

ANA LOURDES DA SILVA MACHADO

**INFLUÊNCIA DA *CALCAREA PHOSPHORICA* E DO
ALENDRONATO SÓDICO NA REMODELAÇÃO ÓSSEA
DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**



2011

ANA LOURDES DA SILVA MACHADO

**INFLUÊNCIA DA *CALCAREA PHOSPHORICA* E DO
ALENDRONATO SÓDICO NA REMODELAÇÃO ÓSSEA
DE RATAS OVARIECTOMIZADAS**

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.

Orientador: Profa. Assist. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão

São José dos Campos

2011

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.

M119i Machado, Ana Lourdes da Silva.
Influência da Calcarea phosphorica e do alendronato sódico na remodelação
óssea de ratas ovariectomizadas / Ana Lourdes da Silva Machado. - São José
dos Campos : [s.n.], 2012.
108 .f. : il.

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

1. Calcarea phosphorica.. 2. Homepatia. 3. Remodelação óssea. 4. Osteoporose.
5. Ovariectomia. 6. Alendronato. 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, 9 de Abril de 2012 .

Assinatura :

E-mail: analour@fosjc.unesp.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assist. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão (Orientador)

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

Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha

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

Profa. Dra. Emília Angela Loschiavo Arisawa

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

Profa. Dra. Renata Falchete do Prado

Departamento de Fisioterapia – Escola Superior de Cruzeiro
“PREFEITO HAMILTON VIEIRA MENDES”

Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa

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

São José dos Campos, 14 de dezembro de 2011.

Dedico este trabalho com todo o meu amor e carinho aos:

Meus pais, irmãos e sobrinhos queridos.

Vocês são muito importantes na minha vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A toda minha família, especialmente aos meus pais pela dedicação e exemplos de conduta.

Muito obrigada por tudo!

À Profa. Assist. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão pela força, paciência e sabedoria nesta jornada.

Muito obrigada por sua orientação.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do Diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Professor Doutor Carlos Augusto Pavanelli e do Vice-Diretor Professor Adjunto Estevaso Tomomitsu Kimpara.

Ao Departamento de Biopatologia e Diagnóstico Bucal na pessoa do chefe, Professor Titular Walter Domingos Niccoli Filho e da Vice-Chefe Professora Adjunta Juliana Campos Junqueira.

A Coordenadoria do curso de pós graduação na pessoa da Profa. Adjunta Cristiane Yumi Kogo Ito e do vice coordenador o Prof. Adjunto Luiz Eduardo Blumer Rosa não só pelo apoio, mas pela luta para manter um curso de qualidade.

Aos Professores das disciplinas de patologia geral e bucal pela compreensão e apoio durante este período.

Aos meus colegas de turma pela convivência alegre e produtiva e especialmente ao amigo Dr. Vitor Hugo Farina pelas horas difíceis, porém necessárias, no biotério durante a fase experimental.

À Doutora Renata Falchete do Prado, pela disponibilidade, paciência e sabedoria durante a elaboração da análise estatística.

À Mestra Tábata de Melo Tera, pela inestimável colaboração na imunohistoquímica.

A toda equipe administrativa da pós - graduação que oferece suporte de forma atenciosa aos alunos.

Aos assistentes de suporte acadêmico do biotério Lourival Jacob, Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos e Marco Antônio Corrêa Alfredo, pela colaboração na fase experimental desta pesquisa.

À Diretora Técnica de Serviços de Biblioteca e Documentação, Silvana Alvarez e a bibliotecária Renata Aparecida Couto Martins, pela revisão normativa, e a todos os funcionários da biblioteca, especialmente a Maria Das Dores Nogueira pela colaboração durante o levantamento bibliográfico deste trabalho.

À amiga Maria Salete Faria pela amizade, compreensão e auxílio durante todo o tempo.

Aos animais experimentais sacrificados em prol da ciência.

“A vida é como andar de bicicleta. Para manter o equilíbrio, é preciso se manter em movimento”.

Albert Einstein (1879-1955)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Osteoporose.....	18
2.2 Ovariectomia.....	23
2.3. Bifosfonatos.....	25
2.4 Homeopatia.....	27
2.4.1 <i>Calcarea phosphorica</i>	30
2.5. Ovariectomia X tratamentos.....	32
2.6 Osteocalcina.....	43
3 PROPOSIÇÃO.....	47
4 MATERIAL E MÉTODO.....	48
4.1 Manuseio geral dos animais e considerações gerais..	48
4.2 Anestesia.....	49
4.3 Ovariectomia e cirurgia sham.....	50
4.4 Tratamentos.....	51
4.5 Sacrifício e processamento histológico.....	52
4.6 Análise histomorfométrica.....	52
4.7 Análise imunohistoquímica.....	54
4.8 Análise estatística.....	58
5 RESULTADOS.....	59
5.1 Histomorfometria e estatística.....	59
5.2 Imunohistoquímica e estatística.....	68

6 DISCUSSÃO.....	82
7 CONCLUSÃO.....	96
8 REFERÊNCIAS.....	98
ANEXO.....	108

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aC	= antes de Cristo
BV	= Volume ósseo
COBEA	= Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DEXA	= Dual-emission X-Ray absorpitiometry
DMO	= Densidade Mineral Óssea
FA	= Fosfatase alcalina
IL-1	= Interleucina 1
IL- 6	= Interleucina 6
M-CFS	= Fator estimulador de colônia de macrófagos
OPG	= Osteoprotegerina
OVZ	= Ovariectomizada
RANK	= Ativador do receptor do fator nuclear κ B
RANKL	= Ativador do receptor do fator nuclear κ B ligante
SUS	= Sistema Único de Saúde
TRAP	= Fosfatase alcalina tartarato resistente
TGF- β	= Fator de crescimento transformante beta
TNF- α	= Fator de necrose tumoral alfa
UI	= Unidade internacional
VT	= Volume total

Machado ALS. Influência da *Calcareea phosphorica* e do alendronato sódico na remodelação óssea de ratas ovariectomizadas [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

A osteoporose é uma doença crônica degenerativa caracterizada por deterioração progressiva e silenciosa da microarquitetura óssea, que requer tratamento, pois aumenta o risco de fraturas. Entre os medicamentos mais utilizados para tratar osteoporose estão os bifosfonatos como o alendronato. Na literatura, há poucos trabalhos que descrevam a ação de medicamentos homeopáticos com possível indicação para o tratamento da osteoporose. O objetivo deste trabalho foi analisar a ação da *Calcareea phosphorica* em comparação à ação do alendronato sódico na remodelação óssea no fêmur de ratas com deficiência estrogênica. Foram utilizadas 120 ratas divididas com 3 meses de idade em quatro grupos de 30 animais. Aos três meses de idade, três grupos foram submetidos à ovariectomia (OVZ) e um grupo à falsa castração (Sham). Após 60 dias os tratamentos foram iniciados de acordo com os seguintes grupos: Sham com placebo, OVZ com placebo, OVZ com *Calcareea phosphorica* 6 CH (2 glóbulos/ml de água/dia/animal) e o OVZ com alendronato sódico (1,2 mg/kg/três vezes/semana/animal). Os animais em grupo de 6 foram sacrificados após 3, 6, 10, 17 e 28 dias de tratamento. O fêmur direito de cada animal foi submetido às análises, histomorfométrica do volume ósseo no colo do fêmur e imunohistoquímica para osteocalcina. Os resultados mostraram que os animais tratados com *Calcareea phosphorica* 6 CH responderam ao tratamento com estímulo à proliferação de osteoblastos e aumento de volume ósseo no colo do fêmur enquanto o tratamento com alendronato influiu apenas na diminuição de reabsorção óssea. Concluiu-se que o tratamento com *Calcareea phosphorica* é válido para o controle da remodelação óssea na osteoporose.

Palavras-chave: *Calcareea phosphorica*. Homeopatia. Remodelação óssea. Osteoporose. Ovariectomia. Alendronato.

Machado ALS. *The effect of Calcarea phosphorica and sodic Alendronate on bone remodeling from ovariectomized rats [thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.*

ABSTRACT

Osteoporosis is a chronic degenerative disease characterized by bone loss due to progressive damage in the bone microarchitecture. It requires treatment because of the increased risk of fractures. There are few reports describing the effects of homeopathic medication on bone remodeling regarding its possible application in the treatment of osteoporosis. The aim of this study was to analyze the effect of Calcarea phosphorica in comparison to Alendronate on bone remodeling of the proximal area of femurs of osteoporotic rats. For that 120 rats 3 months old were used, divided in 4 groups of 30 animals. Three groups went through bilateral ovariectomy in order to induce osteoporosis, and one group had a sham surgery to become a control group. After 60 days the following treatments began: Sham treated with placebo, ovariectomized treated with placebo, ovariectomized treated with Calcarea phosphorica 6 CH (2 globules/1 ml of water/day/animal) and ovariectomized treated with Alendronate sodium (1,2 mg/kg/3 times a week/animal). The animals (n= 6) were sacrificed after 3, 6, 10, 17 and 28 days of treatment. The right femur was removed, and representative sections of the femoral epiphysis and trochanter area were selected to histomorphometric and immunohistochemical analyzes. The results showed that the animals treated with the homeopathic remedy Calcarea phosphorica 6 CH had a positive response with proliferation of osteoblasts while treatment with alendronate had effect on the osteoclasts inhibiting bone resorption. It is concluded that treatment with Calcarea phosphorica is valid to control bone remodeling in osteoporosis.

Keywords: Calcarea phosphorica. Homeopathy. Bone remodeling. Osteoporosis. Ovariectomy. Alendronate.

1 INTRODUÇÃO

Antigamente várias doenças infecciosas e parasitárias acometiam adultos, jovens e crianças, muitas vezes levando á óbito. Em consequência disto, principalmente em países menos desenvolvidos, a população não envelhecia. Com a melhoria das condições de vida, incluindo medidas básicas e preventivas de saúde como vacinação e exames periódicos, a expectativa de vida aumentou, garantindo o envelhecimento e o aparecimento das doenças crônicas e degenerativas, destacando-se as doenças cardiovasculares, as neoplasias malignas, o diabetes e doenças osteometabólicas como a osteoporose (Bandeira et al., 2000).

A osteoporose é caracterizada pelo desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, causando deterioração progressiva do microesqueleto e diminuição da massa óssea de vários ossos, principalmente dos fêmures e vértebras, levando à diminuição da resistência e a um maior risco de fraturas nos ossos (Szejnfeld, 2000).

Aumento no número de idosos e na incidência de osteoporose é uma realidade em nosso país, e a fratura do colo do fêmur é responsável por grande parte das cirurgias e internações, representando altos custos para a saúde pública, além de gerar dependência de atendimento médico especializado e apresentar alta taxa de mortalidade (Mesquita et al., 2009).

Existem algumas formas de tratamento da osteoporose com enfoque curativo e/ou preventivo. A terapia com os bisfosfonatos auxilia na preservação da integridade da estrutura óssea, mas pode ocasionar alguns efeitos colaterais principalmente nos tratamentos de longa duração (McClung, 2006). Por isso, faz-se necessário a busca por

outros tratamentos que além de serem efetivos, minimizem os efeitos adversos e sejam acessíveis à população. A homeopatia é uma alternativa interessante, porém, há poucos estudos científicos sobre os efeitos de medicamentos homeopáticos no tratamento da osteoporose. Portanto, este estudo tem por objetivo avaliar os efeitos da *Calcareo phosphorica* 6 CH na remodelação óssea do colo do fêmur de ratas com deficiência estrogênica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Osteoporose

Em 1994, a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu a osteoporose como um distúrbio osteometabólico caracterizado pela diminuição da densidade mineral óssea (DMO), com deterioração da microarquitetura do osso, levando a um aumento da fragilidade óssea e a maior risco de fraturas (Szejnfeld, 2000).

O osso é um tecido metabolicamente dinâmico e o equilíbrio entre os processos de aposição e de reabsorção óssea são controlados por células, constituintes da matriz óssea e hormônios. Ao longo da vida, alterações no metabolismo, na absorção do cálcio e no perfil hormonal, contribuem para o balanço negativo da remodelação óssea, tendo a osteoporose como principal consequência, especialmente entre as mulheres após a menopausa (Ocarino, Serakides, 2006).

A osteoporose foi definida como a “epidemia do século 21” pelo Consenso de Osteoporose em 2001 devido à alteração do perfil demográfico mundial com aumento da longevidade e diminuição da taxa de natalidade. No entanto, estudos em material paleontológico demonstraram a ocorrência de perda óssea trabecular e cortical em populações pré-históricas. Em 1997, um grupo de pesquisadores analisou o caso de uma mulher do Museu de Historia Natural, com fratura de quadril, ocorrida no Egito durante a XII Dinastia (1990-1786 aC). Provavelmente este é o caso mais antigo de fratura intertrocanter do fêmur associada com osteoporose vertebral, cujo estudo morfométrico revelou a presença de três fraturas. A idade estimada da mulher foi de 60

anos, baseada na espessura cortical radiográfica do rádio, comparada ao padrão da população européia. Outros locais analisados como clavícula, ulna e fíbula, corresponderam a uma idade mais avançada, de aproximadamente 80 anos, idade em que mais ocorrem fraturas de colo femoral (Dequeker et al., 1997).

