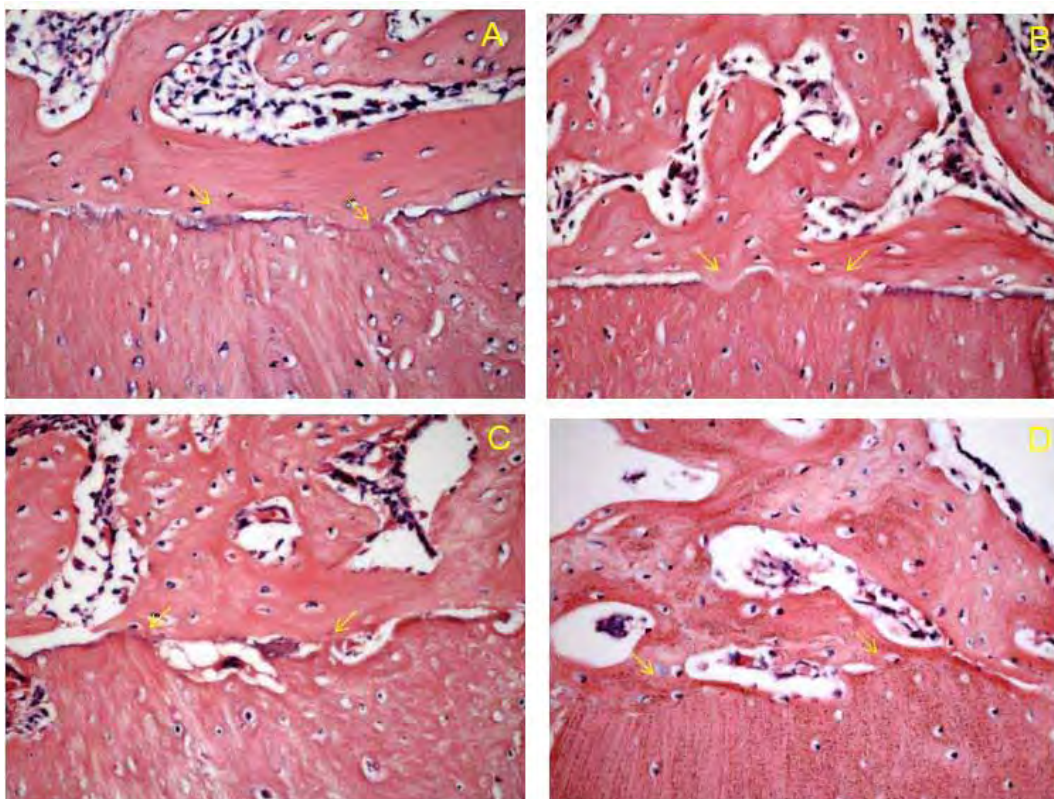


Figura 19 Aspecto da área da lesão 17 dias após a confecção do defeito ósseo. As setas indicam os pontos de fusão do osso novo com a cortical antiga. HE 400X. a) Grupo A (ovariectomizado tratado com alendronato); b) Grupo CP (ovariectomizado tratado com *Calcareia phosphorica*); c) Grupo O (ovariectomizado tratado com placebo); d) Grupo S (*sham* tratado com placebo).

5.3.5 Período de 28 dias

Aos 28 dias o grupo A mostrou presença de osso ainda de aspecto trabecular com trabéculas mais largas e com menor espaçamento entre si. Havia pequena quantidade de osso lamelar contínuo na superfície do reparo. Foram vistos muitos osteócitos, raros osteoclastos e nenhum osteoblasto. Na junção com o osso cortical a lâmina óssea era mais compacta tornando difícil distinguir o limite de união. A formação óssea externa diminuiu sensivelmente.

Neste período o grupo CP apresentou aspecto histológico semelhante ao do grupo A com trabéculas um pouco mais espaçadas e finas. A ponte formada por osso trabecular com pequenas áreas de osso lamelar estava parcialmente unida à cortical. Foram vistos muitos osteócitos e não foram vistos osteoblastos e osteoclastos. A formação óssea externa havia desaparecido.

O grupo O apresentou na região da ponte, osso trabecular, com extensa área de osso lamelar e ainda sem fusão perfeita das extremidades. A ponte tinha uma espessura de cerca de 1/3 a metade da espessura da cortical normal. Foram vistos muitos osteócitos e nenhum osteoblasto ou osteoclasto. A formação óssea externa já havia sido completamente removida.

O grupo S apresentou aspecto semelhante aos demais grupos. A ponte de união tinha aspecto trabecular, com trabéculas largas e com áreas lamelares. Havia muitos osteócitos, não foram vistos osteoblastos nem osteoclastos. Externamente à área do defeito havia pequena quantidade de osso.

As imagens histológicas desta fase da reparação óssea são mostradas na Figura 20.

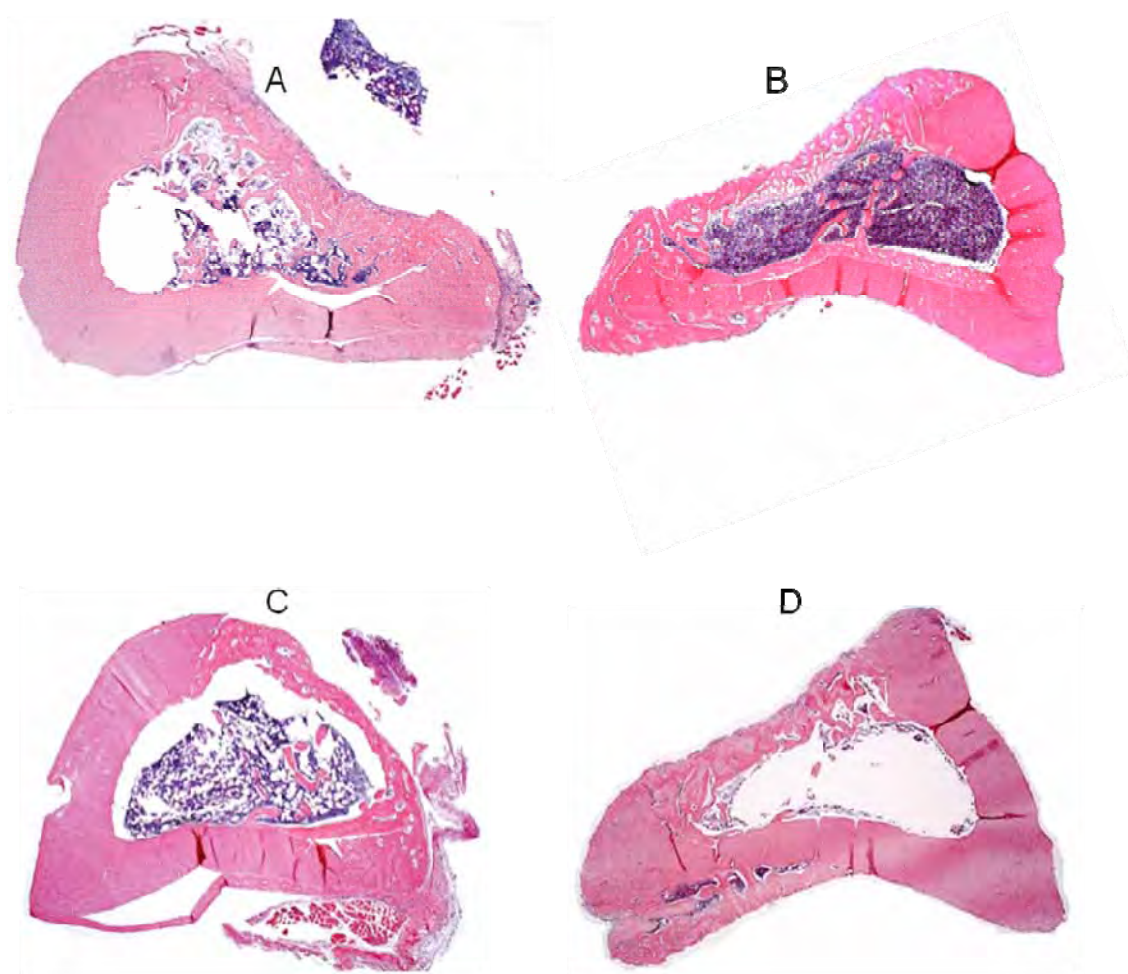


Figura 20 Aspecto da área da lesão 28 dias após a confecção do defeito ósseo. HE 25X. a) Grupo A (ovariectomizado tratado com alendronato); b) Grupo CP (ovariectomizado tratado com *Calcareia phosphorica*); c) Grupo O (ovariectomizado tratado com placebo); d) Grupo S (*sham* tratado com placebo).

