

ANA PAULA DE LIMA

**EFEITO DO *Symphytum officinale* L. (CONFREI)
FITOTERÁPICO E HOMEOPÁTICO NA REPARAÇÃO
ÓSSEA EM TÍBIAS DE RATOS**



2012

ANA PAULA DE LIMA

**EFEITO DO *Symphytum officinale* L. (CONFREI) FITOTERÁPICO E
HOMEOPÁTICO NA REPARAÇÃO ÓSSEA EM TÍBIAS DE RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista, 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

2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Profa. Dra. Ana Lia Anbinder

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Dr. Fernando Augusto Perrella

Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Prof. Dra. Emilia Angela Loschiavo Arisawa

Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP

São José dos Campos, 20 de agosto de 2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter tido projetos tão lindos para a minha vida e para a vida de todas as pessoas. E por ter me dado paz, capacidade e saúde para concluir este sonho e tantos outros, além de ter me protegido nos momentos mais difíceis. Obrigada, Senhor! Não tem como Te agradecer somente com palavras, por tudo que nos proporciona, por isso o nosso viver deve ser um constante agradecimento.

À UNESP – Univ Estadual Paulista, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Prof. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito.

Aos professores Dr. Gokithi Akisue e Lincoln Marcelo L. Cardoso da FAPI – Faculdade de Pindamonhangaba, pela parceria e dedicação desde o plantio até a preparação do fitoterápico, além da exsicata do confrei.

Ao LAB 3D BIO do departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da FORP – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, na pessoa da técnica Adriana Luisa Gonçalves de Almeida. Obrigada pela atenção e cuidados dispensados.

Ao laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic, na pessoa do Prof. Dr. Ney Soares de Araújo. Gostaria de agradecer a todos os professores e funcionários do laboratório que tão bem me receberam, especialmente, a bióloga Jeruza Pinheiro da Silveira Bossonaro e a futura biomédica Nadir S. de Freitas.

Aos técnicos do biotério Marco e Toninho. Obrigada pela ajuda, às vezes, até durante a medicação dos animais.

Ao técnico Walter Cruz pelo imenso amor com que realiza suas atividades.

Aos secretários da Pós-Graduação, na pessoa da Rosemary de Fátima Salgado.

A todos os funcionários da Biblioteca, na pessoa de Silvana Alvarez.

Agradeço a todos os amigos que ajudaram durante as cirurgias. Foram muitas pessoas, mas agradeço especialmente à Gisele Segnini Senra, Victor Hugo Farina, Ana Lourdes Machado, Anita Carolina de Lourdes Ribeiro, Cristina Wekman, Carolina Foot Gomes de Moura. Obrigada pela ajuda, pela convivência e por tantos outros ensinamentos que vocês me proporcionaram.

Agradeço a todos os alunos do curso de Pós-graduação em Biopatologia Bucal. Todos me ajudaram em algum momento. Obrigada!

Agradeço aos colegas: Luana, Tábata, Adriana, Camila, Michelle, Márcia, Gabriela, Miriane, Micheline, Adeline, Cristiane, Luís Felipe, Fernando, Celina.

Agradeço a todos os docentes da Biopatologia Bucal e do Departamento de Biociências e Diagnóstico bucal. Vocês participaram ativamente da minha formação, cada um a seu modo, acrescentando muitos ensinamentos em minha vida.

Às queridas professoras Adj. Rosilene Fernandes da Rocha e Dra. Ana Lia Anbinder por serem também, de certa forma, minhas orientadoras desde a iniciação científica até os dias de hoje. Sou grata!

À professora Maria Nadir Gasparoto Mancini (*in memoriam*) pela convivência e amizade que tive a oportunidade de usufruir e pelos conhecimentos científicos que ela me transmitiu nos últimos anos de sua vida.

Ao professor Ivan Balducci pela ajuda estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Agradeço de forma especial a minha orientadora, Professora Adriana Aigotti Haberbeck Brandão por me orientar ao longo destes cinco anos. E agradeço a Deus pela vida e inteligência dela. Tivemos momentos difíceis, tranquilos, surpreendentes e de duras decisões, e ela sempre teve muita paciência comigo. Muito obrigada, professora!

Agradeço aos meus pais Luiz Gonzaga de Lima e Maria Luzia de Lima pela vida, renúncias e pelo exemplo.

Agradeço ao meu irmão Luiz Danilo de Lima pela fé que tem em mim, pelas conversas, pelas brigas, por tudo!

Agradeço ao Fabrício Luiz Silveira pela ajuda, dedicação, carinho e atenção dispensados a mim. Obrigada, amor!

Agradeço a todos meus familiares e amigos, especialmente Wagner Luís Pereira e Ana Paula Pereira Masa.

Agradeço aos colegas da Prefeitura de Paraibuna (odontologia) e da odontologia do SESC Taubaté.

Agradeço aos animais experimentais.

INQUILINOS DO TEMPO

A resposta a uma pergunta gera em nós novas perguntas.
Alcançar um horizonte mostra-nos novos horizontes.
Cada passo dentro de nós abre-nos novas encruzilhadas.
Um compromisso na história solidariza-nos com outros desafios.
Se é importante chegar, é para partir de novo.
Se nos satisfaz saber, é para buscar o que não sabemos.
Se nos alegramos com o que somos, é para sair rumo àquilo que não somos.
O mesmo pão que nos sacia hoje permite-nos sentir fome amanhã.
Somos uma pergunta com respostas parciais, mas só Deus é a resposta.
Somos felizes com os amores humanos, mas só quando têm o brilho do
Absoluto.
Somos inquilino do tempo e do espaço, mas somos filhos do Infinito.

(Benjamin Gonzalez Buelta)

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... | 9 |
| RESUMO..... | 11 |
| ABSTRACT..... | 12 |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA..... | 15 |
| 2.1 Reparação óssea..... | 15 |
| 2.2 Homeopatia..... | 16 |
| 2.3 Fitoterapia..... | 19 |
| 2.4 Confrei..... | 21 |
| 2.5 Toxicidade do confrei..... | 22 |
| 2.6. Homeopatia na reparação óssea..... | 24 |
| 2.7 Confrei homeopático no tecido ósseo..... | 26 |
| 2.8 Microtomografia por raio-X..... | 28 |
| 2.9 Estudos utilizando a microtomografia por raio-X..... | 31 |
| 3 PROPOSIÇÃO..... | 37 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 38 |
| 4.1 Animais – Manejo e divisão em grupos..... | 38 |
| 4.2 Anestesia..... | 39 |
| 4.3 Procedimento cirúrgico para criação de defeito ósseo..... | 39 |
| 4.4 Preparo da droga vegetal..... | 40 |
| 4.5 Preparo da amostra para administração aos animais..... | 43 |
| 4.6 Tratamento homeopático..... | 44 |
| 4.7 Tratamento fitoterápico..... | 44 |
| 4.8 Grupo controle..... | 45 |
| 4.9 Eutanásia e coleta da tibia..... | 45 |
| 4.10 Análise da reparação por microtomografia..... | 46 |

| | |
|--|------------|
| 4.11 Descalcificação..... | 50 |
| 4.12 Análise histológica..... | 51 |
| 4.13 Análise histomorfométrica..... | 52 |
| 4.14 Delineamento estatístico..... | 55 |
| 5 RESULTADOS..... | 56 |
| 5.1 Análises da microtomografia..... | 56 |
| 5.2 Análise histomorfométrica..... | 74 |
| 5.3 Análise histológica descritiva..... | 82 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 93 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 106 |
| 8 REFERÊNCIAS..... | 107 |
| ANEXO..... | 115 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | | |
|----------|---|---|
| μ TC | = | Microtomografia computadorizada de raios X |
| 2D | = | Bidimensional |
| 3D | = | Tridimensional |
| ALP | = | Fosfatase alcalina |
| ANVISA | = | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| AP | = | Alcalóide pirrolizidínico |
| BS | = | Área superficial das trabéculas ósseas |
| BS/BV | = | Razão da superfície óssea pelo volume ósseo |
| BS/TV | = | Razão da área superficial pelo volume total |
| BV | = | Volume ósseo da amostra |
| BV/TV | = | Razão entre volume ósseo e volume da amostra |
| CH | = | Centesimal Hahnemanniana |
| CTAn | = | <i>Software CTAnalyser da SkyScan</i> |
| CTvol | = | <i>Software Realistic 3D – visualization da SkyScan</i> |
| DVO | = | Doença Venó-Oclusiva |
| EHESo | = | Extrato hidroetanólico de <i>Shymphytum officinale</i> L. |
| F | = | Grupo Fitoterápico |
| F.máx | = | Força máxima |
| FDA | = | <i>Food and Drug Administration</i> |
| gl | = | Grau de Liberdade |
| H | = | Grupo Homeopático |
| HE | = | Hematoxilina e eosina |
| I.S | = | Superfície de intersecção |
| OMS | = | Organização mundial de saúde |
| ROI | = | Região de interesse do objeto (2D) |
| Tb.N | = | Número trabecular |

| | | |
|-------|---|---------------------------------|
| Tb.pf | = | Fator padrão de osso trabecular |
| Tb.Sp | = | Separação trabecular |
| Tb.Th | = | Espessura trabecular |
| TV | = | Volume da amostra |
| VOI | = | Volume de interesse do objeto |

Lima AP. Efeito do *Symphytum officinale* L. (confrei) fitoterápico e homeopático na reparação óssea em tíbias de ratos [tese]. São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2012.

RESUMO

O *Symphytum officinale* L. (confrei) é uma planta usada há mais de 2000 anos no tratamento de fraturas ósseas. Esta já foi utilizada *in natura*, como fitoterápico ou medicamento homeopático. Após casos de intoxicação, o uso interno da planta foi proibido. Não há relato de toxicidade associado à formulação homeopática. O objetivo deste trabalho foi comparar a ação do confrei fitoterápico (F) e homeopático (H), na reparação óssea. Foi realizado defeito ósseo monocortical na tíbia de 72 ratos. Os animais foram, então, divididos em três grupos: *Symphytum officinale* 500mg/kg (F), *Symphytum officinale* 6CH 2 glóbulos (H) e água no grupo controle (C), que foram administrados diariamente, através de gavagem. As eutanásias foram realizadas 7, 14, 21 e 30 dias após a cirurgia. Foi realizada análise por microtomografia e, após descalcificação das tíbias, análise histológica descritiva e histomorfométrica. Aos 14 dias, o grupo H apresentou maior volume ósseo (BV) em relação ao F ($p=0,045$). O Fator de padrão trabecular (Tb.pf), aos 21 dias demonstrou que o grupo H foi menor que o F, que por sua vez apresentou menor valor que o C ($p=0,001$). A superfície de intersecção (I.S) e razão entre a área óssea e o volume ósseo (BS/BV) não apresentaram nenhuma diferença significativa. Na análise histomorfométrica, na % de área de preenchimento do defeito ósseo, o efeito dos tratamentos com confrei não foi evidenciado no período de 7 dias, no qual o grupo C apresentou maior valor em relação ao grupo H ($p=0,005$). Aos 30 dias, o grupo H apresentou maior valor que o grupo F ($p=0,020$). Em relação à % de área de osso neoformado, aos 14 dias, o grupo F apresentou valores menores que os demais (0,016). Conclui-se que o efeito do confrei homeopático na reparação óssea foi melhor que o do fitoterápico aos 14, 21 e 30 dias. Considerando a toxicidade do confrei, a formulação homeopática deve ser privilegiada.

Palavras-chave: Confrei. Homeopatia. Fitoterapia. Regeneração óssea. Microtomografia por raio-X. Microscopia.

Lima AP. Effect of Symphytum officinale L. (Comfrey) homeopathic and phytotherapeutic on bone regeneration in rats [doctorate thesis]. São José dos Campos, School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2012.

ABSTRACT

Symphytum officinale L. (Comfrey) is used for more than 2,000 years in the aid of fractures consolidation, as a medicinal plant, as phytotherapeutic or homeopathic medicine. Reports of toxicity, led to prohibiting its internal use. However, there are no reports of adverse effects associated with the homeopathic formulation. The aim of this study was evaluating comparatively the effects of phytotherapeutic (Phy) and homeopathic (H) Comfrey on bone regeneration. For that, 72 rats, had a monocortical defect drilled in their tibiae and were then divided in three groups: Symphytum officinale L. 500mg/Kg (Phy), Symphytum officinale 6CH 2 globules (H), and Control (C) with 1ml of water. Treatments were given daily by oral gavage until the sacrifice day, at the periods of 7, 14, 21, and 30 days after surgery. The tibiae were analyzed by microtomography. At seven days no statistical differences were seen. At 14 days group H showed higher Bone Volume (BV) value than F ($p=0,045$). In the 21th day, H group showed lower Trabecular pattern factor (Tb.pf) values than F, and F showed lower value than C ($p=0,001$). Intersection Surface (IS) and Bone Surface/Bone Volume ratio (BS/BV) showed no statistical differences. Then the tibiae were decalcified and prepared for microscopic and histomorphometric analysis to evaluate the area filled by repair tissue (%) in the bone defect and the trabecular bone (%) within the repair tissue. The area filled with repair tissue in 7 days was higher in group C than in group H ($p=0,005$) and in 30 days was higher in the group H than in group F ($p=0,020$). Evaluating the trabecular bone formed in the repair tissue, in 14 days the F group showed lower values than the other groups ($p=0,016$). It can be concluded that the effect of the homeopathic Comfrey on bone repair was better than that of the phytotherapeutic Comfrey, at 14, 21 and 30 days. Taking under consideration Comfrey's toxicity its homeopathic formula must be preferentially used.

Keywords: Comfrey. Homeopathy. Phytotherapy. Bone Regeneration. X-Ray Microtomograph. Microscopy.

1 INTRODUÇÃO

A regeneração de lesões ósseas causadas por fraturas, processos infecciosos, neoplasias ou anomalias do desenvolvimento, representa ainda um grande desafio em procedimentos médicos e odontológicos, o que leva a vários estudos visando agentes farmacológicos que facilitem sua integração.

O *Symphytum officinale* L. é uma planta conhecida há mais de 2000 anos devido às suas propriedades cicatrizantes, indicada no tratamento de consolidação de fraturas e de patologias ósseas. Suas propriedades medicinais se devem à presença de alantoína, taninos e mucilagens, sendo estes princípios ativos mais concentrados nas raízes. O *Symphytum officinale* L. também é chamado de confrei ou consólida, devido à capacidade de consolidar fraturas ósseas, atribuída à planta pela medicina tradicional.

Muito embora se reconheça a legitimidade do conhecimento tradicional, uma planta para ser usada em qualquer atividade ou programa de fitoterapia deve ser cientificamente validada. Isso consiste de várias etapas, que vão desde a verificação se a atividade atribuída existe e a avaliação dos riscos de seu uso, até a sua produção industrial. É essa luta por uma fitoterapia científica que precisa ser perseguida por todas as pessoas comprometidas com o estudo de plantas medicinais e o seu retorno social (Albuquerque, Andrade, 2011).

O *Symphytum officinale* L. contém também alcalóides pirrolizidínicos (AP), nas folhas e raízes, que usados cronicamente podem provocar doença veno-oclusiva (DVO) hepática, induzindo degeneração

de hepatócitos e cirrose. Devido a estes alcalóides presentes na planta o uso interno está proibido pelo Ministério da Saúde.

Apesar da ação tóxica com o uso prolongado, o *Symphytum officinale* L. pode ser indicado para uso externo como medicamento específico para casos de traumatologia óssea (fraturas), retardo na consolidação e dores periosteais, sendo, porém seu uso restrito apenas ao período de regeneração que representa um pequeno espaço de tempo (Pozetti, 1991).

O *Symphytum officinale* L. também pode ser prescrito como medicação homeopática, que se baseia no uso de pequenas doses da substância preparada em altas diluições e dinamizada. Não existe na literatura relato sobre efeitos prejudiciais ao fígado do *Symphytum officinale* L. usado como medicamento homeopático.

Apesar de a medicina tradicional atribuir ao confrei uma ação positiva durante o processo de reparação óssea, não existe relato na literatura avaliando cientificamente esta ação do confrei fitoterápico. Além disso, poucos estudos são encontrados em relação à ação do confrei homeopático na reparação óssea. A partir daí, observa-se que há uma lacuna em relação a real eficácia da ação do confrei na reparação óssea.

Assim, é válido um estudo que analise a ação do confrei sob as formulações fitoterápica e homeopática na reparação óssea. Lembrando que apesar do uso interno do confrei fitoterápico estar proibido, na formulação homeopática não há restrições para o uso da planta. Para tanto foram utilizadas análises tradicionais como a histomorfometria e a análise histológica, além da técnica de microtomografia por raio X.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Reparação óssea

Problemas decorrentes de complicações de reparação óssea podem ser considerados um dos principais desafios de saúde pública em todos os países. Cuidados voltados para a solução de complicações de reparação óssea geram custo econômico e impacto nos serviços de saúde. Felizmente, a maioria das fraturas é regenerada sem muitas complicações. Entretanto, estima-se que 7,9 milhões de fraturas ocorram anualmente nos Estados Unidos e que de 5 a 10% destas desenvolvam problemas de reparação (Victoria et al., 2009).

A reparação de fraturas é um processo metabólico complexo e requer a interação de muitos fatores, incluindo a proliferação de células reparativas. Se alguma etapa do processo de reparação óssea for interrompida ou inadequada, a reparação pode ser prejudicada ou atrasada, resultando em uma falta de união do osso ou em uma união fibrosa (Victoria et al., 2009).

O processo de reparação óssea pode ser dividido em 4 estágios: o primeiro estágio é um período inflamatório que dura aproximadamente 3 dias a contar do momento da lesão óssea e que é caracterizado pelo desenvolvimento e reabsorção de um hematoma, seguido de formação de tecido de granulação. O segundo estágio é o período inicial de regeneração óssea, caracterizado por uma resposta endosteal e periosteal periférica à lesão envolvendo o recrutamento de células tronco mesenquimatosas, seguida por formação de uma mistura de ossificação intramembranosa e endocondral, que dura

aproximadamente de 2 a 3 semanas. As ossificações intramembranosa e/ou endocondral vão ocorrer de acordo com o tipo de fratura a ser reparada. O terceiro estágio é o período de reabsorção primária no qual a cartilagem calcificada é reabsorvida e tecido ósseo trabecular é formado, com duração de 3 a 6 semana a partir da lesão óssea. O quarto estágio é o período de remodelação óssea secundária, no qual o osso trabecular é progressivamente remodelado em osso lamelar é formado até finalmente o osso readquirir as características que tinha antes da lesão óssea (Gerstenfeld et al., 2003; Gerstenfeld et al., 2005).

2.2 Homeopatia

Homeopatia (do grego *homoios*, semelhante + *pathos*, doença) é uma prática médica única em seu gênero, baseada na integração e na personalização do doente e de seu tratamento (Cornillot, 2005). A homeopatia, ao invés de considerar um conjunto de sistemas fisiológicos isolados e distintos no indivíduo com um binômio saúde/doença, analisa o indivíduo segundo uma abordagem dinâmica, integrada e multifatorial em vista dos aspectos bio/psico/sociais que definem a individualidade humana (Teixeira, 2007).

Por volta de 1800, Christian Friedrich Samuel Hahnemann, na busca por uma terapêutica menos iatrogênica do que a medicina de sua época utilizava, como sangrias, laxantes, sudoríferos e diuréticos, resolveu parar de clinicar e dedicou-se a traduzir escritos médicos. Enquanto traduzia a *Materia Medica* de Cullen, em 1790, interessou-se pelo uso de uma substância chamada "*Cinchona officinalis*" (quinina ou quina) usada na Europa para tratamento da malária e a experimentou em si mesmo. Percebeu então que a partir de determinada dose, desencadeavam-se nele os mesmos sintomas da enfermidade para

a qual era indicada como curativa. Nascia a partir desta descoberta a prática da Medicina Terapêutica pelos Semelhantes, teorizada milênios antes por Hipócrates (Correa et al., 1997; Cornillot, 2005; Mello, 2011; Teixeira, 2007). *Similia Similibus Curentur* é a lei da cura pelos semelhantes; segundo a qual a doença pode ser debelada pela aplicação de pequenas doses de elementos semelhantes à doença (Correa et al., 1997).

Como algumas plantas e substâncias eram tóxicas, algumas vezes ocorriam efeitos adversos importantes. Hahnemann decidiu, então, diluir os medicamentos ao máximo, de maneira que sua toxicidade fosse diminuída, obtendo resultados promissores com a nova terapêutica (Sigolo, 1996; Correa et al., 1997).

Os medicamentos homeopáticos podem ter sua origem em vegetais, minerais e animais, sendo que o reino vegetal é o que fornece maior quantidade de matérias primas (Castro, 1982).

Além da diluição, o medicamento homeopático passa por um processo chamado de dinamização, que consiste na liberação do poder medicamentoso dinâmico, latente, das substâncias em estado natural e ponderáveis. Este processo é realizado por meio de diluição seguida por sucussão. Sucussão por sua vez é a agitação do medicamento após cada diluição. O resultado final de cada etapa do processo de dinamização (diluição seguida de sucussão) é chamado de potência (Castro, 1982; Bhattacharyya et al., 2008).

Os medicamentos homeopáticos podem ser preparados em diferentes escalas segundo as diluições a que se submete o medicamento durante a sua manipulação farmacêutica. As escalas hahnemannianas são a centesimal e a cinquenta milesimal (Castro, 1982).

Assim, para o preparo das diluições na escala centesimal hahnemanniana, tomamos uma parte da substância escolhida como

medicamento para 99 partes do veículo (água destilada, álcool etílico ou uma mistura dos dois), que são colocadas num frasco e misturadas obtendo-se assim a primeira diluição centesimal, porém, somente após a sucussão (agitação ritmada alternada com impactos) é que será obtida a primeira potência centesimal. Para a segunda potência e as seguintes, procede-se do mesmo modo: uma parte da potência anterior para 99 de veículo, seguida de sucussão, e assim sucessivamente até a potência desejada (Castro, 1982).

A ação dos medicamentos homeopáticos se dá às vezes além do limite de Avogadro e é extremamente difícil compreender essa ação (Khuda-Bukhsh, 2009; Bhattacharyya et al., 2008). Um dos conceitos fundamentais da homeopatia é a estimulação dos mecanismos de defesa do organismo no processo de prevenir e tratar doenças (Smit et al., 2009).

No Brasil, a partir de 1979, a homeopatia passou a constar no Conselho de Especialidades Médicas da Associação Médica Brasileira e em 1980, do rol de especialidades do Conselho Federal de Medicina, deixando de fazer parte das medicinas alternativas e passando a constituir parte do que hoje se chama medicinas integrativas (Correa et al., 1997).

A homeopatia baseou-se num processo tanto experimental quanto empírico. No início sua semiologia proveio da experimentação sobre o homem sadio, efetuada segundo o método Hahnemanniano, portanto parcialmente experimental e empírico pelo trabalho de observação dos médicos homeopatas e pela aquisição de uma experiência prática. O desenvolvimento da pesquisa em homeopatia vem se efetuando progressivamente, tentando integrar os conhecimentos destes dois processos. Os trabalhos podem agrupar-se da seguinte forma: pesquisa biológica experimental, pesquisa clínica, pesquisa físico-química e pesquisas que integram a dimensão “holística” da homeopatia. (Cornillot, 2005).

2.3 Fitoterapia

Fitoterapia é um recurso terapêutico caracterizado pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas. A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Foi por meio de observação e da experimentação pelos povos primitivos que as propriedades terapêuticas de determinadas plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular (Turolla, Nascimento, 2006; Cunha, 2009).

No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (Figueiredo, Kaplan, 1997; Veiga Jr, Pinto, 2005).

Deve-se estar atento ao fato de que existem diferenças entre plantas medicinais e fitoterápicos. As plantas medicinais têm seu uso baseado no conhecimento popular sobre seus efeitos e geralmente são plantadas, colhidas e preparadas sem um critério rigoroso, estando sujeitas a uma série de variações (Veiga Jr; Pinto, 2005).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define fitoterápico como todo medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos de utilização e documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos fase 3. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na

sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais (ANVISA, 2004).

Existe o conceito de que, para o preparo de um fitoterápico, as plantas devam ser usadas integralmente, com o argumento de que a extração do princípio ativo elimina outros componentes que interagiriam com a substância principal para exercer os seus efeitos benéficos. Considera-se também que grande número de plantas medicinais não contém um princípio ativo específico e suas propriedades terapêuticas derivariam da totalidade de seus ingredientes (Clapauch et al., 2002).

A diferença das plantas medicinais para o medicamento fitoterápico reside na elaboração da planta desde seu plantio até uma formulação farmacêutica específica e padronizada, o que permite conhecer seus componentes e garante o controle da qualidade do fitoterápico (Veiga Jr, Pinto, 2005).

Tem sido constatado um aumento no uso de plantas medicinais, e vários fatores têm contribuído para a maior utilização e interesse em relação às plantas medicinais e aos fitoterápicos. Entre outros podemos destacar que muitos países não impõem prescrição e regularização sobre preparos de ervas, além de o acesso a esse tipo de terapia ser irrestrito e de baixo custo. O fato dos tratamentos derivados de plantas não requererem testes pré-clínicos extensos e síntese farmacêutica laboratorial, são atraentes. Também há uma crença de que os tratamentos com ervas medicinais são “naturais” e, portanto seguros, gerando um sentimento de melhor controle da doença e da conduta em relação à doença (Stickel et al., 2005).