A osteoporose é uma doença silenciosa que pode evoluir durante anos sem provocar qualquer sintoma, a não ser que surja uma fratura, sendo os locais de maior incidência os seguintes: vértebras lombares, punho e região do quadril (região proximal do fêmur). Na maioria dos casos é difícil reconhecer a osteoporose pelo exame radiográfico comum, caso não tenha ocorrido nenhuma fratura até o exame. Atualmente, o diagnóstico da osteoporose é feito pela DEXA (dual-energy x-ray absorptimetry) que mede a absorção de fótons de uma fonte de raios X para estimar a quantidade do conteúdo mineral no osso. Os resultados encontrados no exame são correlacionados com os valores referenciais encontrados no adulto jovem estabelecendo-se o “desvio” entre eles. Quando a densidade mineral óssea (DMO) for menor que 2,5 desvios-padrão, independente da ocorrência de uma fratura, o diagnóstico é de osteoporose estabelecida. Quando a DMO variar entre (-) 1 e (-) 2,5 desvios-padrão esta é classificada como osteopenia e quando variar de 0 a (-) 1 a DMO é considerada normal. O DEXA é um exame não invasivo, de baixo custo e alta sensibilidade, permitindo a medida de pequenas variações da massa óssea. As duas principais regiões a serem estudadas na avaliação de pacientes de alto risco para o desenvolvimento da osteoporose são a coluna lombar e a região proximal dos fêmures (Kierszenbaum, 2008; Guarniero, 2008).

A osteoporose é uma doença multifatorial. Os fatores de risco que causam baixo pico de massa óssea e, conseqüentemente a instalação de osteoporose, podem atuar em várias fases da vida. Na infância e adolescência são citados: hereditariedade determinando retardo na puberdade, pouca atividade física, desnutrição e baixa

ingestão de cálcio. Os fatores de risco no adulto jovem incluem: histórico familiar (alteração genotípica no receptor para vitamina D e do colágeno tipo I), baixa ingestão de cálcio, tabagismo, alcoolismo, algumas doenças (Diabetes melitus tipo I, anorexia nervosa, osteogênese imperfeita, artrite reumatóide, menopausa precoce) e o uso de alguns medicamentos (quimioterápicos e imunossupressores). Na idade avançada, os fatores de risco são: menopausa (deficiência de estrógeno), deficiência na absorção do cálcio e vitamina D, depressão, predisposição a quedas com fraturas e também o uso de alguns medicamentos (quimioterápicos antineoplásicos e imunossupressores) (Bandeira et al., 2000). Também foram relacionados como fatores de risco para diminuição da massa óssea baixa escolaridade (Costa-Paiva et al., 2003) e residir na zona rural (Jenkins, Denison, 2008).

A massa óssea é o resultado do equilíbrio entre a quantidade máxima de tecido ósseo alcançado por volta dos 30 anos de idade e a quantidade da perda óssea associada a eventos fisiológicos ou patológicos, sendo a determinante principal do risco de fraturas em qualquer época de vida (Szejnfeld, 2000). Difere entre grupos étnicos e raciais, sendo o pico de massa óssea maior entre os negros do que entre os brancos e os asiáticos, como indianos e iranianos (Pinto Neto et al., 2002, Keramat et al., 2008).

Um grupo de mulheres menopausadas que apresentaram a DMO lombar e do colo do fêmur menor ou igual a (-) 2 foram submetidas à terapia contra perda óssea utilizando 30 mg/kg/semana de alendronato de sódio e/ou adesivos contendo 37,5 mg de 17 β -estradiol, duas vezes por semana. Após nove meses de tratamento, a fosfatase alcalina (FA) diminuiu significativamente em todos os grupos, sendo que nas mulheres que receberam somente o alendronato ou este associado aos adesivos de 17 β -estradiol as reduções de FA foram maiores. Durante os 270 dias do experimento os pesquisadores também puderam observar que a proporção de pacientes que se queixavam de dor intensa diminuiu

e que aumentou o número de pacientes com ausência de dor. A DMO lombar teve um aumento significativo tanto nos grupos de mulheres que receberam os medicamentos isolados quanto associados. Já no colo do fêmur, o aumento da DMO foi significativo somente para o grupo que utilizou somente o alendronato, sem diferenças relevantes entre os outros dois grupos (Carvalho et al., 2002).

Muitos estudos mostram estreita relação entre a deficiência estrogênica e a perda óssea em mulheres pós-menopausa. Neste período, a massa óssea decai cerca de 3 a 5% por ano e aumenta o *turnover* ósseo associado ao aumento do risco de fraturas. Mulheres brancas acima de 50 anos tem 40% de chance de ter alguma fratura. Segundo estudos epidemiológicos, há uma redução de 50 a 60% nas fraturas de pulso e quadril com a terapia de reposição hormonal (Fitzpatrick, 2006).

No hospital da Universidade Federal Fluminense foram analisadas 27 biopsias de crista ilíaca das quais 19 eram de pacientes que sofreram fratura na extremidade proximal do fêmur, sendo nove no colo e 10 na região transtrocanterica. A faixa etária dos pacientes variou de 77 a 79 anos. Oito biopsias que serviram de controle não apresentaram nenhuma fratura e foram retiradas de indivíduos falecidos em decorrência de doenças cardiovasculares, com média de idade de 68 anos. O estudo histomorfométrico mostrou que o volume ósseo trabecular foi menor nos pacientes com fraturas do fêmur em relação aos pacientes sem fratura. Não houve diferença significativa no grau e padrão de osteoporose entre os pacientes com fratura de colo e transtrocanterica. A espessura do osso cortical foi menor nos grupos de pacientes fraturados. O afinamento das trabéculas ósseas foi o principal responsável pela perda óssea no osso esponjoso, vista nos pacientes com fraturas na região proximal do fêmur. Entre os grupos estudados, não foi observado osteomalacia (Gameiro, Schott, 2006).

A incidência da osteoporose pode ser prevenida ou reduzida pelo consumo de nutrientes envolvidos no metabolismo ósseo como as macromoléculas (lipídeos e proteínas), os minerais (cálcio, fósforo, potássio, cloreto de potássio) e as vitaminas (A e D) (Morais, Burgos, 2007). O consumo diário de chocolate foi associado à possibilidade de diminuição da densidade óssea em um grupo de mulheres idosas que foram avaliadas por densitometria óssea, tomografia e ultrassonografia (Hodgson, 2007).

Em pacientes idosos hospitalizados por fratura de bacia (75% mulheres) pesquisadores verificaram que somente 7,8% faziam ingestão de cálcio acima do nível recomendado (1000 mg/dia). De acordo com a análise da DMO 64,2% destes pacientes tiveram um *T-score* para osteoporose, 33,9% para osteopenia e somente um paciente apresentou o *T-score* normal (Lee et al., 2007).

A atividade física praticada durante a vida além de maximizar o pico de massa óssea previne a osteoporose. Nas populações idosas ser ativo fisicamente pode diminuir a ocorrência de fraturas de quadril, já que aumenta a força muscular e a massa óssea. Dentre as atividades esportivas mais indicadas estão a hidroginástica e a caminhada, que são esforços de baixo impacto e estimulam a formação osteoblástica e previnem a reabsorção óssea (Gomes, Guimarães, 2006; Jovine et al., 2006; Oscarino, Serakides, 2006).

Ossos da face também podem ser afetados. Comparando as medidas da cortical mandibular obtidas de radiografias panorâmicas odontológicas com os dados da DMO de mulheres na pós-menopausa, pesquisadores puderam observar que os dados, mandibular e mentoniano, das radiografias panorâmicas permitiram diferenciar pacientes com osteopenia ou osteoporose (Mahl et al., 2008).

2.2 Ovariectomia

A ovariectomia é o modelo experimental mais utilizado na pesquisa da osteoporose pós-menopausa, simulando as condições encontradas na menopausa em humanos. Em diversos estudos, a maioria dos animais utilizados são ratas, que após sofrerem a retirada dos ovários ficam com deficiência estrogênica e desenvolvem posteriormente a perda óssea. (Wronski, Yen, 1991; Frost, Jee, 1992; Lelovas et al., 2008).

Estudos demonstraram decréscimo na DMO e mudanças significativas tanto na resistência quanto na estrutura do colo do fêmur em ratas devido à deficiência estrogênica. As mudanças ósseas que foram encontradas após 4, 8 e 12 semanas da ovariectomia, contribuíram para diminuir a resistência do colo femoral. Os autores observaram decréscimo tanto da massa óssea cortical quanto trabecular e redução da conectividade endocortical - trabecular (Bagi et al., 1997).

A DMO do fêmur de ratas ovariectomizadas foi avaliada após seis e oito semanas da cirurgia, através do DEXA. A média da DMO foi significativamente menor nos animais com deficiência estrogênica em relação ao grupo que não sofreu a retirada dos ovários (Park et al., 2010).

Um estudo histomorfométrico no colo do fêmur em ratas que foram ovariectomizadas com idade de 3 meses e cujos sacrifícios variaram de 30 a 360 dias após a ovariectomia, em comparação a um grupo controle, mostrou que a separação entre as trabéculas ósseas foi relativamente constante no grupo de ratas que não sofreram a ovariectomia. Já nos animais ovariectomizados, os pesquisadores observaram uma diminuição significativa tanto no número quanto na separação entre as trabéculas, com alterações dependentes do tempo de sacrifício, principalmente após 60 dias. Comparando os resultados, a espessura das trabéculas e da cortical diminuiu significativamente,

principalmente após 180 e 360 dias respectivamente (Shen, Wronski, 1997).

Além do osso cortical e esponjoso, outras estruturas ósseas podem apresentar alterações na deficiência estrogênica, como a placa de crescimento, uma estrutura cartilaginosa altamente organizada que se localiza na região proximal ou distal de ossos longos. Um grupo de estudiosos observou que após 8 semanas da ovariectomia em camundongas, houve um aumento significativo na espessura dessas placas de crescimento cartilaginosa, tanto da camada proliferativa da região distal do fêmur quanto da região proximal da tíbia. Além disso, as zonas de repouso, a proliferativa e a hipertrófica, marcaram fortemente para os receptores de estrógeno, enquanto, nos animais que não se submeteram a ovariectomia o número de condrócitos marcados foi muito baixo (Yao et al., 2006).

Os efeitos da ovariectomia no metabolismo ósseo de ratas foram observados após 60 dias da cirurgia. Houve redução significativa na concentração sérica de estrógeno e no conteúdo de cálcio ósseo, permanecendo constante a concentração sérica de cálcio. A atividade da fosfatase alcalina foi maior nos animais ovariectomizados, indicando processo de perda óssea. Analisando as propriedades biomecânicas do fêmur, o período de 60 dias após a ovariectomia foi suficiente para reduzir o limite de deformação óssea, ou seja, o ponto final da região elástica onde o osso tem capacidade de absorver energia e retornar à sua forma anterior após a retirada da carga. A microscopia eletrônica de varredura mostrou que as tíbias das ratas ovariectomizadas apresentaram várias lacunas de reabsorção profundas, enquanto as tíbias das ratas do grupo sem ovariectomia mostraram-se íntegras (Cardoso et al, 2006).

2.3 Bifosfonatos

O tecido ósseo adulto se caracteriza pela presença de fosfato e cálcio, sendo a hidroxiapatita $\{Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2\}$ o principal componente mineral que constitui os ossos. Os bifosfonatos são conhecidos por sua alta afinidade pela hidroxiapatita, e suas ações devem-se à semelhança estrutural com o grupo de compostos chamados de pirofosfatos, reguladores fisiológicos da calcificação e reabsorção óssea, que estão presentes naturalmente no soro e urina. Vários fármacos são utilizados na prevenção e no tratamento das desordens relacionadas ao processo de remodelação óssea. Os primeiros bisfosfonatos aprovados para o uso terapêutico na doença de Paget foram o clodronato e o pamidronato e na osteoporose, o alendronato e o risedronato (Castro et al., 2004).

O alendronato possui a capacidade de se fixar na matriz óssea e ser assimilado pelos osteoclastos, inibindo sua ação. Tem grande afinidade pela matriz óssea e 50% da dose absorvida permanecem fixas nos ossos, sendo lentamente eliminado, possuindo uma vida média de eliminação de até 10 anos (Ribeiro, Volpato, 2005).

Pesquisadores verificaram o efeito do alendronato na atividade osteoblástica, analisando a diferenciação de células tronco mesenquimais de ratos. Constataram que o medicamento foi capaz de aumentar a diferenciação osteogênica, vista pela atividade da fosfatase alcalina, expressão do RNAm da osteocalcina e pela quantidade de cálcio medida pela espectrofotometria (Kim et al., 2009).

Alguns bifosfonatos como o clodronato e etidronato inibem a reabsorção óssea por gerar um análogo tóxico de trifosfato de adenosina (ATP), que interfere na função mitocondrial, induzindo a apoptose dos osteoclastos. O alendronato, risedronato, ibandronato, pamidronato e zoledronato, inibem a síntese do difosfato de adenosina

(ADP). Como resultado desta inibição, tanto o recrutamento como a diferenciação dos precursores dos osteoclastos ficam inibidos, o que favorece a apoptose dos osteoclastos, contribuindo para diminuir a reabsorção óssea e aumentar a DMO (Mc Clung, 2006; Cruz et al., 2011).

