



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Faculdade de Odontologia

EDMUNDO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO REPARO ÓSSEO EM
RATAS OVARIECTOMIZADAS, LESIONADAS E TRATADAS
COM *Arnica montana* FITOTERÁPICA E HOMEOPÁTICA**



2012

EDMUNDO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO REPARO ÓSSEO EM RATAS,
OVARIECTOMIZADAS, LESIONADAS E TRATADAS COM
Arnica montana FITOTERÁPICA E HOMEOPÁTICA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão

São José dos Campos

2012

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático
para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

S38a Silva, Edmundo da
Avaliação da qualidade do reparo ósseo em ratas ovariectomizadas, lesionadas e
tratadas com Arnica montana fitoterápica e homeopática / Edmundo da Silva. -
São José dos Campos : [s.n.], 2012.
63.f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de
São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2012.
Orientador: Profa.Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão.

1. Osteoporose. 2. Arnica montana. 3. Fitoterapia. 4. Homeopatia. 5. Exames
radiográficos. 6. Flexão de três pontos. 7. Microscopia eletrônica de varredura. I.
Brandão, Adriana Aigotti Haberbeck. II. Faculdade de Odontologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade Estadual Paulista
“Julio de Mesquita Filho”. IV. UNESP – Univ Estadual Paulista. V. Título

tD12

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

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 24 de Setembro de 2012.

Assinatura :

E-mail: edmundo.silva@fosjc.unesp.br

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Adriana Adriana Aigotti Haberbeck Brandão

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Universidade Estadual Paulista

Prof^a. Dr^a Luana Marotta Reis de Vasconcellos

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Universidade Estadual Paulista

Prof^a. Dr^a Emilia Angela Loschiavo Arisawa

Diretora da Universidade de Ciências da Saúde

Universidade do Vale do Paraíba

São José dos Campos 13 de julho de 2012

DEDICATÓRIA

Ao Grande e Maravilhoso Deus, pois o que seria de mim se não fosse à fé que tenho Nele.

A meus pais Lúdia e Luis que me ensinaram o valor do conhecimento e a lutar por meus objetivos.

A minha esposa Simone e aos meus filhos, Breno, Raul e Bruna Rafaela por diversas vezes privarem-se de minha presença nas reuniões e comemorações em família, tudo em prol da realização dos meus sonhos.

Aos meus irmãos, Ligia, Lilian e Eduardo por torcerem pelo meu sucesso.

A minha enteada Bianca e minha sogra Zenaide pela paciência e compreensão nos momentos críticos da realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” que me proporcionou a oportunidade de obter uma formação humana, ética e responsável consolidando meus conhecimentos em patologia.

A minha Orientadora Prof^a Dr^a Adriana Aigotti Haberbeck Brandão, que muito me ensinou durante toda a realização desse trabalho. Muito obrigada pela sua paciência, dedicação, disponibilidade e apoio.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia bucal através da coordenadora Cristiane Yumi Koga Ito.

A todos os docentes do programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, em especial a Prof. Titular Horácio Faig Leite, sua colaboração em minha formação foi grandiosa.

Aos Professores e alunos da Pós-graduação do setor de Imagenologia desta Faculdade.

Aos colegas, em especial a Tabata de Melo Tera e Augusto Cesar de Andrade Meyer pela valiosa ajuda durante as cirurgias aos fins de semana.

Ao amigo Vitor Hugo Farina, obrigada por sua amizade e companheirismo e por ceder alguns de seus fins de semana para colaborar em minha pesquisa.

Aos funcionários do Biotério, Antonio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos e Marco Antonio Corrêa Alfredo, pela valiosa colaboração cuidando dos animais que doaram suas vidas em prol da ciência.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia Aeroespacial (DCTA) da Subdivisão de Atividades Materiais Raras (AMR) meus sinceros agradecimentos pela ajuda dispensada;

Ao Sub Oficial Luiz Alberto, Sub Oficial Duque, Sub Oficial Jefferson, Técnico Duarte, Engenheiro. Cairo, Engenheiro Cristian, Engenheiro Rodolfo, Cabo Paiva, Técnico João Batista, Técnico Claudemir e Técnica Elizabeth

Aos amigos de trabalho da Divisão de Saúde do Grupamento de Infraestrutura e Apoio, Capitão Eduardo Veloso, Tenente Félix e Tenente Marcelo Ferreira.

EPIGRAFE

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Estrutura óssea X Osteoporose	19
2.2 Reparo ósseo	22
2.3 Método para avaliação da qualidade óssea	23
2.4 <i>ARNICA MONTANA</i>	26
3 PROPOSIÇÃO	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Manuseio geral dos animais e considerações éticas	32
4.2 Anestesia	33
4.3 Ovariectomia	33
4.4 Execução da lesão óssea e tratamento	34
4.5 Eutanásia dos animais	35
4.6 Radiografia e avaliação da densidade óptica das tíbias	36
4.7 Análises morfológicas das tíbias por MEV	37
4.8 Preparo das tíbias para ensaios biomecânicos	38
4.9 Teste de flexão em três pontos	39
4.10 Análise estatística	40
5 RESULTADOS	42
5.1 Dimensões das tíbias	42
5.1.1 Avaliação da densidade óptica das tíbias	43

5.1.2	Teste de flexão em três pontos	44
5.2	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA	44
5.2.1	Período de 6 dias	45
5.2.2	Período de 12 dias	45
5.2.3	Período de 18 dias	46
5.2.4	Período de 28 dias	46
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÃO	59
8	REFERÊNCIAS	60
ANEXO A		66

Lista de Figuras

Figura 1 – A) Flores de <i>Arnica montana</i> ; B) a flor em detalhe	27
Figura 2 – Fórmula química da <i>Helenalin</i>	27
Tabela - Distribuição dos animais por grupos e tratamentos.....	32
Figura 3 – A) Animal anestesiado e depilado preparado para a cirurgia; B) lesão monocortical na tíbia direita.....	35
Figura 4 – Aparelho radiográfico Gendex 765DC (<i>Gendex Dental Systems, Dentsply International, Chicago, IL, USA</i>).....	37
Figura 5 – Embutimento da amostra em resina baquelite.....	37
Figura 6 – A) Preparo das amostras para a MEV. Realização do recobrimento com ouro; B) material já recoberto.....	38
Figura 7 – Medições das dimensões das tíbias. Comprimento; B) diâmetro da parte distal.....	39
Figura 8 – A) Máquina universal de ensaio EMIC DL 2000; B) aplicação de carga no centro do corpo-de-prova específico, apoiado em dois pontos.....	40
Figura 9 - Gráfico de colunas dos valores médios (desvio padrão) do comprimento total das tíbias.....	42
Figura 10 – Gráfico de colunas dos valores médios do diâmetro da parte distal das tíbias.....	43
Figura 11 - Gráfico de colunas dos valores médios do histograma das tíbias.....	43
Figura 12 – Gráfico de colunas dos valores médios das fraturas	44

mediante a força aplicada nas mesmas.....

Figura 13 - Imagens de MEV da região de reparo na lesão das
tíbias, vista superior e corte longitudinal, no período de 6 dias de
tratamento: SHAM PL (A e B), OVZ PL (C e D), OVZ TM (E e F),
OVZ 6CH (G e H) (aumento original 20 vezes)..... 48

Figura 14 - Imagens de MEV da região de reparo na lesão das
tíbias, vista superior e corte longitudinal, no período de 12 dias
de tratamento: SHAM PL (A e B), OVZ PL (C e D), OVZ TM (E e
F), OVZ 6CH (G e H) (aumento original 20 vezes)..... 49

Figura 15 - Imagens de MEV da região de reparo na lesão das
tíbias, vista superior e corte longitudinal, no período de 18 dias
de tratamento: SHAM PL (A e B), OVZ PL (C e D), OVZ TM (E e
F), OVZ 6CH (G e H) (aumento original 20 vezes)..... 50

Figura 16 - Imagens de MEV da região de reparo na lesão das
tíbias, vista superior e corte longitudinal, no período de 28 dias
de tratamento: SHAM PL (A e B), OVZ PL (C e D), OVZ TM (E e
F), OVZ 6CH (G e H) (aumento original 20 vezes)..... 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ	=	Micrometro
BMP	=	<i>Bitmap</i> (mapa de bits)
BMU	=	Unidade Multicelular Básica
BSE	=	MEV em modo de Elétrons Retroespalhados
Ca/P	=	Relação Cálcio/Fósforo
CCD	=	<i>Charged-Coupled Device</i>
CH	=	Centesimal Hahnemanniana
cm	=	Centímetro
COBEA	=	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CV	=	Coeficiente de variação
DMO	=	Densidade Mineral Óssea
Dpi	=	<i>Dots per inch</i> (pontos por polegadas – ppp)
FDA	=	<i>Food and Drug Administration</i>
g	=	Grama
IC	=	Intervalo de Confiança
Kg/m ²	=	Quilograma/metro quadrado
Kv	=	Quilovolt
mA	=	Miliamperagem
Max	=	Máximo
MEV	=	Microscopia Eletrônica de Varredura
Min	=	Mínimo
mL	=	Mililitro
mm	=	Milímetro
NaCl	=	Cloreto de Sódio
OMS	=	Organização Mundial de Saúde
OVZ	=	Ovariectomia

PL	=	falso tratamento
PNPIC	=	Política de Práticas Integrativas e Complementares
p-valor	=	resultado de cada comparação
SHAM	=	falsa ovariectomia
Trat.	=	Tratamento

Silva, E. Avaliação da qualidade do reparo ósseo em ratas ovariectomizadas, lesionadas e tratadas com *Arnica montana* fitoterápica e homeopática. [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Universidade Estadual Paulista; 2012.

RESUMO

Dados estatísticos nacionais e mundiais demonstram que o número de indivíduos idosos tende a crescer de maneira exponencial nos próximos anos, tornando-se uma população significativamente e proporcionalmente maior que as demais. Entre as doenças mais comuns nesta faixa etária encontra-se a osteoporose, doença que reduz a massa esquelética e deteriora a microarquitetura do osso causando fragilidade e aumentando o risco de fraturas. Este estudo teve como proposta avaliar o efeito da *Arnica montana* fitoterápica e homeopática no reparo de lesões ósseas, visando uma possível forma de tratamento de fraturas na vigência de osteoporose. Os ensaios experimentais foram realizados em ratas *Wistar* adultas, divididas em quatro grupos: ovariectomizado tratado com *Arnica montana* 6CH (OVZ 6CH); ovariectomizado tratado com *Arnica montana* tintura mãe (OVZ TM); ovariectomizado tratado com placebo (OVZ PL) e animais com falsa cirurgia de ovariectomia e tratado com placebo (Sham PL). Após 45 dias da cirurgia sham ou de ovariectomia, foi realizada uma lesão óssea monocortical na tíbia de todos os animais e iniciados os respectivos tratamentos. Os animais foram eutanasiados após, 6, 12, 18 e 28 dias e as tíbias retiradas para avaliação das suas dimensões e análise do reparo ósseo através de densidade óssea radiográfica, ensaios biomecânicos e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os dados foram submetidos à análise estatística pelos testes de ANOVA e Tukey ($p < 5\%$). Demonstraram que o tratamento com arnica 6CH foi melhor que o com arnica TM quanto à resistência e à qualidade da regeneração óssea, enquanto a TM mostrou melhor valor de densidade óptica.

Palavras-chave: Osteoporose. *Arnica montana*. Homeopatia. Fitoterapia. Exames Radiográficos. Flexão de três Pontos. Microscopia eletrônica de varredura.

Silva E. Quality of bone repair in ovariectomized rats with bone lesions treated with phytotherapeutic and homeopathic Arnica montana [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ. Estadual Paulista; 2012.