Niggemann e Grüber (2003) em sua revisão de literatura associam a grande procura desse tratamento ao fato da medicina alopática muitas vezes não conseguir curar algumas doenças e somente promover um alívio.

Por todos esses fatores o interesse pela fitoterapia por parte dos profissionais e dos órgãos de Saúde Pública tem aumentado. O Brasil é um país com muitas potencialidades neste campo, por possuir a maior diversidade vegetal do mundo. Sob o ponto de vista químico e farmacológico, menos de 1% das espécies vegetais foram analisadas (Araújo et al., 2007).

2.4 Confrei

O *Symphytum officinale* L. é uma planta pertencente à família *Boraginaceae*, conhecida popularmente como confrei ou consólida, e é usada como cicatrizante pela medicina tradicional. É conhecida há mais de 20 séculos e utilizada para consolidar ossos fraturados e bordas de feridas. Além disso, também é conhecida por seu efeito no tratamento de dores musculares e articulares. É natural do norte da Ásia e do leste europeu, tendo seu emprego medicinal registrado na Grécia, já no tempo de Hipócrates (460 - 377 AC). O uso desta planta também foi muito difundido na América do Norte. Chegou ao Brasil no início do século XX trazido pelos imigrantes italianos para alimentação de animais domésticos (Chaves, 2003; Carvalho, 2004).

O confrei, além de seu efeito como planta medicinal, devido ao seu alto teor de nutrientes, vitaminas e sais minerais foi utilizado como alimento e fertilizante. Entre todas as plantas do reino vegetal, o confrei é uma das que contém maior teor em proteínas, sendo conhecida como a mais rápida na produção de proteínas do mundo (Carvalho, 2004).

O confrei contém os seguintes componentes: alantoínas, mucilagens, taninos, saponinas, colina, açúcares, triterpenos, vitaminas,

aminoácidos, esteróides, ácidos orgânicos e ácido fólico (Goldman et al., 1985; Vaz, Jorge, 2006).

No início dos anos 80 o confrei foi amplamente divulgado na mídia como possuidor de propriedades terapêuticas “milagrosas” para várias doenças, incluindo a leucemia e outros cânceres. A partir daí houve um grande aumento no consumo do confrei; muitas pessoas passaram a ingerir o confrei em saladas, sucos e chás regularmente. O confrei passou a ser amplamente utilizado como ração para gado. Entretanto, pouco tempo depois, foram identificados alcalóides pirrolizidínicos (AP) no confrei, que consumidos em longo prazo poderiam causar DVO no fígado e câncer hepático, motivo pelo qual o confrei passou a ser proibido para uso interno. No Brasil essa proibição existe desde 1992 (Pozetti, 1991; Brasil, 1992; Chaves, 2003).

2.5 Toxicidade do confrei

Entre seus princípios ativos o confrei contém os alcalóides pirrolizidínicos (AP), que despertam interesse em relação ao risco à saúde associado com o consumo crônico e sistêmico desta planta e de outras plantas que também apresentam estes alcalóides (Pozetti, 1991; Rode, 2002).

Estes alcalóides são componentes de defesa das plantas que são encontrados regularmente em algumas famílias. Estes componentes e também seus derivados N-óxidos (NO) podem apresentar risco à saúde devido ao fato dos vertebrados terem a capacidade metabólica em converter muitos AP em pirróis tóxicos, que são hepatotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (Figueiredo, Kaplan, 1997; Sticckel; Seitz, 2000). São conhecidas cerca de 360 estruturas que são sintetizadas nas raízes, folhas e caules, com maior concentração nas

raízes das plantas (Stickel; Seitz, 2000). O segundo órgão mais afetado pelos AP é o pulmão, sendo citados na literatura alguns casos de hipertensão pulmonar (Györík, Stricker, 2009).

A hepatotoxicidade por AP é bem estabelecida e é responsável pela DVO que é uma obliteração não trombótica, parcial ou total, de pequenos ramos venosos intra-hepáticos, por tecido conjuntivo frouxo subendotelial. Esta resulta em obstrução do fluxo venoso causando congestão hepática, fibrose hepática e cirrose (Gayotto, 2001; Stickel et al., 2005).

Não foram publicados casos de câncer hepático em humanos associado ao uso de confrei, entretanto em trabalhos experimentais com ratos alimentados com confrei por mais de 480 dias, vários animais desenvolveram neoplasias em fígado, principalmente carcinoma hepatocelular e alguns hemangiosarcomas (Hinoro et al., 1978).

Muitos trabalhos que avaliaram a toxicidade do confrei analisaram apenas os AP isolados (Yeong et al., 1991; Yeong et al., 1993), ou utilizaram a raiz da planta que é mais tóxica que as folhas (Guo *et al.*, 2007; Mei *et al.*, 2005; Mei *et al.*, 2006).

Lima (2009) analisou os efeitos da toxicidade do *Symphytum officinale* L. nas formulações homeopática e fitoterápica preparada através das folhas de confrei, em ratos nos períodos de 30 e 60 dias. A análise bioquímica permitiu observar algumas alterações metabólicas nos dois tipos de tratamento. Entretanto, através da análise histológica do fígado observou que o grupo tratado com o confrei homeopático apresentou menor quantidade de focos de fibrose em relação ao tratado com o medicamento fitoterápico e que no grupo homeopático de 60 dias houve diminuição significativa dos focos de inflamação. Não foram observados DVO ou sinal de neoplasias em nenhum dos animais, independente do tipo de tratamento.

Não foram encontrados na literatura relatos de toxicidade associada ao confrei homeopático.

2.6 Homeopatia na reparação óssea

Os estudos sobre a ação de medicamentos homeopáticos na reparação óssea são escassos. Os trabalhos encontrados são baseados em análise histológica e/ou histomorfométrica.

Werkman et al. (2006) avaliaram o efeito da *Calcareo phosphorica* 6CH e do risedronato no reparo de lesões ósseas em tíbias de ratos machos com indução de osteoporose por castração. Os autores concluíram que o tratamento com risedronato induziu a reparação com uma quantidade maior de osso que a *Calcareo phosphorica* 6CH. Entretanto, o osso formado pelo risedronato mostrou uma resistência à reabsorção, mantendo o aspecto trabecular, enquanto que o osso dos animais que receberam a *Calcareo phosphorica* 6CH exibiu inicialmente um osso trabecular que se modificou em osso lamelar ao final do experimento. Os medicamentos alopático e homeopático resultaram em diferentes formações ósseas em relação à remodelação e maturação.

Senra (2006) com o objetivo de avaliar o efeito do risedronato (R) e do medicamento homeopático *Calcareo fluorica* 6CH (Cf) no reparo ósseo em tíbias de ratas com osteopenia induzida por castração, utilizou análise radiográfica e análise histológica/histomorfométrica. A análise radiográfica mostrou diferença significativa nos períodos mais tardios, quando o grupo R mostrou os valores mais altos. A histomorfometria revelou que o grupo R superou os demais em relação à porcentagem de preenchimento e nos períodos iniciais o grupo Cf foi maior que o controle. Em relação à porcentagem de osso neoformado, nos períodos mais tardios o grupo controle apresentou

os maiores valores sendo diferente do grupo risedronado com os menores valores e o grupo homeopático com valores intermediários. A autora concluiu que o risedronato foi o tratamento que estimulou a maior formação óssea e a menor remodelação. O medicamento homeopático estimulou maior formação óssea nas fases iniciais da reparação quando comparada ao grupo controle, e, além disso, estimulou a remodelação óssea.

Almeida et al. (2009) estudaram a ação do *Plumbum metallicum* 30CH, comparando o medicamento com a calcitonina na regeneração óssea guiada em mandíbulas de ratos. Os períodos de observação foram 7, 14, 21 e 28 dias. Através de análise histológica os autores observaram que houve um completo preenchimento do defeito cirúrgico por toda sua extensão somente no grupo tratado com o medicamento homeopático, embora através da análise histomorfométrica os autores não tenham identificado diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado com *Plumbum metallicum* 30 CH e o controle.

Farina (2010) avaliou o medicamento homeopático *Calcarea phosphorica* 6CH (CP) em comparação com o medicamento alendronato (A) na reparação óssea em tíbia de ratas ovariectomizadas. As tibias foram submetidas à análise radiográfica e análise histológica/histomorfométrica. Os resultados mostraram que CP estimulou proliferação tecidual nas fases iniciais da reparação, mas o tecido de reparação era em sua maioria de tecido mole. O grupo A inicialmente formou maior quantidade de osso e este mostrou resistência à remodelação, CP mostrou pouca formação óssea inicial que aumentou progressivamente até o final do experimento. O autor concluiu que a CP 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 CP melhor que a ausência de tratamento.

2.7 Confrei homeopático no tecido ósseo

Balducci-Roslindo et al. (1999) avaliaram a ação de um complexo homeopático contendo *Symphytum officinallis* e *Calendula officinallis* no processo de reparação em feridas de extração dentária em camundongos. O grupo tratado com os medicamentos homeopáticos mostrou alterações significativas desde os períodos iniciais, apresentando uma aceleração na maturação do tecido ósseo neoformado, comprovando assim a eficácia da ação do complexo homeopático no reparo de feridas após a extração dentária.

Chaves (2003) estudou histológica e histomorfometricamente os efeitos do medicamento homeopático *Symphytum officinallis* - 6CH e do osso bovino granulado na reparação óssea em tíbias de ratos. Foram utilizados 60 ratos divididos em quatro grupos: tratados com *Symphytum officinallis* 6CH, com osso bovino granulado, com *Symphytum officinallis* 6CH associado ao osso bovino granulado e grupo controle, analisando o material aos 6, 12, 18, 24, 30 e 36 dias. Concluiu-se que o emprego do *Symphytum officinallis* 6CH favoreceu o reparo dos defeitos ósseos em todos os períodos de observação, obtendo os melhores resultados do experimento, favorecendo também a osseointegração das partículas de osso bovino no grupo onde ambas as terapêuticas foram associadas.

Para avaliar a influência do tratamento homeopático com o confrei (*Shymphytum officinalis* 6CH) na osseointegração em áreas ao redor de implantes de titânio, foi realizado um estudo com 48 ratos divididos em dois grupos (grupo controle e grupo teste). Cada animal recebeu um microimplante de titânio localizado na tíbia. Os animais do grupo teste foram tratados com 10 gotas de *Shymphytum officinalis* 6CH por dia, até o dia da eutanásia em 7, 14, e 28 dias após a cirurgia, respectivamente. Para análise foram obtidas radiografias no dia da colocação dos implantes (imagens iniciais) e no dia do sacrifício (imagens

finais) e foi realizada subtração de imagens. A administração do confrei promoveu aumento na densidade óssea radiográfica ao redor de implantes de titânio no período de reparação óssea (Sakakura et al., 2008).

Spin-neto et al. (2010) avaliaram a influência do *Symphytum officinalis* 6CH no torque de remoção e na densidade óssea radiográfica ao redor de microimplantes de titânio inseridos nas tíbias esquerdas de ratos. Foram utilizados 64 ratos, que depois de submetidos à cirurgia de implante, foram divididos em um grupo tratado, que recebeu 10 gotas do medicamento misturadas à água de beber, e um grupo controle, sem tratamento. Cada grupo de animais foi eutanasiado em 4 tempos diferentes: 7, 14, 28 e 56 dias após a cirurgia (n=8). Foram confeccionadas uma radiografia inicial (após a cirurgia) e uma radiografia final (antes do sacrifício), para realização de subtração de imagem. As tíbias foram submetidas à análise do torque de remoção. Além disso, foram realizadas análises bioquímicas séricas para avaliar a função hepática e a produção aumentada do osso relacionada à enzima fosfatase alcalina (ALP).

Segundo Spin-neto et al. (2010) a força de remoção ao torque no período de 14 dias foi maior no grupo tratado que no grupo controle. Nos períodos de 7, 28 e 56 não foram observadas diferenças significativas. Os dados da imagem radiográfica demonstraram que no período de 7 dias, o grupo tratado com homeopatia apresentou valores de densidade óssea menores comparado ao controle. Entretanto aos 14 e 56 dias os grupos tratados tiveram densidade óssea radiográfica estatisticamente maiores comparadas com o grupo controle. As análises bioquímicas mostraram que os valores de ALP foram estatisticamente maiores no grupo SO comparado ao controle. Não houve diferença significativa em relação à alanina aminotransferase (ALT) e à aspartato aminotransferase (AST). Os autores concluíram que o *Symphytum officinale* 6CH pode aumentar, principalmente nas fases iniciais da

osseointegração, a formação óssea ao redor do implante de titânio colocado em tíbia de ratos, sem causar dano bioquímico detectável.

2.8 Microtomografia por raio-X

A tomografia computadorizada tem sido usada desde 1973 como uma versátil técnica de investigação não invasiva. A microtomografia computadorizada (μ TC) é uma versão miniaturizada da técnica anterior e vem sendo utilizada na área de pesquisa de materiais. Na área biológica, ela foi adaptada para o estudo de materiais duros como matriz óssea e dentária (Davis, Wong, 1996).

O termo “tomografia” é derivado da palavra *tomos* do grego que significa “secção”. Tomografia é, deste ponto de vista, equivalente a imagem seccionada ou imagem em fatias (*slices*). A ideia básica da tomografia computadorizada é que a partir de um número de projeções obtidas do objeto se obtenha uma informação geométrica completa sobre este (Forsberb, 2008).

Esta técnica é especialmente útil na visualização externa e interna da mesma parte do osso, sem provocar danos à amostra. Trata-se de uma técnica não destrutiva usada para criar um mapa tridimensional de pequenos campos com resolução de poucos micrômetros. As imagens obtidas podem ser submetidas ao uso de softwares específicos para análise e melhor compreensão dos dados, bem como para a construção de modelos computacionais 3D e simulações, utilizadas para os mais diversos fins (Rodrigues, 2008).

A criação de dados 3D é feita através de *softwares* após a aquisição das imagens. Uma fatia tem uma dimensão espacial ao longo do eixo Z que em conjunto com a imagem reconstruída nos eixos X e Y, constitui uma imagem tridimensional. A reconstrução das fatias é então

dividida em pequenas unidades de volume: o voxel, que é a versão tridimensional do pixel. Quando a reconstrução do primeiro *slice* é finalizada um novo *slice* é escaneado e reconstruído (Figura 1). Isto é feito pela movimentação do objeto (amostra) ou do sistema detector ao longo da rotação axial. Todo o volume do objeto é reconstruído *slice* por *slice* e representa uma pilha de vários *slices* (Forsberb, 2008).

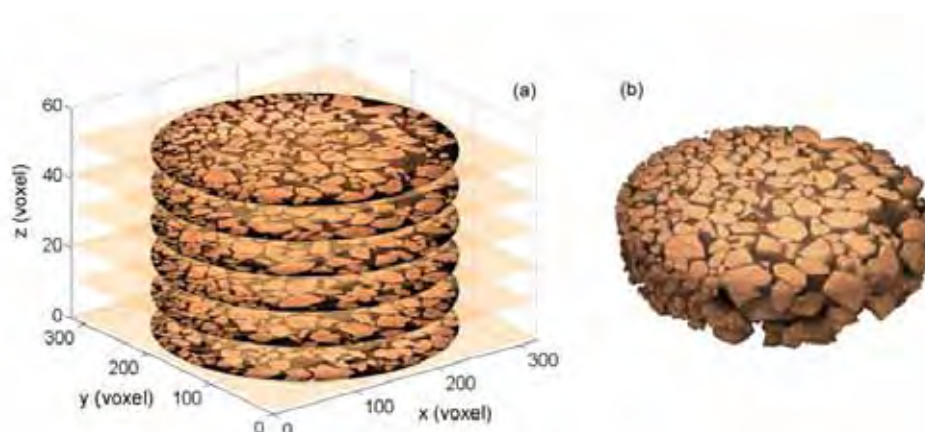


Figura 1 – (a) Pilha de reconstrução dos *slices* ilustrando um material granular; (b) Estrutura granular reconstruída. [Forsberb, 2008]

Após a aquisição das imagens e a reconstrução 3D através de algoritmos, é necessário escolher a região de interesse (ROI) das seções transversais para a análise morfométrica. Também é necessário determinar o volume de interesse (VOI) para as análises. Além disso, é importante o procedimento de tornar binários os dados para se determinar os pixels que vão representar o tecido ósseo. O valor binário do pixel é comparado a um valor limiar, se o valor do pixel se enquadrar no *threshold* o seu valor é convertido em “1”, que representa a região da secção transversal que contém tecido ósseo (Silva, 2009; Sales, 2010).

Após estes procedimentos de reconstrução, binarização, escolha do ROI e escolha do VOI, é possível realizar as análises morfométricas necessárias.

Na análise morfométrica por μ TC os seguintes parâmetros são denominados índices primários: BS – área óssea da amostra, que é a área superficial das trabéculas ósseas, BV – volume ósseo da amostra, TV – volume total da amostra, independente de sua natureza. Quando são utilizadas amostras com diferentes dimensões utilizam-se índices normalizados: BS/TV – razão entre a área óssea superficial da amostra e o volume total da amostra, BV/TV – razão entre o volume ósseo da amostra e o volume total da amostra e BS/BV - razão entre a área óssea superficial da amostra e o volume ósseo da amostra (Silva, 2009).

A μ TC fornece as informações necessárias para que os parâmetros espaciais como a razão entre o volume ósseo e o volume total da amostra (BV/TV), razão entre a área óssea superficial e o volume ósseo da amostra (BS/BV) sejam calculados diretamente do volume reconstruído da amostra (Lima et al., 2009).

Em relação à conectividade, que é definida como uma medida do grau que uma estrutura está multiplamente conectada, isto é, o número máximo de conexões que podem ser rompidas antes que a estrutura seja separada em duas partes, destaca-se o fator de padrão de osso trabecular (Tb.pf) (Silva, 2009). O Tb.pf é o fator de conectividade inversa e terá um valor maior na medida em que as trabéculas estiverem menos conectadas. A maioria das amostras que apresentam um BV/TV maior que 50% mostram valores negativos para Tb.pf, enquanto que a maioria das amostras com BV/TV menor que 50% mostram valores de Tb.pf positivos. Foi observada uma forte correlação inversa entre Tb.pf e BV/TV (Gonzalez-Garcia, Monje, 2012).

Altos valores de conectividade trabecular (Tb.Pf) indicam maior fragmentação e a presença de trabéculas isoladas, menores valores refletem integridade estrutural e maior conectividade. É uma variável estrutural e não uma variável de massa (Lazenby et al., 2011).

O parâmetro de superfície de intersecção (I.S) corresponde a área total de sólidos (ex. trabéculas ósseas) cortados pela

superfície do VOI escolhido. O I.S aumenta com a fração do volume ósseo, espessura trabecular e/ou número trabecular (Lazenby et al., 2011).

Além desses parâmetros destacam-se também os relacionados diretamente com as trabéculas ósseas, tais como: espessura trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N), que corresponde ao número de trabéculas ósseas por milímetro do VOI e a separação trabecular (Tb.Sp) que fornece os espaços entre as trabéculas adjacentes em um VOI escolhido (Lazenby et.al, 2011).

2.9 Estudos utilizando a microtomografia por raio-X

Atualmente são encontrados diversos estudos utilizando a técnica de μ TC para a avaliação de tecido ósseo. Observa-se a importância da escolha de um VOI que permita a correta análise de interesse, além da seleção de parâmetros representativos para cada estudo. Os trabalhos que utilizam a μ TC para a análise da reparação óssea são escassos e ainda estão em fase de delineamento da técnica, entretanto são encontrados muitos outros trabalhos abordando outros aspectos do tecido ósseo como osseointegração, remodelação na presença de osteoporose, além de trabalhos que buscam a melhor utilização técnica da μ TC e outros que comparam a técnica da μ TC com a histomorfometria tradicional.

Müller et al. (1998) estudaram a avaliação da qualidade óssea na osteoporose, comparando a histomorfometria tradicional com a μ TC. Utilizaram 63 cilindros de osso transilíaco humano *post mortem* de 27 mulheres e 36 homens de 23 a 92 anos e realizaram os estudos morfométricos por histomorfometria e μ TC. Os parâmetros morfométricos utilizados pela μ TC foram respectivamente densidade óssea (BV/TV),

densidade óssea de superfície (BS/TV), espessura trabecular (Tb.Th) e separação trabecular (Tb. Sp). Os resultados mostraram alta significância ($p < 0,0001$) de correlação entre a histologia convencional e a μ TC. Este resultado mostrou que o uso da μ TC é muito promissor por ser um método não destrutivo, rápido e muito preciso.

Zhang et al. (2011) com o objetivo de investigar o impacto do sítio de colocação e o tempo de reparação na estabilidade de mini-implantes de titânio usados para ancoragem em ortodontia, utilizaram 8 beagles machos. Estes animais foram divididos em quatro grupos de acordo com os tempos de reparação: um, três, cinco e sete semanas, cada grupo continha dois beagles. Foram implantados 64 mini-implantes, bilateralmente, dois na maxilla e dois na mandíbula em cada animal. Foi realizada μ TC para realização de testes morfométricos além de testes biomecânicos. Os autores observaram que os parâmetros de Força Máxima ($F_{m\acute{a}x}$) aumentaram no decorrer do tempo. Uma semana após a inserção, todas as quatro medidas: osseointegração, densidade de volume ósseo trabecular, superfície de intersecção (I.S) e $F_{m\acute{a}x}$, foram menores no grupo da maxilla que no grupo da mandíbula. No período de três semanas houve uma tendência ao aumento dos quatro valores, mais na maxilla do que na mandíbula. Após cinco e sete semanas, o grupo da maxilla expressou maiores valores que a mandíbula, nas quatro medidas. Os autores concluíram que apesar da inserção na mandíbula apresentar uma maior estabilidade para mini-implantes no início, com o tempo a inserção na maxilla exibiu maior osseointegração. Os resultados indicaram que a inserção na maxilla teve um efeito mais positivo para a estabilidade dos mini-implantes que a inserção na mandíbula.

Yan et al. (2011) relataram que parâmetros arquiteturais representativos de trabéculas ósseas podem ser difíceis de serem alcançados durante o escaneamento de imagens. Isto se deve a porosidade variável e a distribuição das trabéculas dentro do volume de interesse (VOI) escolhido. Com o objetivo de avaliar a influência do VOI

nestes parâmetros, os autores analisaram diferentes VOI, medidos na vértebra humana e correlacionaram com os parâmetros de BV/TV, BS/BV, Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp. Foi obtida uma correlação entre os parâmetros e os VOI estudados. O parâmetro Tb.Th mostrou variação relativamente baixa mesmo em uma amostra com menos de 2 mm³. A análise estatística mostrou que nas amostras com VOI menor que 6 mm³, obtem-se diferença na medida de BV/TV. Tb.N e Tb.Sp mostraram diferenças significantes para VOI menor que 4 mm³ e 5 mm³ respectivamente. Entretanto, não foram observadas diferenças significantes para os índices de BS/BV e Tb.Th. O estudo mostrou que um VOI ótimo precisa ser maior que 6 mm³ para fornecer os parâmetros arquiteturais das trabéculas de vértebras humanas corretamente.

Lazenby et al. (2011) discutem que para estudos de antropologia é preciso evitar o uso de um VOI maior que o mínimo necessário. Além disso, relatam a importância de se saber se o tamanho do VOI influencia em casos onde uma amostra pequena precisa ser comparada a uma maior em regiões que não sejam funcionalmente homólogas. Para sanar essas dúvidas os autores compararam propriedades arquiteturais trabeculares de volume, organização e orientação em 3 VOI diferentes obtidos da distal do primeiro metacarpo em amostras de homens e chimpanzés. Os três VOI foram esféricos. O VOI maior tinha um diâmetro de 4,5 mm. O Segundo VOI era um VOI proporcional e correspondia a 25% do tamanho de cada amostra, o que variava entre cada espécie. E o VOI menor tinha um diâmetro de 3,0 mm para as amostras de homem e 3,5 mm para os chimpanzés. Portanto a ordem dos VOI em relação aos diâmetros do maior para o menor foi: VOI Maior, VOI Proporcional e VOI Menor para a espécie homem e VOI Maior, VOI Menor e VOI Proporcional para a espécie dos chimpanzés. Algumas propriedades (Razão do volume ósseo e espessura trabecular) não foram afetadas pela variação do VOI, outros parâmetros como I.S e conectividade foram afetados. Comparando os VOI entre si, os autores

encontraram que os maiores VOI aumentaram muito a magnitude de diferença entre as espécies homem e chimpanzé. Os autores sugerem a utilização do VOI Proporcional para corretas avaliações ósseas.