O tratamento com ciclosporina, agente imunossupressor, está associado à reabsorção óssea, pois mostrou diminuição da superfície óssea alveolar e aumento do número de osteoclastos por superfície óssea, pela análise da atividade imunoenzimática do TRAP-5b. Esses efeitos foram neutralizados pela administração do alendronato (Spolidoro et al., 2007).

Os bifosfonatos são pouco absorvidos pelo intestino e sua absorção fica prejudicada quando administrados junto com alimentos ou suplementos como cálcio, magnésio ou alumínio. Por vezes, podem gerar algumas reações adversas como, refluxo e hipocalcemia. A osteonecrose na mandíbula foi relatada, porém cerca de 95% destes casos estão relacionados ao tratamento de metástases ósseas (McClung, 2006).

O alendronato administrado na dose de 2,5 mg ao dia, por via subcutânea, para filhotes de ratos, desde recém-nascidos até o trigésimo dia de vida, provocou falha na erupção e ausência de formação de raízes dos dentes incisivos e primeiro molar. Estes achados, demonstrados pela imunohistoquímica do TRAP, sugeriram que o alendronato afetou o desenvolvimento dos dentes por inibir a ativação dos osteoclastos (Bradaschia-Correa et al., 2007).

Embora os bifosfonatos sejam bem tolerados, podem ocorrer vários efeitos colaterais em alguns pacientes, sendo a irritação gástrica a mais comum. Outros efeitos também podem ser observados, incluindo dor musculoesquelética severa, câncer esofágico, inflamação ocular, osteonecrose de mandíbula, aumento da expressão do *turnover* ósseo e fraturas subtrocantérica femural (Kennel, Drake, 2009).

2.4 Homeopatia

A homeopatia procede das palavras gregas *homoios*, que significa semelhante e *pathos*, enfermidade, doença. Proposta pelo médico alemão Samuel Hahnemann em 1796, a homeopatia visa compreender de uma forma global a dinâmica do adoecimento humano, utilizando uma terapia que estimule o organismo a reagir contra seus próprios distúrbios (Azpeitia, 2006; Teixeira, 2009.)

A terapia homeopática baseia-se no princípio da semelhança, dizendo que toda substância capaz de provocar determinados sintomas numa pessoa sadia, pode curar um indivíduo que apresente os mesmos sintomas. Portanto, o medicamento homeopático tem o objetivo de estimular o organismo a reagir contra a sua própria enfermidade, neutralizando os desequilíbrios funcionais, emocionais e psíquicos. Para minimizar os efeitos colaterais indesejáveis que as substâncias poderiam causar, Hahnemann diminuiu gradativamente as doses dos medicamentos para conseguir o efeito curativo na menor quantidade possível (Azpeitia, 2006; Teixeira, 2009).

Os determinantes humanísticos implícitos ao modelo homeopático são os aspectos éticos, filosóficos, antropológicos, psicológicos e socioambientais. É parte fundamental na anamnese homeopática a história biopatográfica no processo do adoecimento, facilitando a escolha do medicamento individualizado, segundo o princípio da similitude terapêutica (Teixeira, 2009).

Os medicamentos homeopáticos são obtidos a partir de substâncias pertencentes a vários reinos, como o vegetal, mineral, animal e até mesmo produtos provenientes do próprio doente (isoterapia). São preparados segundo o processo farmacotécnico da dinamização (diluções e agitações sucessivas) através do qual se busca a liberação da

energia vital contida nas substâncias, segundo o conceito universal de que “toda matéria é energia condensada” (Cornillot, 2005).

Os nomes dos medicamentos homeopáticos são latinos ou gregos e a potência ou a quantidade de vezes que o medicamento é dinamizado, indica-se por um número, enquanto a letra (ou letras) que o acompanha define a forma de preparo (exemplo: *Calcarea phosphorica* 6CH) (Azpeitia, 2006).

Os medicamentos homeopáticos para uso interno encontram-se nas formas líquida (gotas ou dose única) e sólida (comprimidos, glóbulos, pó, tablete e dose única). Os glóbulos são obtidos industrialmente a partir de sacarose ou de uma mistura de sacarose e lactose, com pesos médios de 30, 50 e 70mg. São esferas homogêneas e regulares, de cor branca, inodoros e de sabor adocicado. As farmácias homeopáticas adquirem os glóbulos na forma inerte e a impregnação pelo insumo ativo é uma das formas mais utilizadas na farmácia homeopática brasileira. Um grupo de pesquisadores verificaram, de acordo com os resultados obtidos, que a técnica mais adequada é a impregnação tríplice a 10%, com secagem a uma temperatura de 50°C, por apresentar melhor uniformidade de conteúdo, além de evitar agregação dos glóbulos e perda de massa (Diehl et al., 2008).

A homeopatia no Brasil começou a ser descrita por Benoit-Jules Mure quando fundou a escola homeopata em 1841, mas devido a críticas severas que recebeu, partiu do Brasil sete anos após sua chegada. Porém, deixou vários discípulos, como Licínio Cardoso, que em 1914 fundou a Faculdade Hahnemanniana (RJ) e o hospital homeopático que atualmente é a Escola de Medicina e Cirurgia da UNI-RIO. Somente em 1966, foi decretada a inclusão obrigatória da Farmacotécnica Homeopática em todas as faculdades de farmácia do Brasil e a primeira edição oficial da Farmacopeia Homeopática Brasileira ocorreu em 1977. Mas, somente em 1980, o Conselho Federal de Medicina reconheceu

oficialmente a homeopatia como especialidade médica, deixando de ser terapia alternativa (Corrêa et al., 1997).

A homeopatia no Sistema Único de Saúde (SUS) ainda é raridade, com poucas experiências de serviços em poucos municípios brasileiros. Com o objetivo de conhecer as opiniões dos usuários do SUS a respeito de homeopatia, pesquisadores coletaram dados de questionários e de entrevistas e os resultados mostraram que a principal motivação para a procura da homeopatia foi o insucesso de tratamento alopático anterior. O uso de medicamentos naturais, a consulta com tempo prolongado e com escuta atenta ao paciente, foram as características diferenciais positivas na comparação com o tratamento alopático. Os resultados apontam para uma terapia ainda pouco explorada nos SUS, mas que foi bem aceita entre os usuários de uma unidade de Salvador, Bahia (Monteiro, Iriart, 2007).

Teixeira (2002) relatou o caso de uma mulher de 50 anos com queixa de fogachos intensos, insônia e diminuição do desejo sexual e que possuía histórico familiar de câncer de mama. A densitometria óssea revelou osteopenia no colo do fêmur. O remédio homeopático administrado a ela foi o *Natrum muriaticum*, (30 CH, 60 CH, 200 CH e 400 CH) dose única, líquida, por 18 meses. Após um ano de tratamento, a densitometria óssea no colo do fêmur estava normal, e ao final, a paciente relatou melhora tanto física quanto psicologicamente.

Um grupo de pesquisadores decidiu avaliar o tratamento homeopático para ondas de calor, seus efeitos e impacto na qualidade de vida de mulheres na menopausa em diferentes países. Os critérios de inclusão foram: mulheres acima de 45 anos com menopausa estabelecida, que não receberam nenhum outro tratamento ou terapia hormonal. Foram prescritas 16 medicações homeopáticas diferentes, incluindo a *Lachesis muta*, *Belladonna*, *Sepia officinalis* entre outras e as diluições utilizadas foram de 9 CH e 15 CH. Das mulheres que fizeram o uso dos medicamentos, 19% disseram ter desaparecido os sintomas, 70%

relataram redução e somente 2,34% não observaram nenhuma mudança no estado geral. Estes resultados sugerem que o tratamento homeopático foi efetivo contra as ondas de calor, que tanto prejudicam a qualidade de vida das mulheres (Bordet et al., 2008).

O efeito sistêmico do *Plumbum metallicum* 30 CH foi observado na reparação óssea de mandíbulas de ratos. Dos períodos observados, os autores verificaram que no décimo quarto os animais medicados mostraram neoformação óssea praticamente em toda extensão do defeito ósseo com união das bordas aos 21 dias de tratamento. Os animais tratados com o medicamento homeopático não apresentaram efeitos colaterais (Almeida et al., 2006).

2.4.1 *Calcarea Phosphorica*

A *Calcarea phosphorica* é o fosfato de cálcio, obtido do mineral apatita, cuja fórmula é $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. É um dos doze sais teciduais identificados por Schussler, podendo ser utilizada em afecções desmineralizantes, diarreias e fraturas. A falta de *Calcarea phosphorica* no organismo pode resultar em hipertrofia das amígdalas, voz rouca em crianças, dor e mal estar ao engolir alimentos, palpitações cardíacas, deficiência na coagulação e incapacidade do organismo de responder a estímulos (Andrade et al., 2000; Bear, Bellucco, 2006).

O fosfato de cálcio, conhecido por hidroxiapatita, é o principal componente estrutural da matriz óssea compreendendo por volta de 85% do fosfato do corpo. Os cristais de hidroxiapatita encontram-se unidos herméticamente a cada fibra colágena se sobrepondo uns sobre os outros (Guyton, Hall, 2006).

Existem poucos relatos sobre o uso de medicamentos homeopáticos indutores de formação óssea e a *Calcarea phosphorica* é

um dos medicamentos relacionados à formação e remodelação óssea. Esta ação foi vista num grupo de pacientes com fratura de punho, que utilizaram a *Calcareea phosphorica* na consolidação da lesão. Todos os pacientes foram imobilizados e um grupo recebeu o tratamento homeopático na potencia de 6 CH nos primeiros quinze dias, aumentando para 30 CH na segunda quinzena. O tempo de consolidação da fratura variou entre os grupos, ficando com o menor tempo os pacientes que utilizaram a *Calcareea phosphorica*. A incidência de complicações foi menor no grupo de pacientes que receberam o medicamento homeopático, sem registro de reações adversas (Cardoso, Concepción, 2008).

Para melhorar a qualidade de ovos de galinha de granja, pesquisadores utilizaram a *Calcareea phosphorica*, fornecendo cinco gotas por animal ao dia, durante um mês. Ao final do experimento, os autores verificaram que no grupo dos animais que recebeu a medicação homeopática, houve menor quantidade de ovos quebrados, a espessura da casca dos ovos e a produtividade foram maiores com diferenças significativas (Estrada, et al., 2008).

A *Calcareea phosphorica* 12 CH foi administrada a frangos diariamente por 28 dias para se avaliar o crescimento de animais em sistema semi- intensivo de confinamento. Os autores observaram que não houve diferença na velocidade de crescimento e no peso final dos animais com a mediação (Amalcaburio et al., 2009).

Remédios homeopáticos, entre eles a *Calcareea phosphorica*, foram administrados a frangos durante 42 dias, sendo cinco gotas diariamente. O grupo controle recebeu somente o tratamento tradicional, incluindo uso de antibióticos e vacinas. Ao final do experimento, a taxa de crescimento e o peso final dos animais tratados com as medicações homeopáticas foram maiores do que os resultados vistos no grupo controle, principalmente entre o décimo quinto e o quadragésimo segundo dia de tratamento. A taxa de mortalidade foi

menor entre os animais do grupo experimental que se encontravam numa faixa etária maior (Hadipour et al., 2011).

Um estudo comparativo entre um medicamento alopático (risedronato – 1 mg/Kg/d) e um homeopático (*Calcareo phosphorica* 6 CH – 3 glóbulos/animal/dia) na reparação de defeitos ósseos na tíbia de ratos castrados, mostrou diferenças no que diz respeito à maturação e remodelação óssea. O medicamento homeopático apresentou maior estímulo à neoformação óssea na região do reparo somente nas fases iniciais do processo. A quantidade total de osso trabecular neoformado foi menor, porém mostrou remodelação para osso lamelar no fim do experimento (Werkman et al., 2006).

2.5 Ovariectomia X tratamentos

A ovariectomia com consequente deficiência estrogênica leva ao desenvolvimento de alterações ósseas metabólicas e estruturais semelhantes às observadas após a menopausa. Tais alterações podem atualmente ser tratadas de diversas maneiras e, numerosas pesquisas têm demonstrado diferentes métodos, invasivos e não invasivos, para avaliar e acompanhar tanto a instalação e o desenvolvimento quanto o tratamento das alterações da osteoporose em mulheres e em animais.

Entre os tratamentos utilizados para osteoporose podem ser citados: bisfosfonatos, reposição hormonal com estrógeno, ingestão de cálcio, vitamina D e K, proteínas morfogenéticas do osso, sinvastatina, osteoprotegerina (OPG), isoflavonas, raloxifeno, várias plantas medicinais e muitos outros.