ABSTRACT

*National and international data show that in the next years the elder population tends to have an exponential increase becoming to be significantly higher than the other age population. Among the frequent diseases in the elderly is osteoporosis, a disease that decreases bone mass and deteriorates bone structure causing fragility and a high risk of fracture. The aim of this study was to evaluate the effect of phytotherapeutic and homeopathic *Arnica montana* on bone repair quality, aiming its possible use in the treatment of bone fracture in patients with osteoporosis. This experimental study was realized in Wistar adult female rats divided in 4 groups according to the following treatments: ovariectomized treated with *Arnica montana* 6CH (OVZ 6CH); ovariectomized treated with extract of *Arnica montana* (OVZ TM); ovariectomized with false treatment with placebo (OVZ PL) and rats with sham surgery and false treatment with placebo (Sham PL). In a period of 45 days after ovariectomy or sham surgery all animals were drilled a monocortical lesion in their tibiae and began the proposed treatments. They were euthanized after 6, 12, 18 e 28 days and had the tibiae removed to evaluation of tibiae dimensions and bone repair by radiographic density, biomechanical test and electronic scan microscopy (MEV). Data were analyzed by ANOVA e Tukey tests ($p < 5\%$). The results showed that treatment with *arnica* 6CH was better than with *arnica* TM considering bone resistance to biomechanical flexion and bone repair quality, while *arnica* TM showed better bone density values.*

*Keywords: Osteoporosis. *Arnica montana*. Homeopathy. Phytotherapy. Radiographic bone density. Biomechanical test. Electronic scan microscopy.*

1 INTRODUÇÃO

Até 2025, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Brasil será o sexto país do mundo em número de idosos. Ainda é grande a desinformação sobre a saúde do idoso e as particularidades e desafios do envelhecimento populacional para a saúde pública em nosso contexto social. Entre 1980 e 2000 a população com 60 anos ou mais cresceu 7,3 milhões, totalizando mais de 14,5 milhões em 2000. O aumento da expectativa média de vida também aumentou acentuadamente no país. Este aumento do número de anos de vida, no entanto, precisa ser acompanhado pela melhoria ou manutenção da saúde e qualidade de vida (OMS, 2005).

Uma das doenças comuns nesta faixa etária é a osteoporose, doença metabólica caracterizada por redução da massa esquelética, com deterioração da microarquitetura, resultando em maior fragilidade óssea e, conseqüentemente, em aumento no risco de fraturas (Manolagas, 2000; Namkung-Matthai et al., 2001; Nakamura, 2004; Astacio et al., 2007; Kanis et al.2008). As alterações no equilíbrio da remodelação óssea presentes nessa doença interferem no reparo de lesões ósseas. O tratamento desta doença e de suas complicações representa um impacto financeiro significativo para os pacientes e para o setor de saúde.

Terapias alternativas como a homeopatia e a fitoterapia são amplamente utilizadas para tratar várias doenças, devido a seus efeitos terapêuticos e também por se acreditar que apresentem menos efeitos colaterais. Além disso, ambas apresentam custo financeiro menor se comparadas à terapia alopática e são mais acessíveis à população em geral. Seu uso em doenças ósseas ainda é limitado. Entre as medicações

homeopáticas e fitoterápicas podemos encontrar indicações terapêuticas tanto para osteoporose quanto para fraturas

Arnica montana é uma planta conhecida desde a antiguidade e amplamente utilizada no tratamento de contusões e feridas. Existem poucos estudos na literatura científica avaliando seus efeitos especificamente na osteoporose e no reparo de lesões ósseas na vigência de osteoporose.

Assim, o objetivo deste estudo experimental é avaliar o efeito do tratamento com *Arnica montana*, como medicamento fitoterápico e como medicamento homeopático, na qualidade do reparo ósseo em ratas com osteoporose.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estrutura Óssea X Osteoporose

O osso basicamente é composto por matriz orgânica acrescida de sais minerais que lhe confere resistência. O principal elemento da matriz orgânica são as fibras colágenas na ordem de 95%, estas fibras proporcionam ao osso força tênsil. Já os sais presentes no osso denominados sais cristalinos, são compostos principalmente de cálcio e fosfato. O principal sal cristalino é a hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), além de íons de magnésio, sódio, potássio e carbonato também estão presentes entretanto, ficam adsorvidos à superfície dos cristais de hidroxiapatita. As fibras colágenas possuem grande força tênsil ao passo que os sais têm como propriedade a grande força compressiva, com a combinação destes o osso torna-se resistente a ambas as forças (Guyton et al., 1998).

A formação óssea advém da secreção de colágeno e de substância fundamental dos osteoblastos. O colágeno se polimeriza rapidamente, formando as fibras de colágeno, e o tecido resultante torna-se osteoide. Na formação do osteoide, alguns osteoblastos ficam aprisionados a ele, sendo classificados como osteócitos. Os osteoblastos como elemento precursor de deposição óssea, estão presentes em cerca de 4% de todas as superfícies externas dos ossos assim como nas cavidades. Em contrapartida os osteoclastos têm como função, a absorção do osso.

A deposição de osso novo cessa, quando o suprimento sanguíneo fica reduzido pelo crescimento do osso. O equilíbrio entre

deposição e absorção ocorre a partir da estabilização do osso, porém, esse equilíbrio não está presente durante uma regeneração óssea como ocorre nas fraturas ou na formação como já foi dito (Guyton et al., 1998).

A hidroxiapatita encontrada no osso é nanocristalina que possui grandes variações como imperfeições e impurezas. Partículas de mineral ósseo de tamanho aumentado estão associadas com fragilidade, assim como partículas muito pequenas também podem causar fragilidade (Rubin et al., 2003).

A plenitude de massa óssea cortical é atingida por volta dos trinta anos, em contra partida o osso trabecular tem seu pico de cinco a dez anos antes (Sampson, 2002). A perda óssea tem seu início tanto para o homem como para a mulher, por volta dos quarenta anos, entretanto este se torna mais rápido cinco a dez anos após a menopausa (Manolagas, 2000). A massa óssea perdida gira em torno de 0,5 a 1,0% ao ano para as mulheres, para os homens a perda ocorre de maneira mais lenta e com o menor percentil anual (0,5%) (Sampson, 2002).

As alterações hormonais como a menopausa e a andropausa, adquiridas com o avançar da idade, causam deficiência na concentração de estrogênio. Com a diminuição deste hormônio o equilíbrio, deposição – absorção entra em colapso proporcionando um aumento significativo na atividade dos osteoclastos. O tratamento comumente utilizado na tentativa de reestabelecer os níveis hormonais é a reposição dos mesmos (Faloni, Cerri, 2007).

Osteoporose, doença metabólica caracterizada pela alteração estrutural do osso. Os poros nesta doença aumentam de tamanho e quantidade, produzindo fragilidade e possibilitando consequentemente fratura no osso acometido (Astacio et al., 2007).

A osteoporose está classificada de duas formas, primária e secundária, sendo a primária subdividida em tipo I e tipo II. A osteoporose do tipo I tem relação com as alterações hormonais onde, também pode ser chamada de pós-menopausa. Osteoporose do tipo II,

doença que é desencadeada pela idade avançada e consequentemente deficiência de cálcio, alterações hormonais e diminuição na formação de massa óssea, pode também ser chamada de osteoporose senil. Lembrando que, a osteoporose não é uma doença exclusiva da mulher, e sim existe um predomínio pelo sexo feminino (Gali, 2001).

A osteoporose secundária ocorre em virtude de doenças como a artrite reumatoide, hipertireoidismo, hiperparatireoidismo e mieloma múltiplo. Outras formas decorrem do uso abusivo ou prolongado de bebida alcoólica, anticonvulsivante, vitamina A, anti-agregante plaquetário e imobilização (Jacobs et al., 2007).

A quantidade de deposição óssea na osteoporose pode apresentar valores normais, entretanto, ocorre aumento significativo de absorção (Boyle, 2003). No osso osteoporótico, as atividades dos osteoclastos superam em dobro, a dos osteoblastos (Riggs et al., 2002).

Ammann; Rizzolli, 2003 ratificam que a alteração na microestrutura do osso o torna mais frágil, porém, ressalta que outros elementos como a forma e tamanho do osso também pode contribuir com a diminuição da resistência mecânica.

A qualidade óssea não está simplesmente ligada a fatores lógicos como fragilidade ou resistência, osteoporose ou osso jovem, respectivamente. As propriedades que definem a qualidade óssea são infinitas, devido à complexa interligação de fatores intrínsecos e extrínsecos pertinentes à sua formação. Um exemplo da resistência diminuída é a própria osteoporose (Felsenberg, Boonen, 2005).

2.2 Reparo Ósseo

A deposição e a absorção contínuas no osso têm várias funções fisiologicamente importantes. Primeira, o osso normalmente

ajusta sua força em proporção ao grau do estresse ósseo. Por conseguinte, os ossos ficam mais grossos quando submetidos a cargas pesadas. Segunda, até mesmo a forma do osso pode ser remodelada para sustentar adequadamente as forças mecânicas através da deposição e da absorção do osso de acordo com os padrões de estresse. Terceira, como o osso velho se torna quebradiço e fraco, há necessidade de uma nova matriz orgânica quando a antiga se degenera. Deste modo, a resistência normal do osso é mantida. De fato, os ossos das crianças, nos quais a deposição e a absorção ocorrem com rapidez, são pouco quebradiços quando comparados aos ossos das pessoas idosas, em que a deposição e a reabsorção são lentas (Guyton et al., 1998).

A remodelação óssea sofre influência dos processos patológicos, terapêuticos e fisiológicos podendo resultar deficiência, como a perda da massa óssea (Szejnfeld, 2000). Apresentar da influência de remodelação sofrer com todos esses processos, o mesmo possui um metabolismo ativo e dinâmico, apresentando constante remodelação (Carvalho, Ponzoni, 2002; Diniz et al., 2005).

No momento que ocorre uma fratura, o osso ativa ao máximo todos os osteoblastos, sejam eles periosteos e intraósseos envolvidos na ruptura. Quase imediatamente formam-se inúmeros novos osteoblastos a partir das células osteoprogenitoras, que são células tronco ósseas que revestem as superfícies dos ossos. Por esta razão, dentro de um curto período, desenvolve-se entre duas extremidades quebradas do osso, uma grande massa de tecido osteoblástico e de nova matriz óssea orgânica, seguida logo depois pela deposição de sais de cálcio (Guyton et al., 1998).

Pantaleão et al. 2009, faz a correlação entre a idade de ratos (*Wistar*) com seres humanos, onde 24 meses equivale a 60 anos respectivamente. Isso significa que um dia do animal corresponde a aproximadamente há trinta dias na espécie humana. A tíbia foi o local anatômico de escolha devido a seu fácil acesso, estabilidade satisfatória

para boa recuperação da lesão e posicionamento favorável para avaliação radiográfica sem sobreposição de imagens (Senra, 2006).

As ratas ovariectomizadas têm perda óssea trabecular semelhante as vértebras lombares, isso em razão do mecanismo de desequilíbrio na remodelação (Senra, 2006).

Gosain et al. 2000 simularam traumas ósseos em calvária de cobaias normais, divididas em vários períodos experimentais e diâmetros de lesões. O intuito deste trabalho foi definir o tamanho crítico. Concluíram que, tamanho crítico é aquele que de fato não ocorre reparo total durante o período a ser estudado. Prado, 2003, realizou trabalho semelhante, porém, utilizando tíbia de ratos e concluíram ratificando o que Gosain e colaboradores realizaram no ano de 2000. Entretanto, ressalta que o tamanho ideal para a confecção da lesão em tíbia de ratos é um tamanho intermediário compreendido entre 2,5 a 3,5 mm.

A regeneração trabecular é a referência microestrutural relevante quando se avalia as propriedades mecânicas (força máxima e módulo de elasticidade) do osso trabecular (Mittra et al., 2005).

Quando comparamos os ossos cortical e trabecular este último, tem metabolismo muito mais ativo, devido o fornecimento de suprimento no estágio inicial de deficiência mineral, o qual, é perdido de maneira rápida na osteoporose. A composição do osso compacto maduro é de aproximadamente 70% de sais minerais e 30% de matriz orgânica (Yong et al., 2007).

2.3 Métodos para avaliação da qualidade óssea

A Densidade Mineral Óssea (DMO) é um dos métodos utilizados para avaliar a quantidade de massa óssea em humanos, assim como diagnosticar a osteoporose. Um método bem utilizado para avaliar a

regeneração das lesões experimentais em ossos é através da radiografia simples. Método prático, barato e de fácil realização. A transcodificação da imagem para mensurar a densidade óptica é fornecida em valores que vão de zero a 255. Os níveis de cinza presentes nesta escala são de difícil interpretação a olho nu, tornando o teste qualitativo e não quantitativo (Senra, 2006).