6 DISCUSSÃO

Partindo da hipótese de que a *Calcarea phosphorica* atua na reparação óssea e visando possíveis novas alternativas terapêuticas para o tratamento da osteoporose e de suas consequências em humanos, neste estudo foram avaliados os efeitos deste medicamento homeopático comparando-o com o alendronato, um medicamento alopático. Foi analisada a ação de ambos na reparação de defeitos produzidos em tíbias de ratas ovariectomizadas.

O modelo animal utilizando ratas ovariectomizadas é muito comum em estudos de osteoporose pós-menopausa. O cão e os primatas também podem ser empregados, porém são modelos caros e mais difíceis de serem mantidos. Desta forma, o rato continua sendo o modelo mais utilizado quando se estuda perda óssea por deficiência hormonal ovariana. São baratos, fáceis de manter em cativeiro e sua vida mais curta facilita o estudo da idade óssea. Embora as ratas ovariectomizadas manifestem perda óssea, não apresentam fraturas espontâneas relacionadas a essa perda, sendo as alterações ósseas induzidas consideradas mais como uma osteopenia do que uma osteoporose. Apesar desta diferença, as várias semelhanças existentes na fase de osteoporose pós-menopausa entre animais e humanos qualificam os ratos para o estudo da osteoporose pós-menopausa (Kalu et al., 1989; Kalu, 1991; Castro, 2000; Turner, 2001; Teófilo et al., 2003).

Neste estudo, a ovariectomia foi realizada aos três meses de idade, pois nessa fase o crescimento ósseo já está bastante diminuído e os ratos são considerados sexualmente maduros, além de responderem adequadamente à deficiência de hormônios sexuais (Kalu, 1991).

Após a ovariectomia foi aguardado um período de 60 dias para que houvesse uma significativa perda óssea, pois segundo Wronski et al. (1988), Kalu (1991), Castro (2000) e Perilli (2009), a perda óssea inicial é maior no primeiro mês, continuando porém, num ritmo mais lento durante um período de 3 a 4 meses após a ovariectomia.

Sessenta dias após a ovariectomia foram feitos os defeitos ósseos nas tíbias objetivando o estudo da ação medicamentosa na reparação dos defeitos. Este procedimento é importante, pois como dito anteriormente, as ratas com deficiência hormonal não apresentam fraturas espontâneas como ocorre na osteoporose em humanos. Assim, o defeito ósseo criou um ambiente que permitiu o estudo da ação dos medicamentos na reparação.

A face mesial da tíbia, na altura do terço médio, foi o local escolhido para a realização do defeito ósseo por permitir um fácil acesso cirúrgico, tornando o procedimento rápido e com um bom pós-operatório (Senra, 2006). O defeito monocortical permitiu uma estabilidade óssea natural durante as fases de reparação do defeito, dificultando a formação de fibrose e cartilagem em torno do calo ósseo, o que proporcionou uma maior padronização do processo de reparação óssea.

Os tempos escolhidos para os sacrifícios dos animais foram 3, 6, 10, 17 e 28 dias, períodos de tempo que permitiram acompanhar todas as etapas da evolução da reparação óssea.

Os métodos para a avaliação das diferentes etapas da reparação óssea utilizados neste estudo foram: a análise da densidade óptica; a análise histomorfométrica e a análise histológica descritiva. Estes métodos, em conjunto, foram capazes de identificar as alterações ósseas após a ovariectomia, a neoformação de tecido reparador nas áreas dos defeitos ósseos e a quantidade de tecido ósseo presente na área de neoformação tecidual.

Em relação a diagnósticos baseados em análises de imagens radiográficas, estudos demonstraram que radiografias convencionais são limitadas no diagnóstico precoce da osteoporose, visto que as manifestações radiológicas aparecem quando já houve perda de pelo menos 30% do cálcio esquelético (Gali, 2001; Robson et al., 2006).

Apesar disso, a radiologia convencional pode informar a respeito da osteoporose de forma qualitativa, por meio de sinais radiológicos, ou de forma quantitativa por meio de índices. Em humanos, tanto os métodos qualitativos como os quantitativos podem ser utilizados para a avaliação radiológica da densidade mineral óssea. Estes métodos são úteis na avaliação de mulheres na fase de pós-menopausa, contribuindo para o diagnóstico e seguimento das pacientes em tratamento (Matos et al., 2000).

Nossa avaliação utilizou imagens radiográficas bidimensionais digitais, obtidas pelo método direto e posteriormente essas imagens foram submetidas à análise de densidade óptica. A qualidade dos sistemas digitais, em geral, é considerada equivalente à dos filmes convencionais, contudo com algumas vantagens como permitir *backup*, transmissão das imagens à distância, eliminar erros de processamento e diminuir o tempo de exposição à radiação, o que torna o sistema digital superior aos filmes convencionais (Oliveira et al., 2003; Alkurt et al., 2007; Farman et al., 2008).

Foi utilizado o método de avaliação da densidade óptica por ser um método bem consolidado. A densidade óptica é fornecida em valores numéricos, obedecendo a uma escala de 256 níveis diferentes de cinza, que variam do preto (0) ao branco (255). O olho humano é capaz de identificar aproximadamente 32 tons diferentes, o que evidencia o grau de sensibilidade da leitura por computador (Senra, 2006). Alguns trabalhos têm demonstrado boa sensibilidade deste método como os de

Moraes et al., (2005), Ágreda (2007), Prado (2008) e Mahl et al. (2009), além de ser um método relativamente barato e de simples aplicação.

No presente estudo, a avaliação da densidade óptica mostrou ser um exame com sensibilidade suficiente para acusar as alterações de densidade radiográfica nos diversos períodos de análise.

Quando foram comparados os dois grupos de ratas tratadas com placebo, grupos O e S, ficou evidente a diferença de densidade entre estes grupos nos períodos de 6, 17 e 28 dias, com valores de densidade óptica maiores para o grupo S. Também foi possível observar o aumento de valores de densidade para o grupo S com o passar do tempo, o que era esperado, pois o grau de mineralização óssea tende a aumentar à medida que o tecido de reparação na área do defeito vai amadurecendo. No grupo O, o aumento dos valores de densidade se deu no período de 6 a 10 dias e permaneceu constante até os 28 dias, provavelmente devido à deficiência estrogênica que pode ter interferido na capacidade de mineralização.

Na comparação dos grupos de animais ovariectomizados submetidos a diferentes tratamentos - grupos A, CP e O - o grupo A foi o que apresentou os maiores valores de densidade óptica aos 10 e 28 dias.

Destacou-se o comportamento do grupo CP que apresentou o maior valor de densidade óptica aos 17 dias, sendo, contudo, estatisticamente igual a A17 e O17. Houve diminuição do valor aos 28 dias, devido, provavelmente, à uma perda do grau de mineralização neste grupo.

O grupo O teve aumento evidente dos valores de densidade óptica de 6 para 10 dias e manteve esses valores até o final do experimento, terminando com um valor muito próximo ao do grupo CP.

Por esta análise se concluiu que o grupo A, ao final do experimento, foi o que apresentou o maior grau de densidade óptica com diferença estatística em relação à CP e O.

Quando se estudam doenças metabólicas ósseas, em particular as que afetam o osso trabecular, a histomorfometria é uma das técnicas usadas. A histomorfometria é um método que permite a avaliação das alterações de remodelação óssea, sendo capaz de avaliar de forma direta e precisa os mecanismos teciduais envolvidos na fisiopatologia da osteoporose e de outras doenças osteometabólicas. A histomorfometria analisa de maneira quantitativa os componentes da morfologia óssea como volume, área, perímetro, entre outros. A técnica consiste na contagem ou mensuração dos componentes celulares e das mudanças na microarquitetura óssea (Borelli, 2005; Mahl et al., 2009).