Um estudo comparou os efeitos de 17 β -estradiol e de alendronato nas doses de 30 μ g/Kg e 0,1 mg/Kg, respectivamente, em ratas ovariectomizadas. Os tratamentos duraram 6 semanas, com aplicação subcutânea, diariamente. No período estudado, a DMO

avaliada pelo DEXA no osso esponjoso na região distal do fêmur diminuiu no grupo de ratas ovariectomizadas e mostrou aumento significativo entre os animais que receberam tratamento, principalmente com alendronato. A redução no volume ósseo trabecular e no número de trabéculas observada nos animais ovariectomizados foi inibida pelo tratamento com estradiol e, principalmente, pelo uso de alendronato. A espessura trabecular aumentou apenas entre os animais que fizeram uso do estradiol. O aumento do *turnover* ósseo, indicado pelo elevado volume de osteóide e aumento de reabsorção, visto nas ratas ovariectomizadas, diminuiu com os tratamentos, tanto com estradiol quanto com alendronato. Os marcadores de reabsorção e formação óssea, determinados pela deoxipiridinolina e osteocalcina respectivamente, aumentaram no grupo de ratas ovariectomizadas e diminuíram nos grupos tratados. Embora ambos os tratamentos tenham sido efetivos na inibição de perda óssea, o alendronato foi mais eficiente no aumento de massa óssea que o estradiol, nas doses usadas nesse trabalho (Da Paz et al., 2001).

Outro estudo demonstrou que a administração de uma proteína morfogenética do osso em ratas ovariectomizadas (3 vezes/semana nas doses de 1, 10, 25 e 50 µg na veia da cauda) por períodos de 8 a 30 semanas é uma ótima opção para o tratamento da perda óssea, restaurando o volume ósseo. Pela análise da tomografia computadorizada nos ossos longos (fêmur e tíbia) a área e a espessura do osso cortical foram maiores do que do osso trabecular. Na vértebra lombar, a espessura e o número de trabéculas aumentaram, demonstrando resposta melhor ao tratamento, se comparado aos ossos longos. Testes biomecânicos mostraram que a carga máxima, a rigidez e a energia absorvida foram de três a quatro vezes maiores nas ratas tratadas do que nos animais que não receberam o tratamento. Na cultura de células pré-osteoblásticas houve aumento na diferenciação para osteoblastos e diminuição de diferenciação para osteoclastos. A

expressão gênica aumentou para a fosfatase alcalina (AKp2) e colágeno tipo I (colea 1) e diminuiu para a expressão de osteopontina (Simic et al., 2006).

Estudos mostraram que a administração da OPG diminuiu a perda óssea trabecular em fêmeas de camundongos ovariectomizados. Além de haver ocorrido a diminuição no número de osteoclastos, a análise em microscopia eletrônica mostrou vacúolos de ATPase reduzidos, sugerindo que a baixa dose de OPG trouxe prejuízos estruturais e funcionais aos osteoclastos (Shimizu-Ishiura, et al., 2002).

O efeito do uso concomitante de retinol (vitamina A) e do alendronato de sódio nas alterações ósseas causadas pela deficiência estrogênica foi observado em ratas ovariectomizadas. Os grupos receberam por 28 dias 3 mg/Kg de alendronato e /ou 700 ou 3500 UI/Kg de retinol, diariamente por gavagem. Foram avaliados massa óssea, conteúdo mineral na tíbia, fêmur e vértebra lombar L-4 e parâmetros histomorfométricos como: na tíbia (largura do osteóide, crescimento transversal periosteal e endosteal, área de corte transversal na cavidade da medular e no osso cortical) e no fêmur (largura das trabéculas da epífise e da metáfise, largura da cartilagem da epífise). O alendronato sódico inibiu o desenvolvimento das alterações ósseas induzidas pela ovariectomia enquanto o retinol intensificou as alterações ósseas, principalmente na dosagem de 3500 UI. O retinol associado ao alendronato diminuiu o efeito anti-reabsorção do alendronato nos ossos, indicando que se deve estar atento para interações entre estes dois tratamentos. O uso de grandes doses de vitamina A deve ser acompanhado criteriosamente e limitado em idosos que tratam osteoporose (Pytlík et al., 2004; Sliwinski et al., 2004).

Os efeitos, no osso trabecular, da vitamina K2 (menatetrenone) (50 mg/dia) introduzida na alimentação de ratas ovariectomizadas foram observados após uma, duas, cinco e oito semanas após a cirurgia de ovariectomia. As alterações foram

proporcionais ao tempo de observação. Após oito semanas, a metáfise femoral das ratas ovariectomizadas mostrou intensa reabsorção óssea com poucas trabéculas e volume ósseo reduzido quando comparado ao grupo sem ovariectomia. Na junção condro-óssea, havia uma camada fina de osso recobrimdo a superfície da placa de crescimento ou a matriz cartilaginosa estava completamente exposta. No grupo tratado havia trabéculas delgadas encobrimdo a placa de crescimento. A tomografia computadorizada revelou aumento significativo da DMO na região trabecular, com aumento do volume ósseo nos animais tratados, comparados aos sem tratamento. Na metáfise femoral de ratas não ovariectomizadas foram encontrados numerosos osteoblastos marcados para a fosfatase alcalina (FA), assim como no grupo que se submeteu ao tratamento. Nos animais ovariectomizados, poucos osteoclastos achatados marcados para o TRAP foram encontrados tanto na matriz óssea delgada que encobria a placa cartilaginosa quanto na matriz cartilaginosa exposta. A redução da área com osteoclastos marcados pelo TRAP e o aumento na área com osteoblastos marcados pela FA nos animais tratados ficou evidente. Na microscopia eletrônica, os osteoclastos dos grupos ovariectomizados mostraram-se com bordas pregueadas, sinalizando atividade. Já nos animais tratados, as bordas pregueadas estavam ausentes. A osteocalcina encontrava-se somente na matriz óssea mineralizada, sem diferenças de localização entre os grupos (Asawa et al., 2004).

Em ratas ovariectomizadas os efeitos do alendronato (2,5 mg/Kg/dia) e da vitamina D (0,5 µg/Kg/dia) foram comparados entre si, através de estudos histomorfométricos e das propriedades biomecânicas do osso. Os parâmetros analisados para verificar a qualidade do osso foram a carga máxima, a resistência e a energia gastas para determinar a fratura. No grupo ovariectomizado a carga máxima e a resistência diminuíram na metáfise distal do fêmur e não se modificaram na diáfise. O alendronato não alterou nenhuma propriedade biomecânica do fêmur. Já

a vitamina D, fez aumentar a carga máxima tanto na metáfise distal quanto na diáfise. A energia para fratura aumentou na metáfise, houve aumento da resistência na diáfise, estes valores foram maiores que os observados no grupo sham. Os estudos histomorfométricos realizados na tíbia avaliaram a relação do volume de osso trabecular e do volume total do osso (BV/TV), o número de trabéculas, a espessura das trabéculas, a separação entre as trabéculas, a taxa de aposição mineral e a taxa de formação óssea. Nas ratas ovariectomizadas sem o uso dos medicamentos, a separação entre as trabéculas aumentou como resultado da reabsorção óssea. O alendronato preveniu estas mudanças, suprimindo a reabsorção óssea. A vitamina D mostrou maior número de trabéculas que o grupo sham e preveniu alterações no espaçamento entre trabéculas; seu efeito protetor no osso trabecular foi maior do que no grupo que utilizou o alendronato. A vitamina D aumentou a formação óssea no perióstio e na superfície endocortical. Já o grupo do alendronato não aumentou a formação óssea mas suprimiu a reabsorção óssea endocortical (Iwamoto et al., 2006).

Um estudo mostrou que a terapia combinada com alendronato e calcitriol (vitamina D3) por 12 semanas, reduziu a perda óssea no colo do fêmur devido à deficiência estrogênica. Nos testes mecânicos, a carga aplicada para que a fratura acontecesse no colo do fêmur, ficou no nível dos animais que não sofreram a ovariectomia, mostrando que o tratamento manteve a estrutura óssea. (Nakamura et al., 2008).

Foram avaliados em ratas ovariectomizadas os efeitos do alendronato e da OPG isoladamente ou em combinação, ambos administrados, por via subcutânea, iniciando após 12 semanas de ovariectomia. Os autores demonstraram melhora nas propriedades mecânicas de ossos longos, prevenção da perda de massa óssea, maior volume ósseo trabecular e menor número de osteoclastos. Os tratamentos isolados foram efetivos, porém, quando usados

simultaneamente, houve amplificação da inibição de reabsorção óssea através da inibição da osteoclastogênese RANKL dependente (Wang et al., 2011).

A lactoferrina, uma proteína amplamente presente na dieta, foi administrada diariamente em dose única (8,5 mg/Kg) em ratas ovariectomizadas. Após 3 meses de tratamento, houve aumento do volume ósseo, da espessura e do número de trabéculas. A perda óssea tanto no fêmur quanto na vértebra lombar foi menor, observada pela densidade mineral óssea. Nos animais tratados com lactoferrina, o teste biomecânico na diáfise do fêmur e na vértebra mostrou os maiores valores na carga para fratura, as concentrações séricas de cálcio, de deoxipiridinolina e de IL-6 foram menores e da osteocalcina e da calcitonina maiores (Guo et al., 2009).

O azeite é rico em gorduras monoinsaturadas (Omega-3 e Omega-6) com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Para comprovar seus efeitos, pesquisadores administraram a ratas, óleo de azeite extra virgem (1 mg/100 g/semana), 4 semanas antes da ovariectomia, continuando por mais oito semanas, após a cirurgia. Após este período, os níveis plasmáticos de cálcio diminuíram, os níveis da fosfatase alcalina aumentaram nas ratas ovariectomizadas e os níveis do fósforo permaneceram sem diferenças entre os três grupos. O nível de nitrato encontrava-se muito maior nos animais ovariectomizados se comparado aos animais que fizeram uso do azeite extra virgem. Histologicamente, na metáfise proximal da tíbia dos animais que receberam o tratamento, observou-se que a espessura da cortical ficou próxima aos animais não ovariectomizados, assim como o número de osteoclastos. As trabéculas mostraram mais continuidade entre si, com menor espaçamento, com um significativo aumento na área trabecular se comparada aos animais ovariectomizados (Saleh, Saleh, 2011).

Ratas ovariectomizadas foram submetidas a vários tratamentos contra a perda óssea observada na ausência estrogênica.

Neste estudo, foi comparado o uso da genisteína (derivado da isoflavona) com outras terapias comumente usadas como o alendronato, raloxifeno e estradiol. Seis meses após a ovariectomia os animais começaram o tratamento diário com doses ínfimas, via subcutânea, por 12 semanas. Ao final do experimento, todos os tratamentos aumentaram a resistência para fratura no fêmur, com destaque para os animais que receberam a genisteína. Histologicamente, a cabeça do fêmur dos animais tratados com a genisteína mostrou os melhores resultados quanto à arquitetura do osso cortical e trabecular com matriz óssea bem organizada. Os efeitos positivos no osso também foram confirmados através dos marcadores de formação e reabsorção óssea como a fosfatase alcalina e o telopeptídeo, com aumento e diminuição respectivamente, principalmente na presença da genisteína. Os tratamentos ajudaram a manter a integridade da cartilagem (Bitto et al, 2008).

Um grupo de pesquisadores utilizou genisteína sintética modificada, pois na sua estrutura química foi acrescentado o óxido nítrico, com objetivo de intensificar os efeitos benéficos na prevenção da perda óssea causada pela deficiência de estrógeno. Ratas que foram ovariectomizadas receberam diferentes doses do medicamento por doze semanas, sete dias após a ovariectomia. Nos animais tratados, a DMO na tíbia e fêmur foi maior que nos animais não tratados. Nas propriedades mecânicas do fêmur, a resistência foi maior entre os animais que receberam as doses de 9 e 18 mg/Kg do medicamento. Com relação aos biomarcadores, os níveis na urina da deoxipiridinolina estavam aumentados nos animais ovariectomizados, com redução significativa nos que receberam o medicamento. Já os níveis séricos da fosfatase alcalina e da osteocalcina encontraram-se diminuídos entre os animais que receberam o medicamento, sem diferenças significativas entre os animais não ovariectomizados (Wang et al., 2008).

Um estudo avaliou se a ingestão de 25 g diárias de isoflavona antes da ovariectomia poderia prevenir a perda óssea causada

pela deficiência estrogênica em ratas. Na histomorfometria, as ratas que se alimentaram da soja por dois meses após a ovariectomia mostraram, na região proximal do fêmur e da tíbia, volume ósseo trabecular maior que no grupo controle. Entre as trabéculas houve mais conectividade nos animais tratados e estreitamento e descontinuidade trabecular nos não tratados. No grupo de ratas ovariectomizadas que receberam a isoflavona por um mês, os resultados mostraram que a perda óssea não foi prevenida. Já nos animais que continuaram incluindo na dieta a isoflavona por dois meses, o conteúdo mineral ósseo aumentou nos ossos longos (Tsuang et al., 2008).

Foram comparados os efeitos do estradiol aos da genisteína e equol (ambos derivados da isoflavona) na região proximal do fêmur de ratas ovariectomizadas. Após cinco semanas de tratamento o menor ganho de peso foi exibido pelo grupo de ratas que receberam o estradiol. Nos testes biomecânicos os maiores valores de força aplicados nos fêmures foram vistos nos grupos das ratas que fizeram uso do estradiol e o do equol. No estudo histomorfométrico, a espessura, a área e conectividade entre as trabéculas foram significativamente maiores nos grupos das ratas que utilizaram o estradiol. Com relação a espessura do osso cortical, não houve diferenças significativas entre os grupos estudados, com exceção da região do trocanter. Através de agentes químicos fluorescentes, o grupo que recebeu somente soja na alimentação mostrou remodelação no perióstio, sem alterações no endóstio. Ao contrário, nos animais que receberam estradiol, a remodelação no perióstio foi mínima, com significativa remodelação óssea no endóstio (Tezval et al., 2010).