O reparo em condições experimentais alteram sua qualidade e quantidade de massa óssea influenciada pelo tipo de cobaia, idade, local anatômico, envolvimento cortical (mono e ou bicortical), tipo e tamanho do defeito (Alkan et al., 2002).

As propriedades biomecânicas podem ser divididas e dois níveis. O primeiro nível pode ser descrito como qualidade tecidual do osso e estes são independentes da estrutura e geometria óssea. Já o segundo nível leva em consideração a conformação estrutural completa do osso, pois diferenças na estrutura possibilita alterações de resistência no ensaio mecânico de flexão (Felsenberg, Boonen, 2005). A propriedade biomecânica de um osso é determinada pelo cálculo da tensão máxima aplicada no corpo de prova até sua ruptura. A integração da curva fornece a área e esta é a medida da energia de deformação. A capacidade do material absorver energia até a ruptura é calculada obtendo-se a área total abaixo da curva carga x deflexão (Holanda, 1999).

O MEV tem sua maior aplicação no exame de superfícies rugosas (contraste topográfico). O poder de resolução do MEV, intermediário entre o MF e o MET, resulta em aumentos da ordem de 10 a 150.000 vezes. Certas amostras, principalmente biológicas, contém água e são danificadas pelo vácuo, assim como, também podem prejudicar o equipamento (Goldstein et al., 2002).

O processo de metalografia tem objetivo obter uma superfície plana e polida, (compatível com a profundidade de campo relativamente pequena do instrumento) e que apresente o menor grau de deformação mecânica superficial possível, sem alterar a realidade

estrutural. Para isso, ocorre uma sequência de etapas que incluem secionamento, embutimento, lixamento, polimento e ataque (Vander, 2002).

A maioria dos casos requer secionamento para obter uma amostra conveniente. A operação de corte gera considerável quantidade de calor que pode danificar a amostra, e é preciso refrigera-la continuamente, em geral com água circulante. Após o corte, a amostra deverá ser limpa de resíduos de abrasivos e lubrificantes, com lavagem em solventes adequados eventualmente ativados por ultrassom (Vander, 2002).

Quando a amostra tiver dimensões reduzidas que não permitam o seu processamento nas etapas seguintes com modalidade e segurança, podem ser montadas em dispositivos ou embutidas em plástico.

O método mais comum de embutimento consiste em envolver a amostra com plástico polimerizado a quente, e a resina mais utilizada é a baquelite (Vander, 2002).

A etapa de lixamento é importante porque deve remover os danos mecânicos introduzidos pelo secionamento, ao mesmo tempo em que minimiza os danos remanescentes para que abrasivos sucessivamente mais finos possam eliminá-los. Os abrasivos de polimento não são eficazes para remover deformação superficial substancial (Vander, 2002).

O lixamento é efetuado pelo uso sucessivo de lixas com granulação de 100 até 600 em cerca de cinco etapas. A água também age no sentido de remover detritos e abrasivos, minimizando a tendência de embutir partículas na matriz da amostra, fonte frequente de artefatos. Após o lixamento até grão 600, a amostra é polida para obtenção de superfície plana, reflexiva e o quanto possível livre de arranhões (Vander, 2002).

O disco de polimento é recoberto por pano, retido por um anel circular ou auto-aderente. O pano deve ser capaz de ser impregnado e reter o abrasivo, e não conter materiais estranhos que possam arranhar a amostra (Vander, 2002).

Os materiais a serem examinados no MEV não devem sofrer perda de matéria volátil sob a influência do vácuo ou do feixe de elétrons. Isto é importante tanto para a preservação da higiene ambiental do equipamento, como para evitar modificações na estrutura da amostra com evolução de gases. Quando necessário, deve ser considerado um tratamento prévio em câmara de vácuo ou estufa (ou combinado os dois procedimentos) cuja dinâmica seja otimizada para minimizar tais alterações morfológicas (Vander, 2002).

O material, previamente limpo para remoção de gorduras e detritos por sopro de ar comprimido e ação de solventes, eventualmente ativado por ultrassom, é fixado sobre um suporte. A maneira usual é utilizada uma cola condutora (por exemplo, cola celulósica adicionada de prata coloidal, ou na sua falta, pó de alumínio), atentando sempre para que a cola esteja totalmente seca antes da colocação no MEV, para evitar contaminação pelo solvente. (Vander, 2002).

As amostras não condutoras deverão ser recobertas com uma fina camada de material condutor, utilizando-se comumente ouro, platina ou carbono. O material vaporizado deposita-se em todo o aparelho, inclusive na amostra, que deverá ser girada e oscilada para garantir uniformidade no depósito (Vander, 2002).

2.4 *Arnica montana*

A *Arnica montana* é uma planta originária das regiões montanhosas do norte da Europa de terras silicosas. O cultivo no Brasil é

de adaptação muito difícil (Figura 1). Existem muitas plantas chamadas popularmente de arnica, entretanto, na verdade, existem espécies diferentes que não possuem a mesma aplicação terapêutica (Marques, 2006).



Figura 1 – Flores de *Arnica montana* (foto A) a flor em detalhe (foto B)

Arnica montana muitas vezes cultivada nos jardins e tem sido utilizada medicinalmente há longo tempo. Ela contém a toxina *Helenalin*, que pode ser venenosa se ingerida em grande quantidade, produzindo gastroenterite e sangramento gastrointestinal. O contato com a planta também pode causar irritações na pele. *Helenalin* (Figura 2) é um sesquiterpeno lactona com potente ação anti-inflamatória e antitumoral efeitos encontrados em *Arnica montana* e *Arnica chamissonis foliosa*. É o principal composto responsável pelos efeitos terapêuticos da *Arnica* (Yui et. al., 1998).

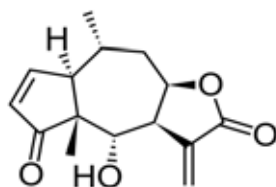


Figura 2 – Fórmula química da *Helenalin*.

A *Arnica montana* tem sido frequentemente pesquisada como medicamento homeopático que é uma solução hidroalcoólica dinamizada, preparada a partir de substâncias minerais, vegetais, animais

ou de produtos sintetizados. Partindo desse princípio, sabe-se que o fundamento básico da terapêutica homeopática consiste na frase em latim “*similia similibus curentur*”, cuja tradução significa: “sejam os semelhantes curados pelos semelhantes”. Os homeopatas modernos não têm considerado a homeopatia como alternativa e sim, como complemento, pois reconhecem a eficácia e validade dos tratamentos alopáticos (Marques, 2006).

A homeopatia foi considerada uma das grandes áreas da medicina alternativa até 1990, atualmente é conhecida como especialidade médica oficial. Surgiu no final do século XVI, quando o médico e químico alemão Samuel Christian Friedrich Hahnemann, propôs uma nova abordagem terapêutica para doenças, desiludido com seus resultados que a medicina tradicional da época fornecia, com tratamentos invasivos e espoliadores, como sangrias, purgantes, mercúrio, enxofre e outros. Parou de clinicar e dedicou-se a traduzir antigos escritos médicos, buscando formas de tratamento menos ameaçadores. Seu primeiro experimento foi com a “cinchona” (casca de Chinchona), utilizada no tratamento da malária. Usando diferentes concentrações a experimentou em si mesmo, percebendo que, a partir de determinada dose, desencadeavam-se nele os mesmos sintomas da enfermidade para qual era indicada como curativa (no caso a malária). Isso levou a considerar que a mesma substância pode provocar sintomas que ela mesma alivia. Nascia então a prática da medicina pela lei dos semelhantes (Brickmann, 1995).

O tratamento homeopático se fundamenta em quatro pilares: princípios de cura pelos semelhantes, experimentação dos medicamentos em indivíduos sadios, emprego de medicamentos dinamizados e prescrição de substâncias simples (medicamento único) (Brickmann, 1995).

O uso de diluições é importante porque, frequentemente, as substâncias usadas para fazer os remédios são tóxicas em

concentrações mais elevadas. O processo de diluição envolve sucussão, em vigorosa agitação da substância original com álcool ou água, que ativa e potencializa o remédio. Por outro lado, a farmacologia convencional nos tempos de hoje, diz que, em razão da alta diluição basicamente produtos homeopáticos não possuem nenhuma molécula da substância original no produto final (Johnson, Boon, 2007).

O princípio alométrico, usa escala de parâmetros fisiológicos comparando animais de vários tamanhos, sendo esta mesma escala usada para parâmetros farmacocinéticos. A absorção, distribuição e eliminação de muitas drogas administradas a animais envolvem processos fisiológicos, compatíveis com a escala alométrica. Em resumo, os efeitos das drogas usadas em um determinado animal podem ser extrapolados para o uso em outros animais através de cálculos aritméticos (Felippe, 2008).

A utilização das plantas medicinais teve seu início na pré-história. Os homens primitivos iniciaram as práticas de saúde, alimentando-se de determinadas plantas pelo instinto de sobrevivência. Com isso, foram observados determinados efeitos para minimizar suas enfermidades, acumulando conhecimentos empíricos que foram passados ao longo do tempo (Brandão, 2003).

Um crescimento exponencial no interesse e no uso das medicinas alternativas e complementares, principalmente em países ocidentais desenvolvidos, pode ser observado por meio de indicação consensual de fitomedicamentos para a prevenção do aparecimento de certos estados patológicos (Spadacio, Barros, 2008; Rossi et al., 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2005) reconhece esta realidade e a importância do uso destas práticas, recomendando o desenvolvimento de políticas públicas que facilitem a integração da medicina tradicional e complementar/alternativa nos sistemas nacionais de atenção à saúde. No Brasil, a Política de Práticas Integrativas e complementares (PNPIC) apresenta as diretrizes para a aplicação deste

conhecimento no Sistema Único de Saúde (SUS) (Spadacio, Barros, 2008).

O fato de uma planta ser totalmente natural não exime de riscos o uso de seus derivados. Várias plantas, quando consumidas na sua forma mais natural, podem causar graves enfermidades e, até mesmo, provocar a morte tanto nos seres humanos quanto nos animais. Existem centenas de ervas e remédios alternativos, em sua maioria ainda não estudadas adequadamente, sobretudo no que concerne à toxicologia. A divulgação inadequada ou inapropriada ao público, somada a uma regulamentação pouco rigorosa, pode levar consumidores imprudentes a fazer uso de plantas medicinais capazes de causar graves reações colaterais (Cerqueira, 1987).

Idosos com 65 a 69 anos consomem em média 13 medicamentos prescritos por ano. Com o aumento da idade o número de medicamentos também se eleva chegando a 18 medicamentos/ano. Polifarmácia pode ser considerada como: uso desnecessário de pelo menos um medicamento, presença de cinco ou mais fármacos associados; ou tempo prolongado superior a sessenta dias. O índice de idosos que praticam a polifarmácia chega a 42% sendo a hipertensão a doença principal. O risco de ocorrência aumenta em 13% com o uso de dois agentes, de 58% quando este número aumenta para cinco, elevando-se para 82% nos casos em que são consumidos sete ou mais medicamentos (Secoli, 2010).

No Brasil, apesar de muito utilizado, os produtos derivados de plantas, que são consumidos e comercializados, não eram passíveis de nenhum tipo de controle. Logo, em 21 de maio de 1993, a Portaria número 546 do Ministério de Estado da Saúde criou o Grupo Consumidor Técnico-Científico da Secretária de Vigilância Sanitária, com o intuito de estabelecer normas, controle de serviços, controle de produção, armazenagem e a utilização de substâncias e produtos naturais (Di Stasi, 1996).

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da *Arnica montana* fitoterápica e homeopática na qualidade do reparo ósseo em ratas lesionadas e ovariectomizadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Manuseio geral dos animais e considerações éticas

Este experimento foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP sob o protocolo número 023/2009-PA/CEP(ANEXO A).

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 96 ratas (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*, Wistar) com cerca de 90 dias de idade e peso aproximado de 300 gramas, mantidas em gaiolas em temperatura ambiente e alimentadas com ração Guabi Nutrilabor e água *ad libitum*, fornecido pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP. Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

Cada grupo teve seus subgrupos com seis animais cada, com o total de noventa e seis animais.