Para este estudo, a técnica utilizada para a análise histomorfométrica seguiu a metodologia utilizada por Senra (2006). Metodologia semelhante usou Leucht et al. (2008), na qual as imagens digitais foram analisadas com o programa *Adobe photoshop*. Os *pixels* foram selecionados usando a ferramenta *Magic wand* com tolerância de 60. O número total de *pixels* individuais foi medido para cada amostra nos diferentes grupos de tratamento e os valores para cada grupo foram calculados baseados nessas médias.

Segundo Parfitt et al., (1987) para a medição de superfícies e volumes é preferível usar valores em porcentagem. Assim, as médias dos valores numéricos obtidos em *pixels*² dentro de cada grupo foram usadas para os cálculos de porcentagem de formação de tecido de reparação do defeito, bem como da área ocupada por matriz óssea dentro do defeito.

Para a análise histomorfométrica foram excluídos os grupos de animais sacrificados com 3 dias de tratamento, pois nesta fase inicial, pela técnica utilizada, não foi possível a mensuração e identificação de tecido ósseo neoformado na área do defeito. Por este motivo, para todos os grupos, esta análise se iniciou a partir dos 6 dias de tratamento.

A análise histomorfométrica dos grupos de animais tratados com placebo, grupos O e S, que comparou os valores médios de área de preenchimento ósseo na área do defeito, mostrou que de um modo geral, o grupo S obteve os maiores valores de área de preenchimento do defeito ósseo durante todos os períodos de observação, com exceção do período de 10 dias. Para este grupo os valores foram crescentes do período de 6 a 17 dias, sofrendo um decréscimo dos 17 aos 28 dias, devido à remodelação, com uma redução de área de preenchimento de cerca de 19%.

O grupo O mostrou um aumento substancial da área de preenchimento entre o período de 6 a 10 dias, sofrendo uma queda brusca aos 17 dias de cerca de 40%. Após esta queda, manteve-se estável, praticamente sem alteração dos valores aos 28 dias.

Comparando os dois grupos, se concluiu que houve um aumento da formação de tecido de reparação antecipada no grupo O e que este aumento não foi capaz de resistir à remodelação que ocorreu em seguida. O grupo S, talvez pelo fato de ter a ação do estrógeno atuando em níveis normais, mostrou uma resposta tecidual mais harmônica, exibindo um máximo de área preenchida numa fase mais tardia em relação ao grupo O.

Estes resultados reforçam o conceito de que o estrógeno é um potente inibidor de *turnover* ósseo e que age protegendo os ossos pela indução de um sinal parácrino originado nos osteoblastos que induz apoptose de pré osteoclastos (Wronski 1988; Westerlind et al., 1993; Krum et al., 2008).

A análise dos valores médios de área de preenchimento do defeito ósseo dos três grupos de animais ovariectomizados, grupos A, CP e O, permitiu concluir que o grupo A apresentou aumento progressivo dos valores até os 28 dias. Aos 6 dias, este grupo apresentou valores maiores do que os dos outros grupos, com diferença estatística

significante. Este valor sofreu ligeiro aumento até os 17 dias e um maior aumento aos 28 dias, superando os outros grupos, com diferença estatística significativa em relação ao grupo O.

O grupo CP sofreu um grande aumento de área de preenchimento dos 6 aos 10 dias, quando atingiu o maior valor entre todos os grupos durante todo o experimento. A partir daí sofreu uma queda gradual até os 28 dias, quando atingiu um valor estatisticamente igual ao do grupo A, apesar de numericamente inferior.

O grupo O mostrou comportamento semelhante ao grupo CP, atingindo sua maior área de preenchimento aos 10 dias a qual diminuiu significativamente aos 17 dias, mantendo o valor estável até os 28 dias. Enquanto em CP a diminuição foi gradual, em O ela foi mais brusca. Apesar desta semelhança parcial o grupo CP apresentou sempre valores numericamente superiores aos do grupo O.

É interessante observar que no período de 10 dias os grupos CP e O superaram numericamente o grupo A, apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa. No período de 10 a 17 dias o grupo CP sofreu uma diminuição de área de preenchimento em torno de 23% e dos 17 aos 28 dias houve diminuição de mais 12%. O grupo O apresentou uma redução de área de preenchimento em torno de 40,5% dos 10 aos 17 dias e de aproximadamente 1,5% dos 17 aos 28 dias.

Esta evolução do reparo ósseo com formação de grande área de preenchimento seguida de diminuição acentuada observada em CP e O mostrou que apesar dos valores serem semelhantes, o tratamento com CP foi melhor que o tratamento com placebo em O, tanto em relação ao estímulo de formação tecidual quanto ao efeito inibidor sobre a remodelação deste tecido formado.

Analisando os dados do comportamento dos grupos A, CP e O, se concluiu que o alendronato dificultou a remodelação do tecido

neoformado e estimulou a proliferação tecidual na área do defeito, uma vez que a área de preenchimento sofreu aumento progressivo até o final do experimento. Estes achados confirmam os de Volpon et al. (2008) que também observaram aumento dos parâmetros histomorfométricos em animais osteopênicos após tratamento com alendronato.

Assim, foi possível afirmar que segundo a avaliação do valor de área de preenchimento no local de reparo, o tratamento com alendronato foi a melhor opção. Contudo, o tratamento com *Calcareia phosphorica* foi melhor que a ausência de tratamento.

Quando analisado o percentual de osso neoformado no interior da área de preenchimento, os grupos de animais tratados com placebo, O e S, apresentaram comportamentos distintos com diferença mais evidente entre eles aos 17 e 28 dias, sendo o grupo O aquele que formou a maior porcentagem de osso. No período de 6 a 28 dias o grupo O apresentou um aumento do percentual de osso neoformado em torno de 49%, enquanto o grupo S apresentou, neste mesmo período, um aumento de 28%.

Estes resultados analisados em conjunto com os resultados de densidade óptica e de área de preenchimento do defeito, mostraram que de modo geral, o grupo O em relação ao grupo S, apresentou menores valores de densidade óptica e menor área de preenchimento tecidual na região do reparo, apresentando, porém, maior proporção de osso neoformado na área de preenchimento. É interessante observar que apesar de haver maior porcentagem de osso neoformado no grupo O, os valores de densidade óptica são inferiores aos do grupo S.

Alguns fatores podem ter influenciado este resultado: a) a leitura de densidade óptica pode ter sido influenciada pela maior quantidade de tecido ósseo neoformado observada na superfície externa da cortical, do lado oposto à área do defeito, nas tíbias do grupo S; b) a massa óssea dos animais com deficiência de estrógeno é menor e as

trabéculas presentes na área de preenchimento são menos espessas devido ao *turnover* ósseo aumentado nestes animais (Kimble et al., 1995; Lorenzo et al., 1998; Perilli et al., 2009); c) um menor grau de mineralização do tecido formado no grupo O pode ter interferido na densidade óptica (Borelli, 2005; Werkman, 2005, Senra, 2006); d) uma menor espessura do calo ósseo frequentemente observada no grupo O.

Quando analisado o percentual de osso neoformado na área de preenchimento nos três grupos de animais ovariectomizados A, CP e O, foram observados os maiores valores aos 28 dias, com resultados muito próximos entre si e estatisticamente iguais. No entanto, os comportamentos dos 3 grupos até atingirem estes valores foram diferentes entre si. Dos 6 aos 28 dias, o grupo A apresentou um aumento percentual de osso neoformado em torno de 16%, enquanto o grupo O, neste mesmo período, apresentou um aumento de 49% e o grupo CP de 132%, refletindo a influência da quantidade percentual de osso observada aos 6 dias. A porcentagem de osso neoformado no grupo CP ficou abaixo dos valores dos grupos A e O no período de 6 a 17 dias, sem diferença estatística significativa, e sofreu um grande aumento de 17 aos 28 dias.

Para os grupos A, CP e O os resultados de neoformação óssea analisados em conjunto com os resultados de densidade óptica e de área de preenchimento, mostraram que nem sempre os maiores valores de densidade óptica corresponderam às maiores áreas de preenchimento do defeito ósseo ou de formação percentual de osso dentro do defeito. Muitas vezes se observou formação de tecido mineralizado em áreas externas à região do defeito ósseo, o que pode ter interferido na leitura da densidade óptica. Esta neoformação óssea externa foi atribuída a uma reação periosteal manifestada, muitas vezes, na face da tíbia oposta à face do defeito ósseo. Dos grupos de animais ovariectomizados, de um modo geral o grupo A foi o que apresentou a maior quantidade desta reação, seguido pelos grupos CP e O. Por outro

lado, comparando os quatro grupos, A, CP, O e S, o grupo S foi o que apresentou a maior reação periosteal.