Ração enriquecida com cebola (3, 7 e 14%) é capaz de diminuir a osteopenia induzida pela ovariectomia em ratas jovens. Houve uma diminuição sérica dose-dependente tanto do cálcio quanto da osteocalcina. Na análise histomorfométrica, o número de trabéculas ósseas aumentou com menor separação trabecular. O número de

osteoclastos por área trabecular foi maior nos grupos de ratas ovariectomizadas que não receberam a ração diferenciada. No teste biomecânico, o grupo com ração acrescida de 14% de cebola, mostrou ligeiro aumento na rigidez do fêmur (Huang et al., 2008).

A talidomida pode ser usada para suprimir a reabsorção óssea excessiva em pacientes com mieloma múltiplo, inibindo a osteoclastogênese, mas pode também inibir a formação óssea. Para investigar melhor seus efeitos, um grupo de pesquisadores utilizou este medicamento em ratas ovariectomizadas em doses diárias de 15 mg/Kg, 30 mg/Kg e 60 mg/Kg, por quatro semanas. Os resultados histomorfométricos no fêmur mostraram que a dose de 15 mg/Kg aumentou a largura das trabéculas ósseas tanto na epífise como na metáfise. Já na dose de 60 mg/Kg, na região da epífise, a largura das trabéculas diminuiu. Não houve diferenças significativas na largura da cartilagem da epífise. No osso compacto da tíbia, a largura do osteóide diminuiu tanto no periosteio quanto no endosteio, independente da dose utilizada, se comparado aos animais ovariectomizados que não fizeram o uso do medicamento. A administração da talidomida na dose de 15 mg/Kg aumentou a carga de fratura no colo do fêmur das ratas ovariectomizadas (Kaczmarczyk-Sedlak et al., 2009).

A perda do osso alveolar em lesão periapical foi induzida em ratas normais e ovariectomizadas. A destruição do osso periradicular foi seguida pelo aumento de osteoclastos observado pela reação do TRAP, indicando reabsorção óssea na região. Comparado com os animais normais houve um aumento significativo da perda óssea nas ratas ovariectomizadas. Com o tratamento pelo alendronato houve redução na perda óssea, com redução do número de osteoclastos corados positivamente para o TRAP (Xiong et al., 2007).

O extrato da *Ajuga decumbens* foi administrado por três meses a camundongas ovariectomizadas. O fêmur esquerdo foi removido para medir o conteúdo de cálcio e o direito para análise histológica. O uso

do extrato preveniu a perda óssea de modo dose dependente (60 e 120 mg/Kg) nos animais ovariectomizados. A concentração de cálcio no fêmur e a concentração de colágeno na vértebra lombar nos animais ovariectomizados foi significativamente menor do que nos animais não ovariectomizados e nos que receberam a dose de 120 mg/Kg do fitoterápico. A deficiência estrogênica causada pela ovariectomia estimulou a diferenciação de osteoclastos, resultando num aumento no número de células multinucleadas positivas para o TRAP. Com a administração da dose de 120 mg/kg do extrato de *Ajuga decumbens* o resultado foi semelhante ao observado em camundongas não ovariectomizadas (Ono et al., 2008).

O extrato da *Femingia macrophylla*, administrado a ratas com deficiência estrogênica, nas doses de 5, 25 e 50 mg/Kg, foi comparado a um grupo de animais que recebeu 0,25 mg/Kg de alendronato, diariamente. Treze semanas depois, os animais ovariectomizados tiveram aumento do peso corporal, o que não foi detectado nos animais tratados. A atividade da fosfatase alcalina estava aumentada nas ratas com ovariectomia sem tratamento e sem mudanças nos animais tratados. A deoxipiridinolina e o cálcio tiveram seus valores diminuídos na presença do alendronato e do extrato nas doses de 25 e 50 mg/Kg. Na tíbia, o conteúdo e a DMO foram menores nos animais que não receberam medicamento algum. O alendronato e o fitoterápico nas doses maiores preveniram a redução tanto do conteúdo mineral quanto da DMO. Histologicamente, a espessura cortical e o volume trabecular ósseo na metáfise da tíbia foram consideravelmente menores nos animais ovariectomizados e aumentados nos animais tratados. No cultivo de células tanto da medula óssea da tíbia quanto do fêmur, os osteoclastos multinucleados positivos para TRAP, foram inibidos na presença dos medicamentos, de forma dose- dependente (Ho et al., 2009).

O extrato da *Cissus quadrangularis*, planta utilizada na medicina Ayurvedica, foi administrado em ratas ovariectomizadas. Após

uma semana da cirurgia, um grupo de animais foi tratado com 500 mg/kg do extrato e outro com 5,4 mg/Kg de raloxifeno. Os tratamentos duraram três meses e foram administrados semanalmente. O peso dos animais ovariectomizados teve aumento significativo, comparado com os demais grupos. Com os tratamentos, o peso dos fêmures foi mais elevado. A resistência biomecânica do fêmur diminuiu com a ovariectomia, assim como a espessura do osso cortical e trabecular. Histoquimicamente, a localização da fosfatase alcalina nos cortes histológicos aumentou e a reação do TRAP decaiu após a administração tanto do raloxifeno quanto do extrato da *Cissus quadrangularis* (Potu et al., 2009; Potu et al., 2010).

A ação do alendronato na reparação óssea em tíbias de ratas ovariectomizadas mostrou aos 14 dias com a dose de 0,5mg/Kg deposição de trabéculas ósseas mais maduras e organizadas, enquanto no grupo de animais que receberam a dose de 0,75 mg/Kg as trabéculas ósseas encontravam-se na maioria imaturas (Machado et al., 2006).

Recentemente os resultados de um estudo comparativo entre um medicamento alopático e homeopático, ocorridos em defeitos ósseos de tíbias de ratas ovariectomizadas, mostraram que o grupo tratado com alendronato apresentou maiores valores de densidade óptica aos 28 dias, sugerindo maior grau de mineralização. A *Calcareia phosphorica* estimulou preenchimento tecidual na região do calo ósseo aos 10 dias, com predomínio do tecido não mineralizado. No tecido de preenchimento houve grande remodelação óssea nos animais tratados com *Calcareia phosphorica* em relação ao grupo do alendronato, sugerindo diferentes mecanismos de ação entre os medicamentos. Porém a quantidade de osso formado ao final do experimento foi semelhante entre os grupos estudados.(Farina, 2010).

2.6 Osteocalcina

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado, servindo de proteção a órgãos vitais e medula óssea, dando suporte aos músculos e estocando e liberando íons, como o cálcio e fosfato, que juntos formam os cristais de hidroxiapatita, que mineralizam o osso. A matriz óssea é composta pelo colágeno tipo I e por uma quantidade de proteínas não colagenosa, que juntas mantêm a mineralização, a resistência, a estabilidade e a integridade óssea. A constante remoção de osso velho, a síntese de proteínas e a subsequente mineralização da matriz para formar osso novo dão o nome de remodelação óssea (Junqueira, Carneiro, 2008; Kierszenbam, 2008; Clarke, 2008).

A remodelação óssea pode ser mensurada por enzimas ou proteínas produzidas por osteoblastos e osteoclastos, células responsáveis respectivamente pela formação e reabsorção óssea. Por isso, o monitoramento de doenças do metabolismo ósseo, como a osteoporose pode ser feito por estas proteínas que são utilizadas como marcadores bioquímicos. Dentre os marcadores de reabsorção estão a fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP), piridinolinas, deoxipiridinolina e N-telopeptídeo. Os marcadores de formação óssea são a fosfatase alcalina, peptídeos do colágeno tipo I e a osteocalcina (Parisi, 2002).

A osteocalcina é uma proteína não colágena do osso, chamada também de proteína GLA, pois dos 49 aminoácidos, três são constituídos por ácido gama-carboxiglutâmico (GLA), permitindo sua interação com a hidroxiapatita, o mineral que confere resistência ao osso. A osteocalcina é específica do tecido ósseo e dentina, secretada por osteoblastos, que se deposita na matriz óssea recém-formada. A quantificação desta proteína é usada para monitorar os níveis de formação óssea, refletindo no *turnover* ósseo. (Prince et al., 1983; Bronckers et al., 1987; Lee et al., 2000; Parisi, 2002; Sarfati, 2004).

Amostras de osso trabecular com osteoporose, retiradas da cabeça do fêmur de humanos, foram comparadas com amostras de osso adulto e jovem. Os dados indicaram que o conteúdo de proteínas não colágenas foi reduzido no osso osteoporótico quando comparado aos ossos de adulto ou jovem. Pela análise por eletroforese em gel, as bandas das proteínas não colágenas do osso com osteoporose apresentaram um peso molecular menor quando comparados às outras amostras. Com a técnica *Western immunoblot*, foi possível identificar várias proteínas, como osteopontina, osteonectina, sialoproteína e a osteocalcina (Grynpas et al., 1994).

Vários órgãos de ratos com 6 semanas analisados pela técnica de *Northern blot*, mostraram que o RNAm do gene da osteocalcina apareceu somente no osso. Os níveis de RNAm da osteocalcina foram quantificados em osteoblastos isolados de calvária de fetos de ratos e em animais com deficiência da vitamina D. Tanto *in vitro* quanto *in vivo*, os níveis do RNAm encontraram-se aumentados na presença da vitamina D (Lian et al., 1989).

As proteínas não colágenas são importantes na organização da matriz óssea e regulação da mineralização. Num estudo, algumas delas foram localizadas imunoistoquimicamente na primeira vértebra lombar de primatas adultos que sofreram ovariectomia. Para a osteocalcina, a marcação foi difusa na matriz óssea e negativa para margens do osso trabecular incluindo o osteóide. A maioria dos osteócitos e os osteoblastos ativos que margearam a superfície trabecular marcaram positivamente. A medula óssea, perióstio, cartilagem, vasos sanguíneos e outros tecidos não ósseos foram negativos para a osteocalcina. Não houve diferenças tanto na extensão quanto na intensidade da imunomarcação para osteocalcina entre os grupos de animais (Carlson et al., 1993).

A imunolocalização da osteocalcina e osteonectina nas placas de crescimento do fêmur de coelhos com idade de cinco a 20

semanas, mostrou que ambas as proteínas estavam presentes nos condrócitos. A intensidade da marcação foi tão intensa quanto as observadas nos osteoblastos e o número de células marcadas foi aumentando com a idade do animal. Na zona hipertrófica foi encontrado o maior número de células marcadas tanto para a osteocalcina quanto para a osteonectina com poucas mudanças com o passar do tempo. A marcação para a osteocalcina encontrou-se também na matriz óssea, nos osteoblastos e osteócitos e os animais que tiveram a menor marcação para a osteocalcina foram os coelhos de cinco semanas (Aizawa et al., 1998).

Um estudo em cães mostrou os estágios iniciais da osteointegração ao redor de implantes na mandíbula e na maxila e os primeiros sinais de formação óssea ocorreu aos 7 dias, visto na coloração de rotina. Na análise imunistoquímica, a osteocalcina já se encontrava no tecido ósseo trabecular neoformado. Aos 14 dias, os osteons primários e secundários do osso alveolar já exibiam sinais de remodelação óssea (Schwarz et al., 2007).

A expressão da osteocalcina foi demonstrada durante a movimentação ortodôntica em cães, que variou de uma a oito semanas. Nas regiões de tensão, a imunomarcação evidenciou principalmente o citoplasma das células do ligamento periodontal, osteoblastos e cementoblastos. Nas regiões de compressão, a osteocalcina ficou evidente na matriz extracelular do ligamento periodontal e foi significativamente maior do que nas regiões de tensão, com pico de intensidade na quarta semana, com declínio drástico na oitava. A expressão da osteocalcina no lado experimental da mandíbula superou a intensidade encontrada no lado sham (Han et al., 2008).

Para verificar a importância da osteocalcina, um grupo de estudiosos através da microespectroscopia Raman e da nanotecnologia, avaliaram a estrutura molecular do osso cortical de fêmur de camundongos mutantes (ausência do gene da osteocalcina) e selvagens

(presença do gene da osteocalcina). Estatisticamente houve um aumento na cristalização dos ossos dos mutantes, exibindo maior dureza e comprometendo a elasticidade se comparado aos ossos corticais dos animais selvagens. As alterações ocorridas na cortical dos animais mutantes não foram uniformes ao longo do fêmur, com diferenças significativas ocorridas na camada central do osso cortical (Kavukcuoglu et al., 2009).

Durante o processo de reparo ósseo alveolar ocorrido em ratas ovariectomizadas, a osteocalcina estava fortemente marcada nos grupos que fizeram uso do raloxifeno e estradiol aos sete dias da extração dentária. Aos 28 dias não houve marcação intensa somente no grupo sham, com grande evidencia nos demais. No quadragésimo segundo dia a expressão da osteocalcina foi discreta em todos os grupos, principalmente no *sham* e nos tratados pelo estradiol. A imunomarcação foi observada nos osteoblastos, osteócitos, células da linhagem osteoblástica e trabécula óssea (Luvizuto et al., 2010).