Tabela 1: Distribuição dos animais por grupos e tratamentos

Grupos	Trat. 6 dias	Trat.12 dias	Trat. 28 dias	Trat. 28 dias
OVZ 6CH	6 ratas	6 ratas	6 ratas	6 ratas
OVZ TM	6 ratas	6 ratas	6 ratas	6 ratas
OVZ Placebo	6 ratas	6 ratas	6 ratas	6 ratas
Sham Placebo	6 ratas	6 ratas	6 ratas	6 ratas

grupo Sham PL - ratas com cirurgia *Sham* e tratadas com placebo; grupo OVZ PL - ratas ovariectomizadas e tratadas com placebo; grupo OVZ 6CH - ratas ovariectomizadas e tratadas com *Arnica montana* 6CH cinco glóbulos dissolvidos em 1 ml de água /animal/dia, por via oral (gavagem); grupo OVZ TM - ratas ovariectomizadas e tratadas com tintura mãe (TM) de *Arnica montana*; 12 mL de TM diluídos em 500 ml disponível por 24 horas; todos os medicamentos homeopáticos e fitoterápicos foram adquiridos na Pharmacia Antiga – São José dos Campos, SP

4.2 Anestesia

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

4.3 Ovariectomia

Os processos de castração (ovariectomia) e falsa castração (SHAM) foram realizados em sala cirúrgica seguindo todos os protocolos de segurança e antissepsia. Com o animal lateralizado realizou-se tricotomia em ambos os flancos com uma área de três centímetros quadrados abaixo da última costela (região dos ovários). Para antissepsia foi utilizado o álcool iodado. Com lâmina de número 15 foi

feito uma loja cirúrgica de 1,5 cm em seguida divulsionando tecidos subjacentes até atingir o ovário onde se realizou uma ligadura logo abaixo desse, com fio de algodão estéril, seguido da excisão do ovário. Depois da retirada do ovário e reposicionamento dos tecidos o procedimento de rafia foi feito com fios de Seda 4.0 (Ethicon®) das camadas mais profundas até a mais externa. Em ambos os flancos o procedimento foi o mesmo. No grupo SHAM (falsa ovariectomia) a castração não se concretiza, havendo somente a exposição e manipulação no ovário, produzindo assim o estresse cirúrgico. Após o ato cirúrgico, ambos todos os grupos ovariectomizados e Sham, receberam dose única do antibiótico Enrofloxacino (Kinetomax®- Bayer), por via oral e permaneceram em gaiolas em número de seis ratas adequadamente limpas e acondicionadas. Como dieta todos os grupos receberam ração e água.

4.4 Execuções da lesão óssea e tratamento

Em todos os animais foram realizados defeitos ósseo monocortical em ambas as tíbias, após 45 dias de castração. Para tal procedimento, foi realizada nova anestesia geral com os medicamentos padronizados anteriormente: solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3 tiazina (Anasedan - Bayer, São Paulo, SP, Brasil), substância sedativa e relaxante muscular, e cloridrato de ketamina 10% (Dopalen - Agribrands do Brasil Ltda), anestésico geral, na proporção de 0,8 - 0,5ml e administrados por via intramuscular na dose de 0,1ml/100g de peso dos animais.

Na face interna da perna, foi realizada manualmente tricotomia tipo depilação e, após antissepsia local com álcool iodado, realizou-se incisão de aproximadamente 1,5 cm na pele e músculo na região do terço proximal tibiano com lâmina de bisturi (Figura 3A e 3B).

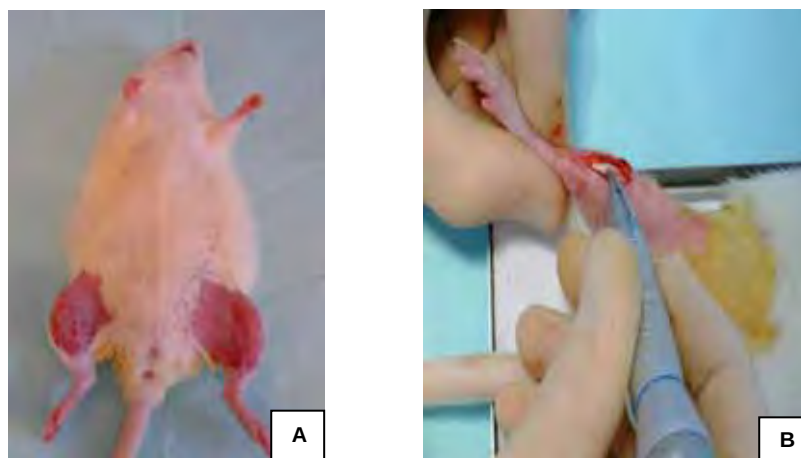


Figura 3 – A) Animal anestesiado e depilado preparado para a cirurgia; B) execução da lesão monocortical na tíbia direita.

Em seguida à exposição da face interna da tíbia, o periósteo e os tecidos moles foram afastados com espátula. Com o auxílio de uma broca de aço número 8, em motor de baixa rotação, sob irrigação constante de solução de NaCl 0,9%, foi realizada uma lesão monocortical de 2,5 milímetros de diâmetro até o limite da medula óssea. Após estabilização do coágulo sanguíneo sobre a lesão, a região foi suturada em planos com fio de Seda 4-0 (Ethicon®, Brasil).

Os animais não receberam anti-inflamatório e ou antibiótico no pós-operatório para evitar uma possível interação medicamentosa, especialmente com o medicamento homeopático. Após a realização da lesão, os animais foram tratados com os respectivos medicamentos propostos para cada grupo. Iniciou-se a medicação no mesmo dia da cirurgia óssea, após recuperação da anestesia.

4.5 Eutanásias dos animais

Todas as ratas foram eutanasiadas, em grupos de seis animais, após 6, 12, 18 e 28 dias a partir do início do tratamento. Para a

realização da eutanásia, utilizou-se anestesia geral (Anasedan® e Dopalen®) em dose excessiva.

4.6 Radiografia e avaliação da densidade óptica das tíbias

As tíbias foram radiografadas pelo Sistema Digital tipo CCD (Digital Direta Intrabucal RVGui, versão 5.0 (*Trophy Radiology, Marnela-Vallée, France*) dotado de dispositivo de carga acoplada, o sensor CCD (*charged-coupled device*) para captura direta de imagem constituída de um sistema ligado por cabo ao microcomputador e utilizando aparelho radiográfico com corrente contínua Gendex 765DC (Figura 4) (*Gendex Dental Systems, Dentsply International, Chicago, IL, USA*) de 65kVp e 7mA com filtração de 2mm/Al, ponto focal efetivo de 0,4 mm² e área focal de 6cm.

A posição para radiografar as tíbias foi com a face lesionada voltada para o sensor, centralizada e fixada, isto no intuito de que não ocorra distorção ou sobreposição de imagens as quais podiam causar alterações significativas no momento da avaliação pelo histograma.

A técnica utilizada é a de 0,05 segundos de exposição com distância focal de quarenta centímetros (cilindro/tíbia). O modo de alta resolução, que foi aplicado neste trabalho, produz imagens grandes de 1840x1360 *pixels* e este foi associado ao tipo de imagem do modo “perio”, que é utilizado para observação do osso alveolar. As imagens radiográficas obtidas com resolução de 600 dpi, salvas em formato *bitmap* (bmp) e analisadas pelo programa *UTHSCSA Image Tool*, versão 3.00 (*University of Texas Health Sciences Center, San Antonio, Texas, USA*) quanto à densidade óptica (DO). A densidade óptica foi medida em uma região selecionada por uma elipse que delimitou toda área do defeito

criado, e demonstrada pelo programa em uma escala de 256 níveis de cinza onde o preto corresponde a zero e o branco aos 255.



Figura 4 – Aparelho radiográfico Gendex 765DC (*Gendex Dental Systems, Dentsply International, Chicago, IL, USA*).

4.7 Análises morfológicas das tíbias por MEV

A avaliação morfológica foi feita através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) ZESS EVO® MA10 (*Series SEM – Carl Zeiss SMT Ltd / Cambridge – England*) em modo de elétrons retroespalhados (BSE), realizadas no Centro Tecnológico da Aeronáutica (CTA), no departamento de Aeronáutica Materiais Raros (AMR) – São José dos Campos.

Para isso, as tíbias direitas foram submetidas a um preparo prévio, através de embutimento em resina (baquelite) a frio como demonstrado na figura cinco.



Figura 5. Embutimento em resina baquelite

Após o embutimento, o lixamento foi efetuado pelo uso sucessivo de lixas d'água com granulação de 100 até 600 micras em 5 etapas, seguido de polimento para retirada de detritos deixados pelas lixas. Com o material limpo, as amostras receberam uma fina camada de ouro (Figura 6A e 6B), o qual aumenta a condutibilidade de elétrons melhorando a qualidade das imagens.

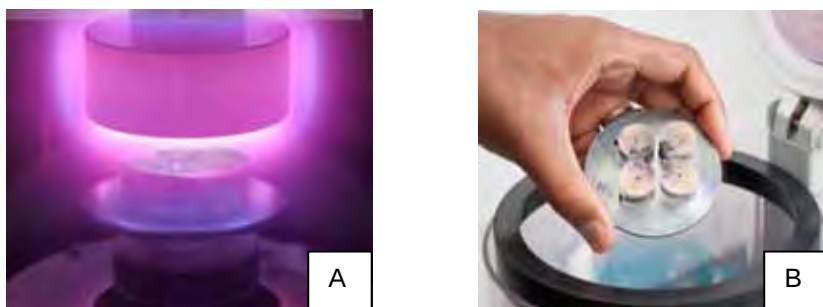


Figura 6 – A) Preparo das amostras para a MEV. Realização do recobrimento com ouro; B) material já recoberto

As imagens obtidas foram no plano superior e em corte longitudinal a lesão, ambos, com aumento de vinte vezes.

4.8 Preparo das tíbias para ensaios biomecânicos

Para realização dos testes biomecânicos das tíbias direitas, foram realizadas medições como tamanho total e espessura da região distal da mesma (Figura 7A e 7B), local onde foi realizado o teste de três pontos, para isso utilizamos um paquímetro Mitutoyo® digital.

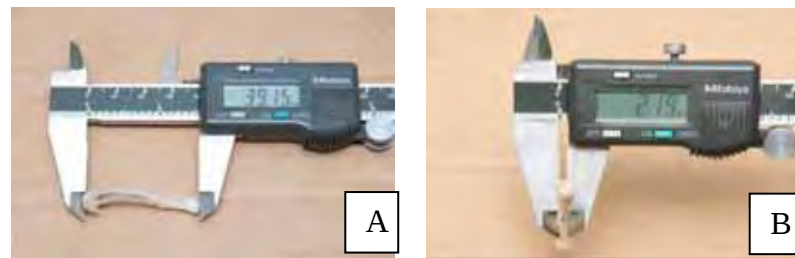


Figura 7 – A) Medições das dimensões das tíbias. Comprimento; B) diâmetro da parte distal.

Todas as tíbias direitas, com lesão, sofreram estresse mecânico para que os resultados obtidos fossem comparados entre os grupos, seguidos de avaliação da regeneração óssea na variação da resistência à flexão obtidos na quantificação das propriedades extrínsecas. As peças após serem descarnadas foram conservadas em Formol a 10% em temperatura ambiente até o momento do ensaio de flexão de três pontos, onde então foram secas com pano comum e levadas ao equipamento.

4.9 Teste de flexão em três pontos

As propriedades biomecânicas das tíbias foram determinadas por meio do teste de resistência a flexão com três apoios utilizando a máquina universal de ensaio EMIC DL 2000 (EMIC Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda) (Figura 8-A) aplicando uma carga com velocidade constante de aplicação de 5.00 mm/minuto e célula de carga com capacidade de medir 100 Kgf até a obtenção da fratura total da tíbia.

A localização do ensaio deu-se na parte cilíndrica distal de cada tíbia numa área de 15 milímetros de distância de um ponto a

outro onde em seu ponto médio aplicou-se carga até a fratura total da tíbia (Figura 8-B).