Segundo Ahlborg et al. (2003) a formação óssea periosteal pode ser um mecanismo compensatório para manter a resistência em situações onde a perda óssea ocorre nas superfícies trabecular e endocortical.

Destas observações, se concluiu que os animais do grupo O tiveram uma resposta de formação óssea periosteal mais pobre do que os animais dos grupos A, CP e S, provavelmente por deficiência hormonal. De modo contrário, os animais do grupo S tratados com placebo, tiveram em seu favor a ação dos hormônios ajudando na formação óssea periosteal. Também se pode afirmar que tanto o alendronato quanto a *Calcareo phosphorica* estimularam as células periosteais a produzir osso novo.

Estudando os efeitos do estrógeno e do alendronato no reparo de fraturas, Kolios et al. (2010) avaliaram comparativamente os efeitos profiláticos do estrógeno e do alendronato no reparo de fraturas em tíbias de ratas ovariectomizadas e *sham*. Verificaram que o estrógeno administrado durante a alimentação dos animais melhorou a resistência às microfraturas em relação ao alendronato que mostrou resultados inferiores nos testes mecânicos. Concluíram que a cura foi qualitativamente e quantitativamente melhorada pelo uso profilático de estrógeno, sendo o processo de cura mais semelhante ao fisiológico.

Aos 28 dias, os três grupos de animais ovariectomizados apresentaram aspecto muito semelhante na área da reparação óssea. Foi observada lâmina óssea neoformada de aspecto lamelar com osso trabecular entremeado, sendo que o grupo A foi o que apresentou aspecto mais compacto na área da ponte óssea, o que foi confirmado por valores mais altos na análise de densidade óptica, com diferença estatística em relação aos grupos CP e O.

Este resultado talvez seja explicado pelos achados de Roschger et al. (2001) e de Recker et al. (2005) que verificaram que o tratamento prolongado com alendronato em humanos proporcionou uma distribuição mineral mais uniforme no interior do osso trabeculado, com aumento da densidade mineral da matriz óssea trabecular. Além disso, foi observado aumento de volume ósseo devido ao espessamento das trabéculas e diminuição da porosidade cortical, possivelmente pela redução da atividade de remodelação.

Komatsubara et al. (2004) estudaram os efeitos da supressão da remodelação óssea a longo prazo sobre a densitometria, sobre o acúmulo de microdanos e sobre propriedades mecânicas no osso cortical de costelas de cães e verificaram que a supressão de remodelação intra cortical foi também associada com aumento nos microdanos acumulados. Uma severa supressão do *turnover* poderia prolongar a duração da mineralização secundária e aumentar o grau de mineralização na cortical óssea. Concluíram que de modo geral a supressão da remodelação intracortical aumenta o acúmulo de micro danos, apesar de aumentar a resistência à flexão, provavelmente devido a um aumento no grau de mineralização.

Em relação à qualidade óssea Byrjalsen et al. (2008) afirmaram que embora as diferentes terapias anti reabsorção tenham se tornado mais efetivas em termos de aumento da densidade mineral óssea, melhorias em termos de eficácia anti-fratura não têm correspondido. Citam como exemplo o crescimento médio na densidade mineral óssea da coluna após tratamento com o alendronato que é sete vezes mais alto quando comparado ao da calcitonina, apesar das reduções no risco de fraturas vertebrais serem respectivamente 44% e 36%. Muitas evidências sugerem que o ganho de densidade mineral explica somente até certo ponto a redução nas fraturas e concluem que

diferentes terapias anti-reabsorção induzem diferenças no perfil de maturação do colágeno ósseo.

A dose de alendronato usada neste estudo foi de 3,75 mg/kg, por gavagem, três vezes por semana. Esta dose, neste intervalo de tempo, foi calculada através do método de extrapolação alométrica com o auxílio de um programa computacional de equivalência de dosagens medicamentosas de uso veterinário e corresponde à dosagem indicada para seres humanos adultos que tomam doses semanais de 70mg (Pachaly, 2000). A dosagem que utilizamos está dentro dos padrões utilizados nos estudos de Guy et al. (1993), que considera baixa a dose de 1 mg/Kg/dia e alta a dose de 3,75 mg/Kg/dia.

Neste estudo, a *Calcareo phosphorica* 6CH foi administrada para cada grupo de seis animais após a diluição de dois glóbulos em 6 ml de água destilada, sendo que cada animal recebeu 1 ml do medicamento em cada administração. Foi escolhida a potencia 6CH, pois de acordo com Kossak-Romanach (1984) as baixas dinamizações possuem maiores efeitos teciduais locais sendo por isso, em caso de lesões teciduais localizadas ou em doenças agudas, indicadas dinamizações baixas em torno de 6CH, enquanto que para doenças sistêmicas crônicas convêm dinamizações médias e altas, 12CH, 30CH ou excepcionalmente 200CH.

Segundo Eizayaga (1972), em homeopatia, não se deve falar em doses medicamentosas no sentido de massa, mas sim de potências e repetições de tomadas. Quando se prescreve um medicamento, não interessa a quantidade de glóbulos nem de gotas nem de bebida que ingere, mas sim sua potência e frequência de ingestão.

Nos últimos anos tem havido um aumento no número de estudos pré-clínicos, *in vitro* e em animais, objetivando avaliar a atividade farmacológica ou eficácia de medicamentos homeopáticos em condições de reproduzir os testes (Conforti et al., 2007).

Em uma pesquisa que avaliou aproximadamente 1300 experimentos em homeopatia, constatou-se que o rato foi o organismo mais estudado. A base de dados sugere que experimentos com animais saudáveis é a categoria mais promissora. Normalmente as doenças são induzidas nos animais, particularmente intoxicação, edema/inflamação, distúrbios comportamentais e hormonais (van Wijk et al., 2009).

Para o tratamento de fraturas em humanos não há dados em relação à prevalência do uso da homeopatia. Com a população idosa em crescimento, o número de fraturas também aumenta e esta população precisa ser mais bem orientada com relação à medicina alternativa. Ainda não está claro na literatura quais medicamentos alternativos afetam a reparação óssea e em que grau. Um estudo realizado por Sprague et al. (2007) mostrou que 1/3 dos pacientes com fraturas clínicas estavam usando algum tratamento alternativo, incluindo a homeopatia, e destes pacientes, mais de 50% não haviam informado seus médicos a respeito do uso de tais medicamentos, por considerarem os mesmos inofensivos.

Teixeira (2007a) afirma que comparar a homeopatia com tratamentos naturais, erroneamente isentados de efeitos adversos ou colaterais pela crença popular, induz à falsa conclusão de que a homeopatia se não fizer bem, mal não faz. Descrita em todas as épocas pela maioria dos clássicos homeopatas, a aplicação insensata de medicamentos, doses e potências homeopáticas pode causar agravações, patogenesias, supressões e outras manifestações indesejáveis, contrapondo a inverossimilhança da inocuidade do tratamento homeopático.

A falta de conhecimento de um mecanismo de ação para as substâncias é o calcanhar de Aquiles da pesquisa clínica homeopática. Resultados de experimentos que não mostraram efeitos benéficos com homeopatia tem levado muitos especialistas a concluir que a homeopatia não passa de curandeirismo. Estudos clínicos mostrando resultados

positivos ainda são vistos com reservas, devido à falta de elucidação sobre o mecanismo de ação (Johnson, Boon, 2007).

Recentemente, importantes descobertas têm tentado esclarecer o mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos. Foi comprovado que a água, após os procedimentos de preparo preconizados pela medicina homeopática tais como diluições de solutos, seguida por succussão, torna-se diferente da água inicial. Testes feitos com calorimetria de fluxo, conductometria, pHmetria e potencial eletrodo de célula galvânica mostraram os indícios desta diferença (Elia et al., 2007).