A expressão imunoistoquímica de várias proteínas não colágenas, entre elas a osteocalcina, foi observada no processo de reparação de mandíbulas de ratas ovariectomizadas. Nos dois períodos iniciais (7 e 21 dias), os osteoblastos mostraram marcação de leve à moderada, assim como os osteócitos e as trabéculas ósseas imaturas aos 21 dias marcaram intensamente. Aos 45 dias o tecido ósseo neoformado marcou discreta e difusamente, com marcação intensa para os osteoblastos tanto no citoplasma quanto na membrana e para os osteócitos, marcação de leve a ausente. No último período (60 dias) o tecido ósseo neoformado obteve marcação leve e difusa, mas para os osteoblastos e osteócitos houve intensa marcação. Em todos os períodos estudados os megacariócitos foram marcados intensamente (Tera, 2010).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar comparativamente os efeitos da *Calcareia phosphorica* 6 CH e do Alendronato na remodelação óssea na região proximal do fêmur de ratas ovariectomizadas, utilizando análise histomorfométrica do volume ósseo no colo do fêmur e análise imunoistoquímica para detectar osteocalcina em células ósseas.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Manuseio geral dos animais e considerações éticas

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todas as medidas possíveis foram tomadas para evitar sofrimento desnecessário dos animais, bem como para reduzir o número de animais utilizados e as perdas durante os procedimentos trans e pós-operatório.

Este projeto encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais da FOSJC sob o protocolo nº 20/2009-PA/CEP (Anexo A).

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 120 ratas (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*, *Wistar*) com 90 dias de idade e peso aproximado de , mantidas em gaiolas em temperatura ambiente e alimentadas com ração Guabi Nutrilabor e água *ad libitum*, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais:

- a) Sham-placebo = ratas com cirurgia simulada tratadas com placebo (1 ml de água/animal/dia) por via oral (gavagem);
- b) OVZ-placebo = ratas ovariectomizadas e tratadas com placebo (1 ml de água/animal/dia) por via oral (gavagem);

- c) OVZ-*Calcarea phosphorica* = ratas ovariectomizadas e tratadas com *Calcarea phosphorica* 6CH (Pharmaciantiga – São José dos Campos, SP) (dois glóbulos dissolvidos em 1 ml de água/animal/dia), por via oral (gavagem);
- d) OVZ-alendronato = ratas ovariectomizadas e tratadas com alendronato (Terapêutica – São José dos Campos, SP) (1,20 mg/Kg dissolvidos em 1 ml de água/animal/ 3 vezes por semana), por via oral (gavagem).

Este mesmo grupo de animais foi utilizado para outro projeto de pesquisa (Farina, 2010. Efeitos da *Calcarea phosphorica* 6 CH e do alendronato na reparação de lesões ósseas em ratas ovariectomizadas), simultaneamente, o qual estudou a reparação de defeitos ósseos na tíbia, aproveitando os animais na mesma dinâmica de tratamento, de acordo com o conceito ético de redução de uso de animais e melhor aproveitamento destes.

4.2 Anestesia

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

4.3 Ovariectomia e cirurgia sham

A ovariectomia foi realizada cirurgicamente. Primeiro foi feita a tricotomia e a assepsia com álcool iodado na pele na região correspondente ao ovário a ser removido. Com o animal posicionado lateralmente, os ovários localizam-se aproximadamente a 1 cm de distância da coluna vertebral e 1 cm abaixo da última costela. Uma incisão de um centímetro foi realizada nesta região, na pele e na musculatura, paralelamente ao longo eixo do animal, seguindo-se a divulsão dos tecidos subjacentes até a exposição do ovário que foi retirado da cavidade abdominal. Foi feita uma ligadura logo abaixo desse, com fio de algodão estéril, seguindo-se a remoção mesmo. Os tecidos foram reposicionados e foi feita uma sutura em planos com fios de nylon monofilamentar (Mononylon® 4.0, Ethicon, Brasil). Na pele do local foi feita nova assepsia com álcool iodado. Este procedimento foi realizado bilateralmente no animal.

Para a cirurgia sham todos os procedimentos foram realizados como descritos anteriormente. No entanto, não foi feita ligadura nem remoção dos ovários, somente a exposição dos mesmos, pois a intenção desta cirurgia foi simular estresse cirúrgico no grupo não ovariectomizado.

Todos os animais receberam após a cirurgia de ovariectomia ou cirurgia sham, dose única de enrofloxacino (Kinetomax® - Bayer) na dosagem de 0,3 mg/100g por animal e permaneceram em gaiolas (n=6/gaiola) com fornecimento de ração e água *ad libitum* até o final do experimento.

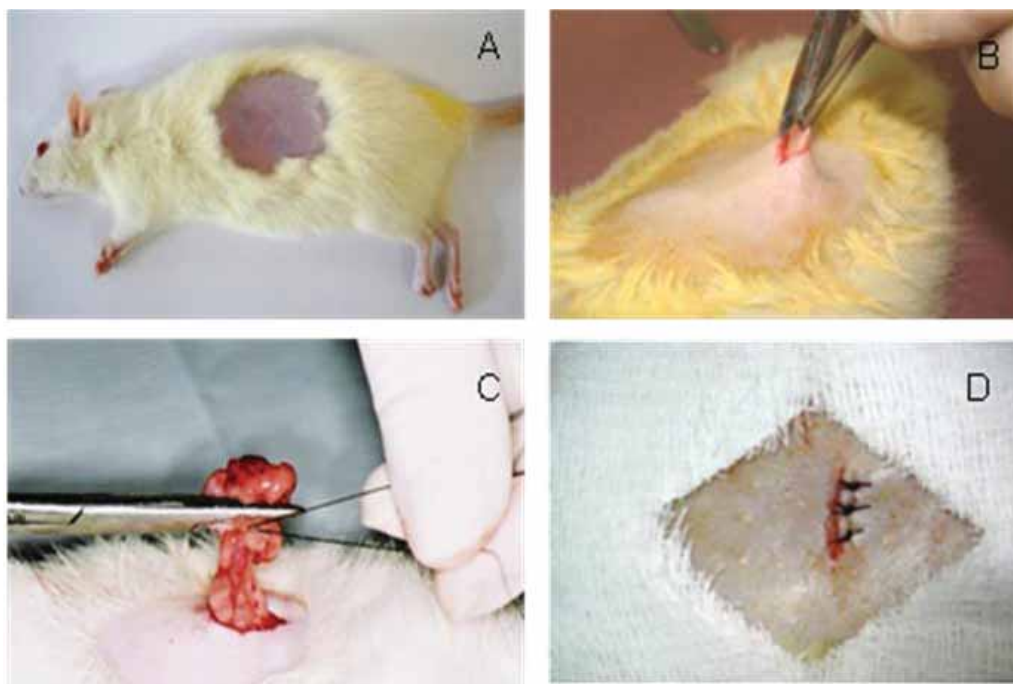


Figura 1 – Procedimento cirúrgico de ovariectomia: A) animal anestesiado e depilado; B) incisão da pele e camada muscular; C) ligadura e excisão do ovário; D) aspecto final após sutura da camada muscular e da pele.

4.4 Tratamentos

Após dois meses de ovariectomia e cirurgia sham, foram feitas lesões ósseas nas tíbias em todos os animais. O período de 2 meses após a ovariectomia foi o tempo selecionado neste trabalho para desenvolvimento de osteoporose pela deficiência estrogênica. Os animais iniciaram os tratamentos com *Calcareia phosphorica* 6 CH, alendronato ou placebo (água), conforme descrito na divisão dos grupos no item 4.1, logo após a cirurgia de lesão óssea. Os tratamentos serviram para avaliar os efeitos na reparação óssea na tíbia (Farina, 2010) e na remodelação óssea em fêmur (trabalho em questão).

4.5 Sacrifício e processamento histológico

Todas as ratas foram sacrificadas, em subgrupos de seis animais, após 3, 6, 10, 17 e 28 dias a partir do início do tratamento. Para a realização do sacrifício foi utilizada anestesia geral em dose excessiva. A comprovação da ovariectomia foi feita macroscopicamente, durante a necropsia dos animais, por meio da visualização da atrofia dos cornos uterinos. O fêmur direito das ratas foi removido, descarnado e fixado em formol neutro tamponado a 10% por pelo menos 48 horas. Posteriormente o fêmur foi desmineralizado em EDTA 10% em temperatura ambiente, por aproximadamente quatro meses, com trocas semanais e então encaminhado ao processamento histológico, incluído no sentido longitudinal em bloco de parafina. Foram feitos cortes seriados, com aprofundamento suficiente para visualização da epífise do fêmur e a partir dessa profundidade foram feitos cortes histológicos seriados de 5 µm de espessura para a coloração HE e de 3 µm para a imunohistoquímica.

4.6 Análise histomorfométrica

Para a análise histomorfométrica, as lâminas foram coradas pelo método de rotina com Hematoxilina e Eosina – HE (*Merck & Co.,Inc.*). Foram selecionados três cortes representativos do colo do fêmur por animal. As lâminas foram fotografadas no aumento de 25x em microscópio de luz Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) que transmitiram as fotos para o programa computacional

AxioVision Release 4.7.2. As imagens digitais (formato JPEG) selecionadas na região do colo do fêmur foram usadas para análise quantitativa do tecido ósseo.

Foi demarcada a área de preenchimento por osso trabecular abrangendo toda a área do colo do fêmur (Figura 2). Primeiramente a área abrangendo todo o colo do fêmur foi calculada em *pixels*². Depois foi utilizada a ferramenta *magic wand* do programa *Adobe Photoshop*, versão 7.0, com tolerância de 40, para selecionar somente as trabéculas ósseas presentes na área mencionada. As trabéculas foram copiadas e salvas como uma nova imagem que foi analisada pelo programa *ImageJ* (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA - <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), versão 1.31 para *Windows*, através dos seguintes passos:

- a) *Process* → *Binary* → *Make Binary*;
- b) medição da área: *Analyze* → *Analyze Particles*.

Com esses passos a área trabecular analisada foi medida automaticamente em *pixels*². Para cada animal, o osso trabecular contido no colo do fêmur considerado para análise estatística corresponde à média dos valores obtidos nos três cortes analisados.

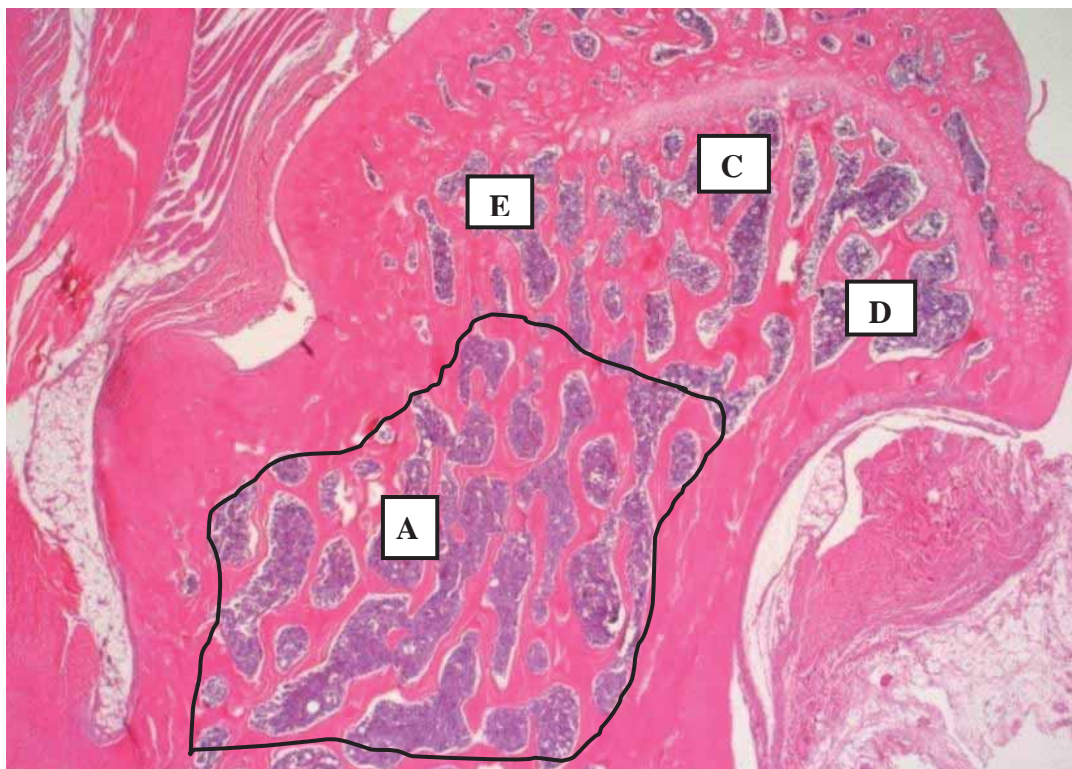


Figura 2 – A= área utilizada para a análise histomorfométrica do volume ósseo no colo do fêmur; C,D,E= áreas utilizadas para análise imunohistoquímica. As letras E, C e D representam as áreas onde foram feitas as contagens de células.

4.7 Análise imunohistoquímica

Para a análise imunohistoquímica lâminas silanizadas com corte histológico fino foram tratadas com anticorpo anti osteocalcina. Uma lâmina de cada animal foi selecionada para análise da marcação imunohistoquímica. Os anticorpos para osteocalcina OCC (FL-110: sc-30044) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology®, CA, USA.