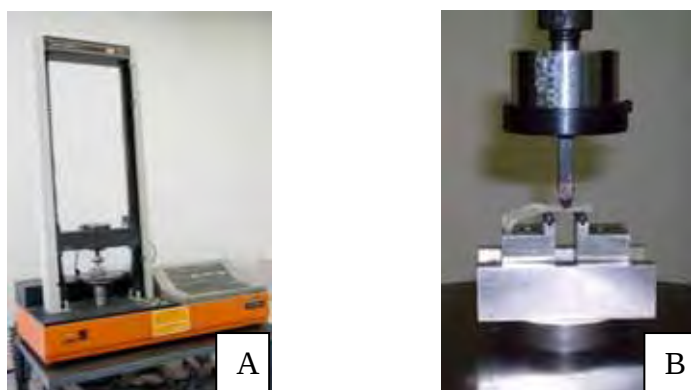


Figura 8 – A) Máquina universal de ensaio EMIC DL 2000; B) aplicação de carga no centro do corpo-de-prova específico, apoiado em dois pontos.

4.10 Análises Estatísticas

A análise da densidade óssea ocorreu com a divisão de quatro partes de histograma os quais compreenderam uma análise por graduações de cor na escala de cinza, composta por uma tabela que varia de 0 a 255 pixels, sendo a cor preta (valor 0) inicial, e a cor branca (valor 255 pixels) a cor final.

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA.

Foi definido, para este trabalho, um nível de significância de 0,05 (5%). Lembramos também que todos os intervalos de confiança construídos ao longo do trabalho, foram construídos com 95% de confiança estatística.

Foram utilizados testes estatísticos paramétricos, pois os dados são quantitativos e contínuos. Além disso, foi obtida uma amostragem superior a 25 sujeitos, o que pelo Teorema do Limite Central,

garante que a distribuição tenda a uma distribuição Normal. Também foi testada a normalidade dos resíduos deste modelo estatístico (teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov) e verificou-se que os mesmos possuem normalidade, o que garante o uso de teste paramétrico.

5 RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados da análise da qualidade óssea dos grupos pesquisados com seus respectivos tratamentos. Para a representação dos resultados constarão gráficos com seus respectivos cálculos e imagens de formação óssea nas áreas previamente descritas. Todos os resultados obtidos foram utilizados na comparação entre os grupos de ratas operadas (OVZ) e as não operadas (SHAM), assim como os demais grupos operados e tratados com *Arnica montana* tintura mãe e 6CH.

5.1 Dimensões das tíbias

O resultado das dimensões deu-se intra e intergrupo com seus valores médios conforme tabela que se segue.

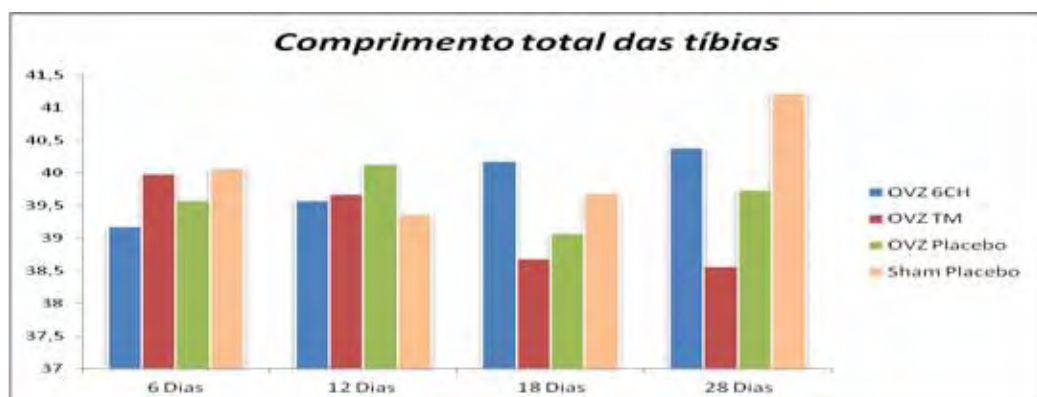


Figura 9 - Gráfico de colunas dos valores médios do comprimento total das tíbias.

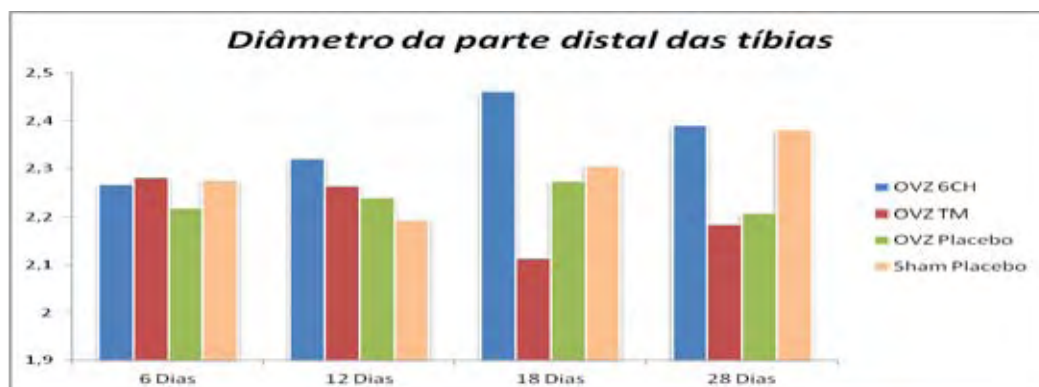


Figura 10 – Gráfico de colunas dos valores médios do diâmetro da parte distal das tíbias.

5.1.1 Avaliação da densidade óptica das tíbias

A forma de análise do Histograma mensura em uma escala de cinza, a formação óssea nas tíbias lesionadas. Esta escala varia de 0 a 255, onde o zero corresponde à cor preta e 255 a cor branca. A correlação não-formação e formação óssea equivalem ao número zero e 255 respectivamente. Essa avaliação está demonstrada na figura 11.

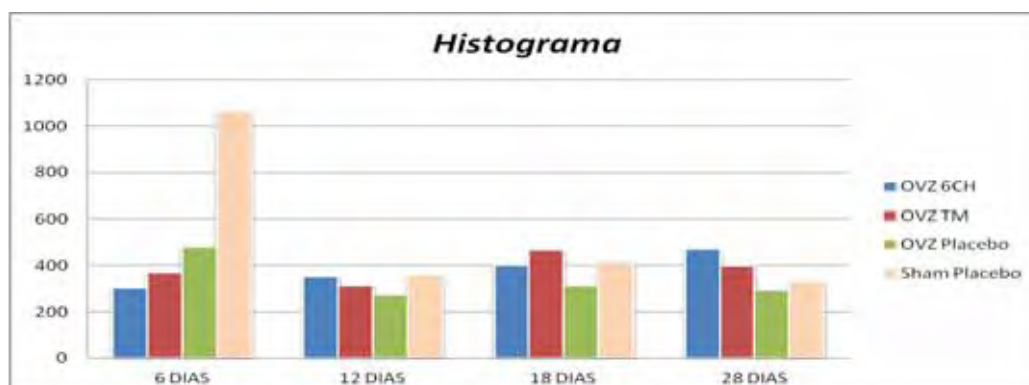


Figura 11 – Gráfico de colunas dos valores médios do histograma das tíbias

5.1.2 Teste de Flexão em Três Pontos

O ensaio biomecânico realizado pelo teste de três pontos, apresenta a resistividade das tíbias mediante ao estresse de esforço.

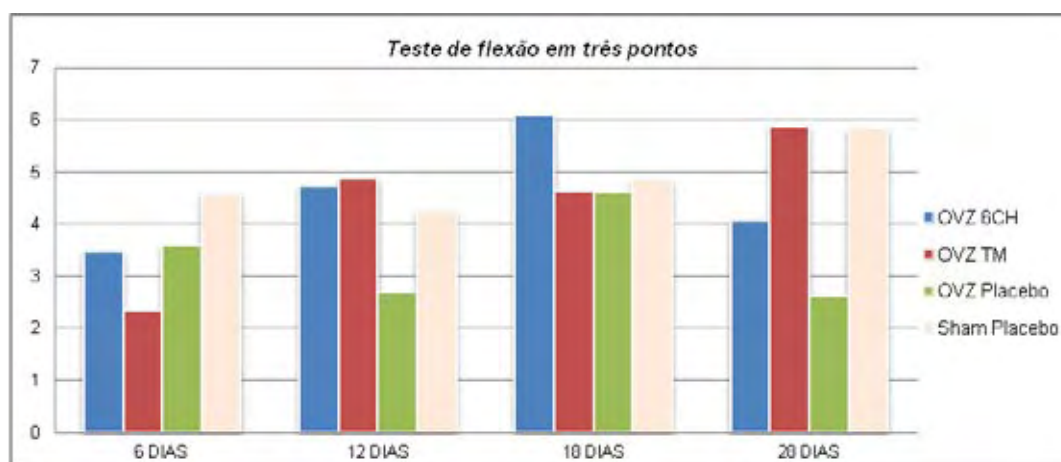


Figura 12 – Gráfico de colunas dos valores médios das fraturas mediante a força aplicada nas mesmas.

5.2 Avaliações Morfológicas

Para estes resultados não constam dados estatísticos, já que a avaliação foi realizada pelo observador. Todos os grupos foram avaliados da mesma maneira e em todos os períodos de tratamentos 6, 12, 18 e 28 dias.

As imagens foram realizadas com Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) nos planos superior, transversal com aumento de 20 vezes.

5.2.1 Período de 6 dias

Após seis dias de lesão e tratamento com placebo, a imagem numa visão superior demonstra a escassa recuperação óssea dos grupos SHAM PL e OVZ PL (Figuras 13 A e 13 C). A confirmação da ausência da neoformação óssea se faz na imagem das figuras 13 B e 13 D em corte longitudinal. As tíbias das ratas ovariectomizadas e tratadas com arnica tintura mãe e 6CH têm em suas vistas superiores uma completa ocupação de fibras no local da lesão (Figuras 13 E e 13 G). Por outro lado, a formação óssea difere muito da regeneração dos grupos placebo. OVZ TM (Figura 13 F) apresentou um crescimento maior que o OVZ 6CH (Figura 13 H), com presença de trabéculas paralelas e com grandes porosidades, formando pequena elevação na superfície. Já o OVZ 6CH tem uma camada superficial menor com presença de pequena depressão e as trabéculas apresentam arranjo mais variado que em arnica TM (Figura 13 F).

5.2.2 Período de 12 dias

No período de 12 dias, com vista superior, pode-se notar um crescimento significativo para todos deste grupo. Nas figuras 14 C, 14 E e 14 G, toda a área da lesão foi ocupada por fibras. A figura 14 B do grupo Sham PL, apresentou um bom crescimento ósseo tanto na lesão, como em sua profundidade ocupando a área medular. Neste a neoformação era composta basicamente de osso poroso. A tíbia do grupo OVZ PL (Figura 14 D) teve como formação óssea, um osso trabecular desorganizado ocupando a área da lesão e atingindo parte da medula óssea. Na imagem da figura 14 F houve regeneração óssea ocupando

toda a área do defeito, constituída por uma camada trabecular porosa em sua superfície e mostrando, na sua profundidade, a presença de grandes poros com uma camada de osso lamelar. Na imagem da tíbia do grupo OVZ 6CH (Figura 14 H) a regeneração óssea apresentou um osso mais espesso e compacto na superfície, porém, poroso e trabecular na profundidade.

5.2.3 Período de 18 dias

Analizadas as figuras deste período, pode-se notar o preenchimento completo da área da lesão nas figuras 15 A, 15 C e 15 G com exceção da figura 15 E, pertencente ao grupo OVZ TM, que mostra um sulco ao redor do defeito. O comportamento de crescimento neste grupo foi bem heterogêneo, a começar da figura 15 B, nesta, nota-se crescimento ósseo trabecular ocupando parte da medula com expansão até a superfície da lesão onde se observa delgada lâmina de osso lamelar. A figura 15 F apresentou crescimento de osso trabecular preenchendo toda a área do defeito e com depressão na superfície. A figura 15 D apresentou uma lâmina de osso lamelar na superfície com espessura menor que a cortical antiga e a figura 15 H mostrou osso compacto preenchendo toda a extensão da lesão, com espessura próxima a da cortical antiga.