Ebina et al (2009), com o objetivo de estabelecer um modelo experimental para ratos em relação ao defeito ósseo alveolar de tamanho crítico, utilizaram a μ TC para avaliação dos defeitos ósseos alveolares, além de utilizar a hibridização *in situ* para avaliar o colágeno tipo I. Para tanto, utilizaram 117 ratos divididos em dois grupos. Nos dois grupos foi realizado um defeito ósseo com broca em baixa rotação na região de primeiro molar mandibular direito. No primeiro grupo o defeito foi realizado na região vestibular, sendo um defeito menor, já no segundo o defeito foi realizado na região mesio-vestibular e tinha dimensões maiores que o primeiro. Os animais foram sacrificados três, seis, 12 e 24 semanas após o defeito. O VOI selecionado ficava na área entre o lado mesial do forame mentoniano e o lado mesial do segundo molar da mandíbula. Foram obtidos os BV dos VOI selecionados e os autores observaram que os defeitos vestibulares repararam significativamente em 24 semanas, enquanto que os mesio-vestibulares não repararam. Além disso, os autores usaram a μ TC para avaliar a exposição radicular distal e observaram que o tamanho da exposição distal diminuiu no período da terceira semana no grupo vestibular e na 12ª semana para o grupo mesio-vestibular. Através da histologia e da hibridização *in situ* os autores concluíram que osteoblastos e osteócitos expressaram colágeno tipo I em ambos os defeitos na terceira semana, mas mostraram pouca expressão na sexta semana. Os autores concluíram que o defeito mesio-vestibular é um defeito de tamanho crítico, pois não foi reparado com osso, e pode se tornar um modelo experimental apropriado para investigação de agentes de reparação óssea na perda óssea alveolar. Além disso, concluíram que a μ TC 3D é uma ferramenta poderosa para analisar quantitativamente o complexo morfológico do osso alveolar.

Lima et al. (2009) fizeram uma análise de amostras ósseas através da técnica de μ TC 3D para compreender a estrutura óssea, que é um fator importante no diagnóstico de osteoporose, que implica em deterioração da arquitetura do tecido ósseo e aumento da fragilidade óssea. Para tanto os autores utilizaram amostras ósseas de calcâneo humano e fêmur de ratos. Foram avaliados cinco parâmetros: BV/TV, o número de trabéculas existente na amostra (Tb.N), a razão entre a superfície óssea e o volume do osso (BS/BV), a espessura das trabéculas (Tb.Th) e a separação trabecular (Tb.Sp). Os resultados obtidos pelos autores mostraram que a μ TC 3D por raios X é uma técnica que pode ser potencialmente utilizada para análise de microestruturas ósseas.

Nyman et al. (2009) comentam sobre a carência de técnicas objetivas para analisar o reparo ósseo. Relatam que os testes biomecânicos são os testes quantitativos mais utilizados atualmente, mas constituem uma técnica destrutiva. Sugerem a μ TC como técnica adequada e não destrutiva para avaliar a estrutura e densidade ósseas. O objetivo do trabalho foi comparar as correlações entre características quantitativas do calo ósseo por μ TC e por teste biomecânico durante o tratamento de fraturas com lovastatina em diferentes doses. Foi realizada uma fratura em fêmur de ratos que receberam lovastatina local. O sacrifício foi feito após 4 semanas. Foram realizadas análises por μ TC e teste de flexão em três pontos. Para determinação do ROI os autores localizaram uma linha de fratura e selecionaram cem *slices* acima e cem abaixo dessa linha. Os parâmetros utilizados foram: TV, BV, BV/TV e BMD (densidade mineral óssea) volumétrica do tecido mineralizado dentro do calo ósseo. Para a obtenção dessas medidas, foi feito um contorno no perímetro de cada *slice* do calo ósseo. Com o objetivo de quantificar a conectividade da cortical do calo ósseo (ausência de lacunas e fendas), os autores fizeram um ROI menor que continha apenas uma fina região da cortical do calo e analisaram os mesmos parâmetros. No

teste biomecânico os autores obtiveram F.máx, Rigidez e Energia de F.máx. Os autores observaram que o TV e o BV do calo foram inversamente proporcionais com a Rigidez e F.máx. sugerindo que os maiores calos foram mais fracos que os calos menores. A densidade de tecido mineralizado no calo (BMD) teve a mais forte correlação com a resistência do calo. A F.máx e rigidez aumentaram de acordo com BMD indicando um aumento da resistência do calo. Na análise da cortical externa do calo ao redor da fratura, BV/TV foi diretamente proporcional com a F.máx e Rigidez do calo. Isto sugerere que menor quantidade de fendas e lacunas na cortical do calo aumenta a resistência do mesmo.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a ação do *Symphytum officinale* L. na reparação óssea comparando o medicamento fitoterápico com a formulação homeopática 6CH.

3.2 Específica

Determinar e comparar os efeitos do confrei homeopático e fitoterápico na reparação óssea em diferentes tempos experimentais, por meio de:

- a) quantificação do osso neoformado na área do reparo através de microtomografia computadorizada de raios-X (μ TC);
- b) avaliação das características microscópicas do tecido neoformado na área do reparo;
- c) quantificação do osso neoformado na área de reparo por análise histomorfométrica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais - manejo e divisão em grupos

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a aprovação fornecida pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, sob o Protocolo nº 043/2007 – PA/CEP de 06 de novembro de 2007 (Anexo).

Para este estudo foram utilizados 72 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Wistar*), com aproximadamente 90 dias de idade, peso médio de 300 gr, mantidos em gaiolas em temperatura ambiente e alimentados com ração e água *ad libitum*, fornecidas pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

Aos 90 dias de idade foi realizado um defeito ósseo monocortical na tíbia direita de todos os animais, a partir daí os animais foram aleatoriamente divididos em três grupos de acordo com os tratamentos: Homeopático (H), tratado com *Symphytum officinale* 6CH, Fitoterápico (F) tratado com *Symphytum officinale* 500 mg/kg e Controle (C), tratado com veículo inerte. Foram eutanasiados 6 animais de cada um dos três grupos nos seguintes períodos experimentais: 7, 14, 21, e 30 dias após a cirurgia (Figura 2). Os diferentes tratamentos foram iniciados logo após a confecção do defeito ósseo e foram mantidos até o dia anterior ao da eutanásia dos animais.

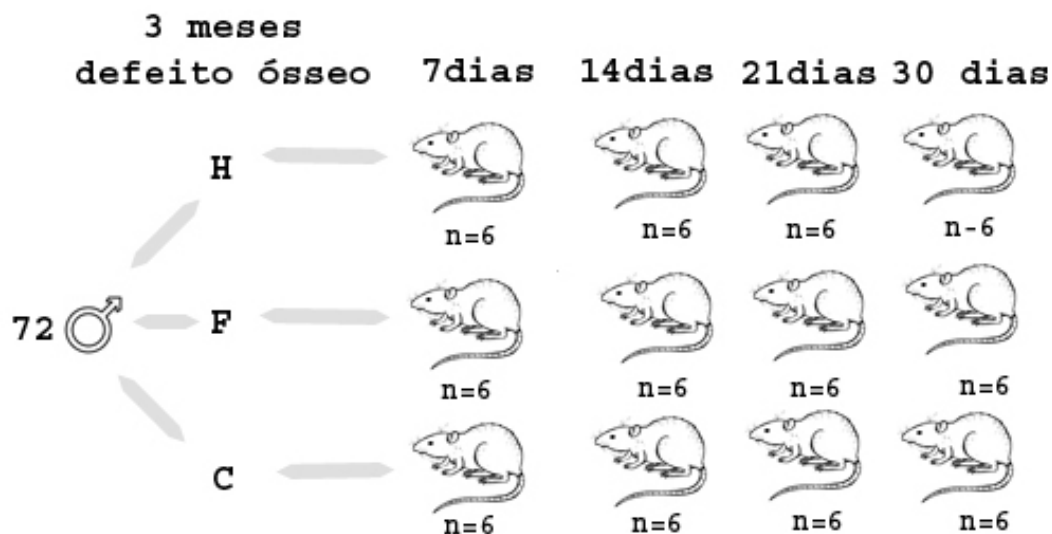


Figura 2 – Esquema da divisão dos animais por grupo.

4.2 Anestesia

Para a realização da cirurgia os animais foram anestesiados usando-se uma mistura de cloridrato de xilasina 2% (Anasedan®), substância sedativa e relaxante muscular, com cetamina base (Francotar®), anestésico geral. A dose utilizada foi de 12 mg de xilasina por kg de peso corporal e 38 mg de cetamina por peso corporal, por via intramuscular. Os ratos foram pesados para calcular a dose ideal de anestésico.

4.3 Procedimento cirúrgico para criação de defeito ósseo

Após anestesia, depilação manual da pata traseira direita e antissepsia com álcool iodado, a pele e o músculo da face lateral interna da pata traseira foram incisados longitudinalmente com bisturi com lâmina

nº 15. Os músculos e periósteo foram divulsionados com espátula nº 7 para expor a região da tíbia onde foi confeccionado um defeito de 2,5 mm de diâmetro, com broca esférica carbide nº 8, sob irrigação abundante e contínua com solução fisiológica (Figura 3). O defeito foi confeccionado na extremidade superior da diáfise, na face medial. Após a cirurgia aguardou-se estabilização do coágulo na região do defeito ósseo, os tecidos foram reposicionados e a camada muscular e a pele foram suturadas com fio de seda nº 4 (Ethicon/Johnson & Johnson).



Figura 3 – Após exposição da face medial da tíbia, foi confeccionado um defeito ósseo monocortical com uma broca de 2,5 mm em baixa rotação, sob irrigação constante.

4.4 Preparo da droga vegetal constituída das folhas de confrei

O material vegetal foi coletado no sítio Pinheiros, localizado no bairro Vila Élvio, pertencente ao município de Piedade, no Estado de São Paulo e identificado pelo Prof. Dr. Gokithi Akisue. Foi feita uma exsicata que foi depositada no Herbário de Fanerógamas do Instituto

de Botânica da Universidade de São Paulo (USP), sob a identificação: G.Akissue 032 - SPF.

As folhas da espécie foram colhidas inteiras e secas naturalmente à sombra. Posteriormente, as folhas foram submetidas à secagem complementar em estufa a temperatura controlada de 45°C durante 72 horas. Após a secagem, as folhas foram pulverizadas em moinho de facas, de modo que suas partículas tivessem seu diâmetro máximo padronizado por tamis de malha 20 Mesh.

Para a obtenção do extrato fluido das folhas da espécie foi empregado o Processo A (Farmacopéia Brasileira, 1959) adaptado para as características do estudo. Assim, 1.000 g da droga vegetal pulverizada grosseiramente (partículas com diâmetro padronizado em 20 Mesh) foram submetidas a intumescimento em solução hidroetanólica 70% (v/v) ficando neste estado de repouso por 30 minutos.

O material já intumescido, após o tempo de 30 minutos, foi acondicionado em um vaso percolador. Durante este procedimento foi tomado o cuidado de não se compactar o material excessivamente de modo a não criar resistência e não dificultar a passagem do solvente durante o processo de percolação, resistência esta, resultante do possível aumento da força de capilaridade frente à pressão hidrostática do sistema (Saito, 1998).

Uma vez acondicionada, a droga vegetal, e com todo o sistema para percolação já montado, foi adicionada solução hidroetanólica 70% (v/v) até cobrir 10 cm acima do nível da droga vegetal, que ficou em repouso neste estado de maceração durante 24 horas. Após o repouso em maceração, foi iniciado o processo de percolação com fluxo controlado de 25 gotas por minuto.

Foram recolhidos os primeiros 850 mL de extrato, correspondendo à primeira fração extrativa, a qual foi acondicionada e reservada em vidro âmbar bem fechado. Esta primeira fração extrativa foi armazenada em refrigerador à temperatura de 8°C. A percolação foi

continuada até o esgotamento da droga vegetal, mantendo-se o fluxo de 25 gotas por minuto até a sua conclusão.

Após o esgotamento da droga vegetal, a segunda fração extrativa obtida foi concentrada, em aparelho evaporador rotativo acoplado a vácuo, em temperatura de 45°C, e o procedimento foi concluído em aparelho de banho-maria, também em temperatura de 45°C, até se obter o volume final de 150 mL desta fração extrativa. Este volume foi acrescentado à primeira fração reservada, totalizando 1.000 mL de extrato fluido na proporção de 1:1 (ativos solúveis presentes em 1.000 g da droga vegetal, dissolvidos em 1.000 mL de extrato fluido hidroetanólico).

Uma alíquota, equivalente a 500 g, do extrato fluído obtido foi evaporado para fins de redução do teor de etanol, sendo este processo iniciado em aparelho evaporador rotativo a 45°C, sob vácuo, e concluído em banho-maria. A evaporação foi conduzida, em temperatura de 45°C, até uma redução de 75% da massa inicial do extrato, o que consiste na obtenção de uma massa de extrato hidroetanólico evaporado equivalente a 125 g. Este extrato hidroetanólico evaporado das folhas de *Symphytum officinale* L. foi identificado como “EHESo” (Figura 4).

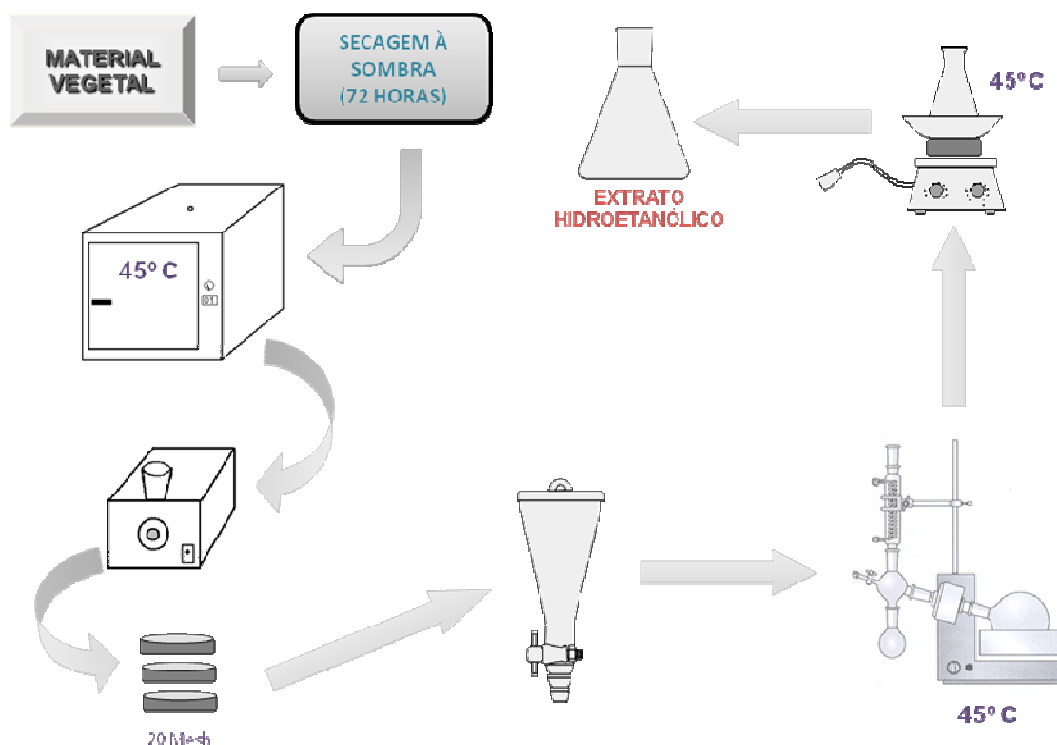


Figura 4 - Esquema demonstrativo do processo de produção da droga vegetal e do extrato hidroetanólico. Esquema cedido pelo Professor Lincoln Cardoso.

4.5 Preparo da amostra para administração aos animais

Foi preparada uma dispersão contendo 500 mg.mL^{-1} de EHESo em solução aquosa de Tween 80 (monoleato de sorbitano polioxietileno) a 12,0%. Esta dispersão foi utilizada para administração oral aos animais.

Os procedimentos acima descritos para preparo da droga vegetal e da amostra para administração aos animais foram realizados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Pindamonhangaba – FAPI pelo Professor Lincoln Cardoso.

4.6 Tratamento homeopático

Foram administrados a cada animal do grupo homeopático (H), através de gavagem, 02 glóbulos de sacarose impregnados de *Symphytum officinallis* 6CH dissolvidos em um ml de água filtrada por dia (Figura 5). A dose foi escolhida a partir dos princípios básicos de homeopatia, segundo a qual o efeito da droga não depende tanto do número de glóbulos administrados, mas do acerto do medicamento escolhido (Kossak-Romanach, 2003). O tratamento iniciou no dia da cirurgia da confecção do defeito ósseo e continuou até o dia anterior à eutanásia, dependendo do período experimental. O medicamento homeopático foi adquirido na Pharmaciantiga Homeopatia, São José dos Campos – SP.

4.7 Tratamento fitoterápico

Foram administrados a cada animal do grupo fitoterápico (F), através de gavagem, 500 mg/Kg de extrato de *Symphytum officinale* L. por dia (Figura 5). O tratamento foi iniciado no dia da confecção do defeito ósseo e continuou até o dia anterior à eutanásia, variando de acordo com cada período experimental. Cada animal foi pesado semanalmente para cálculo da dose. A dose de 500mg/Kg foi escolhida por não haver na literatura uma dose definida para ação da planta na reparação óssea.

4.8 Grupo controle

Foram administrados a cada animal do grupo controle (C), através de gavagem, 02 glóbulos de sacarose sem medicamento homeopático ou fitoterápico, dissolvidos em um ml de água filtrada por dia (Figura 5), iniciando no dia da cirurgia da confecção do defeito ósseo e continuando até o dia anterior à eutanásia, conforme o período experimental. Os glóbulos foram adquiridos na Pharmaciantiga Homeopatia, São José dos Campos – SP.



Figura 5 – Da esquerda para direita: Medicamento homeopático e fitoterápico. Animal recebendo tratamento através de gavagem.

4.9 Eutanásia e coleta da tíbia

Para a eutanásia, os animais foram submetidos à anestesia geral profunda e sangria. As tíbias foram retiradas e imediatamente fixadas em formol a 10%.

4.10 Análise da reparação óssea por microtomografia

A reparação óssea foi avaliada através da análise pelo microtomógrafo de raios-X Sky Scan modelo 1172 e com os softwares NRecon, Dataviewer, CT-Analyzer e CT-Vol (Figura 6). A captação dos dados desta análise foi realizada no Laboratório 3D Bio localizado no Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP.



Figura 6 – Microtomógrafo de raios-X Sky Scan modelo 1172.

A avaliação foi feita de acordo com as seguintes etapas:

- a) escaneamento das tíbias com os parâmetros de: 100 KV, 100 μ A, filtro de alumínio de 0,5 mm e com resolução de 4,96192 μ m;
- b) reconstrução utilizando-se o programa NRecon;
- c) após a visualização no programa Dataviewer, nas vistas coronal, transversal e sagital (Figura 7) foi criado um *dataset* a partir da vista sagital para análise da reparação óssea.

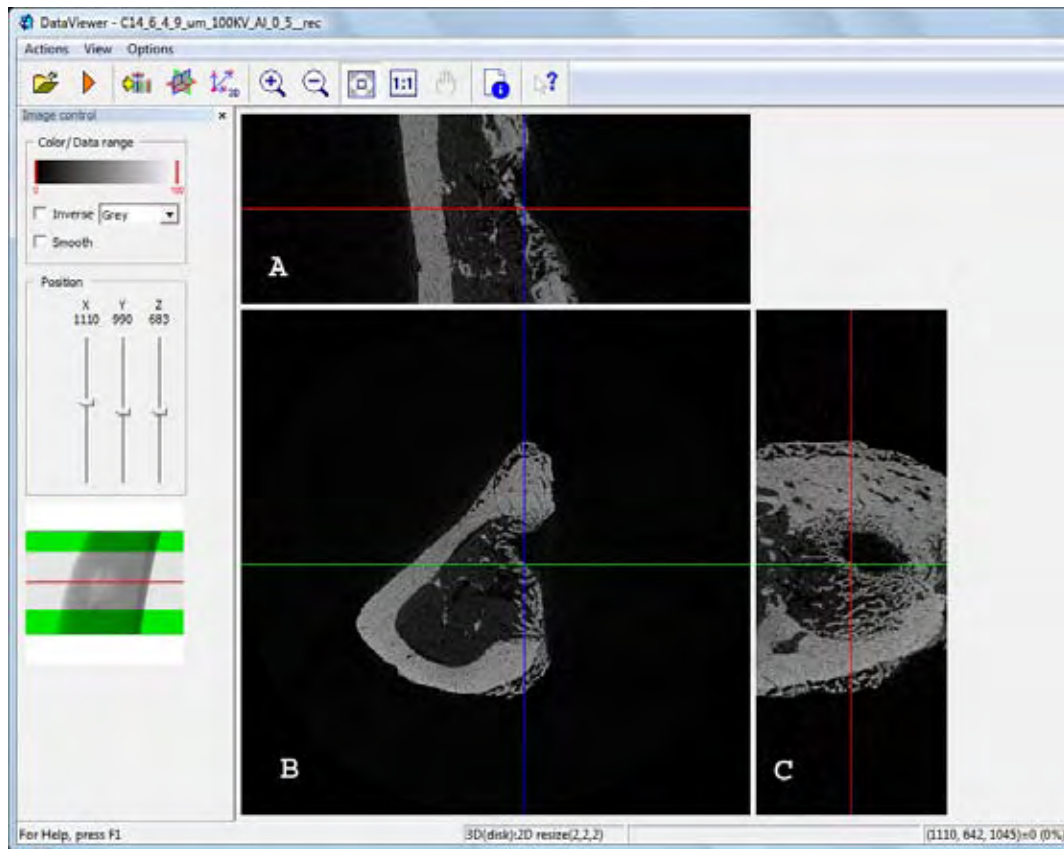


Figura 7 – Software DataViewer exibindo os cortes nas vistas coronal (A), transversal (B) e sagital (C).

- d) Através do programa CTAn, na vista sagital, foi feita a seleção de uma região de interesse (ROI) circular, que teve seu diâmetro estabelecido em 2,5 mm por ser do mesmo tamanho da broca utilizada para confecção do defeito ósseo (Figura 8).

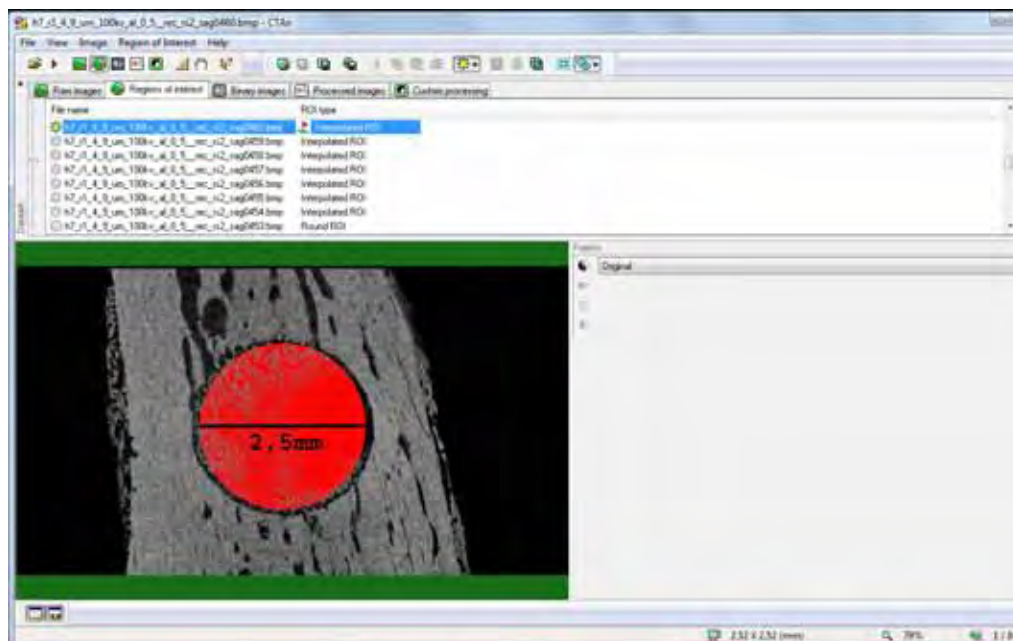


Figura 08 – Software CT-analyzer (CTAn) mostrando o ROI circular de 2,5 mm de diâmetro.

e) Ainda no programa CTAn foi criado um Volume de interesse (VOI), a partir do ROI circular. Foram utilizados 162 cortes (*slices*) da tíbia para compor o VOI (Figura 9). Foi escolhido este valor, por ser o número de cortes (*slices*) máximo em que o VOI não invadiria o osso cortical de nenhuma das 72 tíbias, o que poderia alterar os resultados do estudo. O presente VOI tem volume de 8 mm^3 .