Os cortes histológicos foram submetidos às reações de imunohistoquímica, segundo o protocolo do Laboratório de Imunohistoquímica da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - FOSJC/UNESP:

1. Desparafinização em 2 banhos de xilol por 5 minutos cada;
2. Reidratação em uma série de passagens em etanol em concentrações decrescentes: absoluto, 70° GL, 50° GL, cada passagem por duas vezes de 3 minutos cada;
3. Duas passagens em água destilada;
4. Recuperação antigênica. As lâminas foram acondicionadas e imersas em recipiente contendo solução de Citrato, pH 6,0, e levadas ao forno de micro-ondas, onde foram submetidas a 3 ciclos consecutivos de 3 minutos, em potência 7, seguidas de resfriamento em temperatura ambiente. Após, realizou-se lavagem por 10 minutos em água corrente, seguindo-se 2 passagens em água destilada;
5. Bloqueio da peroxidase endógena tecidual usando solução de álcool metílico 50% e peróxido de hidrogênio 20 vol, na proporção de 1:1, em 2 ciclos de 5 minutos cada;
6. Lavagem por 10 minutos em água corrente, seguindo-se 2 passagens em água destilada;
7. Imersão em solução de TRIS hidroximetil amino metano, pH 7,4, que é a solução tampão da reação, em 2 ciclos de 5 minutos cada;
8. Incubação com soro albumina bovina (BSA) por 1 hora, em câmara úmida, para eliminação dos anticorpos inespecíficos;

9. Incubação dos anticorpos primários para osteocalcina, na diluição 1:300, por um período de 18 horas, à temperatura de 4°C;
10. Lavagem e imersão em solução de TRIS hidroximetil amino metano, em dois ciclos de 5 minutos cada;
11. Incubação do anticorpo secundário (Universal LSAB TM Kit/HRP, Rb/Mo/Goat – DAKO CO., California, USA) por 30 minutos;
12. Lavagem e imersão em solução de TRIS hidroximetil amino metano, em dois ciclos de 5 minutos cada;
13. Incubação do complexo terciário estreptavidina peroxidase (Universal LSAB TM Kit/HRP, Rb/Mo/Goat – Dako) por 30 minutos;
14. Lavagem e imersão em solução de TRIS hidroximetil amino metano, em dois ciclos de 5 minutos cada;
15. Revelação da reação com diaminobenzidina (DAB) (DAKO CO., California, USA) por 10 minutos;
16. Duas lavagens em solução de TRIS hidroximetil amino metano;
17. Lavagem por 10 minutos em água corrente, seguindo-se 2 passagens em água destilada;
18. Contra-coloração com a hematoxilina de Mayer por 2 minutos;
19. Lavagem por 10 minutos em água corrente, seguindo-se 2 passagens em água destilada;

20. Os cortes foram desidratados em cadeia crescente de etanóis (50° GL, 70° GL, absoluto) 2 vezes por 3 minutos em cada concentração, diafanizados em xilol e montados com resina permount (Fisher Scientific®, New Jersey, NY, USA) para microscopia.

A análise microscópica imunohistoquímica foi feita através da captura de imagens das lâminas a partir de um microscópio de luz Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) que transmite para o programa computacional AxioVision Release 4.7.2.

Para cada corte histológico foram feitas três fotos em aumento de 400 X em áreas padronizadas logo abaixo da linha de crescimento, sendo uma na região central, uma na extremidade esquerda e outra na extremidade direita (Figura 2). Para todos os cortes histológicos foram avaliadas a quantidade de imunomarcção positiva e negativa em células pré-definidas.

As estruturas analisadas foram: osteócitos, osteoblastos, e células da medula óssea com características de megacariócitos. As contagens foram feitas por três observadores calibrados e considerou-se para análise estatística o valor médio dos resultados dos observadores e a soma dos valores das 3 áreas padronizadas para a avaliação (Figura 2).

4.8 Análise estatística

Os dados obtidos na análise histomorfométrica do colo do fêmur e a análise imunohistoquímica para osteocalcina foram submetidos à estatística descritiva e aos testes estatísticos paramétricos. Os testes utilizados foram: análise de variância ANOVA usando o programa computacional MINITAB® Release 14.12.0 e teste de comparação múltipla de Tukey, usando o programa Statistix 8.0. Os gráficos foram feitos no programa Excel e o nível de significância adotado foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Histomorfometria e estatística

O volume ósseo (massa óssea) considerado corresponde ao valor em pixel² ocupado pelo osso trabecular no colo do fêmur direito. Os dados obtidos segundo os diferentes tipos de tratamento e o período de duração dos mesmos estão expostos nas tabelas 1, 2 e 3 e nas figuras 3 e 4.

Tabela 1 - Estatística descritiva dos valores médios de volume ósseo expressos em pixel² obtidos na análise histomorfométrica segundo os diferentes tratamentos e tempos de observação

Tipos de tratamento / valores de volume ósseo		Períodos de observação em dias				
		3	6	10	17	28
SHAM- placebo	Média	271188	393991	445503	356260	343933
	*DP	10786	32538	35214	31409	22587
OVZ- placebo	Média	241229	275870	316282	261465	258881
	*DP	14963	24644	39938	15023	9139
OVZ- Calcarea phosphorica	Média	278275	295282	405860	352657	365898
	*DP	24112	33753	30238	27982	42843
OVZ- Alendronato	Média	264965	290851	365261	381252	463399
	*DP	21045	14726	33808	23435	23592

*DP = Desvio Padrão

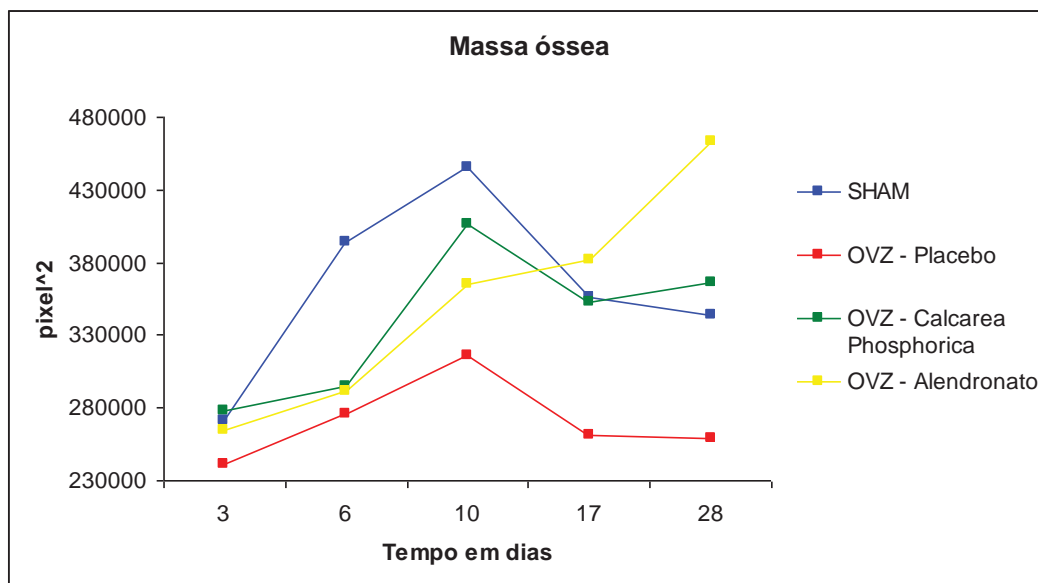


Figura 3– Distribuição gráfica dos valores médios de volume ósseo (em pixels²) de cada grupo experimental, segundo os diferentes tratamentos nos cinco períodos de observação (em dias).

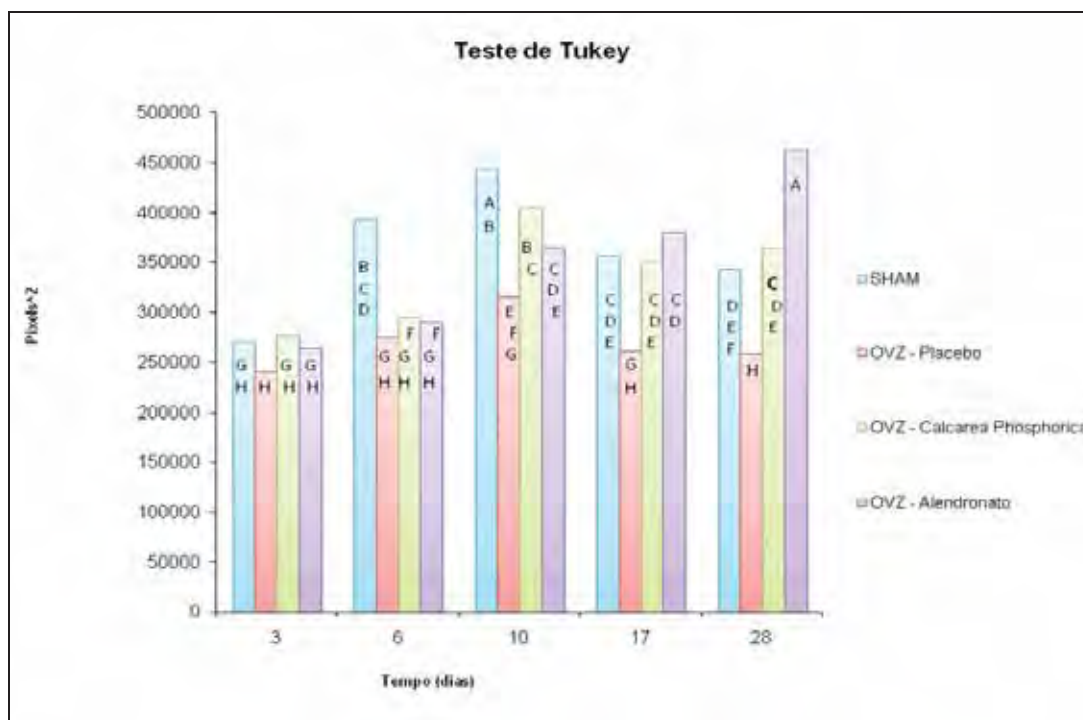


Figura 4 – Representação gráfica em colunas dos resultados do Teste de Comparação Múltipla de Tukey para análise do volume ósseo (em pixels²) no colo do fêmur entre todos os grupos, segundo os quatro diferentes tipos de tratamento experimental nos cinco períodos de observação (em dias). Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

Tabela 2 – Teste de Tukey para análise do volume ósseo no colo do fêmur entre todos os grupos, segundo os cinco diferentes períodos de observação experimental

PERÍODOS DE OBSERVAÇÃO (DIAS)	MÉDIA DE VOLUME ÓSSEO	GRUPOS HOMOGÊNEOS
10	383227	A*
28	358028	B
17	337909	B
6	313999	C
3	263914	D

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

Tabela 3 - Teste de Tukey para análise do volume ósseo no colo do fêmur entre todos os grupos, segundo os quatro diferentes tipos de tratamento experimental

TIPOS DE TRATAMENTO	MÉDIA DE VOLUME ÓSSEO	GRUPOS HOMOGÊNEOS
SHAM-Placebo	362175	A*
OVZ-Alendronato	353146	AB
OVZ-Calcareia phosphorica	339595	B
OVZ-Placebo	270745	C

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

No período de três dias de tratamento o volume ósseo do colo do fêmur em todos os grupos não mostrou diferença estatisticamente significativa, embora o grupo Ovz-placebo apresentasse um valor numérico ligeiramente menor em relação aos outros três grupos (Tabela 1 e Figura 3). O teste de comparação múltipla de Tukey não evidencia diferença estatística neste período (Figura 4).

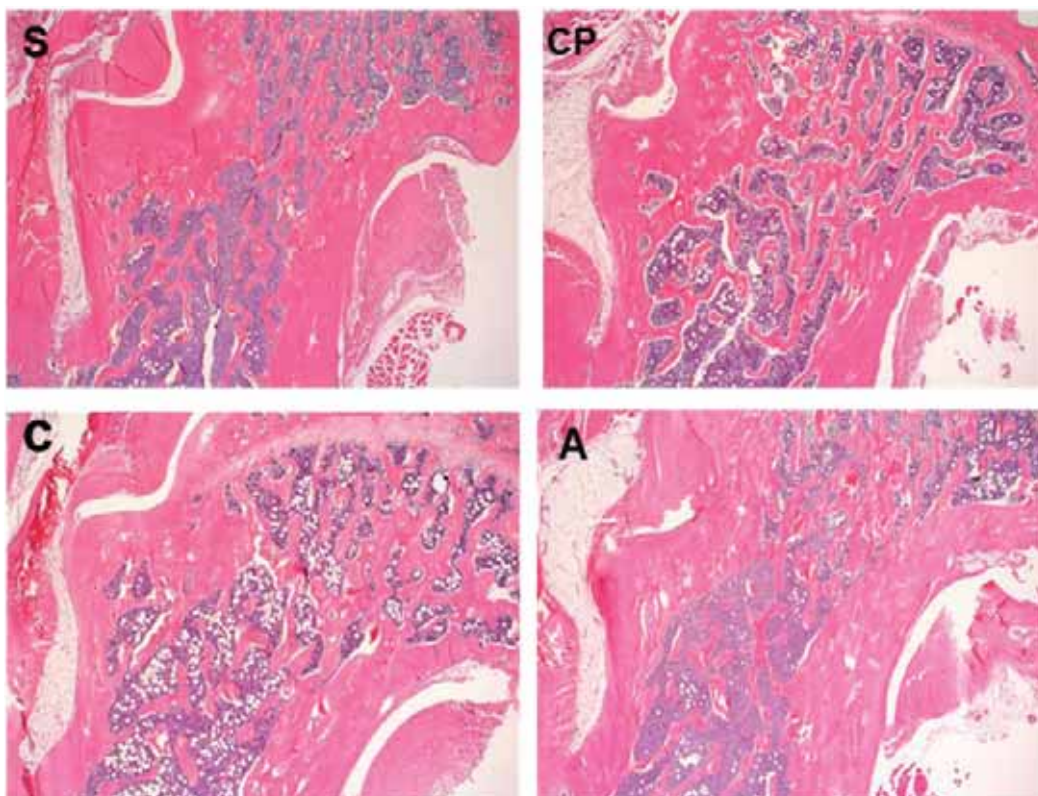


Figura 5- Aspecto microscópico do colo do fêmur aos 3 dias de tratamento. Trabéculas ósseas pequenas entrelaçadas e distribuídas homogeneamente, com aspecto semelhante em todos os grupos. S (Sham-placebo); CP (OVZ- Calcarea phosphorica); C (OVZ-placebo); A (OVZ-alendronato). HE 25X.