Botha e Ross (2008) através de exame de espectroscopia de ressonância magnética mostraram que o processo de trituração causa alterações físicas da substância medicamentosa. Quanto maior o nível de trituração, mais pronunciada a diferença na estrutura física dos respectivos ingredientes ativos. O estudo concluiu que a potência 4CH apresenta características físico-químicas distintas da potência 3CH que a originou.

Figueiredo (2009) avaliou as propriedades físico-químicas da água em preparados homeopáticos analisando alterações no pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, temperatura e turbidez da água tratada. Os valores foram comparados com os resultados obtidos com água destilada. Foi concluído que os preparados homeopáticos alteram as propriedades físico-químicas da água.

No Brasil a pesquisa científica em homeopatia tende a crescer. Salles (2008) afirma que ainda que reduzida, a pesquisa em nosso país é bastante significativa demonstrando os resultados do trabalho conjunto entre homeopatas e outros pesquisadores da saúde. Acrescenta que diante do incremento da demanda social por essa forma de cuidado em saúde e das disposições da Portaria 971 publicada pelo Ministério da Saúde recomendando a implementação da assistência

homeopática no âmbito do SUS, seja necessário criar núcleos de ensino e informação sobre a homeopatia nas instituições de ensino brasileiras.

A proposta deste estudo foi comparar a ação de um medicamento homeopático versus um medicamento alopático administrados por um período máximo de 28 dias na reparação de defeitos produzidos em tíbias de ratas ovariectomizadas. Após a análise da evolução do reparo através das três medidas propostas para este estudo - densidade óptica, porcentagem de área de preenchimento do defeito e porcentagem de osso formado na área de preenchimento - se concluiu que de forma global, ao final do experimento (28 dias), os animais tratados com os dois medicamentos e com placebo apresentaram resultados com pequena diferença estatística entre si. Esta diferença se manifestou em favor do alendronato, que foi a melhor opção de tratamento seguido pela *Calcarea phosphorica* e esta foi melhor que a ausência de tratamento.

Ao longo do período experimental foram observadas diferenças no comportamento dos diversos tratamentos. O alendronato mostrou aumento progressivo de densidade óptica e do volume de área de preenchimento ao longo do experimento enquanto a porcentagem de osso formado na área de preenchimento foi elevada no início, sofreu pequena queda aos 10 dias e aumentou progressivamente até os 28 dias. Tal comportamento é compatível com os dados da literatura demonstrando que o alendronato age sobre osteoclastos inibindo e modulando a reabsorção óssea. Além disso, sugere que atua estimulando a formação do tecido de reparo no calo com neoformação óssea desde as fases iniciais.

A ação da *Calcarea phosphorica* produziu aumento progressivo de densidade óptica até os 17 dias com ligeira queda aos 28 dias. Em relação ao preenchimento do defeito mostrou grande volume aos 10 dias, superando o alendronato, com diminuição progressiva até os

28 dias. Em relação ao percentual de osso formado na área de preenchimento, mostrou valores pequenos no início, com aumento progressivo a partir de 17 dias. Tais dados mostram que houve grande estímulo formador de tecido de reparo, incluindo tecido mole em grande quantidade, que não resistiu à remodelação. Além disso, a formação percentual de osso no grupo *Calcareea phosphorica* foi mais tardia que no grupo alendronato, sugerindo que as células alvo e o mecanismo de ação da *Calcareea phosphorica* devem ser diferentes do alendronato.

Para melhor compreensão do mecanismo de ação da *Calcareea phosphorica* são necessários mais estudos analisando a população de células que compõem o tecido de reparo e sua variação ao longo do processo, através de marcação imuno-histoquímica e microscopia eletrônica. Avaliações da mineralização através de quantificação iônica ou de microtomografia computadorizada também podem agregar dados.

7 CONCLUSÃO

Segundo as condições experimentais deste estudo e a partir dos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- a) o grupo tratado com alendronato foi o que apresentou os maiores valores de densidade óptica aos 28 dias, com diferença estatística em relação aos demais grupos, sugerindo um maior grau de mineralização;
- b) comparada ao alendronato, a *Calcareia phosphorica* estimulou maior preenchimento tecidual na região do calo ósseo aos 10 dias, com predomínio de tecido não mineralizado. O tecido de preenchimento do grupo tratado com alendronato resistiu à remodelação, ao passo que no grupo tratado com *Calcareia phosphorica* houve grande remodelação, o que sugere diferentes mecanismos de ação entre os medicamentos;
- c) a quantidade de neoformação óssea no calo variou entre os diferentes tratamentos, sendo que nas fases iniciais houve maior formação no grupo tratado com alendronato em comparação ao tratado com *Calcareia phosphorica*. Ao final do experimento a neoformação foi estatisticamente igual entre os dois grupos;
- d) o tratamento com alendronato foi a melhor opção para tratar lesões ósseas e o tratamento com *Calcareia phosphorica* foi melhor que a ausência de tratamento.

8 REFERÊNCIAS*

Ágreda CG. Análise comparativa por meio da densidade óptica radiográfica entre o grau de osteopenia induzida pela fenitoína e ausência hormonal em ratos [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2007.

Ahlborg HG, Johnell O, Turner CH, Rannevik G, Karlsson MK. Bone loss and bone size after menopause. *N Engl J Med*. 2003 Jul.;349(4):327-34.

Alkurt MT, Peker I, Bala O, Altunkaynak B. In vitro comparison of four different dental X-ray films and direct digital radiography for proximal caries detection. *Oper Dent*. 2007;32(5):504-9.

Allori AC, Sailon AM, Warren SM. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair – Part I: bioquímica signaling molecules. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008 Sep.;14(3):259-73.

Allori AC, Sailon AM, Warren SM. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair – Part II: extracellular matrix. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008 Sep.;14(3):275-83.

Almeida DJ, Arisawa EAL, Balducci I, da Rocha RF, Carvalho YR. Homeopathic treatment for bone regeneration: experimental study. *Homeopathy*. 2009 Apr.;98(2):98-6.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Arisan V, Özdemir T, Anil A, Jansen JA, Özer K. Injectable calcium phosphate cement as a bone-graft material around peri-implant dehiscence defects: a dog study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008 Nov-Dec.; 23(6):1053-62.

Astacio GSM, Marchiori E, Gaspareto EL, Azevedo F. Vertebroplastia percutânea nas fraturas vertebrais por osteoporose. *Arq Neuropsiquiatr*. 2007; 65(2-B):482-7.

Astrand J, Aspenberg P. Reduction of instability-induced bone resorption using bisphosphonates. *Acta Orthop Scand*. 2002;73(1):24-30.

Balducci-Rosindo E, Silvério KG, Malagoli DM. Processo de reparo em feridas de extração dentária em camundongos tratados com o complexo *Symphytum officinale* e *Calendula officinallis*. *Rev Odontol Univ São Paulo*. 1999;13(2):181-87.

Bandeira F, Macedo G, Caldas G, Griz L, Faria M. Osteoporose. Rio de Janeiro: Medsi; 2000. 390p.

Berne RM, Levy MN, Koeppen BM, Stanton BA. Regulação endócrina do metabolismo do cálcio e do fosfato. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. p.846-47.

Black DM, Thompson DE, Bauer DC, Ensrud K, Musliner T, Hochberg MC, et al. Fracture risk reduction with alendronate in women with osteoporosis: the fracture intervention trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(11):4118-24.

Boonen S, Haentjens P, Vandenput L, Vanderschueren D. Preventing osteoporotic fractures with antiresorptive therapy: implications of microarchitectural changes. *J Intern Med*. 2004; 255:1-12.

Borelli A. Envelhecimento Ósseo: Osteoporose. In: Filho ETC, Netto MP. *Geriatrics: fundamentos, clínica e terapêutica*. São Paulo: Atheneu; 2005. Cap. 50, p.553-62.

Botha I, Ross AHA. A nuclear magnetic resonance spectroscopy comparison of 3C trituration derived and 4C trituration derived remedies. *Homeopathy*. 2008 Oct.;97(4):196-201.

Boyd HW. *Introdução à medicina homeopática*. São Paulo: Santos;1993. 285p.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May;423:337-42.

Byrjalsen I, Leeming DJ, Qvist P, Christiansen C, Karsdal MA. Bone turnover and bone collagen maturation in osteoporosis: effects of antiresorptive therapies. *Osteoporos Int*. 2008 Mar.;19(3):339-48.