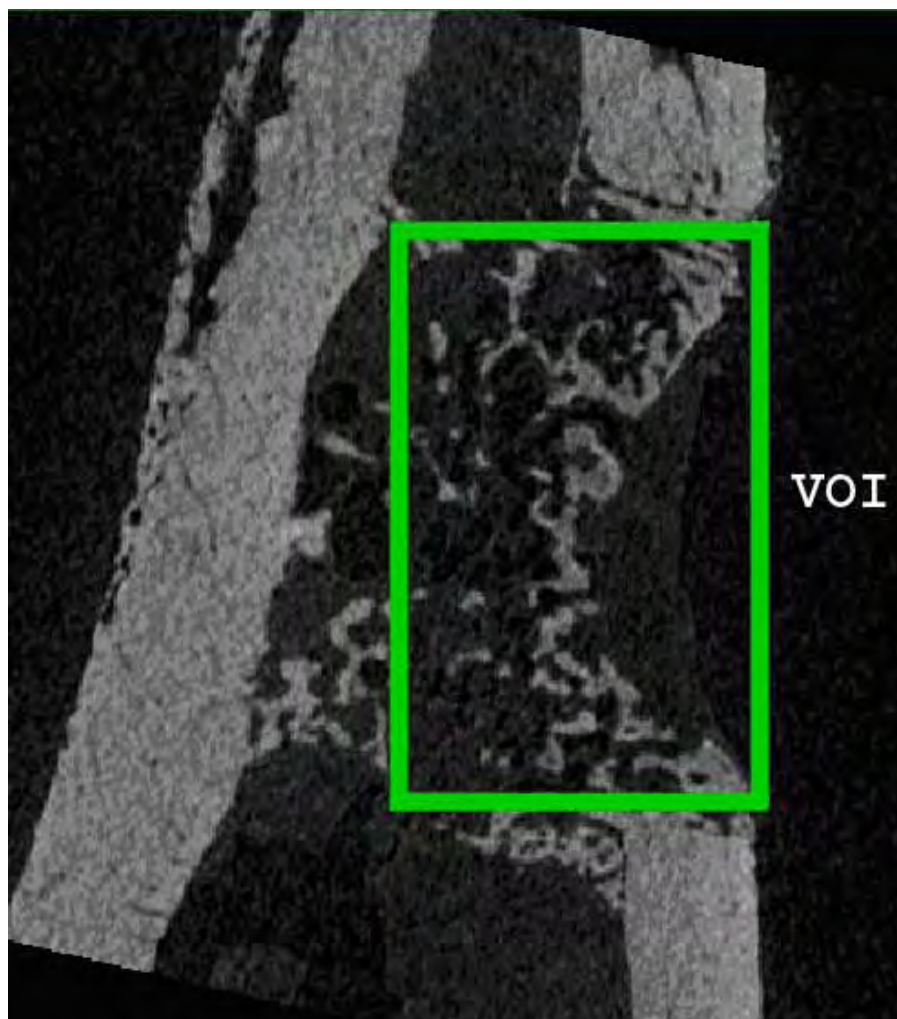


Figura 9 –VOI pela vista coronal.

- f) após a visualização 2D, foi feita a binarização das reconstruções microtomográficas;
- g) foram utilizados os seguintes *thresholds* mínimo e máximo: 62 e 184;
- h) foi realizada a medida dos valores 3D de BV, Tb.pf, I.S e BS/BV do VOI selecionado (Figura 10).

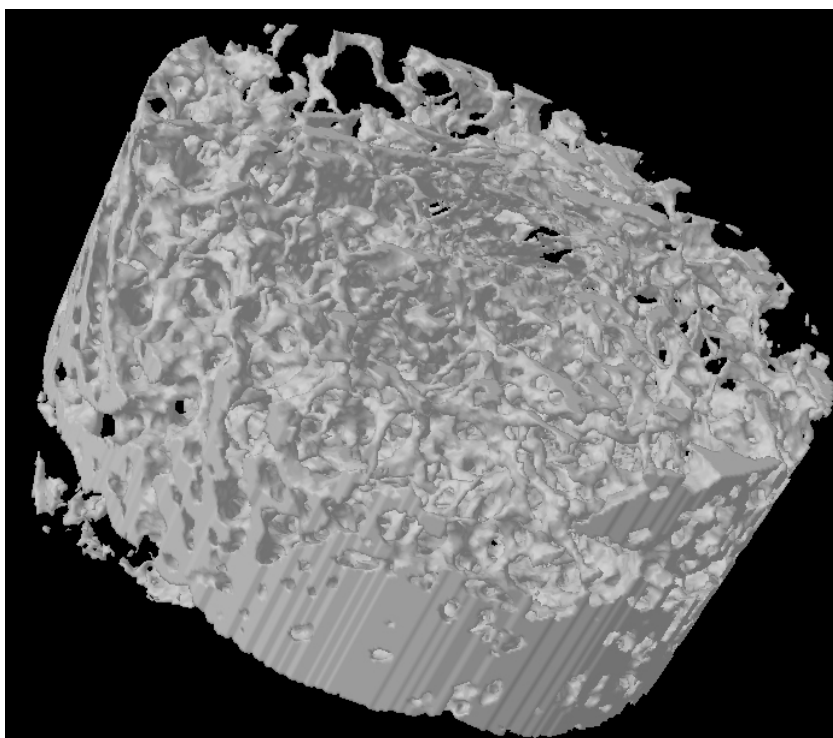


Figura 10 – Visualização 3D do VOI a partir do *software* CT-Vol.

4.11 Descalcificação

As tíbias foram descalcificadas em solução de EDTA 10% na FOSJC-UNESP. Para a aceleração da reação as tíbias foram submetidas a ciclos de 15 min em forno de micro-ondas Pelco – *Laboratory Microwave System Model 3440* (Figura 11). Este forno de micro-ondas teve sua temperatura controlada para o máximo de 33 °C por meio de um resfriador *Microwave Load Cooler Model 3420*. Esta parte do procedimento foi realizada no forno que está localizado no Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic – Campinas – Brasil.



Figura 11 – Forno de micro-ondas utilizado para acelerar o processo de descalcificação das tíbias.

4.12 Análise histológica

Os fragmentos ósseos contendo a lesão foram incluídos em blocos de parafina, com a superfície de corte no sentido transversal, tangente à borda do defeito ósseo. Então foram submetidos às técnicas laboratoriais de rotina para o preparo de lâminas. Os blocos foram desgastados até o centro do defeito ósseo, a partir daí foram obtidas quatro lâminas contendo cortes seriados de 5 μ m que foram corados por HE (duas lâminas) e Tricrômio de Mallory (duas lâminas).

Na análise histológica descritiva foram observados os aspectos do desenvolvimento da reparação óssea, avaliando-se a formação do tecido de granulação, a neoformação óssea, o arranjo de trabéculas ósseas imaturas e a maturação óssea até a remodelação final. Para tanto foi utilizada um quadro para nortear esta análise

semiquantitativa (Quadro 1, 2 e 3). A análise histológica descritiva foi realizada por um único observador que foi previamente calibrado.

4.13 Análise histomorfométrica

Para análise histomorfométrica, os cortes foram fotografados com microscópio de luz Zeiss Axioskop 40 (Carl Zeiss do Brasil), com câmera digital acoplada Canon, modelo Power Shot A640. Foram obtidas três imagens digitais (formato JPEG) em aumento de 25x, de 3 cortes para cada animal, da região mais central do defeito, que foram usadas para análise quantitativa do tecido de reparação óssea e do tecido ósseo neoformado neste.

Foi utilizado o programa *Image J* (*U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA* - <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), versão 1.31 para *Windows*. Foi calculada a área em *pixels*² de uma região delimitada que incluiu todo o defeito criado e o canal medular adjacente, chamada de área A, e também foi calculada uma segunda área formada pela delimitação de toda a área preenchida pelo tecido de reparação óssea neoformado, chamada de área B. Usando-se os valores obtidos calculou-se a proporção percentual de área preenchida pelo tecido de reparação óssea neoformado (B) em relação à área total disponível no osso (A) no corte analisado segundo a equação:

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

Desta forma foi mensurada a área média do calo ósseo neoformado em relação à área total do defeito e do espaço disponível no osso em questão (figura 12).

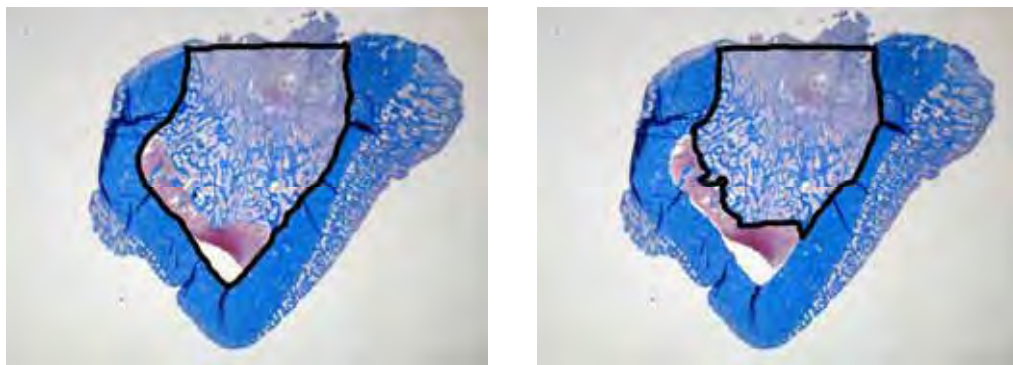


Figura 12 – À esquerda delimitação da área que abrange todo o defeito ósseo e o canal medular (área A). À direita delimitação da área preenchida pelo tecido de reparação óssea neoformado (área B).

A seguir, foi utilizada a ferramenta *magic wand* do programa *Adobe Photoshop*, versão 7.0, para selecionar somente as trabéculas ósseas presentes no tecido de reparação óssea. 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) conversão da imagem para escala de cinza:
Image-Type-8-bit;
- b) *threshold* da imagem: *Process-Binary-Threshold*;
- c) medição da área: *Analyze-Analyze Particles*.

Com esses passos a área analisada (trabéculas) foi delimitada e medida automaticamente em *pixels*. A proporção de osso neoformado foi calculada através da relação entre a área ocupada somente pelas trabéculas ósseas neoformadas (área C) e a área preenchida por tecido de reparação óssea (área B) segundo a equação:

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

Esse cálculo permite o conhecimento da proporção entre trabéculas ósseas e espaço intertrabecular e da área ocupada por tecido ósseo no calo ósseo (Figura 13).

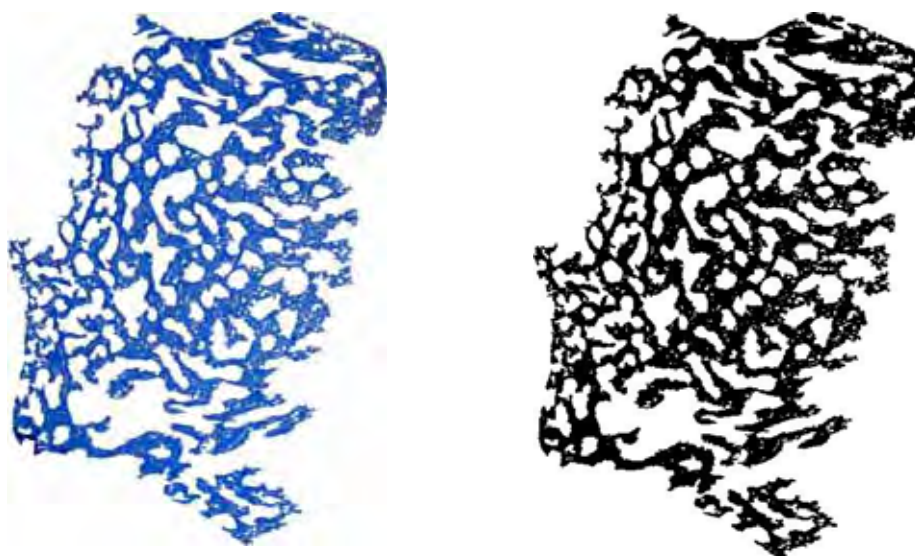


Figura 13 – À esquerda observam-se as trabéculas ósseas isoladas da área B, após seleção pelo programa *Adobe Photoshop*. À direita, observa-se a imagem após conversão para escala de cinza (área C).

Foi realizada uma análise cega dos dados. O valor da porcentagem de preenchimento por tecido de reparação e a porcentagem de osso neoformado nessa área, por animal, corresponderam à média dos valores obtidos nas três fotomicrografias analisadas. A leitura foi feita por apenas um observador. Esta metodologia foi utilizada por Senra, 2006.

4.14 Delineamento estatístico

A variável resposta (ou dependente) foi a reparação óssea. Esta foi medida por meio das variáveis em análise obtidas pela microtomografia: Volume ósseo (mm^3), Fator de padrão trabecular (1/mm), Superfície de intersecção (mm^2), Razão entre área óssea e volume ósseo (1/mm). E pelas variáveis em análise obtidas pela histomorfometria: proporção de área de preenchimento (%) e proporção de osso neoformado (%).

Os dados obtidos por meio das análises microtomográficas e histomorfométricas foram analisados de forma descritiva e inferencial. Para a análise inferencial foi utilizado o teste estatístico de análise de variância (ANOVA) 1 fator e o teste de comparação múltipla de Tukey, com nível de significância de 5%. Quando se observou que as suposições do modelo ANOVA não foram válidas, foi utilizado o teste estatístico ANOVA não paramétrica de Kruskal-Wallis e o teste de comparação múltipla de Dunn, utilizando-se também o nível de significância de 5%.

A análise estatística comparou a ação do *Symphytum officinale* L. fitoterápico (F), homeopático (H) e o controle (C) em cada período experimental, separadamente (7, 14, 21 e 30 dias). Uma vez que devido as etapas observadas na reparação óssea, não haveria sentido a comparação entre períodos diferentes.

5 RESULTADOS

A análise dos dados obtidos será apresentada a seguir, primeiramente os obtidos através das análises de microtomografia, seguido dos dados da análise histomorfométrica e finalizando com a análise histológica descritiva, da região do defeito ósseo nas tíbias, nos diferentes tempos experimentais.

5.1 Análises da microtomografia

Serão apresentados os resultados das análises de microtomografia de Volume ósseo (BV), Fator de padrão trabecular (Tb.pf), Superfície de Intersecção (I.S) e Razão entre área óssea e o volume ósseo da amostra (BS/BV).

5.1.1 Volume ósseo (BV)

Os dados da estatística descritiva relativa ao BV obtido através da μ TC estão representados na Tabela 1 e Figura 14.

Tabela 1 - Medida de tendência central (média) e de dispersão (desvio padrão) dos valores de BV (mm^3) nos grupos controle, homeopático e fitoterápico nos períodos de 7, 14, 21 e 30 dias

| Tratamento | Tempo (dias) | N | ($m \pm dp$) mm^3 |
|------------|--------------|---|------------------------------|
| C | 7 | 6 | 0,447 \pm 0,119 |
| H | 7 | 6 | 0,439 \pm 0,293 |
| F | 7 | 6 | 0,565 \pm 0,245 |
| C | 14 | 6 | 1,989 \pm 0,371 |
| H | 14 | 6 | 2,056 \pm 0,517 |
| F | 14 | 6 | 1,512 \pm 0,152 |
| C | 21 | 6 | 1,572 \pm 0,281 |
| H | 21 | 6 | 2,140 \pm 0,633 |
| F | 21 | 6 | 1,807 \pm 0,360 |
| C | 30 | 6 | 2,415 \pm 0,291 |
| H | 30 | 6 | 2,329 \pm 0,608 |
| F | 30 | 6 | 1,926 \pm 0,218 |

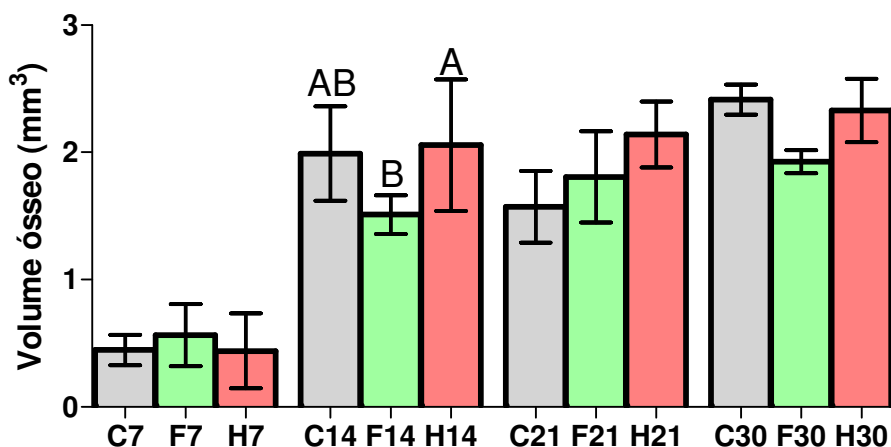


Figura 14 – Gráfico de colunas (Média \pm desvio padrão) dos valores de BV (mm^3) para os grupos C, F e H nos períodos de 7, 14, 21 e 30 dias. Letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes.

Uma análise comparativa de BV entre os grupos controle, homeopático e fitoterápico para o período de 7, 14, 21 e 30 dias

foi efetuada por meio do teste ANOVA 1 fator. Os resultados para o período de 7 dias estão na Tabela 2, para o período de 14 dias estão na Tabela 3, para o período de 21 dias na Tabela 5 e para o período de 30 dias na Tabela 6.

Tabela 2 – Resultado da ANOVA para o período de 7 dias referente aos dados de BV nos grupos H, C e F

| Efeito | gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|---------|---------|------|---------|
| Tratamento | 2 | 0,05918 | 0,02959 | 0,55 | 0,586 |
| Resíduo | 15 | 0,80169 | 0,05345 | | |
| Total | 17 | 0,86086 | | | |

Quando se avalia comparativamente a influência dos tratamentos (F e H) e do grupo controle no período de sete dias, através do teste ANOVA 1 fator, pode-se verificar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,586$).

Os dados do volume ósseo obtidos durante a análise da μ TC no período de 14 dias foram transformados na escala logarítmica decimal pelo fato de não ocorrer a mesma dispersão dos valores de desvio padrão em cada grupo, que é uma suposição do modelo ANOVA paramétrico.

Tabela 3 - Resultados da ANOVA para o período de 14 dias referentes aos dados de BV nos grupos H, C e F

| Efeito | gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|----------|----------|------|---------|
| Tratamento | 2 | 0,056680 | 0,028340 | 3,84 | 0,045* |
| Resíduo | 15 | 0,110699 | 0,007380 | | |
| Total | 17 | 0,167379 | | | |

* $p < 0,05$

No período de 14 dias, verifica-se que a hipótese de igualdade (H_0) entre os grupos C, H e F foi rejeitada ($p= 0,045 < 0,05$). Quando se aplica o teste de comparação múltipla de Tukey (5%), observam-se os efeitos dos tratamentos neste período conforme a Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados do teste de comparação múltipla de Tukey (5%) no período de 14 dias. Formação de grupos homogêneos em relação aos tratamentos, para BV

| Tratamento | Média | Grupos Homogêneos* |
|------------|-------|--------------------|
| H | 2,056 | A |
| C | 1,989 | A B |
| F | 1,512 | B |

*conjuntos que apresentam letras iguais indicam diferença não estatisticamente significativa

Através dos resultados estatísticos apresentados na Tabela 4, verifica-se que o grupo H apresenta BV maior em relação ao grupo F. Sendo esta diferença estatisticamente significativa. Ainda, constata-se que não há diferença estatística entre o grupo C em relação aos grupos H ou F.

Tabela 5 - Resultado da ANOVA para o período de 21 dias referente aos dados de BV nos grupos H, C e F

| Efeito | gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|--------|--------|------|---------|
| Tratamento | 2 | 0,9768 | 0,4884 | 2,40 | 0,124 |
| Resíduo | 15 | 3,0478 | 0,2032 | | |
| Total | 17 | 4,0246 | | | |

No período de 21 dias, através da ANOVA, não foi possível rejeitar a hipótese de igualdade (H_0) entre os grupos, C($1,572 \pm 0,281$), F($1,807 \pm 0,360$) e H($2,140 \pm 0,633$).

Tabela 6 - Resultados da ANOVA para o período de 30 dias, referentes ao BV nos grupos H, C e F

| Efeito | gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|--------|--------|------|---------|
| Tratamento | 2 | 0,8184 | 0,4092 | 2,44 | 0,121 |
| Resíduo | 15 | 2,5125 | 0,1675 | | |
| Total | 17 | 3,3309 | | | |

Pode-se verificar que não foi possível rejeitar a hipótese de igualdade (H_0) entre os três medicamentos, C($2,415 \pm 0,291 \text{ mm}^3$), F ($1,9259 \pm 0,218 \text{ mm}^3$), H ($2,329 \pm 0,608 \text{ mm}^3$).

Para uma melhor visualização do comportamento dos grupos durante o tempo de reparação é apresentado um gráfico de médias na Figura 15.

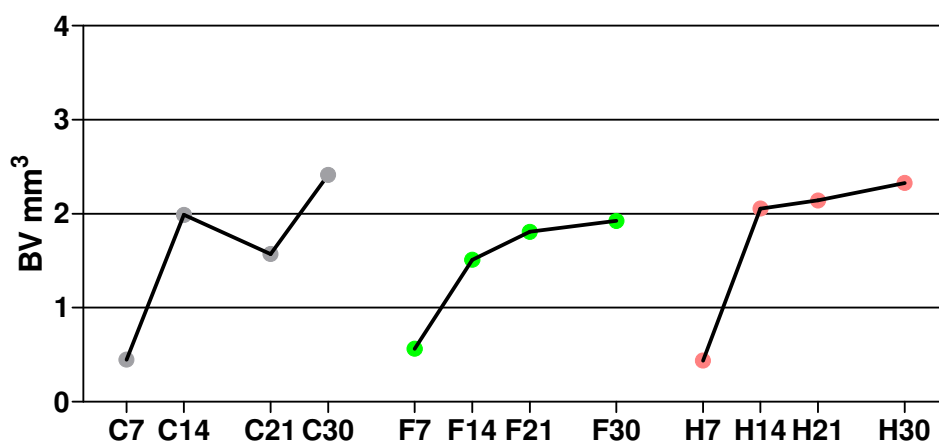


Figura 15 – Gráfico de médias dos grupos C, F e H no decorrer dos períodos experimentais de 7, 14, 21 e 30 dias para os valores de BV.

5.1.2 Fator de padrão trabecular – Tb.pf

Os dados da estatística descritiva do fator de padrão trabecular (Tb.pf) (1/mm) obtido através da μ TC estão representados na Tabela 7 e Figura 16. O rato 5 do grupo C21, estava com um valor muito discrepante por isso para a análise estatística ele foi retirado do grupo e portanto neste grupo o n foi 5.

Tabela 7 - Medida de tendência central (média) e de dispersão (desvio padrão) de Tb.pf (1/mm) nos grupos controle, homeopático e fitoterápico nos períodos de 7, 14, 21 e 30 dias

| Tratamento | Tempo (dias) | N | Tb.pf(m±dp) 1/mm |
|------------|--------------|---|---------------------|
| C | 7 | 6 | 35,37±7,77 |
| H | 7 | 6 | 28,04±17,58 |
| F | 7 | 6 | 36,28±8,83 |
| C | 14 | 6 | -3,06±4,09 |
| H | 14 | 6 | -5,76±6,74 |
| F | 14 | 6 | -0,0995±7,49 |
| C | 21 | 5 | 2,18±3,46 |
| H | 21 | 6 | -18,67±7,76 |
| F | 21 | 6 | -8,10±3,03 |
| C | 30 | 6 | -22,53±10,06 |
| H | 30 | 6 | -27,70±9,46 |
| F | 30 | 6 | -23,19±9,59 |

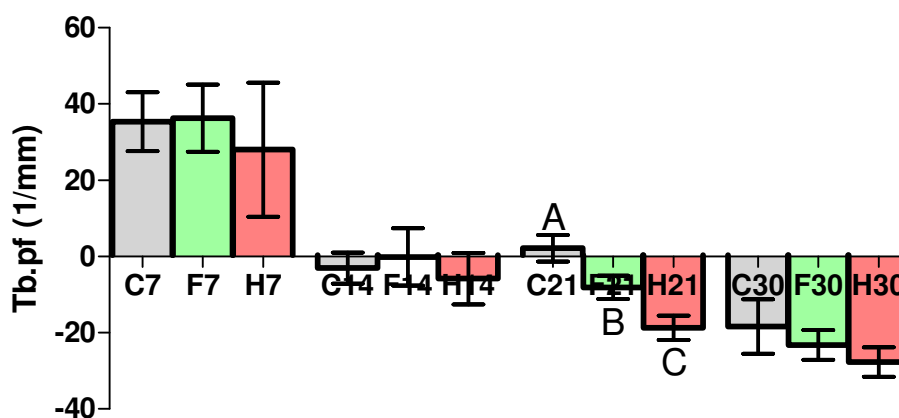


Figura 16 – Gráfico de colunas (Média ± desvio padrão) dos valores de padrão trabecular (1/mm) para os grupos C, F e H nos períodos de 7, 14, 21 e 30 dias. Letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas.

Uma análise comparativa do Tb.pf entre os grupos homeopático, fitoterápico e controle para o período de 7, 14, 21 e 30 dias foi efetuada por meio do teste ANOVA 1 fator. Os resultados para o período de 7 dias estão na Tabela 8, para o período de 14 dias estão na Tabela 9, para o período de 21 dias na Tabela 10 e para o período de 30 dias na Tabela 12.