5.2.4 Período de 28 dias

E por fim, neste grupo, há dificuldade de observar nas figuras 16 A, C, E e G, a silhueta da lesão na vista superior, com variação

entre os grupos. A heterogeneidade foi o destaque para avaliação da regeneração óssea neste período. Para figura 16 B, a formação se fez por uma fina camada de osso lamelar, porém sem continuidade de uma extremidade a outra. Na figura 16 D, ocorreu crescimento ósseo com grande porosidade na parte mais profunda da lesão e desorganização das trabéculas. Na figura 16 F, observa-se osso compacto, com diferença de espessura nas extremidades da lesão, sendo uma das extremidades mais fina do que outra. E concluindo, na figura 16 H, formou-se uma fina camada de osso compacto a qual, em uma extremidade exibe grandes poros e na outra, porosidade reduzida.

Figura 13 – Imagens de MEV da região de reparo na lesão das tíbias, vista superior e corte longitudinal, no período de 6 dias de tratamento: SHAM PL (A e B), OVZ PL (C e D), OVZ TM (E e F), OVZ 6CH (G e H) (aumento original 20 vezes).

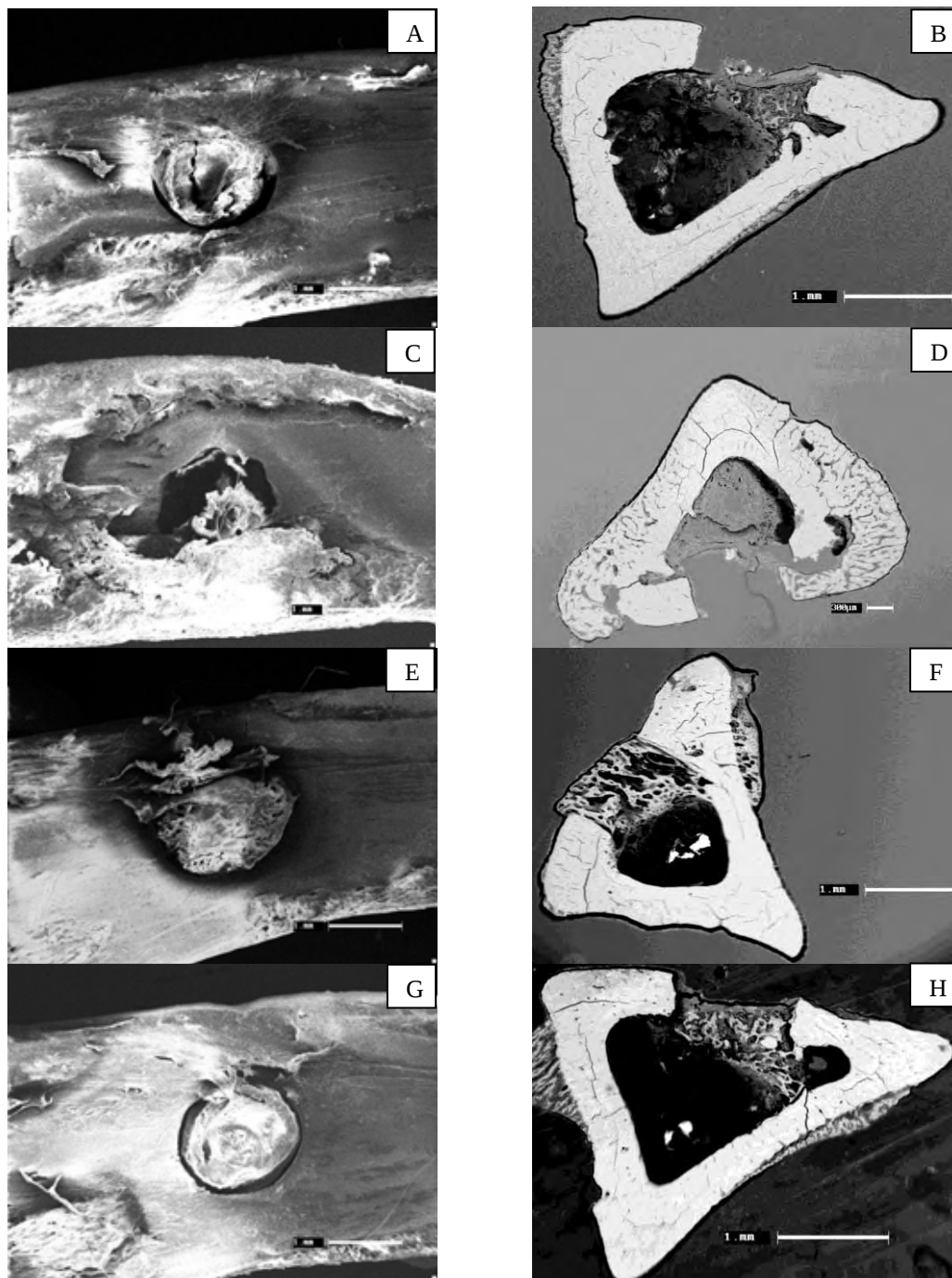


Figura 14 – Imagens de MEV da região de reparo na lesão das tíbias, vista superior e corte longitudinal, no período de 12 dias de tratamento: SHAM PL (A e B), OVZ PL (C e D), OVZ TM (E e F), OVZ 6CH (G e H) (aumento original 20 vezes).

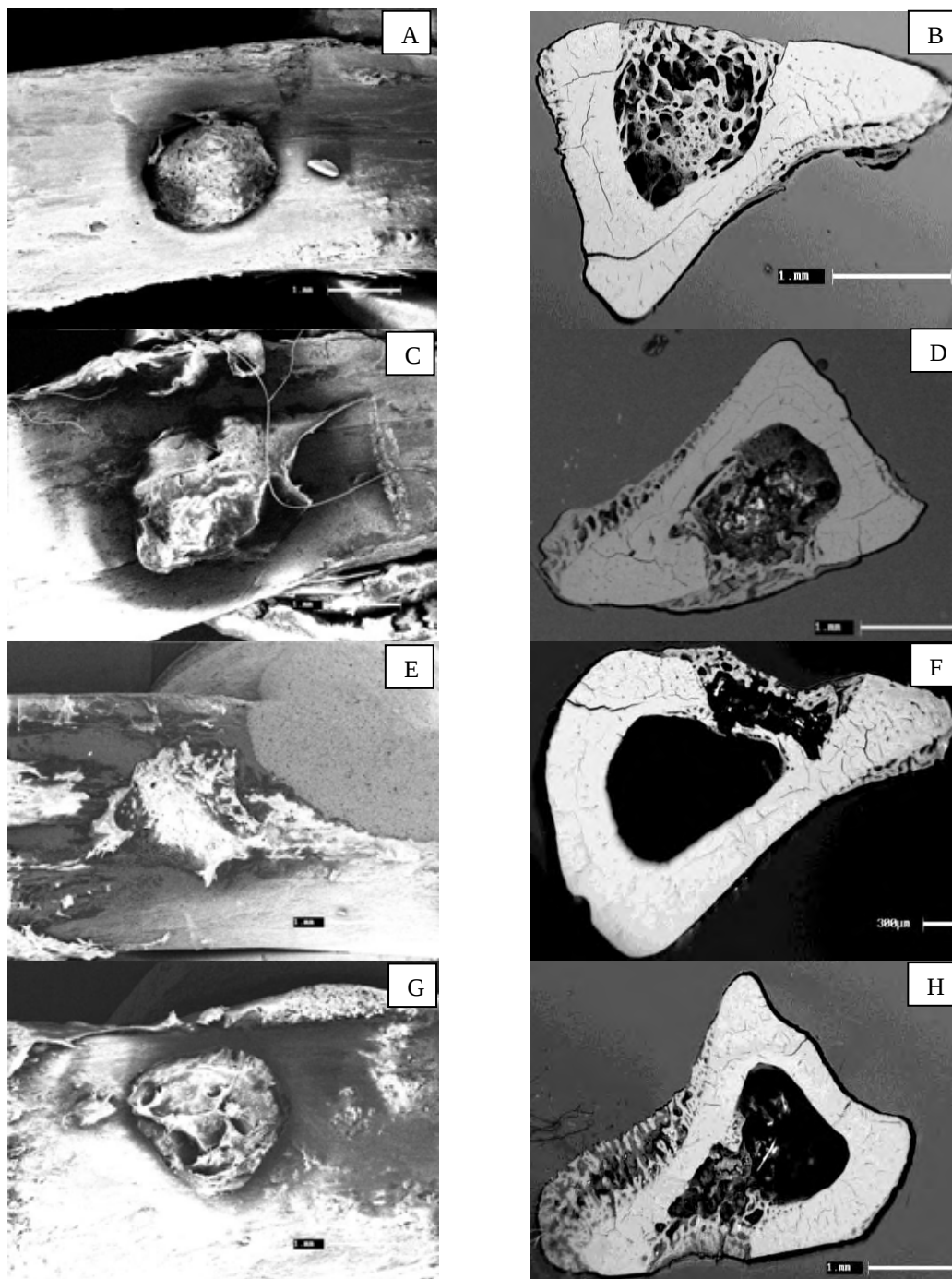


Figura 15 – Imagens de MEV da região de reparo na lesão das tíbias, vista superior e corte longitudinal, no período de 18 dias de tratamento: SHAM PL (A e B), OVZ PL (C e D), OVZ TM (E e F), OVZ 6CH (G e H) (aumento original 20 vezes).