Carvalho AB, Reis LM, Jorgetti V. Biópsia e histomorfometria óssea. In: Szejnfeld VL. *Osteoporose diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Sarvier; 2000. p. 259-74.

Carvalho PSP, Ponzoni D. Biologia da osseointegração. In: Gomes LA. *Implantes osseointegrados*. São Paulo: Livraria Santos Editora; 2002. Cap. 1, p.1-9.

Castro CHM. Modelos animais em osteoporose. In: Szejnfeld VL. *Osteoporose diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Sarvier; 2000. p.46-53.

Castro LF, Silva ATA, Chung MC, Ferreira AG, Ferreira EI. Bisfosfonatos (Bfs) como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. *Quim Nova*. 2004;27(3):456-60.

Cauley JA, Thompson DE, Ensrud KC, Scott JC, Black D. Risk of mortality following clinical fractures. *Osteoporos Int*. 2000;11:556-61.

Coghlan A. Is this the trick that proves homeopathy isn't hokum?. *New Sci*. 2001 Nov.;172:4-6.

Conforti A, Bellavite P, Bertani S, Chiarotti F, Menniti-Ippolito F, Raschetti R. Rat models of acute inflammation: a randomized controlled study on the effects of homeopathic remedies. *BMC Complement Altern Med.* 2007 Jan.;17:7-1.

Consolaro A. *Inflamação e reparo.* Maringá: Dental Press Editora; 2009. 349p.

Corrêa AD, Siqueira-Batista R, Quintas LEM. Similia similibus curentur: notação histórica da medicina homeopática. *Rev Ass Med Brasil.* 1997; 43(4):347-51.

Corrêa AD, Siqueira-Batista R, Quintas LEM, Siqueira-Batista R. Similia similibus curentur: revisitando aspectos históricos da homeopatia nove anos depois. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos.* 2006;13(1):13-31.

Diniz JS, Dionísio VC, Nicolau RA, Pacheco MTT. Propriedades mecânicas do tecido ósseo: uma revisão bibliográfica. *Anais do IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP; São José dos Campos.* 2005; 1:189

Douglas CR, Douglas NA. Fisiologia do osso. In: Douglas CR. *Tratado de fisiologia aplicada às ciências médicas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p.1249-57.

El-Husseini AA, El-Agroundy AE, El-sayed MF, Sobh MA, Ghoneim MA. Treatment of osteopenia and osteoporosis in renal transplant children and adolescents. *Pediatr Transplantation.* 2004; 8:357-61.

Elia V, Baiano S, Duro I, Napoli E, Niccoli M, Nonatelli L. Permanent physico-chemical properties of extremely diluted aqueous solutions of homeopathic medicines. *Homeopathy.* 2004 Jul.;93(3):144-50.

Elia V, Napoli E, Germano R. The “memory of water”: an almost deciphered enigma. Dissipative structures in extremely dilute aqueous solutions. *Homeopathy.* 2007 Jul.;96(3):163-9.

Esquivel A, Picovsky E, Wiluzanski D. Osteoporosis – Estudio de un tratamiento homeopático. *Homeopatía*. 1996;61:59-65.

Eizayaga FX. Tratado de medicina homeopática. Buenos Aires: Marecel; 1972. p.314.

Farman AG, Levato CM, Gane D, Scarfe WC. In practice: how going digital will affect the dental office. *J Am Dent Assoc*. 2008 Jun.;139:14s-9s.

Feher A, Kuivunemi M, Fuchs RK, Burr DB, Phipps RJ, Reinwald S, et al. Bisphosphonates do not inhibit periosteal bone formation in estrogen deficient animals and allow enhanced bone modeling in response to mechanical loading. *Bone*. 2009 Oct.; [Epub ahead of print].

Figueiredo CC. Propriedades físico-químicas da água com preparados homeopáticos [dissertação]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (MG); 2009.

Fleisch H. Mechanisms of action of the bisphosphonates. *Medicina (B Aires)*. 1997;57(1):65-75.

Fleisch H. Bisphosphonates in osteoporosis. *Eur Spine J*. 2003; 12(supl):142-6.

Franchimont N, Durant D, Rydzziel S, Canalist E. Platelet-derived growth factor induces interleukin-6 transcription in osteoblasts through the activator protein-1 complex and activating transcription factor-2. *J Biol Chem*. 1999 Mar.;274(10):6783-9.

Francis RM. Management of established osteoporosis. *Br J Clin Pharmacol*. 1998;45:95-9.

Freitas FJ, Castro LP. Medicamentos homeopáticos usados em ortopedia em dois casos clínicos. *Homeopatía Brasileira*. 1995;2:177-81.

Fuchs RK, Phipps RJ, Burr DB. Recovery of trabecular and cortical bone turnover after discontinuation of risedronate and alendronate therapy in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 2008;23(10):1689-97.

Gali JC. Osteoporose. *Acta Ortop Bras.* 2001 Abr./Jun.;9(2):3-12.

Girosole G, Williams DC, Manolagas SC. 17β -estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest.* 1992 Mar.;89(3):883-91.

Goldring MB, Krane SM. Modulation by recombinant interleukin 1 of synthesis of types I and III collagens and associated procollagen mRNA levels in cultured human cells. *J Biol Chem.* 1987;262:16724-9.

Graham DY, Malaty HM. Alendronate gastric ulcers. *Aliment Pharmacol Ther.* 1999 Apr.;13(4):515-19.

Guy JA, Shea M, Peter CP, Morrissey R, Hayes WC. Continuous alendronate treatment throughout growth, maturation, and aging in rat results in increases in bone mass and mechanical properties. *Calcif Tissue Int.* 1993; 53(4):283-8.

Guyton AC, Hall JE. Paratormônio, calcitonina, metabolismo de cálcio e fosfato, vitamina D, ossos e dentes. In:_. *Tratado de fisiologia médica.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. cap. 79, p. 978-95.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003 May;423:349-55.

Hayes WC, Shea M, Rodan GA. Preclinical evidence of normal bone with alendronate. *Int J Clin Pract Suppl.* 1999 Apr.;101:9-13.

Heilkberg IP. Homeostasia mineral. In: Szejnfeld VL. *Osteoporose diagnóstico e tratamento.* São Paulo: Sarvier; 2000. p. 30-7.

Higdon J. Phosphorus [database on the Internet]. Oregon State University. Linus Pauling Institute. 2003 [updated 2007 Aug]. Available from:<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/mineral/phosphorus>.

Íseri SÖ, Yüksel M, Contuk G, Çetinel S, Gedik N, Yegen BC. Ghrelin against alendronate-induced gastric damage in rats. *J Endocrinol*. 2005 Dec.; 187(3):399-406.

Jacobs JWG, de Nijs RNJ, Lems WF, Geusens PPMM, Laan RFJ, Huisman AM, et al. Prevention of glucocorticoid induced osteoporosis with alendronate or alfacalcidol: relations of change in bone mineral density, bone markers, and calcium homeostasis. *J Rheumatol*. 2007 May; 34(5):1051-7.

Johnson T, Boon H. Where does homeopathy fit in pharmacy practice? *Am J Pharm Educ*. 2007 Feb.;71(1):1-8.

Junqueira LC, Carneiro J. Tecido ósseo. In: *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p.135-52.

Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology*. 1989 Jan.;124(1):7-16.

Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. 1991;15:175-92.

Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Oden A, Melton LJ, Khaltsev N. A reference standard for the description of osteoporosis. *Bone*. 2008 Mar.; 42(3):467-75.

Kierszenbaum AL. *Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. Cap. 5, p.141-56.

Kimble RB, Matayoshi AB, Vannice JL. Simultaneous block of interleukin-1 and tumor necrosis factor is required to completely prevent bone loss in the early postovariectomy period. *Endocrinology*. 1995 Jul.;136(7):3054-61.

Kolios L, Hoerster AK, Sehmisch S, Malcherek MC, Rack T, Tezval M, et al. Do estrogen and alendronate improve metaphyseal fracture healing when applied as osteoporosis prophylaxis? *Calcif Tissue Int.* 2010 Jan.; 86(1):23-32.