Tabela 8 – Resultado da ANOVA para o período de 07 dias referente aos dados de Tb.pf nos grupos H, C e F

| Efeito | gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|------|-----|------|---------|
| Tratamento | 2 | 245 | 123 | 0,82 | 0,458 |
| Resíduo | 15 | 2237 | 149 | | |
| Total | 17 | 2482 | | | |

Quando se avalia comparativamente a influência dos tratamentos (F e H) e do grupo controle no período de sete dias, através do teste ANOVA 1 fator, pode-se verificar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,458$).

Tabela 9 - Resultados da ANOVA para o período de 14 dias referentes aos dados de Tb.pf nos grupos H, C e F

| Efeito | gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|-------|------|------|---------|
| Tratamento | 2 | 96,2 | 48,1 | 1,22 | 0,323 |
| Resíduo | 15 | 591,7 | 39,4 | | |
| Total | 17 | 687,9 | | | |

No período de 14 dias, verifica-se que a hipótese de igualdade (H_0) entre os grupos C ($-3,06 \pm 4,09$), H ($-5,76 \pm 6,74$) e F ($-0,0995 \pm 7,49$) não foi rejeitada ($p= 0,323$).

No grupo C do período de 21 dias, um dos animais apresentou fator de padrão trabecular muito discrepante em relação aos demais, por isso para na análise estatística deste grupo o n foi 5.

Tabela 10 - Resultados da ANOVA para o período de 21 dias referentes aos dados de Tb.pf nos grupos H, C e F

| Efeito | gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|--------|-------|-------|---------|
| Tratamento | 2 | 1190,1 | 595,0 | 21,11 | 0,001* |
| Resíduo | 14 | 394,7 | 28,2 | | |
| Total | 16 | 1584,8 | | | |

* $p < 0,05$

No período de 21 dias, verifica-se que a hipótese de igualdade (H_0) entre os grupos C ($2,18 \pm 3,46$), H ($-18,67 \pm 7,76$) e F ($-8,10 \pm 3,03$) foi rejeitada ($p = 0,001 < 0,05$). Quando se aplica o teste de comparação múltipla de Tukey (5%), observam-se os efeitos dos tratamentos neste período conforme a Tabela 11.

Tabela 11 - Resultados do teste de comparação múltipla de Tukey (5%) no período de 21 dias. Formação de grupos homogêneos em relação aos tratamentos, para Tb.pf

| Tratamento | Média | Grupos Homogêneos* |
|------------|---------|--------------------|
| C21 | 2,177 | A |
| F21 | -8,101 | B |
| H21 | -18,671 | C |

*conjuntos que apresentam letras iguais indicam diferença não estatisticamente significante

Os resultados estatísticos apresentados na Tabela 11 mostram que o grupo C apresenta Tb.pf maior em relação ao grupo F e H. Consta-se também que o grupo F apresenta Tb.pf maior em relação ao grupo H. Sendo estas diferenças estatisticamente significantes.

Tabela 12 - Resultado da ANOVA para o período de 30 dias referente aos dados de Tb.pf nos grupos H, C e F

| Efeito | gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|--------|------|------|---------|
| Tratamento | 2 | 94,8 | 47,4 | 0,50 | 0,614 |
| Resíduo | 15 | 1413,1 | 94,2 | | |
| Total | 17 | 1507,9 | | | |

Pode-se verificar na tabela 12 que não foi possível rejeitar a hipótese de igualdade (H_0) entre os tratamentos, C ($-22,53 \pm 10,06$ 1/mm), F ($-23,19 \pm 9,59$ 1/mm³), H ($-27,70 \pm 9,46$ 1/mm) no período de 30 dias.

Para uma melhor visualização do Tb.pf em relação ao comportamento dos grupos durante o tempo de reparação é apresentado um gráfico de médias na Figura 17.

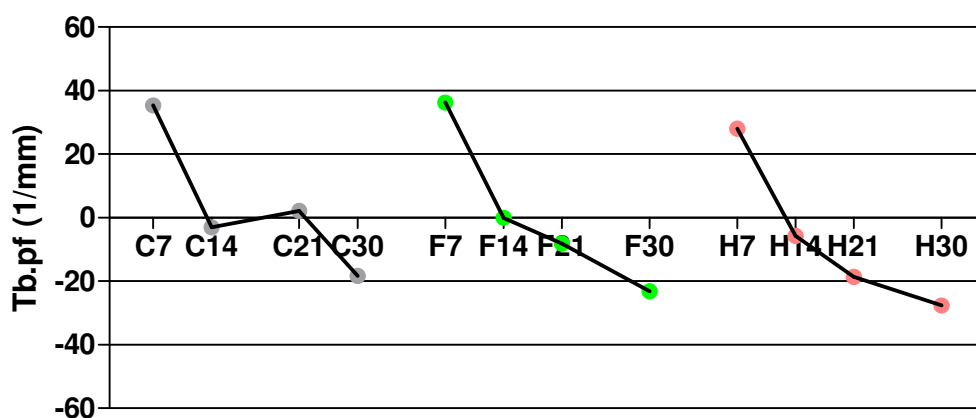


Figura 17 – Gráfico de médias dos grupos C, F e H no decorrer dos períodos experimentais para os dados de fator de padrão trabecular.

5.1.3 Superfície de intersecção – I.S

Os dados da estatística descritiva da superfície de intersecção (I.S) (mm^2) obtido através da μTC estão representados na Tabela 13 e Figura 18.

Tabela 13 - Medida de tendência central (média) e de dispersão (desvio padrão) da superfície de intersecção (mm^2) nos grupos controle, homeopático e fitoterápico nos período de 7, 14, 21 e 30 dias

| Tratamento | Tempo (dias) | N | I.S($m \pm dp$) mm^2 |
|------------|--------------|---|---------------------------------|
| C | 7 | 6 | 2,038 \pm 0,438 |
| H | 7 | 6 | 1,516 \pm 0,690 |
| F | 7 | 6 | 1,698 \pm 0,409 |
| C | 14 | 6 | 6,118 \pm 1,148 |
| H | 14 | 6 | 5,339 \pm 1,145 |
| F | 14 | 6 | 5,036 \pm 0,578 |
| C | 21 | 6 | 5,669 \pm 1,711 |
| H | 21 | 6 | 6,126 \pm 1,168 |
| F | 21 | 6 | 5,066 \pm 0,850 |
| C | 30 | 6 | 6,472 \pm 0,800 |
| H | 30 | 6 | 6,076 \pm 1,125 |
| F | 30 | 6 | 6,126 \pm 0,613 |

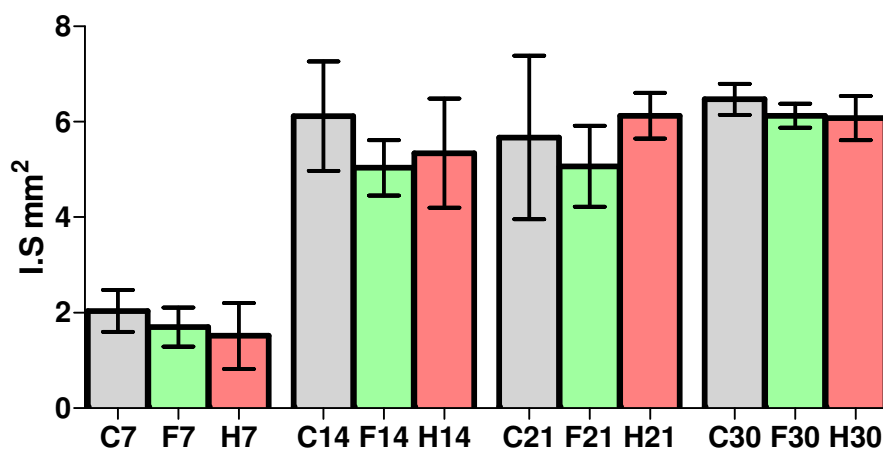


Figura 18 – Gráfico de colunas (Média \pm desvio padrão) dos valores de I.S. (mm^2) para os grupos C, F e H nos períodos de 7, 14, 21 e 30 dias.

Uma análise comparativa de I.S. entre os grupos homeopático, fitoterápico e controle para o período de 7, 14, 21 e 30 dias foi efetuada por meio do teste ANOVA 1 fator. Os resultados para o período de 7 dias estão na Tabela 14, para o período de 14 dias estão na Tabela 15, para o período de 21 dias na Tabela 16 e para o período de 30 dias na Tabela 17.

Tabela 14 – Resultado da ANOVA para o período de 07 dias referente aos dados de I.S. nos grupos H, C e F

| Efeito | Gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|-------|-------|------|---------|
| Tratamento | 2 | 0,842 | 0,421 | 1,51 | 0,252 |
| Resíduo | 15 | 4,176 | 0,278 | | |
| Total | 17 | 5,018 | | | |

Quando se avalia comparativamente a influência dos tratamentos (F e H) e do grupo controle no período de sete dias, para os valores de I.S, através do teste ANOVA 1 fator, pode-se verificar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,252$).

Tabela 15 - Resultados da ANOVA para o período de 14 dias referentes aos dados de I.S nos grupos H, C e F

| Efeito | Gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|--------|-------|------|---------|
| Tratamento | 2 | 3,738 | 1,869 | 1,89 | 0,185 |
| Resíduo | 15 | 14,813 | 0,988 | | |
| Total | 17 | 18,551 | | | |

No período de 14 dias, verifica-se que a hipótese de igualdade (H_0) entre os grupos não foi rejeitada ($p= 0,185$).

Tabela 16 - Resultados da ANOVA para o período de 21 dias referentes aos dados de I.S nos grupos H, C e F.

| Efeito | gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|-------|------|------|---------|
| Tratamento | 2 | 3,39 | 1,70 | 1,01 | 0,386 |
| Resíduo | 15 | 25,07 | 1,67 | | |
| Total | 17 | 28,46 | | | |

No período de 21 dias, verifica-se que a hipótese de igualdade (H_0) entre os grupos C, H e F não foi rejeitada ($p= 0,386 > 0,05$).

Tabela 17 - Resultado da ANOVA para o período de 30 dias referente aos dados de I.S nos grupos H, C e F

| Efeito | gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|--------|-------|------|---------|
| Tratamento | 2 | 0,558 | 0,279 | 0,37 | 0,699 |
| Resíduo | 15 | 11,405 | 0,760 | | |
| Total | 17 | 11,963 | | | |

Pode-se verificar que não foi possível rejeitar a hipótese de igualdade (H_0) entre os tratamentos.

5.1.4 Razão entre a área óssea e o volume ósseo – BS/BV

Os dados da estatística descritiva da razão entre a área superficial das trabéculas ósseas e o volume ósseo da amostra – BS/BV obtida através da μ TC estão representados na Tabela 18 e Figura 19.

Tabela 18 - Medida de tendência central (média) e de dispersão (desvio padrão) BS/BV(1/mm) nos grupos controle, homeopático e fitoterápico nos períodos de 7, 14, 21 e 30 dias

| Tratamento | Tempo (dias) | N | BS/BV(m±dp)1/mm |
|------------|--------------|---|-----------------|
| C | 7 | 6 | 134,05±14,73 |
| H | 7 | 6 | 121,80±19,88 |
| F | 7 | 6 | 133,25±8,54 |
| C | 14 | 6 | 54,82±5,44 |
| H | 14 | 6 | 58,56±6,72 |
| F | 14 | 6 | 57,14±2,82 |
| C | 21 | 6 | 41,05±3,79 |
| H | 21 | 6 | 36,77±8,60 |
| F | 21 | 6 | 40,68±3,79 |
| C | 30 | 6 | 25,59±5,08 |
| H | 30 | 6 | 25,04±5,42 |
| F | 30 | 6 | 27,56±4,57 |

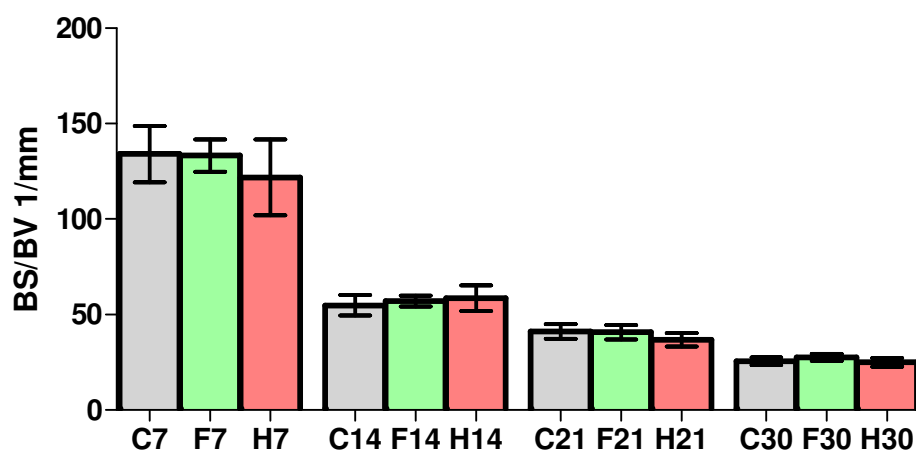


Figura 19 – Gráfico de colunas (Média ± desvio padrão) dos valores BS/BV (1/mm) para os grupos C, F e H nos períodos de 7, 14, 21 e 30 dias.

Uma análise comparativa de BS/BV entre os grupos homeopático, fitoterápico e controle para o período de 7, 14, 21 e 30 dias foi efetuada por meio do teste ANOVA 1 fator. Os resultados para o período de 7 dias estão na Tabela 19, para o período de 14 dias estão na Tabela 20, para o período de 21 dias na Tabela 21 e para o período de 30 dias na Tabela 22.

Tabela 19 – Resultado da ANOVA para o período de 07 dias referente aos dados de BS/BV, nos grupos H, C e F

| Efeito | Gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|------|-----|------|---------|
| Tratamento | 2 | 564 | 282 | 1,23 | 0,319 |
| Resíduo | 15 | 3426 | 228 | | |
| Total | 17 | 3990 | | | |

Quando se avalia comparativamente a influência dos tratamentos (F e H) e do grupo controle no período de 7 dias, através do teste ANOVA 1 fator, pode-se verificar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,319$).

Tabela 20 - Resultados da ANOVA para o período de 14 dias referentes aos dados de BS/BV nos grupos H, C e F

| Efeito | Gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|-------|------|------|---------|
| Tratamento | 2 | 43,0 | 21,5 | 0,78 | 0,476 |
| Resíduo | 15 | 413,4 | 27,7 | | |
| Total | 17 | 456,4 | | | |

No período de 14 dias, verifica-se que a hipótese de igualdade (H_0) entre os grupos não foi rejeitada ($p= 0,476 > 0,05$).

Tabela 21 - Resultados da ANOVA para o período de 21 dias referentes aos dados de BS/BV nos grupos H, C e F

| Efeito | gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|-------|------|------|---------|
| Tratamento | 2 | 67,7 | 33,8 | 0,99 | 0,395 |
| Resíduo | 15 | 513,5 | 34,2 | | |
| Total | 17 | 581,2 | | | |

No período de 21 dias, verifica-se que a hipótese de igualdade (H_0) entre os grupos C, H e F não foi rejeitada ($p = 0,395 > 0,05$).

Tabela 22 - Resultado da ANOVA para o período de 30 dias referente aos dados de BS/BV nos grupos H, C e F

| Efeito | gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|-------|------|------|---------|
| Tratamento | 2 | 21,0 | 10,5 | 0,41 | 0,668 |
| Resíduo | 15 | 380,1 | 25,3 | | |
| Total | 17 | 401,1 | | | |

Pode-se verificar que não foi possível rejeitar a hipótese de igualdade (H_0) entre os tratamentos ($p = 0,668$).

A Figura 20 ilustra as visualizações 3D obtidas através da microtomografia na região do defeito ósseo das tíbias dos animais. O software utilizado foi o CTVol.

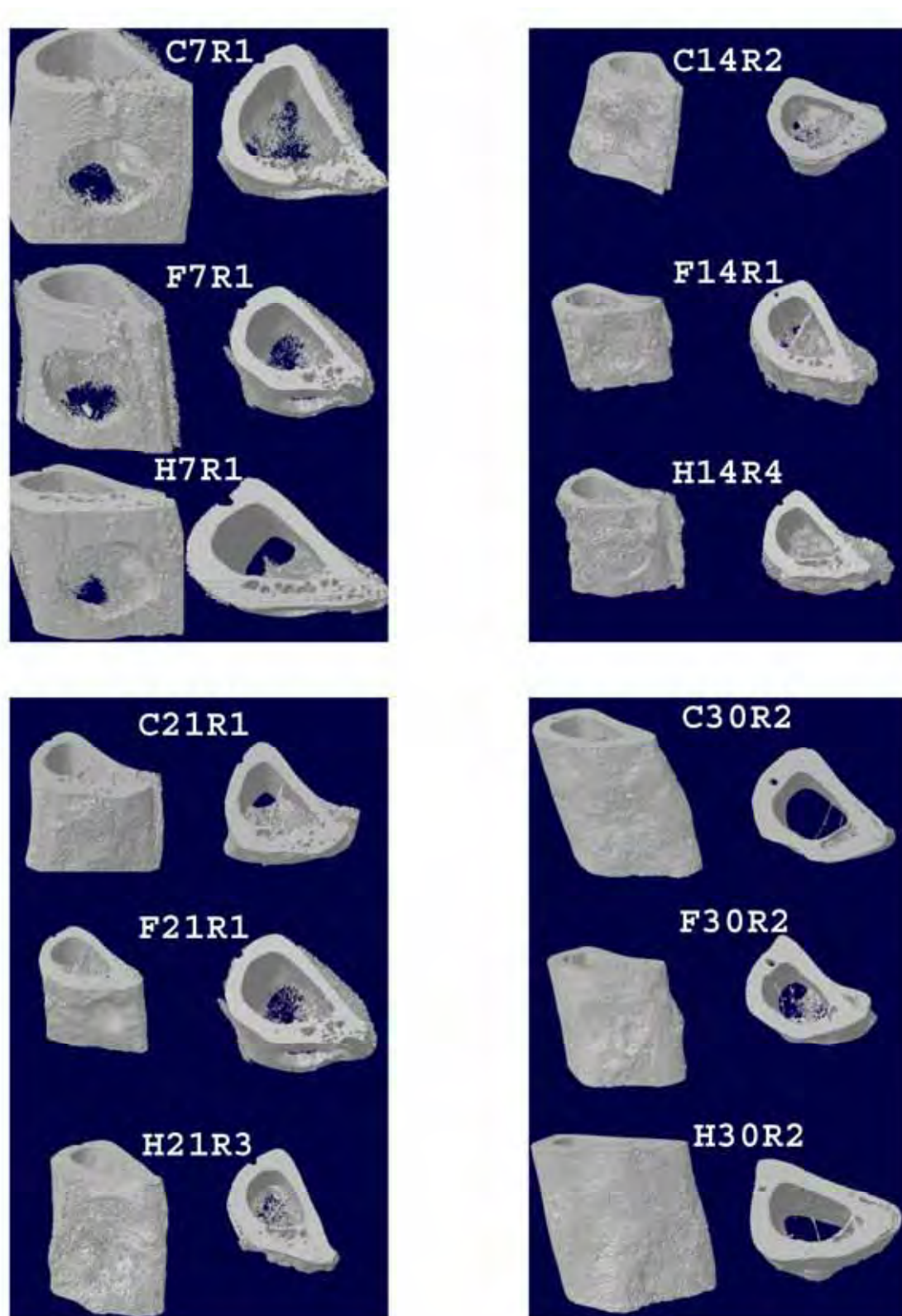


Figura 20 – Aspecto microtomográfico da reparação óssea nas vistas sagital e axial. É possível observar a diferença do processo de reparação óssea durante os períodos.

5.2 Análise histomorfométrica

Através da análise histomorfométrica foram obtidas duas variáveis em análise que serão apresentadas em sequência. Primeiramente foi realizada a medida da área de preenchimento por tecido de reparação, independente da natureza do conteúdo deste preenchimento. A outra variável resposta obtida corresponde à proporção da área de osso neoformado em relação a esta área de preenchimento.

5.2.1 Análise da área de preenchimento do defeito ósseo

A área de preenchimento por tecido de reparação corresponde à área do defeito ósseo mais o espaço medular que apresenta tecido neoformado, considerando-se tanto o tecido ósseo como o tecido mole intertrabecular. A estatística descritiva dos valores em porcentagem de preenchimento do defeito ósseo estão expressas na Tabela 23 e Figura 21. Nos seguintes animais: rato 2 do grupo H21, rato 5 do grupo C21, rato 5 do grupo C14 e rato 5 do grupo C7 o defeito ósseo da tíbia não pode ser localizado na lâmina histológica. Por essa razão não foi possível incluir estes animais nas análises histomorfométricas e o n nos referidos grupos é 5

Tabela 23 - Estatística descritiva da % de preenchimento por tecido de reparação nos grupos controle, homeopático e fitoterápico nos períodos de 7, 14, 21 e 30 dias

| Grupos | N | %(m±dp) | Min | Mediana | Máx | Faixa |
|--------|---|-------------|-------|---------|-------|-------|
| C7 | 5 | 90,43±5,15 | 85,84 | 87,74 | 96,60 | 10,76 |
| H7 | 6 | 65,51±12,49 | 54,06 | 63,25 | 87,62 | 33,56 |
| F7 | 6 | 77,69±11,00 | 61,38 | 77,27 | 92,63 | 31,25 |
| C14 | 5 | 65,54±20,01 | 33,54 | 70,49 | 85,37 | 51,83 |
| H14 | 6 | 80,91±18,01 | 57,90 | 84,61 | 98,89 | 40,99 |
| F14 | 6 | 72,92±5,85 | 66,95 | 73,07 | 78,43 | 11,48 |
| C21 | 5 | 42,66±19,97 | 13,71 | 53,99 | 58,54 | 44,83 |
| H21 | 5 | 40,70±20,12 | 21,86 | 29,71 | 67,07 | 45,21 |
| F21 | 6 | 35,40±9,71 | 20,35 | 36,25 | 46,63 | 26,29 |
| C30 | 6 | 37,90±6,85 | 28,86 | 36,30 | 47,08 | 18,21 |
| H30 | 6 | 40,75±12,45 | 24,20 | 45,12 | 55,23 | 31,03 |
| F30 | 6 | 24,90±7,01 | 15,19 | 24,10 | 34,45 | 19,27 |

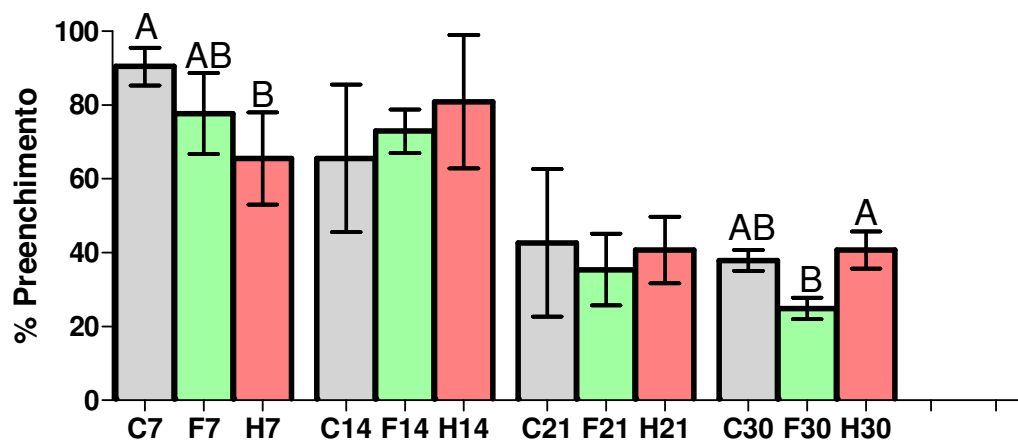


Figura 21 – Gráfico de colunas (Média ± desvio padrão) dos valores de % de preenchimento por tecido de reparação para os grupos C, F e H nos períodos de 7, 14, 21 e 30 dias. Letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes.

Uma análise comparativa da porcentagem de preenchimento entre os grupos controle, homeopático e fitoterápico para o período de 7 dias foi efetuada por meio do teste ANOVA 1 fator. Os resultados deste período estão na Tabela 24

Tabela 24 – Resultado da ANOVA para o período de 7 dias referente a % preenchimento nos grupos H, C e F

| Efeito | gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|------|-----|------|---------|
| Tratamento | 2 | 1697 | 848 | 7,96 | 0,005* |
| Resíduo | 14 | 1492 | 107 | | |
| Total | 16 | 3188 | | | |

* $p < 0,05$

Pode-se verificar que aos 7 dias, a hipótese de igualdade (H_0) entre os grupos C ($90,43 \pm 5,15$), H ($65,51 \pm 12,49$) e F ($77,69 \pm 11,00$) foi rejeitada ($p = 0,005 < 0,05$). Na Tabela 25 podem-se observar os efeitos dos tratamentos após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%).

Tabela 25 - Resultado do teste de comparação múltipla de Tukey (5%) no período de 7 dias. Formação de grupos homogêneos em relação aos tratamentos, para Preenchimento (%)

| Tratamento | Média | Grupos Homogêneos* |
|------------|--------|--------------------|
| C7 | 90,431 | A |
| F7 | 77,691 | A B |
| H7 | 65,509 | B |

*conjuntos que apresentam letras iguais indicam diferença não estatisticamente significativa

Por meio dos resultados estatísticos apresentados na Tabela 19, verifica-se que o grupo C apresenta maior porcentagem de preenchimento em relação ao grupo H. Sendo esta diferença estatisticamente significativa. Ainda, constata-se que não há diferença estatística entre o grupo F em relação ao C ou H.