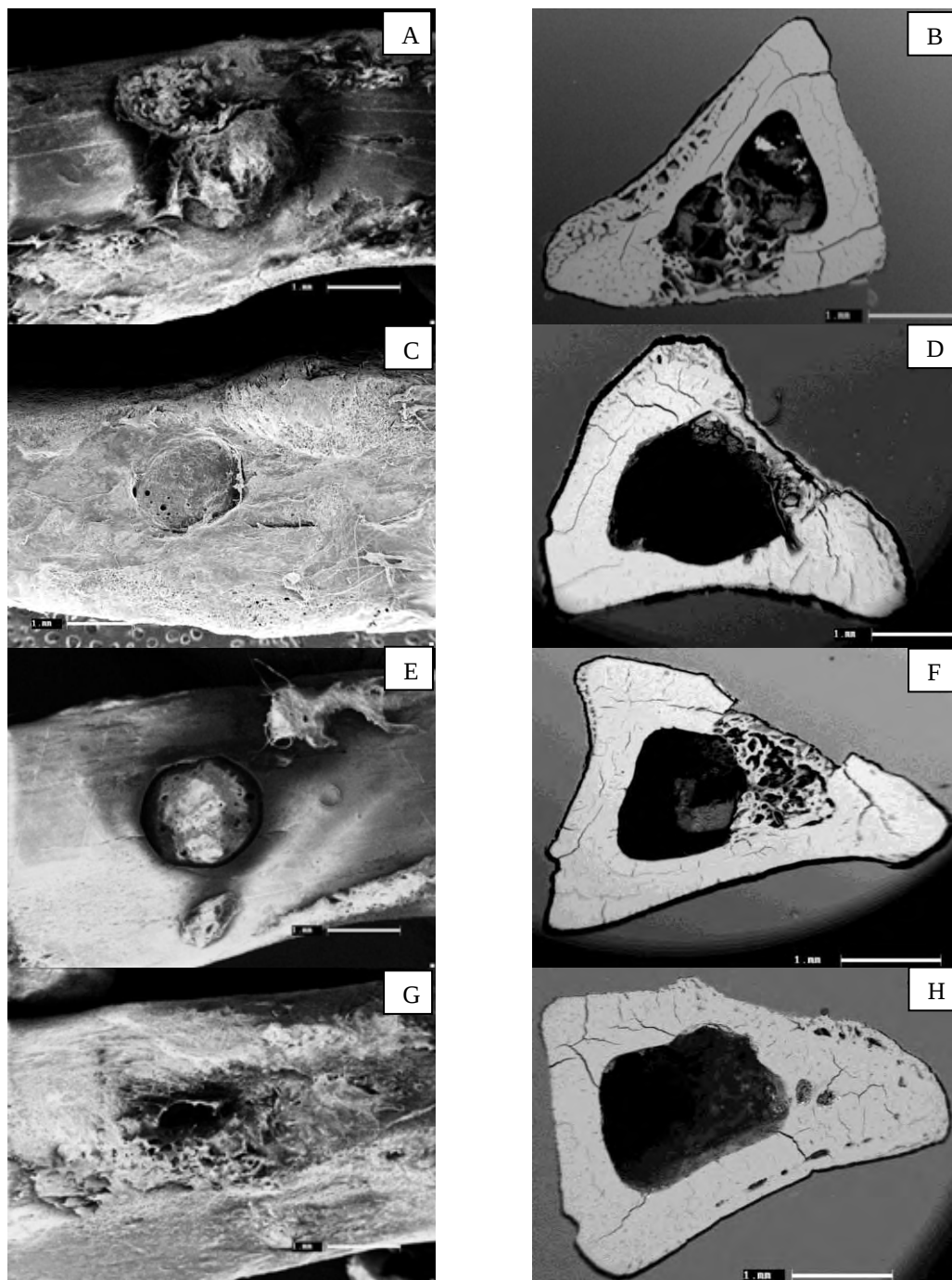
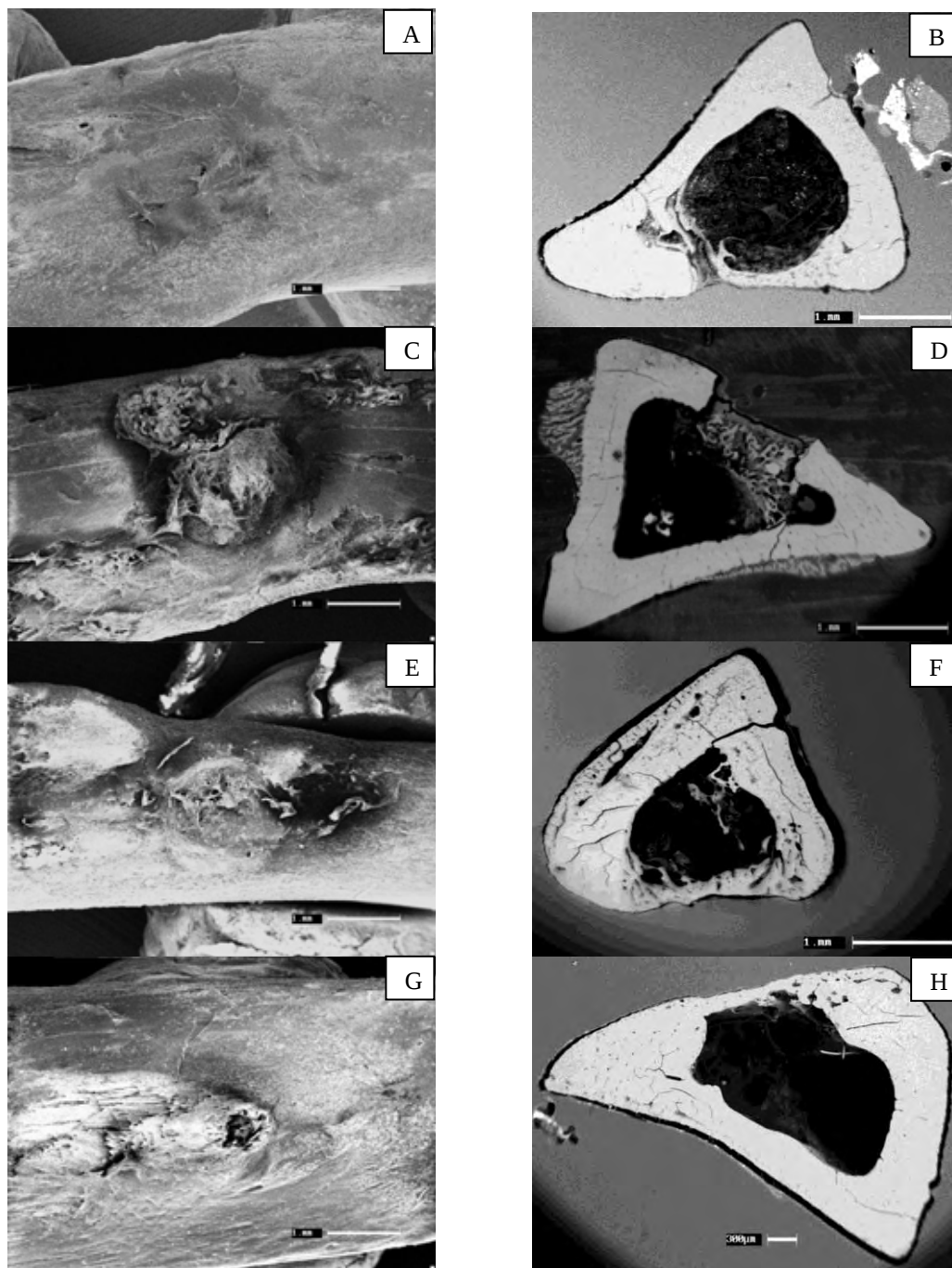


Figura 16 – Imagens de MEV da região de reparo na lesão das tíbias, vista superior e corte longitudinal, no período de 28 dias de tratamento: SHAM PL (A e B), OVZ PL (C e D), OVZ TM (E e F), OVZ 6CH (G e H) (aumento original 20 vezes).



6 DISCUSSÃO

Graças a avanços na medicina e nas condições socioeconômicas gerais dos indivíduos atualmente observa-se maior expectativa de vida com aumento do número de idosos. Este aumento do número de anos de vida vem, conseqüentemente, acompanhado de aumento na incidência de doenças próprias dessa faixa etária como, por exemplo, a osteoporose e, por isso, precisa ser acompanhado pela melhoria ou manutenção da saúde e qualidade de vida (OMS, 2005).

A osteoporose é uma doença crônica degenerativa caracterizada por uma alteração no metabolismo ósseo com desequilíbrio da remodelação óssea, em que predomina a reabsorção em relação à formação, o que leva à deterioração da microarquitetura óssea e deixa os ossos mais susceptíveis a fraturas (Manolagas, 2000; Namkung-Matthai et. al., 2001; Nakamura, 2004; Astacio et. al., 2007; Kanis et. al.2008).

O tratamento das complicações da osteoporose, mais do que o tratamento da doença em si, representa um impacto sócio econômico significativo para o paciente e sua família e também para o setor de saúde das comunidades (OMS, 2005). Além dos medicamentos é necessário equipar hospitais e centros de atendimento com aparelhos caros e sofisticados e capacitar pessoal adequado para tal atendimento específico, de modo a possibilitar atuação em diagnóstico, tratamento e acompanhamento da evolução dos pacientes.

Investimento no estudo de terapias profiláticas e curativas é relevante e pode ajudar a mudar o curso de evolução deste quadro.

Terapias alternativas como a homeopatia e a fitoterapia são amplamente utilizadas devido a seus efeitos terapêuticos e também por se acreditar que apresentem menos efeitos colaterais. Além disso,

ambas apresentam custo financeiro menor se comparadas à terapia alopática e são mais acessíveis à população em geral.

Entre os medicamentos homeopáticos e fitoterápicos existem indicações terapêuticas tanto para osteoporose quanto para fraturas. No entanto, ainda são escassos os relatos científicos sobre o seu uso em doenças ósseas.

Arnica montana é uma planta medicinal utilizada desde a antiguidade no tratamento de contusões e feridas em tecidos moles e duros. Porém, existem poucos estudos na literatura científica avaliando seus efeitos especificamente na osteoporose e no reparo de lesões ósseas na vigência de osteoporose.

Assim, este estudo experimental teve como meta avaliar o efeito do tratamento com *Arnica montana*, como medicamento fitoterápico e como medicamento homeopático, na qualidade do reparo ósseo em ratas com osteoporose, visando esta planta como mais um medicamento a ser utilizado na profilaxia ou tratamento da osteoporose e de suas complicações, melhorando a qualidade do tecido ósseo.

A osteoporose acomete mais a mulher idosa, principalmente após a menopausa, por isso neste estudo optou-se pelo modelo experimental com ratas ovariectomizadas, o qual já é consagrado para o estudo desta doença. O período de 45 dias aguardado após a ovariectomia foi suficiente para o desenvolvimento de alterações ósseas compatíveis com osteoporose. Segundo diversos autores a partir de 30 dias de insuficiência hormonal feminina já é possível observar perda de massa óssea em ratas.

Os métodos escolhidos para avaliar os tratamentos foram análise da densidade óptica em imagens de radiografia digital, dimensões das tíbias, resistência no teste biomecânico de flexão em três pontos e imagens da região de reparo na microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A análise radiográfica não é um teste muito sensível para detectar alterações na mineralização em ossos tão pequenos como o das ratas. Mas, ainda assim insistimos na sua realização porque se for possível verificar e demonstrar o efeito dos tratamentos por esse método, isso tem um valor clínico de peso. Este exame é o mais acessível à população em geral, além de ser mais barato, simples, rápido e de boa sensibilidade em humanos.

A densidade óptica é fornecida em valores numéricos, escalonada de zero a 255, onde o zero corresponde à cor preta e 255 à cor branca. Traduzindo para nossa pesquisa, na região do osso lesionado com pouca ou nenhuma mineralização teremos a cor cinza escura ou preta, enquanto quanto maior a regeneração e mineralização mais próximo à cor branca serão as imagens. Como esta mensuração não é possível a olho nu devido aos mais de 30 tons de cor estes foram convertidos em histogramas. Esta forma de pesquisa foi bem consagrada como método válido de avaliação óssea em regiões lesionadas como dizem os pesquisadores Senra, (2006), Moraes et al., (2005), Ágreda (2007), Prado (2008) e Mahl et al. (2009).

A forma de análise do histograma foi intragrupo e intergrupo, na tentativa de evidenciar melhor as diferenças dos valores de densidade óptica entre os tratamentos.

A densidade óptica aplicada no reparo ósseo nos demonstrou a pouca mineralização óssea praticamente em todos os grupos com 6 e 12 dias de reparo. A exceção entre esses grupos assim como nos demais foi o grupo Sham Placebo aos 6 dias, demonstrando resultado expressivo intra e intergrupo. O grupo Arnica 6CH apresentou uma crescente densidade óptica, de 6 a 28 dias de tratamento. Farina, 2010 obteve resultados parecidos em estudo semelhante a este. Farina notou a evidência de aumento gradual e contínuo, da densidade óssea em grupos ovariectomizados tratados por seis, dez, dezessete e vinte e oito dias com *Calcareia phosphorica* 6CH. Para os grupos tratados com

arnica fitoterápica o destaque foi aos 18 dias intra e intergrupo, porém com oscilação de densidade em outras datas de tratamentos. Outra semelhança com Farina, 2010 ocorreu com o grupo ovariectomizado e tratado por 17 dias por *Calcareo phosphorica* 6CH, onde este grupo teve a maior densidade. Aos 28 dias de tratamento, a *Arnica montana* homeopática manteve a mesma mineralização dos 18 dias, já para arnica fitoterápica houve um decréscimo, entretanto, com densidade semelhante ao homeopático de mesmo período.

A implantação de mensuração de comprimento e diâmetro das tíbias neste trabalho foi uma forma de avaliar o efeito dos medicamentos na qualidade do tecido ósseo e na possibilidade de interferir nas propriedades mecânicas das tíbias ao serem executados os testes biomecânicos de flexão em três pontos.

O comprimento das tíbias oscilou de maneira expressiva no grupo Sham PL aos 28 dias, que apresentou tamanho superior aos demais, com diferença significativa para o grupo OVZ TM. Por outro lado, o grupo OVZ TM tratado durante 18 e 28 dias, apresentou os menores comprimentos. As medidas do diâmetro na parte distal das tíbias mostrou diferença significativa do grupo arnica TM para arnica 6CH aos 18 e 28 dias, sendo maior para o medicamento homeopático.

O grupo não ovariectomizado foi o que apresentou maior comprimento das tíbias ao final do experimento, podendo-se levantar a hipótese de que a osteoporose influa no crescimento dos ossos longos. Os grupos ovariectomizados tratados com arnica TM foram os que apresentaram as tíbias mais curtas aos 18 e 28 dias. Embora a diferença observada tenha sido pequena tal fato pode representar reflexo de toxicidade do tratamento uma vez que a arnica possui princípios ativos tóxicos como o sesquiterpeno *Helenalin* (Yui et al., 1998). Nossos animais receberam *Arnica* TM na água de beber durante cerca de um mês. Não há relatos sobre a influência negativa da arnica no crescimento ósseo,

mas, tal fato merece investigação uma vez que esta planta é amplamente utilizada pela população em geral.