Komatsubara S, Mori S, Mashiba T, Li J, Nonaka K, Kaji Y, et al. Suppressed bone turnover by long-term bisphosphonate treatment accumulates microdamage but maintains intrinsic material properties in cortical bone of dog rib. *J Bone Miner Res.* 2004 Jun.;19(6):999-1005.

Kossak-Romanach A. *Homeopatia em 1000 conceitos.* São Paulo: Elcid; 1984. p.191, 562.

Krum SA, Miranda-Carboni GA, Hauschka PV, Carroll JS, Lane TF, Freedman LP, et al. Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival. *Embo J.* 2008 Feb.;27(3):535-45

Leucht P, Kim JB, Amasha R, James AW, Girod S, Helms JA. Embryonic origin and hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration. *Development.* 2008 Sep.;135(17):2845-54.

Lin JH, Chen IW, Duggan ED. Effects of dose, sex, and age on the disposition of alendronate, a potent antiosteolytic bisphosphonate, in rats. *Drug Metab Dispos.* 1992 Jul-Aug.;20(4):473-78.

Lin JH, Duggan ED, Chen IW, Ellsworth RL. Physiological disposition of alendronate, a potent anti-osteolytic bisphosphonate, in laboratory animals. *Drug Metab Dispos.* 1991 Sep-Oct.;19(5):926-32.

Lorenzo JA, Naprta A, Rao Y, Alander C, Glaccum M, Widmer M, et al. Mice lacking the type I interleukin-1 receptor do not lose bone mass after ovariectomy. *Endocrinology.* 1998;139(6):3022-5.

Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Russel RGG, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res.* 1998 Apr.;13(4):581-89.

Mahl CRW, Tonietto A, Giorgi BG, Giroto CV, Fontanella VRC. Evaluation of radiographic density and proportion of trabecular bone in the femur of female rats medicated with glucocorticoid and bisphosphonate. *Rev Odonto Ciênc.* 2009;24(1):28-31.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000;21(2):115-37.

Marie PJ. Bone cell-matrix protein interactions. *Osteoporos Int.* 2009 Jun.; 20(6):1037-42.

Martin TJ, Grill V. Bisphosphonates – mechanisms of action. *Aust Prescr.* 2000;23:130-2.

Martini LA. Orientação dietética. In: Szejnfeld VL. Osteoporose diagnóstico e tratamento. São Paulo: Sarvier; 2000. p. 277-88.

Marx RE, Cillo JE Jr, Ulloa JJ. Oral bisphosphonate-induced osteonecrosis: risk factors, prediction of risk using serum ctx testing, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Dec.; 65(12):2397-410.

Matos PG, Yamaguchi KC, Fernandes ARC, Turrini E. In: Szejnfeld VL. Osteoporose diagnóstico e tratamento. São Paulo: Sarvier; 2000. p.206-24.

Moraes MEL, Soares MG, Takeshita WM, Moraes LC, Medici Filho E, Castilho JCM. Estudo Radiográfico de ratos estressados: densidade óptica por meio de radiografia digital. *Rev Odonto Cienc.* 2005 jul./set.; 20(49):257-61.

Nagae M, Hiraga T, Wakabayashi H, Wang L, Iwata K, Yoneda T. Osteoclasts play a part in pain due to the inflammation adjacent to bone. *Bone.* 2006;39:1107-15.

Nakamura T. Current situation of osteoporosis treatment in Japan: From the aspect of fracture prevention. *Geriatr Gerontol Int.* 2004 Sept.;4:S69-71.

Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M, et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone.* 2001 Jan.;28(1):80-6.

Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, Henneman Z, Gulde S, Wu W, et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. *Bone.* 2006 May;38(5):617-27.

Nishikawa M, Akatsu T, Katayama Y, Yasutomo Y, Kado S, Kugai N, et al. Bisphosphonates act on osteoblastic cells and inhibit osteoclast formation in mouse marrow cultures. *Bone.* 1996;18(1):9-14.

O'Connor JP, Lysz T. Celecoxib, NSAIDs, and the skeleton. *Drugs of Today.* 2008 Sep;44(9):693-709.

O'Mahony D. Prevention of corticosteroid-induced osteoporosis and fractures. *J Clin Pharm Ther.* 1999 Apr;24(2):83-5.

Oliveira SHG, Kalczuk L, Salgado CSC, Valera MC, Araújo MAM, Miquilito JL. Técnicas radiográficas digital e convencional na determinação da odontometria. *Revista da APCD.* 2003;57(2):106-10.

Orwoll ES. Toward an expanded understanding of the role of the periosteum in skeletal health. *J Bone Miner Res.* 2003 Jun.;18(6):949-54.

Pachaly JR, Brito HFV. Emprego do método de extrapolação alométrica no cálculo de protocolos posológicos para animais selvagens. *A Hora Veter.* 2000;20(118):59-65.

Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem.* 1994 Jul.;55(3):273-86.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. *J Bone Miner Res.* 1987 Dec.;2(6):595-610.

Perilli E, Le V, Ma B, Salmon P, Reynolds K. Detecting early bone changes using in vivo micro-CT in ovariectomized, zoledronic acid-treated, and sham-operated rats. *Osteoporos Int.* 2009 Oct. [Epub ahead of print].

Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *J Clin Invest.* 1999 Nov.;104(10):1363-74.

Poitevin B. Las bases científicas de la homeopatía. *Homeopatía Mex.* 1992;60(560):14-20.

Prado RF. Efeitos da osteopenia no reparo ósseo alveolar de ratas [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2008.

Radominski SC, Pinto-Neto AM, Marinho RM, Costa-Paiva LHS, Pereira FAZ, Urbanetz AA, et al. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa. *AMB CFM.* 2002 Ago.:1-16.

Rajkumar R, Srivastava SK, Yadav MC, Varshney VP, Varshney JP, Kumar H. Effect of a homeopathic complex on oestrus induction and hormonal profile in anoestrus cows. *Homeopathy.* 2006;95:131-35.

Recker R, Masarachia P, Santora A, Howard T, Chavassieux P, Arlot M, et al. Trabecular bone microarchitecture after alendronate treatment of osteoporotic women. *Curr Med Res Opin.* 2005 Feb.; 21(2):185-94.

Riggs BL. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest.* 2000 Nov.;106(10):1203-4

Robson GF, Balieiro JCC, Serman FA, Pinto ACBCF, Miglino MA, Zatz M, et al. Estudo longitudinal da densidade mineral óssea em cães jovens da

raça Goden Retriever: Correlações com idade e peso corpóreo. *Braz J vet Res anim Sci.* 2006; 43(5):681-7.

Rodan GA, Fleisch HA. Bisphosphonates: Mechanisms of action. *J Clin Invest.* 1996 Jun.;97(12):2692-6.

Roschger P, Rinnerthaler S, Yates J, Rodan GA, Fratzi P, Klaushofer K. Alendronate increases degree and uniformity of mineralization in cancellous bone and decreases the porosity in cortical bone of osteoporotic women. *Bone.* 2001 Aug.;29(2):185-91.

Roughead EE, McGeechan K, Sayer GP. Bisphosphonate use and subsequent prescription of acid suppressants. *Br J Clin Pharmacol.* 2004; 57(6):813-6.

Russel RGG, Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, et al. The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. *J Bone Miner Res.* 1999;14(supl. 2):53-65.

Salles SAC. A presença da homeopatia nas faculdades de medicina brasileiras: resultados de uma investigação exploratória. *Rev Bras Edu Med.* 2008;32(3):283-90.

Sampath TK, Simic P, Sendak R, Draca N, Bowe AE, O'Brien S, et al. Thyroid-stimulating hormone restores bone volume, microarchitecture, and strength in aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 2007 Jun.; 22(6):849-59.

Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest.* 1991 Dec.;88(6):2095-105.

Senra GS. Estudo comparativo de reparação óssea em ratas ovariectomizadas tratadas com risedronato e Calcarea fluorica [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista – UNESP; 2006.

Sprague S, Lutz K, Bryant D, Farrokhyar F, Zlowodzki, Bhandari M. Complementary and alternative medicine use in patients with fractures. *Clin Orthop Relat Res.* 2007 Oct.;463:173-8.

Teixeira MZ. Homeopatia: desinformação e preconceito no ensino médico. *Rev Bras Educ Med.* 2007;31(1):15-20.

Teixeira MZ. Homeopatia: prática médica humanística. *Rev Assoc Med Bras.* 2007; 53(6):547-9.

Teófilo JM, Azevedo AC, Petenusci SO, Mazaro R, Lamano-Carvalho TL. Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxilla and proximal tibia of female rats. *Pesqui Odontol Bras.* 2003 Oct-Dec.;17(4):302-6.

Thompson TDB, Weiss M. Homeopathy – what are the active ingredients? An exploratory study using the UK medical research council's framework for the evaluation of complex interventions. *BMC Complement Altern Med.* 2006 Nov.; 6:37.

Thomson AB, Marshall JK, Hunt RH, Provenza JM, Lanza FL, RoyerMG, et al. 14 Day endoscopy study comparing risedronate and alendronate in postmenopausal women stratified by *Helicobacter pylori* status. *J Rheumatol.* 2002 Sep.;29(9):1965-74.

Turner AS. Animal models of osteoporosis – necessity and limitations. *Eur Cell Mater.* 2001;1(1):66-81.

Tyler ML. Retratos de medicamentos homeopáticos. São Paulo: Livraria Ed. Santos; 1992. v.1, p.181-87.

Udagawa N, Horwood NJ, Elliot J, Mackay A, Owens J, Okamura H, et al. Interleukin-18 (interferon- γ -inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon- γ to inhibit osteoclast formation. *J Exp Med.* 1997 Mar.;185(6):1005-12.

Udagawa N, Takahashi N, Katagiri T, Tamura T, Wada S, Findlay DM, et al. Interleukin (IL-6) induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J Exp Med*. 1995 Nov.;182(5):1641-68.

Ullman Dana. Homeopatia – medicina para o século XXI. São Paulo: Cultrix; 1988. 344p.

Vasconcelos LW, Francishone CE, Petrilli G, Paleckis LGP. Osseointegração em diferentes qualidades ósseas. In: Gomes LA. Implantes osseointegrados. São Paulo: Livraria Santos Editora; 2002. Cap. 17, p.261-78.

Vijnovsky B. Tratado de matéria médica homeopática. Buenos Aires: Rumo; 1992. v. 1, p. 331-36.

Volpon JB, Cecim PES, Miyase CI, Gava NF. O alendronato de sódio na prevenção da osteopenia secundária à imobilização gessada, em ratas: avaliação histomorfométrica. *Rev Bras Ortop*. 2008;43(10):442-51.

Watts NB, Worley K, Solis A, Doyle J, Sheer R. Comparison of risedronate to alendronate and calcitonin for early reduction of nonvertebral fracture risk: Results from a managed care administrative claims database. *J Manag Care Pharm*. 2004 Mar./Apr.;10(2):142-51.

Watts NB. Diagnosis and evaluation of patients with osteoporosis. *South Med J*. 2004; 97(6):540-1.

Werkman C. Estudo dos efeitos do risedronato e da *Calcareia phosphorica* 6CH na reparação óssea em ratos machos castrados [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista – UNESP; 2005

Werkman C, Senra GS, Rocha RF, Brandão AAH. Comparative therapeutic use of risedronate and *Calcareia phosphorica* – *allopathy* versus *homeopathy* – in bone repair in castrated rats. *Braz Oral Res*. 2006;20(3):196-201.

Westerlind KC, Wakley GK, Evans GL, Turner RT. Estrogen does not increase bone formation in growing rats. *Endocrinology*. 1993 Dec.; 133(6):2924-34.

van Wijk R, Clausen J, Albrecht H. The rat in basic therapeutic research in homeopathy. *Homeopathy*. 2009 Oct.;98(4):280-6.

Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 1988 Sep.;43(3):179-83.

Yong B, Lowe JS, Stevens A, Heath JW. Tecidos esqueléticos. In: Wheater histologia funcional: texto e atlas em cores. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007. Cap. 10, p.186-206.

Zhou AJJ, Peel SAF, Clokie CML. An evaluation of hydroxyapatite and biphasic calcium phosphate in combination with pluronic F127 and BMP on bone repair. *J Craniofac Surg*. 2007 Nov.;18(6):1264-75.

ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
 Av. Eng. Francisco José Leão, 777 - Jd. São Dimas
 CEP 12201-970 - F. (12) 3947-9028 / 9037
 Fax. (12) 3947-9010 / ajm41@focj.unesp.br / Guedes@focj.unesp.br

CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 045/2007-PA/CEP, sobre “Estudo comparativo dos efeitos do Alendronato e da Calcarea phosphorica, alopatia X homeopatia, sobre o reparo ósseo em ratas com osteoporose” sob responsabilidade de LUCIANA APARECIDA MASSARI MOTTA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.


São José dos Campos, 12 de novembro de 2007.



Profa. Dra. ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO
Coordenadora do CEP/ANIMAIS/FOSJC

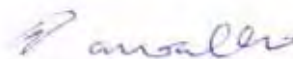
Recebi o original deste documento.
 em 05/12/08
 Ass: 

ANEXO B – Adequação do certificado do comitê de ética em pesquisa

 	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS FACULDADE DE ODONTOLOGIA <small>Rua Eng. Francisco José Longo, 777 - São Diniz - CEP 12241-900 - Fone: (12) 3943-0841 - FAX: (12) 3943-1002</small>
	
Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais	
São José dos Campos, 28 de maio de 2010	
Ofício nº 006/10-CEP	

Prezado(a) Sr.(a)	LUCIANA APARECIDA MASSARI MOTTA
Projeto	Estudo comparativo dos efeitos do Alendronato e da Calcarea phosphorica, alopatia X homeopatia, sobre o reparo ósseo em ratas com osteoporose
<h3>PARECER</h3>	
<p>Por solicitação da orientadora, Professora Adriana Aigotti Haberbeck Brandão, foi alterado a responsabilidade do trabalho para seu orientado VITOR HUGO FARINA. Alterando-se também o título do projeto para " AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA Calcarea phosphorica 6CH COMPARADA AO ALENDRONATO NA REPARAÇÃO DE LESÃO ÓSSEA EM RATAS COM DEFICIÊNCIA HORMONAL". Convalidando dessa forma o Protocolo nº 045/2007-PA/CEP de 12/11/2007</p>	

Atenciosamente,



Profa. Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora

Farina VH. Evaluation of the effects of *Calcarea phosphorica* 6CH compared to alendronate on bone repair in rats with hormonal deficiency [doctorate thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2010.

ABSTRACT

Osteoporosis is one of the most prevalent diseases in the elderly population. There are few reports in scientific literature about the efficiency of homeopathy in the treatment of osteoporosis and in bone repair in the presence of this disease. The aim of this work was to evaluate the efficiency of the homeopathic medicine *Calcarea phosphorica* 6CH (CP) compared to alendronate (A) on bone repair in ovariectomized rats. Four groups of 30 female rats were used. Three of these groups were submitted to ovariectomy (OVX) and one group had sham surgery (S). After 60 days, a 2,5mm monocortical lesion was drilled on the tibiae of all rats and treatment began according to: A- OVX/alendronate (1,2mg/ml/3times a week/rat), CP- OVX/*Calcarea phosph* 6CH (2 globules/1ml/day/rat), O- OVX/placebo (1ml/day/rat) and S- sham/placebo (1ml/day/rat). The animals (n=6) were sacrificed 3, 6, 10, 17 and 28 days after making the bone defect. The tibiae were fixed in 10% phormol solution, submitted to digital X ray, decalcified and submitted to histological and histomorphometric analyses. The results showed that CP stimulated intense tissue proliferation leading to the formation of a callus larger than the other groups in the initial phases of repair (10 days), but this callus showed a large amount of soft tissue that was fast remodeled. The amount of bone tissue in the callus varied among the different treatments but, at the end of the experimental period (28 days) all groups showed equivalent amounts. The treatment with A showed earlier bone formation, which was resistant to remodeling while with CP bone formed later, accumulated progressively and showed remodeling. It was concluded that alendronate and *Calcarea phosphorica* stimulated bone repair by different mechanisms of action and that alendronate was a better option of treatment of bone lesions being *Calcarea phosphorica* 6CH better than absence of treatment.

Keywords: Osteoporosis. Diphosphonates. Alendronate. *Calcarea phosphorica*. Alopathy. Homeopathy.