Foi realizada uma análise comparativa do preenchimento (%) entre os grupos controle, homeopático e fitoterápico para o período de 14 dias. Para esta avaliação foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA de Kruskal Wallis, devido à grande variabilidade do desvio padrão nestes grupos, o que fere as suposições do modelo ANOVA paramétrico.

Após aplicação do teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos valores em cada grupo ($kw = 1,6353$; $gl = 2$ p -valor = $0,4415$).

Uma análise comparativa da porcentagem de preenchimento entre os grupos controle, homeopático e fitoterápico para os períodos de 21 e 30 dias foi efetuada por meio do teste ANOVA 1 fator. Os resultados do período de 21 dias estão na Tabela 26 e os do período de 30 dias estão na Tabela 27.

Tabela 26 – Resultado da ANOVA para o período de 21 dias referente à % preenchimento nos grupos H, C e F

| Efeito | Gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|------|-----|------|---------|
| Tratamento | 2 | 157 | 79 | 0,28 | 0,762 |
| Resíduo | 13 | 3684 | 283 | | |
| Total | 15 | 3842 | | | |

Pode-se verificar que não foi possível rejeitar a hipótese de igualdade (H_0) entre os tratamentos ($p=0,762$)

Tabela 27 – Resultado da ANOVA para o período de 30 dias referente à % preenchimento nos grupos H, C e F

| Efeito | gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|--------|-------|------|---------|
| Tratamento | 2 | 856,4 | 428,2 | 5,12 | 0,020* |
| Resíduo | 15 | 1254,7 | 83,6 | | |
| Total | 17 | 2111,2 | | | |

* $p < 0,05$

Pode-se verificar que aos 30 dias, a hipótese de igualdade (H_0) entre os grupos C ($37,90 \pm 6,85$), H ($40,75 \pm 12,45$) e F ($24,90 \pm 7,01$) foi rejeitada ($p = 0,020 < 0,05$). Na Tabela 28 podem-se observar os efeitos dos tratamentos após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%).

Tabela 28 - Resultados do teste de comparação múltipla de Tukey (5%) no período de 30 dias. Formação de grupos homogêneos em relação aos tratamentos, para Preenchimento (%)

| Tratamento | Média | Grupos Homogêneos* |
|------------|--------|--------------------|
| H30 | 40,749 | A |
| C30 | 37,904 | A B |
| F30 | 24,903 | B |

*conjuntos que apresentam letras iguais indicam diferença não estatisticamente significativa

Por meio dos resultados estatísticos apresentados na Tabela 28, verifica-se que o grupo H apresenta maior % de preenchimento em relação ao grupo F. Sendo esta diferença estatisticamente significativa. Ainda, constata-se que não há diferença estatística entre o grupo C em relação aos demais.

5.2.2 Análise da área de osso neoformado presente na área de preenchimento no defeito ósseo

Considerou-se osso neoformado toda matriz óssea presente no interior da área de preenchimento por tecido de reparação no defeito ósseo. Assim como na análise da área de preenchimento, nos animais: rato 2 do grupo H21, rato 5 do grupo C21, rato 5 do grupo C14 e rato 5 do grupo C7 o defeito ósseo da tíbia não pode ser localizado na lâmina histológica. Por essa razão não foi possível incluir estes animais nas análises histomorfométricas e o tamanho da amostra nos referidos grupos foi 5. A estatística descritiva dos dados referentes à formação óssea na área de preenchimento por tecido de reparação está representada na Tabela 29 e na Figura 22.

Tabela 29 - Estatística descritiva da % de osso neoformado nos grupos controle, homeopático e fitoterápico nos períodos de 7, 14, 21 e 30 dias

| Grupos | n | %(m±dp) | Min | Mediana | Máx | Faixa |
|--------|---|-------------|-------|---------|-------|-------|
| C7 | 5 | 62,60±5,99 | 54,96 | 66,13 | 68,07 | 13,11 |
| H7 | 6 | 56,568±2,35 | 52,83 | 56,637 | 59,48 | 6,641 |
| F7 | 6 | 60,95±6,10 | 55,84 | 58,16 | 70,89 | 15,05 |
| C14 | 5 | 2,295±0,963 | 0,778 | 2,457 | 3,291 | 2,513 |
| H14 | 6 | 2,362±0,717 | 1,293 | 2,240 | 3,305 | 2,013 |
| F14 | 6 | 1,111±0,442 | 0,644 | 1,042 | 1,930 | 1,286 |
| C21 | 5 | 4,86±3,25 | 1,17 | 6,60 | 7,97 | 6,80 |
| H21 | 5 | 4,177±2,068 | 2,680 | 2,827 | 7,269 | 4,589 |
| F21 | 6 | 4,059±2,049 | 1,361 | 5,239 | 5,643 | 4,283 |
| C30 | 6 | 86,75±4,78 | 81,58 | 85,73 | 94,29 | 12,71 |
| H30 | 6 | 78,29±11,47 | 58,25 | 81,90 | 91,51 | 33,27 |
| F30 | 6 | 86,38±17,37 | 61,66 | 87,06 | 106,6 | 44,96 |

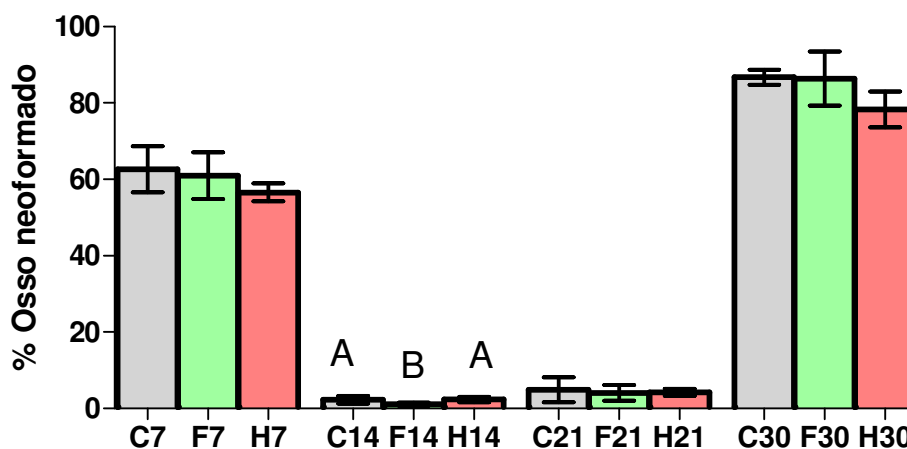


Figura 22 – Gráfico de colunas (Média \pm desvio padrão) dos valores de % de osso neoformado para os grupos C, F e H nos períodos de 7, 14, 21 e 30 dias. Letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significantes.

Uma análise comparativa da porcentagem de tecido ósseo neoformado entre os grupos controle, homeopático e fitoterápico para o período de 7 e 14 dias foi efetuada por meio do teste ANOVA 1 fator. Os resultados para o período de 7 dias estão na Tabela 30 e para o período de 14 dias estão na Tabela 31.

Tabela 30 – Resultado da ANOVA para o período de 7 dias referente a % de tecido ósseo neoformado nos grupos H, C e F

| Efeito | GI | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|-------|------|------|---------|
| Tratamento | 2 | 109,7 | 54,9 | 2,15 | 0,153 |
| Resíduo | 14 | 357,3 | 25,5 | | |
| Total | 16 | 467,1 | | | |

No período de 7 dias, através da ANOVA, não foi possível rejeitar a hipótese de igualdade (H_0) entre os tratamentos.

Tabela 31 – Resultado da ANOVA para o período de 14 dias referente a % de tecido ósseo neoformado nos grupos H, C e F

| Efeito | Gl | SQ | QM | F | p-valor |
|------------|----|--------|-------|------|---------|
| Tratamento | 2 | 5,797 | 2,898 | 5,59 | 0,016 |
| Resíduo | 14 | 7,256 | 0,518 | | |
| Total | 16 | 13,052 | | | |

Pode-se verificar que aos 14 dias, a hipótese de igualdade (H_0) entre os grupos C ($2,295 \pm 0,963$), H ($2,362 \pm 0,717$) e F ($1,111 \pm 0,442$) foi rejeitada ($p=0,016 < 0,05$). Na Tabela 32 podem-se observar os efeitos dos tratamentos após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%).

Tabela 32 – Resultado do teste de comparação múltipla de Tuckey (5%) no período de 14 dias. Formação de grupos homogêneos em relação aos tratamentos para % de osso neoformado na área de preenchimento

| Grupo | Média | Grupos homogêneo |
|-------|--------|------------------|
| C14 | 2,2946 | A |
| H14 | 2,3623 | A |
| F14 | 1,1109 | B |

*conjuntos que apresentam letras iguais indicam diferença não estatisticamente significativa

Através dos resultados estatísticos apresentados na Tabela 32, verifica-se que o grupo F apresenta menor % de osso neoformado em relação ao grupo H e C, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

Após aplicação do teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis para a área de osso neoformado (%) no período de 21 dias verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos valores em cada grupo ($kw = 0,4529$; $gl = 2$; $p\text{-valor} = 0,7973$).

Após aplicação do teste ANOVA não paramétrico de Kruskal-Wallis para a área de osso neoformado (%) no período de 30 dias verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre a distribuição dos valores em cada grupo ($k_w = 2,5614$; $gl = 2$; $p\text{-valor} = 0,2778$).

5.3 Análise histológica descritiva

Verificaram-se variações no padrão histológico entre os grupos, principalmente em relação aos períodos de observação. Os dados da análise e variação entre os grupos são demonstrados nos Quadros 1, 2 e 3.

5.3.1 Período de 7 dias

No período de sete dias todos os grupos apresentaram as características da fase inicial do processo de reparação. Observaram-se resquícios de coágulo sanguíneo, áreas fibrinosas e tecido de granulação em quantidades variáveis, localizados na porção superior e central do tecido de reparação que preenche o defeito ósseo. O tecido de granulação apresentava-se muito celularizado, com numerosos fibroblastos volumosos e células osteoprogenitoras em meio a numerosas hemácias. No restante do canal medular notou-se tecido ósseo neoformado com grande quantidade de trabéculas ósseas imaturas entremeadas por tecido conjuntivo frouxo bem vascularizado e com extravasamento de hemácias. A neoformação de osso trabecular se originou principalmente do endóstio, mas também era evidente na face externa da tíbia se formando a partir do perióstio. As trabéculas ósseas

neoformadas mostravam-se delgadas, bastante interconectadas, com numerosas lacunas contendo osteócitos e hemácias e com pouca matriz colagenosa ficando por isso com aspecto poroso (Figura 23D). Tais características foram semelhantes em todos os grupos. Em alguns animais observou-se tecido osteocondral em quantidade variável na região onde o calo ósseo se une à cortical original e no tecido ósseo neoformado no periósteeo (Quadro 1).

No grupo C (controle) observou-se calo ósseo preenchendo completamente o canal medular em todos os animais, pequena quantidade de coágulo sanguíneo, espessa camada de tecido de granulação na superfície e reação periosteal (Figura 23B). Houve formação de tecido osteocondral em metade dos animais, sendo que no rato 3 a quantidade foi grande. No rato 5 deste grupo não foi possível localizar o defeito nos cortes histológicos realizados, por isso o mesmo foi desconsiderado ficando o grupo com n=5.

No grupo tratado com confrei fitoterápico (F) o calo ósseo preencheu totalmente o canal medular em 2 ratos e preencheu 2/3 do canal medular em 4 ratos (Figura 23A). A camada de tecido de granulação na superfície foi mais delgada que no grupo controle, a quantidade de reação periosteal com formação de osso trabecular foi maior que no grupo controle e houve formação de bastante tecido osteocondral.

No grupo tratado com confrei homeopático (H) observou-se calo ósseo em estágio discretamente menos avançado que os demais grupos. O calo ósseo preencheu completamente o canal medular em apenas 1 rato enquanto nos outros 5 ratos preencheu 2/3 do canal medular. No entanto, a reação periosteal foi mais intensa e camada de tecido de granulação na superfície do calo era mais espessa que nos demais grupos (Figura 23C). Houve formação de tecido osteocondral em apenas 1 rato.

Quadro 1 - Características histológicas presentes na região da reparação óssea nas tíbias nos grupos controle (C), fitoterápico (F) e homeopático (H) aos 7 dias de experimento

| Grupo experimental nº do rato | Volume do calo ósseo | Osso periosteal | Coágulo sanguíneo | Tecido osteocondral | Tecido de granulação |
|----------------------------------|----------------------|-----------------|-------------------|---------------------|----------------------|
| C7 - r1 | +++ | ++ | ++ | ∅ | + |
| C7 - r2 | +++ | + | + | ∅ | + |
| C7 - r3 | +++ | ++ | + | ++ | ++ |
| C7 - r4 | +++ | + | ++ | + | ++ |
| C7 - r5 | XX | XX | XX | XX | XX |
| C7 - r6 | +++ | + | + | + | ++ |
| F7 - r1 | +++ | ++ | + | ++ | + |
| F7 - r2 | ++ | + | + | ++ | + |
| F7 - r3 | ++ | ++ | + | + | + |
| F7 - r4 | ++ | + | ∅ | + | + |
| F7 - r5 | +++ | ++ | + | ++ | ++ |
| F7 - r6 | ++ | ++ | + | + | + |
| H7 - r1 | ++ | + | + | ∅ | + |
| H7 - r2 | ++ | ++ | ∅ | ∅ | ++ |
| H7 - r3 | ++ | ++ | + | ∅ | ++ |
| H7 - r4 | +++ | ++ | ++ | ∅ | ++ |
| H7 - r5 | ++ | ++ | ++ | ∅ | ++ |
| H7 - r6 | ++ | ++ | + | + | ++ |

Volume do calo ósseo: +=1/3, ++=2/3, +++=3/3 do canal medular,

Osso periosteal: ∅=ausente, +=pouco, ++=muito,

Coágulo sanguíneo: ∅=ausente, +=presente,

Tecido osteocondral: ∅=ausente, +=pouco, ++=muito,

Tecido de granulação: ∅=ausente, +=pouco, ++=muito,

XX: animal excluído.

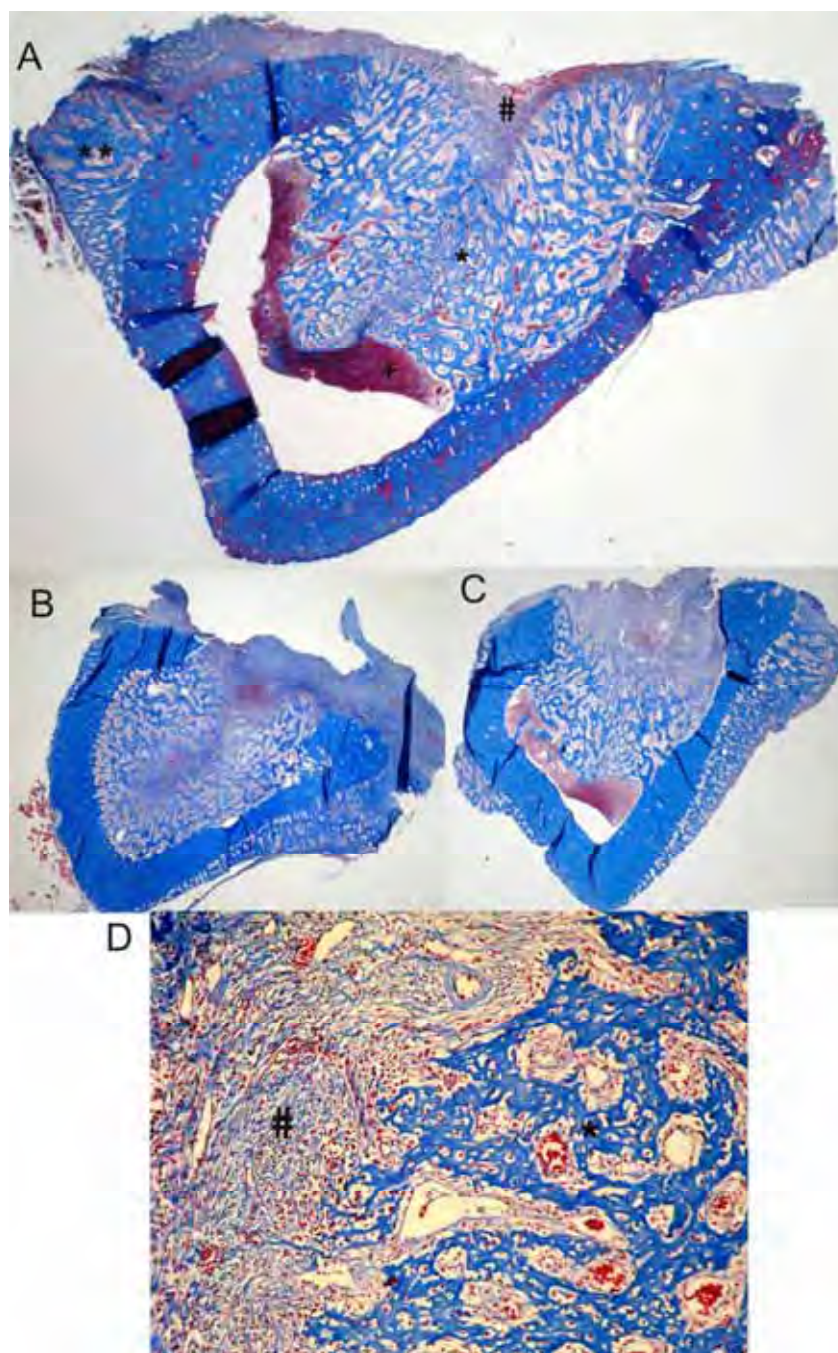


Figura 23 - Aspecto histológico da reparação óssea no período de 7 dias. A - grupo F7 (rato 3): calo ósseo preenchendo 2/3 do canal medular, com resquícios de coágulo sanguíneo (+), tecido de granulação na superfície (#) e formação de tecido ósseo trabecular no canal medular (*) e na face externa da tíbia (**). B - grupo C7 (rato 3): calo ósseo preenchendo completamente o canal medular, com resquícios de coágulo sanguíneo, espessa camada de tecido de granulação na superfície e reação periosteal. C - grupo H (rato 3): calo ósseo preenchendo 2/3 do canal medular, com grande quantidade de tecido de granulação e neoformação óssea periosteal. D - grupo H (rato 2): detalhe da área de união entre o tecido de granulação (#) e o osso novo imaturo (*) com trabéculas muito celularizadas e interconectadas. Coloração: Tricrômico de Mallory. Aumento original 25X e 200X.

5.3.2 Período de 14 dias

No período de 14 dias foi possível observar a evolução da maturação do calo ósseo em todos os grupos. O volume deste diminuiu, as trabéculas ósseas ficaram mais espessas, com maior quantidade de matriz colágena e com osteócitos bem evidentes nas lacunas. O aspecto poroso contendo hemácias não foi mais observado. Havia numerosos osteoblastos delineando as trabéculas e estas tendiam a se concentrar no terço superior do canal medular, se orientando para iniciar a formação de uma ponte óssea entre as bordas do defeito. Havia formação de osso trabecular periosteal em vários ratos e já se observava tecido hematopoiético ocupando o espaço intertrabecular (Quadro 2).

No grupo C de 7 para 14 dias observou-se diminuição do volume do calo ósseo, da reação periosteal, da formação de tecido osteocondral e da quantidade de tecido de granulação superficial. Início de formação de uma ponte óssea unindo as bordas do defeito já era evidenciado (Figura 24A). As diferenças microscópicas entre os grupos C e F não foram muito acentuadas. No rato 5 do grupo C não foi possível localizar o defeito nos cortes histológicos realizados, por isso o mesmo foi desconsiderado ficando o grupo com n=5.

No grupo F de 7 para 14 dias notou-se diminuição do volume do calo ósseo e início de formação de ponte óssea unindo as bordas do defeito. A porção do calo dentro do canal medular foi menor que no grupo H. A camada de tecido de granulação superficial diminuiu sua espessura, a reação periosteal foi escassa e não se observou mais coágulo sanguíneo (Figura 24B).

No grupo H observou-se maior formação óssea que nos demais grupos, preenchendo quase todo o canal medular, principalmente na região do fundo do canal medular, originado a partir do endóstio onde se forma uma espessa camada de tecido endosteal reativo contornando a

face interna do canal medular. Observaram-se trabéculas espessas, bastante conectadas e celularizadas, com muitos osteoblastos ao seu redor e início de formação de ponte óssea em todos os animais (Figura 24C). De 7 para 14 dias notou-se no calo ósseo aumento do volume, da celularidade e da quantidade de osteoblastos. O rato 2 ainda apresentava uma área com trabéculas mais porosas no centro da parte mais superficial do calo misturado a resíduo de coágulo sanguíneo.

Quadro 2 - Características histológicas presentes na região da reparação óssea nas tíbias nos grupos experimentais controle (C), fitoterápico (F) e homeopático (H) aos 14 dias de experimento

| Grupo experim. n ^o do rato | Volume do calo ósseo | Osso periosteal | Tecido osteocond. | Tecido de granul. | Ponte óssea | Espaço entre trabéculas medulares | Espaço entre trabéculas na ponte |
|---------------------------------------|----------------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| C14 – r1 | +++ | ∅ | ∅ | ∅ | + | ++ | ++ |
| C14 – r2 | ++ | ∅ | ∅ | + | + | ++ | + |
| C14 – r3 | ++ | + | + | ++ | + | ++ | + |
| C14 – r4 | ++ | ∅ | ∅ | + | + | ++ | ++ |
| C14 – r5 | XX | XX | XX | XX | XX | XX | XX |
| C14 – r6 | + | ∅ | ∅ | ∅ | + | +++ | + |
| F14 – r1 | ++ | ++ | + | + | + | +++ | ++ |
| F14 – r2 | ++ | + | ∅ | + | + | +++ | ++ |
| F14 – r3 | + | ∅ | ∅ | + | + | +++ | ++ |
| F14 – r4 | ++ | ∅ | + | + | + | +++ | ++ |
| F14 – r5 | ++ | ∅ | ∅ | + | + | +++ | ++ |
| F14 – r6 | ++ | + | ∅ | + | + | +++ | ++ |
| H14 – r1 | +++ | ∅ | ∅ | + | + | + | + |
| H14 – r2 | +++ | ∅ | ∅ | + | + | + | + |
| H14 – r3 | ++ | + | + | + | + | + | + |
| H14 – r4 | +++ | + | ++ | + | + | + | + |
| H14 – r5 | ++ | ∅ | ∅ | + | + | ++ | + |
| H14 – r6 | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + | ++ |

Volume do calo ósseo: +=1/3, ++=2/3, +++=3/3 do canal medular,
 Osso periosteal: ∅=ausente, +=pouca quantidade, ++=muita quantidade,
 Tecido osteocondral: ∅=ausente, +=pouca quantidade, ++=muita quantidade,
 Tecido de granulação: ∅=ausente, +=pouca quantidade, ++=muita quantidade,
 Ponte óssea: ∅=ausente, +=presente,
 Espaço entre as trabéculas ósseas medulares: +=pouco, ++=médio, +++=muito,
 Espaço entre as trabéculas ósseas na ponte óssea: +=pouco, ++=médio, +++=muito,
 XX: animal excluído do grupo.