O grupo tratado com arnica 6CH apresentou aumento progressivo do comprimento das tíbias ao longo do experimento e aos 28 dias esta diferença alcançou valor significativamente maior que o do grupo tratado com arnica TM ($p=0,051$). Por outro lado, o grupo tratado com arnica TM mostrou uma linha de diminuição progressiva do comprimento das tíbias ao longo do experimento. Analisando-se comparativamente o comportamento do crescimento das tíbias nos dois grupos tratados com arnica pode-se levantar a hipótese de que a tintura mãe tenha toxicidade enquanto a diluição homeopática em 6CH não apresente toxicidade como é esperado em medicações com alta diluição e que este fato tenha influência no crescimento ósseo.

A propriedade biomecânica de um osso é determinada pelo cálculo da tensão máxima aplicada no corpo de prova até sua ruptura. A capacidade de o material absorver energia até a sua ruptura indica sua resistência ao estresse (Holanda, 1999). Neste estudo foi realizado o teste de resistência à flexão em três pontos. A localização do ensaio deu-se na parte cilíndrica distal de cada tíbia numa área de 15 milímetros de distância de um ponto a outro e em seu ponto médio aplicou-se carga até a fratura total da tíbia.

Na certeza de que os tratamentos propostos afetam a qualidade do osso como um todo foi selecionado a área cilíndrica da tíbia para o teste biomecânico e não a área de reparo, porque esta estaria sujeita a interferência de outros fatores que poderiam modificar os resultados.

A avaliação da regeneração óssea por MEV demonstrou boa aplicabilidade no que se refere à qualidade óssea. As imagens adquiridas com aumento de 20 vezes, com visão superior e em corte transversal da lesão complementam os contrastes das avaliações pela densidade óssea e propriedades biomecânicas.

As imagens adquiridas dos períodos de seis dias apresentaram pouca formação óssea nos grupos tratados com placebo, sendo que o grupo OVZ PL formou menos osso que o Sham PL. Ambos os grupos tratados com arnica formaram mais osso que os grupos placebo e mostravam calo ósseo composto por osso trabecular ocupando toda a região do defeito.

Aos 12 dias o grupo Sham placebo foi o que apresentou o maior calo ósseo ocupando a região do defeito e a medula óssea. Foi possível observar que os animais ovariectomizados tiveram menor regeneração óssea quando comparados aos grupos não ovariectomizados(grupo Sham). O grupo da arnica 6CH mostrou calo com maior quantidade de osso trabecular e maior reação periosteal.

Aos 18 dias o grupo Sham PL mostrou grande remodelação do calo, mas este ainda era composto principalmente por osso trabecular. O grupo OVZ PL mostrou calo pequeno com remodelação para osso lamelar formando uma lâmina delgada na superfície do defeito. Os grupos tratados com arnica mostraram calo ósseo maior que o OVZ PL e, o tratado com arnica 6CH apresentou maior quantidade de osso lamelar que o tratado com arnica TM. Por meio da análise das imagens no MEV, comparando os animais OVZ's, foi possível verificar que os tratamentos com arnica, tanto homeopática quanto fitoterápica, diminuíram a reabsorção do calo ósseo e que a arnica 6CH foi melhor que a arnica TM.

Aos 28 dias o grupo Sham PL mostrou remodelação completa do calo para osso tipo lamelar compacto, mas em alguns animais foi observado áreas de defeito na fusão com a cortical antiga. O grupo OVZ placebo mostrou atraso na remodelação do calo e regeneração incompleta. Os grupos tratados com arnica mostraram comportamento semelhante entre si, caracterizado por calo ósseo constituído principalmente por osso lamelar compacto, formando uma lâmina delgada na superfície do defeito e que não apresentando ainda a

mesma espessura da cortical antiga. Fica a sugestão de qual seria o resultado em período mais longo de observação.

Senra, 2006 pesquisou *Calcareo fluorica* 6CH em cobaias osteoporóticas em diversos períodos (3, 6, 12, 18 e 24 dias), porém, aos 24 dias de tratamento a regeneração óssea assemelha-se a deste estudo. Houve formação de ponte óssea delgada e remodelação de osso cortical, mostrando assim a eficiência do medicamento (Senra, 2006). Este estudo corrobora com nossa afirmativa de aumentar o período de pesquisa.

A análise da qualidade óssea é muito complexa quanto aos seus fatores intrínsecos e extrínsecos, macro e microscópico para avaliar um osso lesionado ou não. Seria preciso analisar por meio de diferentes testes e em número maior de animais.

O grupo ovariectomizado tratado com *Arnica montana* 6CH foi o que melhor se comportou mediante aos diferentes testes realizados. O destaque foram os animais tratados por 28 dias que apresentaram uma boa regeneração e qualidade óssea, quando comparados aos demais grupos de mesmo tempo de tratamento.

Os animais ovariectomizados e tratados com *Arnica montana* tintura mãe, apresentaram bons resultados de regeneração segundo a análise de MEV, mas no contexto geral estes foram inferiores aos do grupo tratado com arnica 6CH. A densidade óptica foi melhor que no grupo da arnica 6CH, porém as propriedades biomecânicas não demonstraram tão boa resistência quanto o grupo da arnica 6CH. Fica a hipótese de que a *Arnica montana* tintura mãe, tenha causado efeito tóxico, o qual tenha interferido o crescimento ósseo.

Os resultados deste trabalho sugerem que outros estudos sejam realizados para melhor compreensão da eficácia desta planta medicinal no tratamento da osteoporose e fraturas na vigência desta doença. Faz-se necessário avaliar um maior tempo de tratamento, outras concentrações da tintura mãe de *Arnica montana* e de arnica homeopática e a presença de toxicidade

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas condições experimentais deste estudo permitiu concluir que:

- a) o tratamento com *Arnica montana* homeopática foi mais eficiente que o com arnica fitoterápica na regeneração óssea em ratas com osteoporose;
- b) o tratamento com Arnica montana homeopática ou fitoterápica atuou positivamente na regeneração óssea;
- c) a arnica influenciou negativamente no comprimento total das tíbias em períodos longos de administração.

8 REFERÊNCIAS*

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

Alkan A, Gorrustovich A, Veinsten F, Costa OR, Guglielmotti MB. Histomorphometric evaluation of the effect of doxycycline on the healing of bone defects in experimental diabetes mellitus: a pilot study. J Oral Maxillofac Surg. 2002; 60(8):898-904.

Amman P, Rizzolli R. Bone strength and its determinants. Osteoporos Int. 2003; Suppl 3:13-8.

Akkus O, Adar F, Schaffler MB. Age-related change in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. Bone. 2004; Mar 34(3): 443-53.

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

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

Brandão MG. Plantas medicinais e fitoterapia. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2003.

*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

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico. Primeira ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

Brickmann A. Hahnemann S. Organon da arte de curar. sexta ed. Ribeirão Preto: Museu de Homeopatia Abrão Brickmann; 1995.

Carvalho PSP, Ponzoni D. Biologia da osseointegração. In: Gomes LA. Implantes osseointegrados. São Paulo: Santos ; 2002. cap. 1: 1-9.

Cenci S, Weitzmann MN, Gentile MA, Aisa MC, Pacifici R. M-CSF neutralization and egr-1 deficiency prevent ovariectomy-induced bone loss. J Clin Invest. 2000; 105: 1279-87.

Cerqueira MBS, Souza JT, Júnior RA; Peixoto ABF. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e folhas de *Lychnophora ericoides* Mart. Ciência e Cultura. 1987;39(5/6):551-3.

Di Stasi LC. Plantas medicinais: artes e ciência um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP; 1996.

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

Faloni APS, Cerri PS. Mecanismos celulares e moleculares do estrógeno na reabsorção óssea. Rev Odont UNESP. 2007;36(2) 181-8.

Farina VH. Efeito da *Calcareia phosphorica* 6CH e do alendronato na reparação de lesão óssea em ratas ovariectomizadas [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): UNESP - Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos; 2010.

Felippe PAN. Sistema alométrico ou cálculo de dosagem por taxa metabólica do animal. Campinas: Unicamp; 2008.

Felsenberg D, Boonen S. The bone quality framework: determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. Clin Ther 2005 Jan; 27 (1):1-11.

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

Goldstein JI, Newbury D, Joy D, Lyman C, Echlin P, Lifshin E, Sawyer L, Michael J, et al.. *Scanning electron microscopy and X-ray analysis*. In: Microscopia dos materiais, 2002; cap. 7:1-18.

Gosain AR. et al.. Osteogênese intracranial defects: reassessment of the concept critical size and the expression of TGF- β isoforms. Plastic Reconstr Surgery, 2000;106(2):360-71.

Guyton AC, Hall JE. Hormônio paratireoideo, calcitonina, metabolismo do cálcio e fosfato, vitamina D, ossos e dentes. In: Fisiologia Humana e mecanismos das doenças. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. cap 12, p 568-70.

Holanda AJ. Estudo dos efeitos da orientação das fibras de colágeno nas propriedades mecânicas de flexão e de impacto dos ossos [dissertação]. Ribeirão Preto. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (SP); 1999.

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

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

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

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

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

Marques MF. Estudo da resposta Imunológica induzida por *Arnica montana*. [tese]. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (SP): UNESP - Universidade Estadual Paulista; 2006.

Mittra E, Rubin C, Qin YX. Interrelationship of trabecular mechanical and microstructural properties in sheep trabecular bone. *J Biomech*. 2005 Jun; 38(6):1229-37

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

Nakamura T. Current situation of osteoporosis treatment in Japan: From the aspect of fracture prevention. *Geriatr Gerontol Int*. 2004 Sept.;4:69-71.

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

Organização Mundial de Saúde. Estratégia da OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Genebra, 2002.

Organização Mundial de Saúde. Envelhecimento ativo: uma política de saúde. Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde;2005.

Pantaleão JAS, Henriques HN, Carvalho ACB, Pollastri CE. Efeito da tibolona sobre o endométrio de ratas castradas. Rev Bras Ginecol Obstet,2009;31(3):124-30.

Prado FA. Determinação do tamanho crítico em defeitos ósseos em tíbias de ratos. In: Reunião de Pós Graduação e Iniciação Científica da UNESP, São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista – UNESP; 2003.

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

Riggs BL, Klosla S, Melton LJ. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. Rev Endocr 2002 June; 23(3):279-302.

Rossi E., Baccetti S., Firenzuoli F., Belvedere K. Homeopathy and complementary medicine in Tuscany, Italy: integration in the public system. *Homeopathy* Rubin MA, Jasiuk I, Taylor J,

Rubin J, Ganey T, Apkari RP. TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular bone. Bone. 2003; 33: 270-82.

Sampson HW. Alcohol and other factors affecting osteoporosis risk in women. Alcohol Res Health. 2002;26(4):292-8

Secoli RS. Polifarmácia: interações e reações adversas no uso de medicamentos por idosos. Rev Brás Enferm 2010;63 (1):136-40

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

Spadacio C, Barros NF. Uso de medicinas alternativas e complementares por pacientes com câncer. Revista sistemática. Rev de Saúde Públ. 2008;42(1):158-64.

Szejnfeld VL. Osteoporose: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Sarvier; 2000.

Vander Voort GF. Metallography, principles and practice. In: Microscopia dos materiais. E-papers Serviços Editoriais;2002.cap12,p.1-6.

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

Yui F, Linarelli M, Zelante CB; Zelante PM. Atividade antiinflamatória da Arnica Montana. Rev Ciências Médicas, 1998;7(1):21-6.

ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP: 12201-970 – F. (12) 3947-9023 / 9037
Fax: (12) 3947-9010 / aigotti@fosjc.unesp.br / Guodes@fosjc.unesp.br

CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **023/2009-PA/CEP**, sobre **“Efeitos da arnica fitoterápica e homeopática comparados com o alendronato no reparo de lesões ósseas em ratas ovariectomizadas”** sob responsabilidades de **EDMUNDO DA SILVA**, tendo como orientadora a Profa.Adjunto **ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO**, 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, 23 de setembro de 2009



Profa.Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora