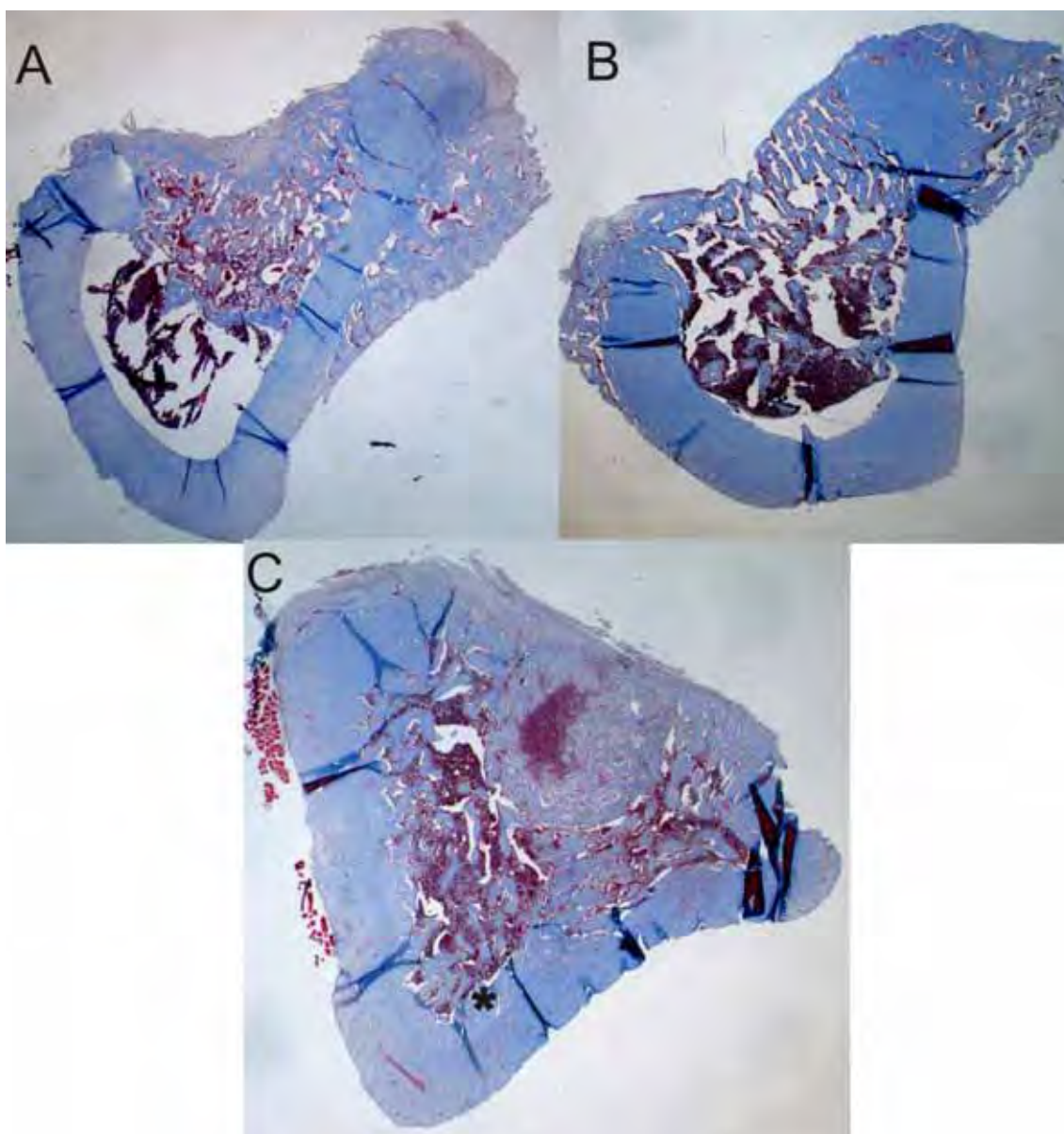


Figura 24 - Aspecto histológico da reparação óssea no período de 14 dias. A - grupo C (rato 3): calo ósseo preenchendo 2/3 do canal medular, com tecido de granulação e tecido conjuntivo fibroso na superfície, formação de tecido ósseo trabecular no canal medular e na face externa da tíbia e orientação das trabéculas formando ponte na superfície. B - grupo F (rato 1): calo ósseo preenchendo parte do canal medular, com grande espaçamento entre as trabéculas. C – grupo H (rato 2): calo ósseo preenchendo completamente o canal medular, com trabéculas mais espessas se orientando para formar uma ponte na superfície, com restos de coágulo na região central superior e com espessa camada de osso novo se formando a partir do endóstio (*). Coloração: Tricrômico de Mallory. Aumento original 25X.

5.3.3 Período de 21 dias

No período de 21 dias o calo ósseo estava em uma fase mais avançada do processo de reparação. Neste período quase não foi observada a formação óssea na parte externa da tíbia. Todos os grupos apresentavam uma ponte óssea trabecular bem formada unindo as bordas do defeito, com vários pontos de fusão com a cortical remanescente. A ponte óssea mostrava sinais de remodelação como trabéculas mais espessas e menos espaçadas entremeadas com áreas de osso lamelar e, sua espessura era mais delgada que a cortical original. Não foram evidenciadas muitas diferenças histológicas entre os grupos C, F e H. No entanto, observou-se que a remodelação do osso neoformado foi maior nos grupos tratados com confrei uma vez que a quantidade de trabéculas ósseas dentro do canal medular foi menor e a quantidade de osso lamelar na ponte óssea foi maior que no grupo controle (Quadro 3 e Figura 25A,B e C).

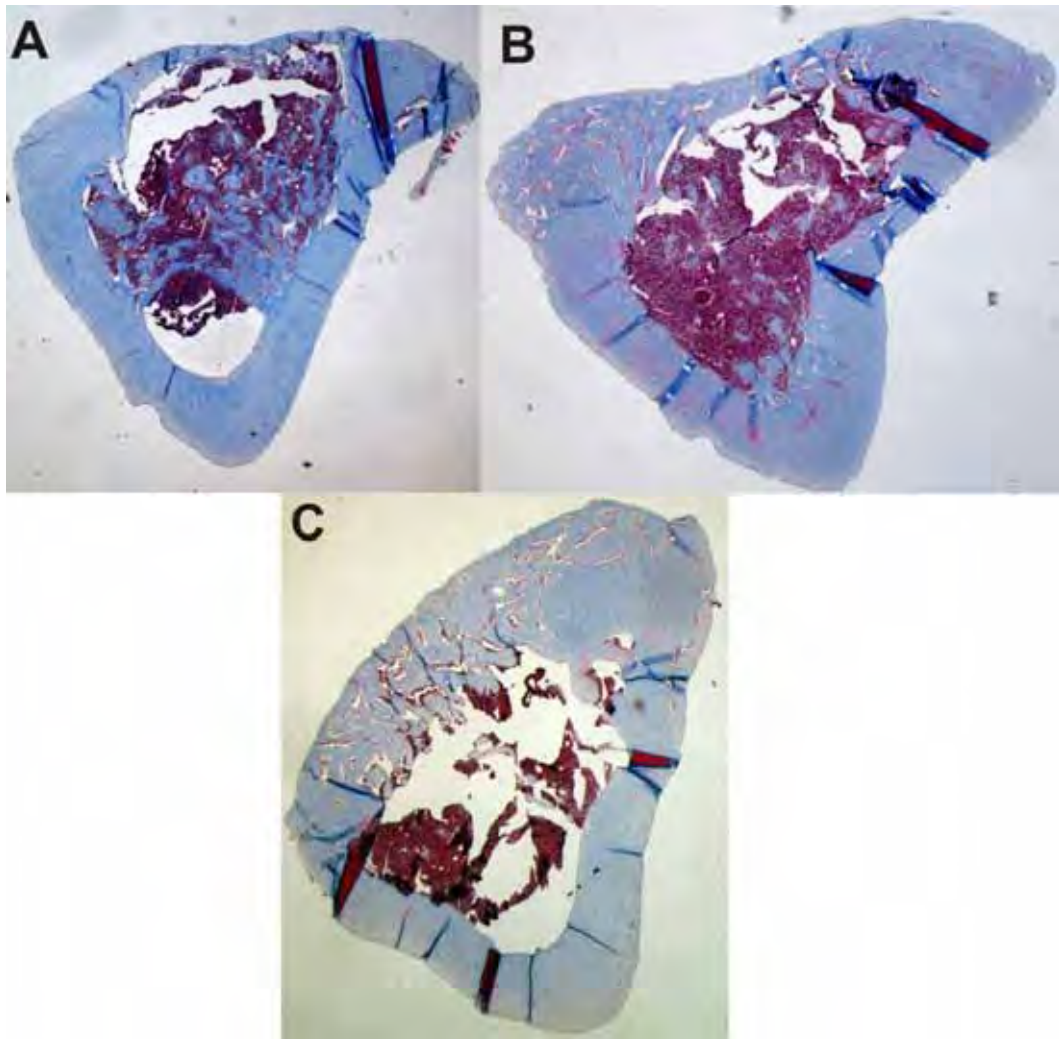


Figura 25 - Aspecto histológico da reparação óssea no período de 21 dias. A - grupo C (rato 1): calo ósseo com várias trabéculas remanescentes no canal medular em meio a tecido hematopoiético, ponte óssea remodelada e mais delgada que a cortical. B - grupo H (rato 6): poucas trabéculas no canal medular, ponte óssea com trabéculas mais espessas, pouco espaçadas e entremeadas a osso lamelar, pequena quantidade de osso periosteal. C – grupo F (rato 6): poucas trabéculas no canal medular e ponte óssea com maior quantidade de trabéculas. Coloração: Tricrômico de Mallory. Aumento original 25X.

Quadro 3 - Características histológicas presentes na região da reparação óssea nas tíbias nos grupos experimentais controle (C), fitoterápico (F) e homeopático (H) aos 21 dias de experimento.

| Grupo experim. n ^o do rato | Calo ósseo no canal medular | Osso periosteal | Tecido fibroso periosteal | Fusão ponte / cortical óssea | Osso trabecular na ponte | Osso lamelar na ponte |
|---------------------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------------------|------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| C21 – r1 | ++ | ∅ | + | + | + | + |
| C21 – r2 | + | + | ++ | + | + | ∅ |
| C21 – r3 | ++ | ∅ | + | + | + | ∅ |
| C21 – r4 | + | ∅ | ++ | + | + | + |
| C21 – r5 | XX | XX | XX | XX | XX | XX |
| C21 – r6 | + | ∅ | + | + | + | + |
| F21 – r1 | ∅ | ∅ | + | + | + | + |
| F21 – r2 | + | ∅ | ∅ | + | + | + |
| F21 – r3 | ∅ | ∅ | ∅ | + | + | + |
| F21 – r4 | + | ∅ | ∅ | + | + | + |
| F21 – r5 | ∅ | ∅ | ∅ | + | + | + |
| F21 – r6 | ∅ | ∅ | ∅ | + | + | + |
| H21 – r1 | + | ++ | + | + | + | + |
| H21 – r2 | XX | XX | XX | XX | XX | XX |
| H21 – r3 | + | ∅ | + | + | + | + |
| H21 – r4 | ∅ | + | + | + | + | + |
| H21 – r5 | ∅ | ∅ | ∅ | + | + | + |
| H21 – r6 | ∅ | + | ∅ | + | + | + |

Calo ósseo no canal medular: ∅=ausente, +=pouca quantidade, +++=muita quantidade,
 Osso periosteal: ∅=ausente, +=pouca quantidade, +++=muita quantidade,
 Tecido fibroso periosteal: ∅=ausente, +=pouca quantidade, +++=muita quantidade,
 Fusão da ponte óssea com a cortical óssea: ∅=ausente, +=presente,
 Osso trabecular na ponte óssea: ∅=ausente, +=presente,
 Osso lamelar na ponte óssea: ∅=ausente, +=presente,
 XX: animal excluído do grupo.

5.3.4 Período de 30 dias

No período de 30 dias a ponte óssea mostrou remodelação mais avançada com espessura mais delgada que a cortical antiga. Nas suas extremidades havia mais osso lamelar e na porção central da ponte óssea havia maior quantidade de osso trabecular. A fusão com a cortical estava mais acentuada, por vezes tornando difícil

evidenciar o limite entre a ponte e a cortical original. Em nenhum dos grupos a ponte óssea atingiu a espessura do osso cortical anterior nem completou a remodelação para osso lamelar. Não houve grande diferença microscópica entre os 3 grupos (Figura 26 A, B e C).

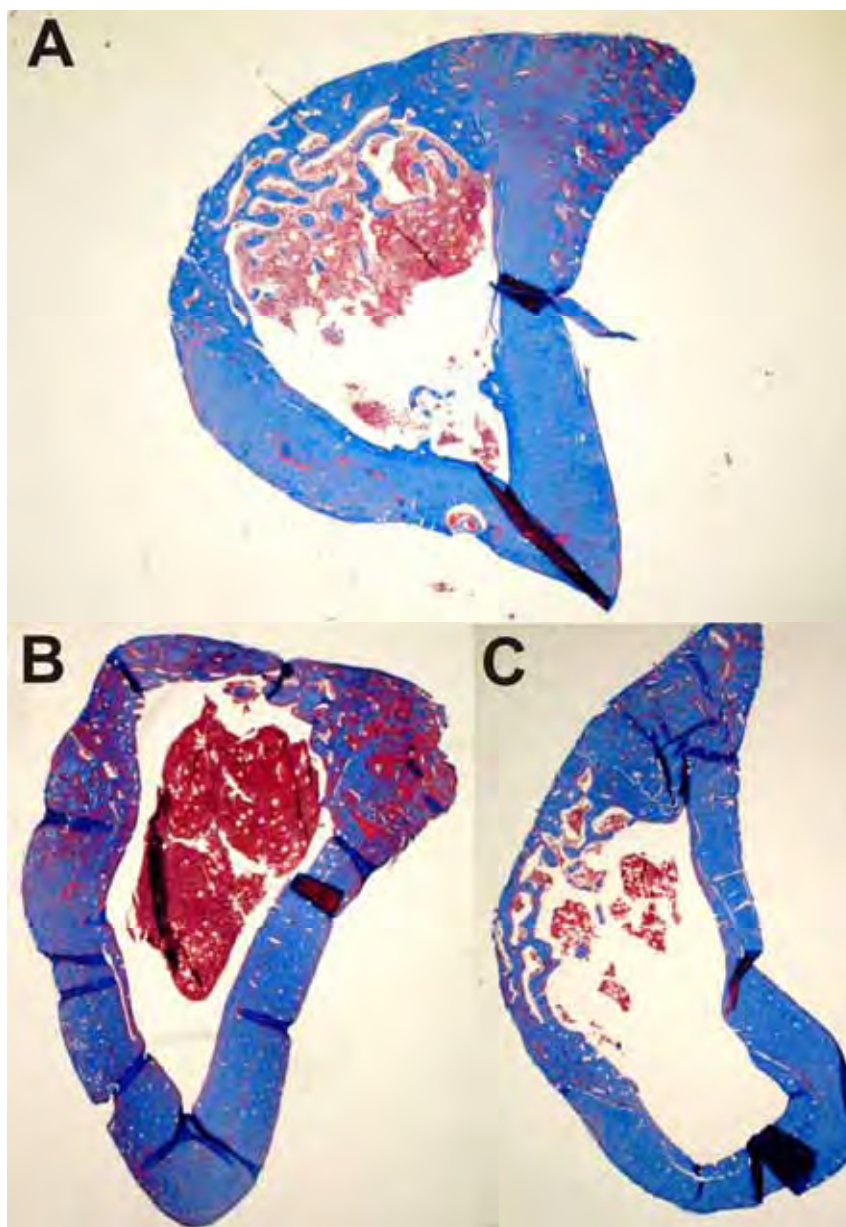


Figura 26 - Aspecto histológico da reparação óssea no período de 30 dias. A - grupo C (rato 3), B - grupo F (rato 6) e C - grupo H (rato 1): canal medular liberado com presença de tecido hematopoiético, ponte óssea mais delgada que a cortical apresentando trabéculas espessas na região central e aspecto mais lamelar nas extremidades. Coloração: Tricrômico de Mallory. Aumento original 25X.

6 DISCUSSÃO

As fraturas e diversas lesões ósseas destrutivas apresentam impacto significativo na saúde e nas condições socioeconômicas da população em geral. Sua maior relevância tem sido influenciada pelo aumento na incidência de neoplasias ósseas malignas primárias ou metastáticas, de condições como os acidentes e traumatismos em geral e também do envelhecimento da população. O último fator acarretou no aumento da osteoporose e, conseqüente aumento da sua principal complicação, as fraturas ósseas.

Felizmente, a maioria das fraturas e lesões ósseas é regenerada sem muitas complicações. Entretanto, estima-se que 5 a 10% destas não ocorram de modo adequado (Victoria et al., 2009).

O *Symphytum officinale* L. ou confrei é uma planta medicinal conhecida há mais de 2000 anos tendo seu emprego medicinal registrado na Grécia, já no tempo de Hipócrates. Seu nome científico é derivado da palavra grega *Symphyo* que significa “unir”, em alusão ao seu poder terapêutico como cicatrizante utilizada para cicatrizar bordas de feridas e consolidar ossos fraturados, por isso também é conhecida popularmente como consuelda ou consólida. Além disso, é utilizada por seu efeito no tratamento de dores musculares e disfunções articulares (Staiger, 2012).

As propriedades terapêuticas do confrei estão baseadas nos seus efeitos anti-inflamatórios e analgésicos e na ação estimuladora da formação de tecido de granulação e da regeneração tecidual, além de auxiliar também na formação do calo ósseo (Kommission E, 1990). Entretanto, a chave dos constituintes que determinam a ação do extrato de confrei, e seus mecanismos moleculares de ação, ainda não foi

completamente elucidada. A alantoína e o ácido rosmarínico são provavelmente de importância central para os efeitos farmacológicos do confrei (Andrés et al., 1989).

Apesar de a medicina tradicional atribuir ao confrei a propriedade de reparação óssea, na verdade são escassos os relatos científicos sobre sua ação especificamente neste processo.

Estão presentes alcalóides pirrolizidínicos (AP) no confrei, principalmente na forma de N-óxidos, como a intermedina, licoposamina e sinfitina (Brauchli et al., 1982). O consumo de AP em longo prazo pode causar doença veno-oclusiva (DVO) no fígado e câncer hepático. Por esse motivo o confrei passou a ser proibido para uso interno. No Brasil essa proibição existe desde 1992 (Pozetti, 1991; Brasil, 1992; Chaves, 2003).

A concentração de AP no confrei varia de acordo com a espécie da planta e é maior na raiz que nas folhas. Nas raízes relata-se quantidade entre 0,013% e 1,2% baseado no método analítico usado (Staiger, 2012). Os extratos de confrei podem conter concentração alta de AP de acordo com o método de preparo.

A legislação na Alemanha limita o tratamento a aplicações externas por um período de 4 a 6 semanas por ano e as aplicações devem conter entre 10µg e 100µg, que é a dosagem máxima permitida por dia (Staiger, 2012). Atualmente, na Europa, são usados somente extratos de confrei livres de alcalóides no preparo de produtos medicinais (Staiger, 2012).

A terapia homeopática é uma forma válida de trabalhar com drogas tóxicas, que tenham potencial terapêutico útil conhecido. Os medicamentos homeopáticos são preparados em altas diluições e são usados na diluição 6CH ou maior, que está acima do número de Avogadro, ou seja, não contem mais moléculas em peso ponderal da droga. Assim, considera-se que não ocorra a toxicidade causada pelas

doses ponderais. Até venenos e toxinas podem ser preparados como remédio homeopático.

O poder dos medicamentos homeopáticos reside na energia medicamentosa liberada pela dinamização e não na concentração ponderal. Ainda não está esclarecido o mecanismo de ação dos medicamentos homeopáticos, mas um deles é a estimulação dos mecanismos de defesa do próprio organismo no processo de tratamento e cura das doenças (Smit et al., 2009).

Alguns autores que estudaram a densidade óssea radiográfica ao redor de implantes observaram que o confrei homeopático 6CH colaborou com a osseointegração (Sakakura, 2008; Spin-neto, 2010). Além disso, Chaves, (2003) concluiu que o *Symphytum officinallis* 6CH estimulou o reparo ósseo em vários períodos experimentais, favorecendo inclusive a osseointegração de partículas de osso bovino no grupo onde ambas as terapêuticas foram associadas.

A maioria dos trabalhos atuais aborda o uso tópico do confrei no tratamento de dores e inflamação musculares e articulares (Predel et al., 2005). Poucos relatos investigam o uso sistêmico, a ação na reparação de fraturas e a ação de sua formulação homeopática

As análises escolhidas neste estudo permitiram avaliar a quantidade e qualidade de osso formado na reparação óssea. O grau de precisão das diferentes análises foi variado, mas houve correspondência entre as mesmas.

Através da análise microtomográfica do volume ósseo, observa-se que o tratamento com *Symphytum officinale* L. homeopático fez diferença aos 14 dias quando estimulou maior formação de osso no tecido de reparação se comparado ao *Symphytum officinale* L. fitoterápico, mas esta diferença não se manteve aos 21 e 30 dias.

Este dado concorda com os achados da análise histológica descritiva, na qual se observou que os animais do grupo H, no período de 14 dias, mostraram uma maior formação óssea. Esta

neoformação óssea estava localizada em todo o canal medular sendo originada do endósteo da tíbia, diferentemente dos demais grupos do mesmo período experimental. Pode-se relacionar esse aumento no volume ósseo neste grupo à ação da planta na formulação homeopática.

O fator de padrão trabecular (Tb.pf) na microtomografia é um dado representativo da capacidade de formar trabéculas isoladas ou de conectividade. Quanto maior seu valor menor é o índice de conectividade (Lazenby et al., 2011). Foi possível verificar que os valores de padrão trabecular diminuíram e a conectividade trabecular aumentou à medida que a reparação óssea evoluiu e que esse comportamento foi semelhante entre os grupos.

Quando se avaliou comparativamente a influência dos tratamentos F, H e do grupo controle no fator de padrão trabecular pode-se verificar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos períodos de 7, 14 e 30 dias. Os valores numéricos de Tb.pf foram menores no grupo homeopático em todos os períodos experimentais embora não houvesse sempre diferença estatística entre os grupos. No entanto, no período de 21 dias, verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa. Sendo que o grupo C apresentou Tb.pf maior que os grupos F e H e o grupo F apresentou Tb.pf maior que o grupo H, sendo os 3 grupos estatisticamente diferentes entre si.

Tais dados demonstraram que nas fases iniciais da reparação os tratamentos com confrei H e F não influíram na conectividade das trabéculas neoformadas, mas aos 21 dias o *Symphytum officinale* L. homeopático induziu formação de trabéculas com maior conectividade, sendo melhor inclusive que o tratamento com confrei fitoterápico. Na fase final da reparação o Tb.pf tornou a não exibir diferença entre os grupos.

Este dado estatístico revela que o grupo H no período de 21 dias apresentou maior conectividade trabecular que os grupos F e C, apesar do volume ósseo não ter mostrado diferença estatisticamente

significante. Isto se deve ao fato de o Tb.pf ser um parâmetro estrutural e o BV por sua vez, uma variável de volume. Isso revela que o confrei sob a formulação homeopática teve uma influência positiva na estruturação óssea no referido período e que o confrei na formulação fitoterápica exerceu uma ação positiva em relação ao controle.

Como não houve diferença no volume ósseo (BV) no período de 21 dias, pode-se concluir que o confrei nas duas formulações, mas principalmente na homeopática, não aumentou a quantidade de osso na região do defeito ósseo, entretanto, agiu positivamente na configuração das trabéculas ósseas durante o processo de reparação aos 21 dias. A configuração das trabéculas nos grupos tratados apresenta uma maior conectividade e integridade estrutural.

O parâmetro de intersecção de superfície (I.S) (mm^2) corresponde à área total de sólido, por exemplo, trabéculas que foram seccionadas pela superfície do VOI (volume de interesse), no nosso caso, um cilindro. O valor de I.S aumenta com a espessura e/ou número das trabéculas que foram cortadas pelo VOI (Lazenby et al., 2011).

Quando se avaliou comparativamente a influência dos tratamentos (F e H) e do grupo controle nos valores de I.S pode-se verificar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em nenhum período estudado.

Embora não tenha ocorrido diferença estatística no I.S entre os tratamentos neste estudo, os valores aumentaram muito de 7 dias para os demais períodos experimentais em todos os grupos, indicando maior formação de osso no tecido de reparação ao longo do experimento, como era esperado.

Os valores da razão entre a área superficial das trabéculas ósseas e o volume ósseo da amostra (BS/BV) identificam a porosidade do osso, uma vez que BS corresponde à superfície total do osso trabecular e BV ao volume ósseo. Assim, quanto maior o valor de

BS/BV mais esponjoso é o osso e quanto menor o valor mais compacto é o osso.

Quando se avaliou comparativamente a influência dos tratamentos (F e H) ao grupo controle na relação BS/BV pode-se verificar que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em nenhum período estudado.

Ao longo do processo de reparação esperava-se a diminuição progressiva dos valores de BS/BV, o que ocorreu em todos os grupos. Esta análise demonstrou que mesmo sem haver diferença estatística entre os tratamentos ocorreu remodelação do tecido de reparação e amadurecimento do osso trabecular para osso lamelar.

Neste trabalho não foi utilizado o parâmetro BV/TV, a razão entre o BV e o volume total da amostra (TV), devido ao fato do nosso volume de interesse (VOI), ter sido o mesmo em todas as amostras (8 mm³), esse parâmetro é utilizado quando o volume é diferente para cada uma das amostras.

A análise histomorfométrica avaliou a porcentagem da área preenchida pelo tecido de reparação como um todo, isto é, a área do calo ósseo. Através de fotomicrografias selecionadas na região central do defeito foram feitas as mensurações. Para a análise histomorfométrica foram consideradas duas variáveis em análise, a medida percentual da área de preenchimento por tecido de reparação, independente da natureza do conteúdo deste preenchimento, e a proporção da área de osso neoformado nesta área de preenchimento. A área de preenchimento por tecido de reparação corresponde à área de tecido formado no defeito ósseo e no canal medular, considerando-se tanto o tecido ósseo quanto o tecido mole do calo ósseo.

Pode-se verificar que aos 7 dias entre os grupos C, F e H houve diferença estatística. Após o teste de comparação múltipla de Tukey verificou-se que o grupo C apresentou maior porcentagem de preenchimento em relação ao grupo H, sendo esta diferença

estatisticamente significativa e que o grupo F apresentou valores intermediários.

Considerando-se o parâmetro de porcentagem de preenchimento por tecido de reparo na histomorfometria, aos 7 dias o grupo controle foi o que formou o maior calo ósseo e o tratamento com homeopatia o menor calo ósseo. A análise histológica descritiva confirma este dado. De acordo com os relatos da literatura, esse resultado não era esperado. Mas os parâmetros que escolhemos para análise não permitem explicar o porquê desse comportamento.

Nos períodos de 14 e 21 dias não foram observadas diferenças estatisticamente significantes. Aos 30 dias, o grupo H apresentou maior porcentagem de preenchimento em relação ao grupo F, sendo esta diferença estatisticamente significativa e não houve diferença estatística entre o grupo C e os dois grupos tratados.

Estes dados demonstraram que os grupos tratados com confrei formaram calo ósseo menor que o grupo controle aos 7 dias e que houve diferença estatisticamente significativa em relação ao confrei homeopático que foi o tratamento que formou o menor calo ósseo neste período. No entanto, esta situação se inverteu e aos 30 dias o grupo homeopático apresentou mais tecido de reparação preenchendo o defeito, inclusive superando o grupo fitoterápico.

Segundo os dados da histomorfometria, considerando-se o percentual de preenchimento do defeito pelo tecido de reparação, a resposta ao tratamento com confrei homeopático foi mais tardia, mas na fase final do reparo resultou em calo ósseo maior.

A área percentual de osso formado no tecido de reparação do defeito ósseo mostra valores representativos da remodelação do calo ósseo e do amadurecimento do tecido ósseo formado. Os valores devem aumentar à medida que o calo diminui de volume e as trabéculas aumentam em quantidade e espessura até chegar ao estágio de osso lamelar compacto.

Neste trabalho, aos 7 dias observaram-se valores altos nos grupos C, H e F, mas sem diferença estatística entre os grupos ($p=0,153$). Aos 14 dias os valores foram baixos e pode se verificar diferença entre os grupos, sendo F menor que os demais. Aos 21 dias os valores foram baixos e não mostraram diferença estatística. Aos 30 dias foram maiores que aos sete dias, mas sem diferença estatisticamente significativa.

Esta variação depende do volume ou área do calo ósseo, assim, aos 7 dias quando o calo estava volumoso e cheio de osso sem remodelação o valor foi alto. Aos 14 e 21 dias começou a remodelação, levando à concentração das trabéculas na superfície para formar a ponte medular os limites inferiores do calo estavam distantes da superfície e a área total do calo considerada na mensuração foi grande, o que deu origem aos valores baixos no cálculo percentual. Aos 30 dias o calo mostrava volume bem pequeno, praticamente restrito à espessura da ponte óssea entre as margens do defeito e exibia intensa remodelação óssea, agora constituído por trabéculas mais espessas e menos espaçadas e por osso lamelar.

Alguns dados em nosso trabalho foram conflitantes. A partir dos dados da literatura era esperado que os grupos tratados com confrei apresentassem mais osso no tecido de reparação que o grupo controle. Além disso, o resultado do confrei fitoterápico aos 14 dias com formação de menos osso no calo que os demais grupos, foi controverso.

A análise histomorfométrica é um método eficiente para avaliação da formação e evolução do calo ósseo. Permite medir a área na superfície de cortes histológicos e a quantidade de osso na sua constituição. Quanto mais cortes seriados do material forem examinados, maior a precisão dos resultados.

No entanto, os dados da histomorfometria estão sujeitos a erros. Nas etapas do processamento técnico a qualidade das lâminas histológicas é afetada por diversos fatores como alterações na fixação, na

descalcificação, no emblocamento em parafina, na realização e estiramento adequado dos cortes histológicos e na coloração. Os artefatos gerados podem prejudicar a avaliação microscópica e induzir a erros de mensuração. Esta análise também é influenciada por erros humanos na mensuração e demarcação correta das áreas de análise.

Em nosso material nem todos os cortes estavam adequadamente estendidos na lâmina, o que pode ter gerado algum erro durante a mensuração das áreas A ou B. Nos períodos mais avançado da reparação como 21 e 30 dias, em alguns cortes foi difícil detectar os limites precisos entre o tecido ósseo neoformado e o osso remanescente, tanto nas margens do defeito quanto na superfície endosteal.

A análise histológica descritiva é um método adequado para mostrar os aspectos característicos da reparação do defeito ósseo e a evolução das fases reparação.

No período de 7 dias todos os grupos apresentaram as características da fase inicial do processo de reparação. Embora havendo apenas sete dias de evolução já havia formação de calos ósseos volumosos preenchendo a área do defeito e o canal medular. A maior parte do calo estava constituída por trabéculas ósseas e somente a porção superior mostrava tecido de granulação e pequena quantidade de coágulo sanguíneo. As trabéculas eram de aspecto imaturo, delgadas, mas bastante interconectadas e com alta celularidade, não havendo diferença em seu aspecto entre os 3 grupos. No grupo homeopático o calo ósseo estava em estágio discretamente menos avançado que nos demais grupos, quanto ao volume de preenchimento do canal medular, mas não em relação ao aspecto microscópico das trabéculas ósseas.

No período de 14 dias foi possível observar a evolução da remodelação do calo ósseo em todos os grupos. As trabéculas ósseas ficaram mais espessas, mais conectadas, com maior quantidade de matriz colágena, com osteócitos bem evidentes nas lacunas e já se organizavam na superfície delineando a formação de uma ponte óssea entre as bordas

do defeito. O volume do calo diminuiu nos grupos C e F e aumentou no grupo H, no qual se observou maior formação óssea que nos demais grupos, preenchendo quase todo o canal medular.

No período de 21 dias, o calo ósseo estava em uma fase mais avançada do processo de reparação. A ponte óssea mostrava sinais de remodelação, com trabéculas mais espessas e menos espaçadas entremeadas com áreas de osso lamelar. A remodelação do osso neoformado foi maior nos dois grupos tratados com confrei. Nestes a quantidade de trabéculas ósseas dentro do canal medular foi menor e a quantidade de osso lamelar na ponte óssea foi maior que no grupo controle. Este fato pode explicar as variações nos valores de percentual ósseo no tecido de reparo, pois quando havia trabéculas ósseas esparsas no canal medular foi difícil delimitar com precisão os limites inferiores do calo.

No período de 30 dias o calo ósseo se restringia praticamente à ponte óssea unindo as margens do defeito, que mostrou remodelação mais avançada que aos 21 dias e com presença de maior quantidade de osso lamelar. A fusão com a cortical estava mais acentuada, por vezes tornando difícil evidenciar o limite entre a ponte e a cortical original. Em nenhum dos grupos a ponte óssea atingiu a espessura do osso cortical anterior nem completou a remodelação para osso lamelar. Não houve grande diferença microscópica entre os 3 grupos.

A análise histológica descritiva mostrou que aos 7 dias o tratamento com confrei homeopático apresentou resposta mais tardia que o com confrei fitoterápico, mas aos 14 dias o confrei homeopático foi o melhor tratamento, formando o calo maior e com trabéculas mais conectadas e menos espaçadas, além de ter a reação periosteal e endosteal maior. A remodelação do calo aos 21 dias foi maior nos 2 grupos tratados e ao final do experimento (30 dias) os grupos igualaram

os aspectos microscópicos, o que reflete os dados da histomorfometria e da microtomografia.

Embora os métodos de análise escolhidos para este estudo sejam diferentes é possível verificar que existe coerência entre eles.

Através da análise histológica descritiva observa-se que aos 30 dias o defeito ósseo não foi totalmente regenerado em nenhum animal de nenhum grupo. Este fato revela que o modelo experimental utilizado, defeito monocortical de 2,5 mm em tíbia de rato, foi adequado para a análise do medicamento dentro dos parâmetros utilizados nesta pesquisa. Apesar deste defeito não ser considerado um defeito de tamanho crítico, para o nosso tempo de investigação, a metodologia foi adequada. (Prado et al., 2006)

A microtomografia mostra com mais precisão a formação de osso no calo e não está tão sujeita a erros técnicos artefatuais e erros humanos como os outros 2 métodos de análise. Uma vez selecionado o VOI e os parâmetros que serão avaliados, o equipamento os processa sem interferências.

Os dados da microscopia descritiva refletiram os da microtomografia quanto à quantidade e aspecto do tecido ósseo e evolução da reparação. Acrescenta-se que permite analisar com mais detalhe as características celulares do tecido de reparação e suas diferenças entre os grupos.

A histomorfometria foi o exame mais influenciado pela margem de erro nas medições, mas ainda é um exame bastante eficiente. Guardando-se os cuidados necessários, pode ser utilizado na análise da reparação principalmente se for levado em conta que é mais barato e acessível que a microtomografia.

Os dados obtidos na microtomografia não foram mais concordantes com os dados obtidos na histomorfometria devido ao fato

do VOI escolhido para a análise não contemplar toda a área analisada pela histomorfometria. Além disso, a análise histomorfométrica contemplou apenas a região central do defeito ósseo, enquanto que a microtomografia analisou tridimensionalmente um volume de 8 mm³

A resposta à nossa proposição foi parcialmente respondida. O tratamento com confrei apresentou melhores resultados aos 14 dias e 21 dias, quando foi possível verificar calo ósseo maior e com mais trabéculas e depois com melhor remodelação.

No entanto, comparando-se com as informações sobre o potencial efeito da droga na reparação óssea relatada pela medicina popular era esperado um resultado mais evidente desta diferença.

Nossos resultados poderiam ter sido diferentes se fossem utilizados outras doses do medicamento fitoterápico. Como não há relatos na literatura em relação à dose utilizada para ação terapêutica do confrei na reparação óssea, foi-se estabelecida a dose de 500 mg/Kg. Uma dose maior, talvez resultasse em resultados mais expressivos.

Optou-se pela utilização das folhas do confrei para a preparação do medicamento fitoterápico devido ao fato desta ser a parte da planta que era tradicionalmente utilizada pela medicina popular em casos de fraturas ósseas. Entretanto, a partir da observação do uso das raízes do confrei em alguns medicamentos fitoterápicos comercializados para ação tópica como o *flexive*®, aventa-se que fosse utilizada a raiz da planta ao invés das folhas se obteria um resultado diferente.

Outro fator que pode ter influenciado nossa metodologia foi o fato dos ratos utilizados não serem isogênicos, não oferecendo assim uma uniformidade genética entre os animais estudados. Deste modo entre os animais do mesmo grupo, a estrutura óssea de cada animal poderia ser diferente, alterando assim os resultados. Pois o tamanho das tíbias poderia não ser igual.

Em trabalhos futuros a ação do confrei pode ser avaliada na presença de alguma deficiência, como por exemplo, em ratas fêmeas castradas com o objetivo de gerar osteopenia. O confrei poderia mostrar maior ação, frente à reparação óssea na presença desta deficiência.

O medicamento homeopático foi adquirido em uma farmácia homeopática de confiança, entretanto seria interessante se o medicamento homeopático fosse preparado a partir do mesmo extrato utilizado pelo medicamento fitoterápico e que fosse feita a quantificação de todos os componentes deste extrato.

Um dado importante que este trabalho demonstrou é que o confrei homeopático a partir de 14 dias apresentou resultados iguais ou até melhores que o confrei fitoterápico. A avaliação de BV e Tb.pf na microtomografia aos 14 e 21 dias, o preenchimento do defeito com tecido de reparação e o percentual ósseo neste pela histomorfometria aos 14 e 30 dias e pela análise microscópica descritiva demonstram resultados em favor do confrei homeopático. Então, se existe a questão da toxicidade da planta não há necessidade de expor o paciente ao risco uma vez que o medicamento com o confrei em alta diluição se mostrou eficiente.

Nosso estudo não responde a todas as expectativas. São necessários mais estudos para esclarecimento das dúvidas e melhor compreensão do efeito da planta no reparo ósseo.

Neste trabalho não foi realizado nenhuma análise que investigasse o mecanismo de ação do confrei sobre o tecido ósseo. Em trabalhos futuros é importante investigar através de imunistoquímica, cultura de células e outros métodos qual o mecanismo de ação do confrei e quais células são influenciada por esta planta.

6 CONCLUSÃO

O efeito do tratamento com *Symphytum officinale* L. fitoterápico e homeopático na reparação óssea foi evidenciável a partir de 14 dias.

O efeito do *Symphytum officinale* L. homeopático na reparação óssea foi melhor que o fitoterápico aos 14, 21 e 30 dias.

A partir dos resultados obtidos com o *Symphytum officinale* L. homeopático e tendo em vista o potencial tóxico do uso sistêmico do confrei fitoterápico, conclui-se que o uso da formulação homeopática deve ser privilegiado.

São necessários mais estudos para avaliar e melhor compreender os efeitos do *Symphytum officinale* L. na reparação óssea.

8 REFERÊNCIAS*

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. [on line]. Resolução – RDC n. 48, de 16 de março de 2004. [acesso 20 ago 2011]. Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc_48_16_03_04_registro_fitoterapicos%20.pdf

Albuquerque UP, Andrade LHC. Fitoterapia: uma alternativa para quem? Recife: Departamento de Botânica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco.[s.d] [Acesso 20 ago 2011]. Disponível em:

<http://www.etnobotanicaaplicada.com.br/pt/gerenciador/uploadfiles/de4150f7b77ca0c1e7a29032802ab8f5.pdf>.

Almeida JD, Arisawa AL, Balducci I, Rocha RF, Carvalho YR. Homeopathic treatment for bone regeneration: experimental study. Homeopathy. 2009;98(2): 92-6.

Andres P, Brenneisen R, Clerc JT. Relating antiphlogistic efficacy of dermatics containing extracts of *Symphytum officinale* to chemical profiles. Planta Med. 1989;55:66-7.

Araújo ED, Oliveira RAG, Coriolano AT, Araújo ED. Uso de plantas medicinais pelos pacientes com câncer de hospitais da rede pública de saúde em João Pessoa (PB). Rev Espaço Saúde. 2007 Jun;8(2):44-52.

Balducci-Roslindo 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):181-7.

* 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

Bhattacharyya SS, Mandal SK, Biswas R, Pauls S, Pathak S, Boujedaini N, et al. In vitro studies demonstrate anticancer activity of an alkaloid of the plant *Gelsemium sempervirens*. *Exp Biol Med*. 2008 Dec; 233(12):1591-601.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS). [on line]. Portaria n. 19, de 30 de janeiro de 1992. [acesso 2007 set 20]. Disponível em: http://200.214.130.38/saudelegis/leg_norma_espelho_consulta.cfm?id=3232655&highlight=&bkp=pesqnorma&fonte=0&origem=156&sit=0&assunto=&qtd=10&tipo_norma=27&numero=19&data=&dataFim=&ano=1992&pag=1.

Brauchli J, Lüthy J, Zweifel U, Schlatter CH. Pyrrolizidine alkaloids from *Symphytum officinale* L. and their percutaneous absorption in rats. *Experientia*. 1982 Sep;38(9):1085-87.

Carvalho JCT. Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. São Paulo: Tecmedd; 2004.

Castro D. Noções elementares de farmacotécnica homeopática. São Paulo: Edição da revista similia; 1982

Chaves MGAM. Efeito do medicamento homeopático (*Symphytum officinallis* 6CH) e do osso bovino granulado na reparação óssea em tibia de ratos: estudo histomorfométrico [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): UNESP - Univ Estadual Paulista; 2003.

Clapauch R, Meirelles RMR, Julião MASG, Loureiro CKC, Giarodoli PB, Pinheiro AS, et al. Fitoestrogênios: posicionamento do departamento de endocrinologia feminina da sociedade brasileira de endocrinologia e metabologia (SBEM). *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2002 dez;46(6):679-95.

Cornillot P. Tratado de homeopatia. Porto Alegre: Artmed; 2005.

Corrêa AD, Siqueira-Batista R, Quintas LEM. *Similia Similibus Curentur*: notação histórica da medicina homeopática. *Rev Assoc Med Bras*. 1997 out/dez; 43(4):347-51.

Cunha AP. Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia. [aceso 20 ago 2009]. Disponível em: <http://antoniopcunha.com.sapo.pt/ahspmscaf.htm>

Davis GR, Wong FS. X-ray microtomography of bones and teeth. *Physiol Meas*. 1996;17: 121-46.

Ebina H, Hatakeyama J, Onodera M, Honma T, Kamakura S, Shimauchi H, et al. Micro-CT analysis of alveolar bone healing using a rat experimental model of critical-size defects. *Oral dis*. 2009;15(4):273-80

Farina VH. Efeitos da Calcarea fosporica 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 (SP): UNESP - Univ Estadual Paulista; 2010

Farmacopéia brasileira. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira; 1959

Figueiredo MR, Kaplan MAC. Pyrrolizidine alkaloids: A word of caution. *J Braz Assoc Adv Sci*. 1997 Sep-Dec;49(5/6):331-8.

Forsberb F. X-ray microtomography and digital volume correlation for internal deformation and strain analysis [tese]. Lulea: Lulea University of Technology; 2008.

Gayotto LCC, Alves VAF. Doenças do fígado e vias biliares. São Paulo: Atheneu; 2001.

Gerstenfeld LC, Culliname DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects o its regulation. *J Cell Biochem*. 2003;88(5):873-84.

Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA. Perspective application of histomorphometric methods to the study os bone repair. *JBMR*. 2005;20(10):1715-22.

Goldman RS, Freitas PCD, Oga S. Wound healing and analgesic effect of crude extracts of *Symphytum officinale* in Rats. *Fitoterapia*. 1985; 56(6): 323-9.

González-García R, Monje F. Is micro-computed tomography reliable to determine the microstructure of the maxillary alveolar bone? *Clin Oral Impl Res*. 2012 Apr; 30: doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02478.x

Guo L, Mei N, Dial S, Fuscoe J, Chen T. Comparison of gene expression profiles altered by comfrey and riddelliine in rat liver. *BMC Bioinformatics*. 2007 Nov; 8 Suppl 7:S22.

Györika S, Striker H. Severe pulmonary hypertension possible due to pyrrolizidine alkaloids in polyphytotherapy. *Swissmedwky*. 2009;139(13-14): 210-11.

Hinoro I, Mori H, Haga M. Carcinogenic activity of *Symphytum officinale*. *JNC1* 1978;61:865-9.

Khuda-Bukhsh AR. Mice as a model for homeopathy research. *Homeopathy*. 2009 Oct;98(4):267-79.

Kommission E. Monographie *Symphyti herba/-folium* (Beinwellkraut/-blätter) *Bundesanzeiger*; 1990.

Kossak-Romanach A. *Homeopatia em 1000 conceitos*. São Paulo: Editora Elcid; 2003.

Lazenby RA, Skinner MM, Kivell TL, Hublin JJ. Scaling VOI size in 3D ICT studies of trabecular bone: A test of over-sampling hypothesis. *Am J Phys Anthropol*. 2011 Feb;144(2):196-203.

Lima AP. Análise bioquímica e histológica da toxicidade do *Symphytum officinale* fitoterápico e homeopático em fígado e rins de ratos [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): UNESP – Univ Estadual Paulista; 2009.

Lima I, Lopes RT, Oliveira LF, Alves JM. Análise de estrutura óssea através de microtomografia computadorizada 3D. Rev Bras Física Médica. 2009;2(1):6-10.

Mei N, Guo L, Fu PP, Heflich RH, Chen T. Mutagenicity of comfrey (*Symphytum Officinale*) in rat liver. Br J Cancer. 2005 Mar 14;92(5):873-5.

Mei N, Guo L, Zhang L, Shi L, Sun YA, Fung C, et al. Analysis of gene expression changes in relation to toxicity and tumorigenesis in the livers of Big Blue transgenic rats fed comfrey (*Symphytum officinale*). BMC Bioinformatics. 2006 Sep 26;7 Suppl 2:S16.

Mello MLV. Noções sobre Hahnemann e a homeopatia em animais. [texto na internet]. [acesso em 2011 set. 07]. Disponível em : http://www.homeopatiaonline.com/ver_texto.asp?id=41. [sd]

Müller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J. Morphometric analysis of human bone biopsies: A quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. Bone. 1998 Jul;23(1):59-66.

Niggemann B, Grüber C. Side-effects of complementary and alternative medicine. Allergy. 2003 Aug;58(8):707-16.

Nyman S, Munoz S, Jadhav S, Mansour A, Yoshii T, Mundy GR, et al. Quantitative measures of femoral fracture repair in rats derived by micro-computed tomography. J Biomech. 2009 May;42(7):891-7

Pozetti GL. *Symphytum officinale*, sua toxicologia e a respectiva patogenia registrada na literatura homeopática. Pesq Homeop. 1991;6(1):29-33

Prado FA, Anbinder AL, Jaime APG, Lima AP, Balducci I, Rocha RF. Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. Rev Odontol Unacid. 2006 jan-abr;18(1):7-13.

Predel HG, Giannetti B, Koll R, Bulitta M, Staiger C. Efficacy of a comfrey root extract ointment in comparison to a diclofenac gel in the treatment of ankle distortions: results of an observer-blind, randomized, multicenter study. *Phytomedicine*. 2005 Nov; 12(10):707-14.

Rode D. Comfrey toxicity revisited. *Trends Pharmacol Sci*. 2002 Nov; 23(11):497-9.

Rodrigues MES. Análise da relação entre osteopenia induzida por ovariectomia e perda dentária em ratas wistar [dissertação]. Fortaleza: Universidade Estadual do Ceará; 2008.

Saito ML. Formas farmacêuticas extrativas. *Lecta – USF*. 1998;6(5):7-24.

Sakakura CE, Neto RS, Bellucci M, Wenzel A, Scaf G, Marcantonio E Jr. Influence of homeopathic treatment with comfrey on bone density around titanium implants: a digital subtraction radiography study in rats. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Jun;19(6):624-8. Epub 2008 Apr 16.

Sales ES. Estudo da qualidade óssea através das técnicas de microtomografia e microfluorescência de raios X [tese]. Rio de Janeiro. Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (RJ): UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2010

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): UNESP - Univ Estadual Paulista – UNESP; 2006

Sigolo RP. Pensamento médico e história: um breve ensaio. *Rev Hist Reg*. 1996;1(1):145-58.

Silva AMH. Análise morfométrica 2D e 3D de amostras de osso trabecular utilizando microtomografia tridimensional por raio-X. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos: Universidade de São Paulo; 2009

Smit E, Oberholzer HM, Pretorius E. A review of immunomodulators with reference to Canova. Homeopathy. 2009 Jul;98(3):169-76.

Spin-Neto R, Belluci MM, Sakakura CE, Scaf G, Pepato MT, Marcantonio Jr E. Homeopathic *Symphytum officinale* increases removal torque and radiographic bone density around titanium implants in rats. Homeopathy. 2010 ;99(4):249-54.

Staiger C. Comfrey: a clinical overview. Phytother Res. 2012 Feb;doi: 10.1002/ptr.4612.

Stickel F, Patsenker E, Schuppan D. Herbal hepatotoxicity. J Hepatol. 2005 Nov;43(5):901-10.

Stickel F, Seitz HK. The efficacy and safety of comfrey. Public Health Nutr. 2000 Dec;3(4A):501-8.

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

Turolla MSR, Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. Rev Bras Ciênc Farm. 2006 Jun; 42(2):289-306.

Vaz APA, Jorge MHA. Confrei [Folheto on line]. Corumbá: EMBRAPA; 2006. (Série Plantas Mediciniais, Condimentares e Aromáticas). [Acesso 22 Ago 2011]. Disponível em: <http://www.campinas.snt.embrapa.br/plantasMediciniais/confrei.pdf>

Veiga VF Jr, Pinto AC. Plantas medicinais: cura segura? Quim Nova. 2005;28(3): 519-28.

Victoria G, Petrisor B, Drew B, Dick D. Bone stimulation for fracture healing: What's all the fuss? IJO. 2009 ;43(2):117-20.

Werkman C, Senra, GS, Rocha RF, Brandão AAH. Comparative therapeutic use of Risedronate and *Calcareia phosphorica* – alopathy

versus homeopathy – in bone repair in castrated rats. Braz Oral Res. 2006;20(3):196-201.

Yan YB, Qi W, Wang J, Liu LF, Teo EC, Tianxia Q, et al. Relationship between architectural parameters and sample volume of human cancellous bone in micro-CT scanning. Me Eng Phys. 2011 Jul;33(6):764-9.

Yeong ML, Clark SP, Waring JM, Wilson RD, Wakefield SJ. The effect of comfrey derived pyrrolizidine alkaloids on rat liver. Pathology. 1991;23(1):35-8.

Yeong ML, Wakefield SJ, Ford HC. Hepatocyte membrane injury and bleb formation following low dose comfrey toxicity in rats. Int J Exp Pathol. 1993 Apr; 74(2):211-7.

Zhang Q, Zhao L, Wu Y, Wang H, Zhao Z, Xu Z, et al. The effect of varying healing times on orthodontic mini-implant stability: a microscopic computerized tomographic and biomechanical analysis. Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011 Oct;112(4):423-9.

ANEXO – Certificado do comitê de ética em pesquisa animal.

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Il. São Diniz
CEP 12201-970 - F. (12) 3947-9028 / 9037
Fax: (12) 3947-9010 / aigotti@fosjc.unesp.br / Quodas@fosjc.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **043/2007-PA/CEP**, sobre **"Análise comparativa dos efeitos do Symphytum officinale usado homeopática e fitoterapeuticamente na reparação óssea, no fígado e rins de ratos"** sob responsabilidade de **ANA PAULA DE LIMA**, 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, 06 de novembro de 2007.

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