No período de seis dias de tratamento o volume ósseo do colo do fêmur aumentou em todos os grupos em relação ao período de três dias. Os animais que sofreram ovariectomia mostraram um pequeno aumento e não se diferenciaram estatisticamente dos valores dos 3 dias e nem entre si, independente do tratamento. Destacou-se o grupo Sham-placebo, cujo volume ósseo mostrou valor significativamente maior que aos 3 dias e comparado aos grupos com deficiência estrogênica (Figuras 3 e 4 e Tabela 1).

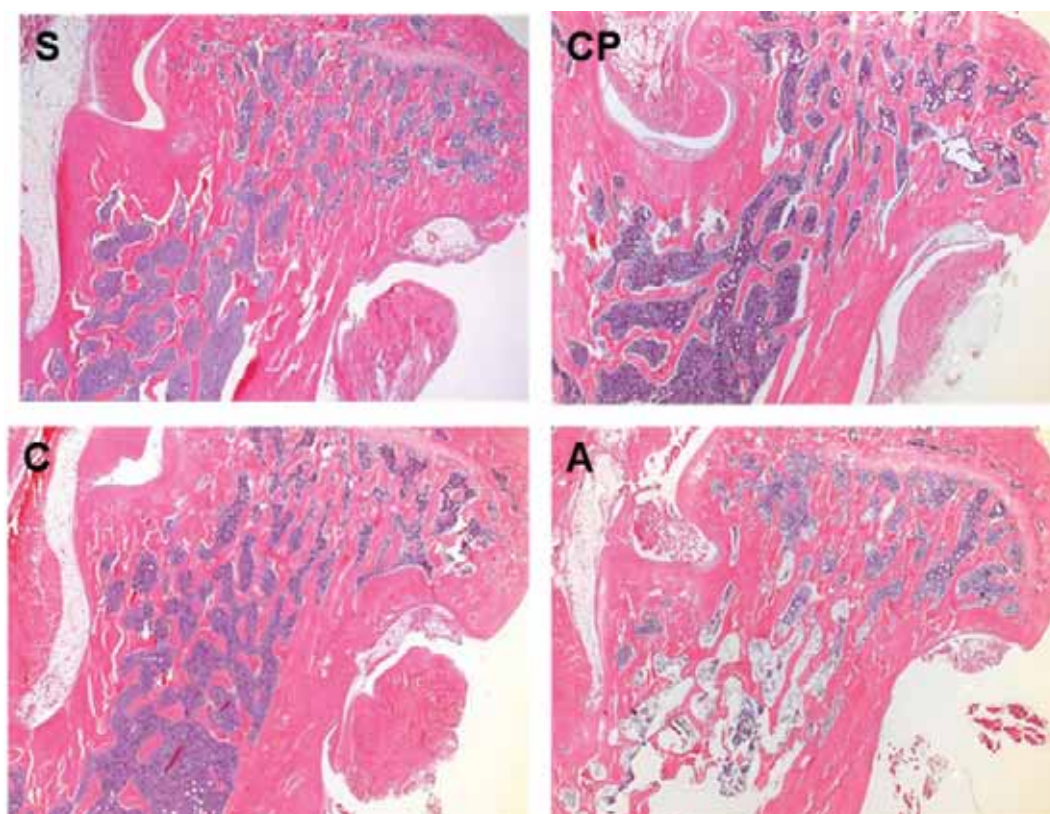


Figura 6- Aspecto microscópico do colo do fêmur aos 6 dias de tratamento. S (Sham-placebo); CP (OVZ- Calcarea phosphorica); C (OVZ-placebo); A (OVZ-alendronato). HE 25X.

No período de 10 dias de tratamento o volume ósseo do colo do fêmur continuou aumentando em relação ao período de seis dias e, no contexto desse experimento, mostrou um pico de formação óssea para todos os tratamentos (Tabela 2), mas em intensidade variada, com exceção do grupo tratado com alendronato que continuou aumentando até o fim do experimento. O grupo Sham-placebo foi o que mais se destacou e o da *OVZ-Calcareia phosphorica* mostrou um aumento do volume ósseo que superou o grupo OVZ-alendronato. O grupo OVZ-Placebo foi o que apresentou o menor volume ósseo. Os grupos Sham-placebo e *OVZ-Calcareia phosphorica* alcançaram aos 10 dias os maiores valores dentro de seus grupos observados durante esse estudo (Tabela 1, Figuras 3 e 4).

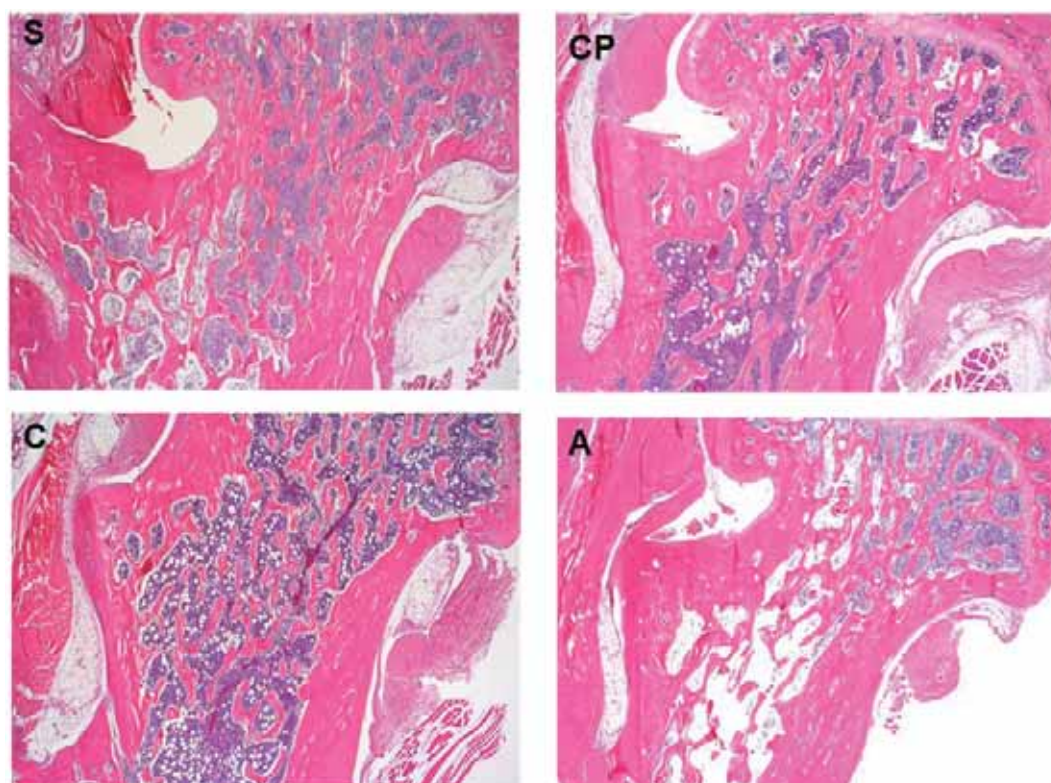


Figura 7-Aspecto microscópico do colo do fêmur aos 10 dias de tratamento. S (Sham-placebo); CP(*OVZ-Calcareia phosphorica*); C (OVZ-placebo); A (OVZ-alendronato). HE 25X.

No período de 17 dias de tratamento houve uma desaceleração no ganho de volume ósseo em todos os grupos exceto o do alendronato. O grupo Sham-placebo mostrou diferença estatística na perda de volume ósseo dos 10 para os 17 dias. Os grupos OVZ-alendronato, Sham-placebo e OVZ-*Calcareia phosphorica* ficaram sem diferenças estatisticamente significativas entre si aos 17 dias. O grupo que recebeu o alendronato mostrou um pequeno aumento numérico dos 10 dias para os 17 dias, mas sem diferença estatística. O grupo OVZ-Placebo aos 17 dias perdeu todo o volume ósseo alcançado aos 10 dias e foi o grupo que exibiu o menor volume ósseo neste período experimental e foi estatisticamente menor que os outros 3 grupos (Tabelas 1, 2 e 3 e Figuras 3 e 4).

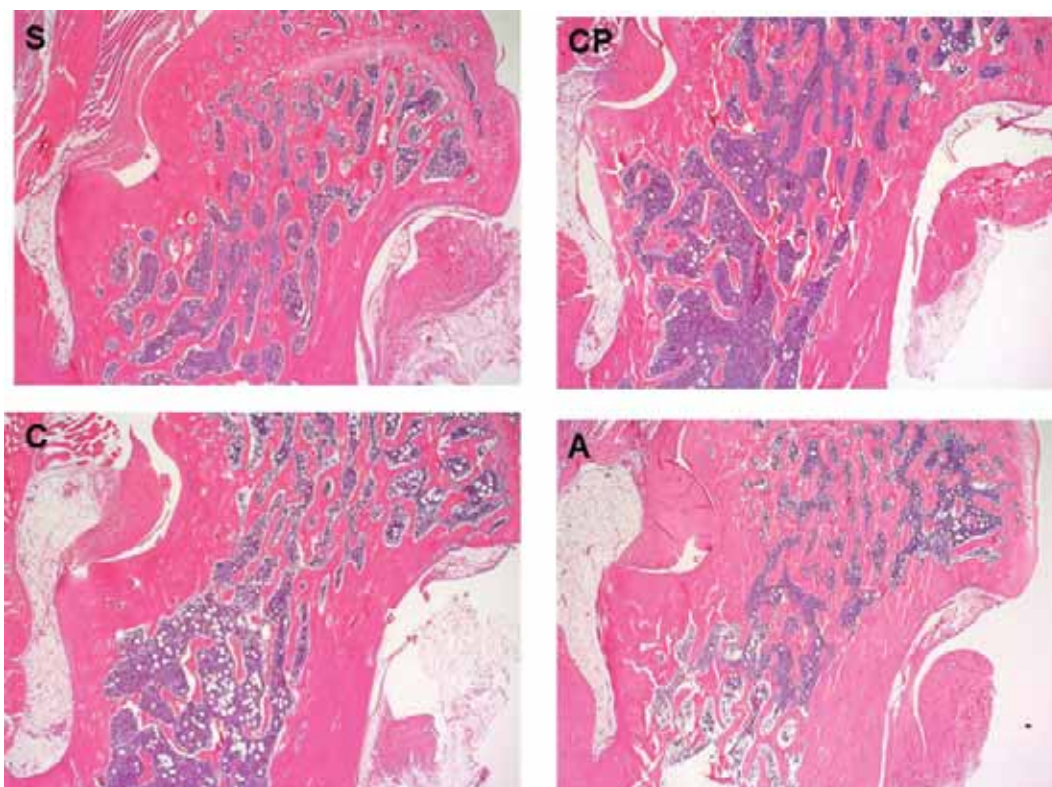


Figura 8-Aspecto microscópico do colo do fêmur aos 17 dias de tratamento. S (Sham-placebo); CP (OVZ- *Calcareia phosphorica*); C (OVZ-placebo); A (OVZ-alendronato). HE 25X.

Aos 28 dias o grupo que recebeu o alendronato se destaca dos demais com diferença significativa no aumento de volume ósseo. O grupo OVZ-Placebo aos não se recuperou da perda do volume ósseo alcançado aos 10 dias e manteve valores semelhantes aos observados aos 17 dias, foi o grupo que exibiu o menor volume ósseo aos 28 dias, com valor estatisticamente menor que os outros 3 grupos. Os grupos OVZ-Calcareia phosphorica e Sham-placebo mantiveram basicamente valores semelhantes aos de 17 dias e não apresentaram diferença estatística entre si embora o tratado com Calcareia phosphorica tenha exibido valor numérico discretamente maior que o Sham-placebo. O único grupo que voltou a apresentar volume ósseo estatisticamente igual ao dos 3 dias do experimento foi o OVZ-placebo.

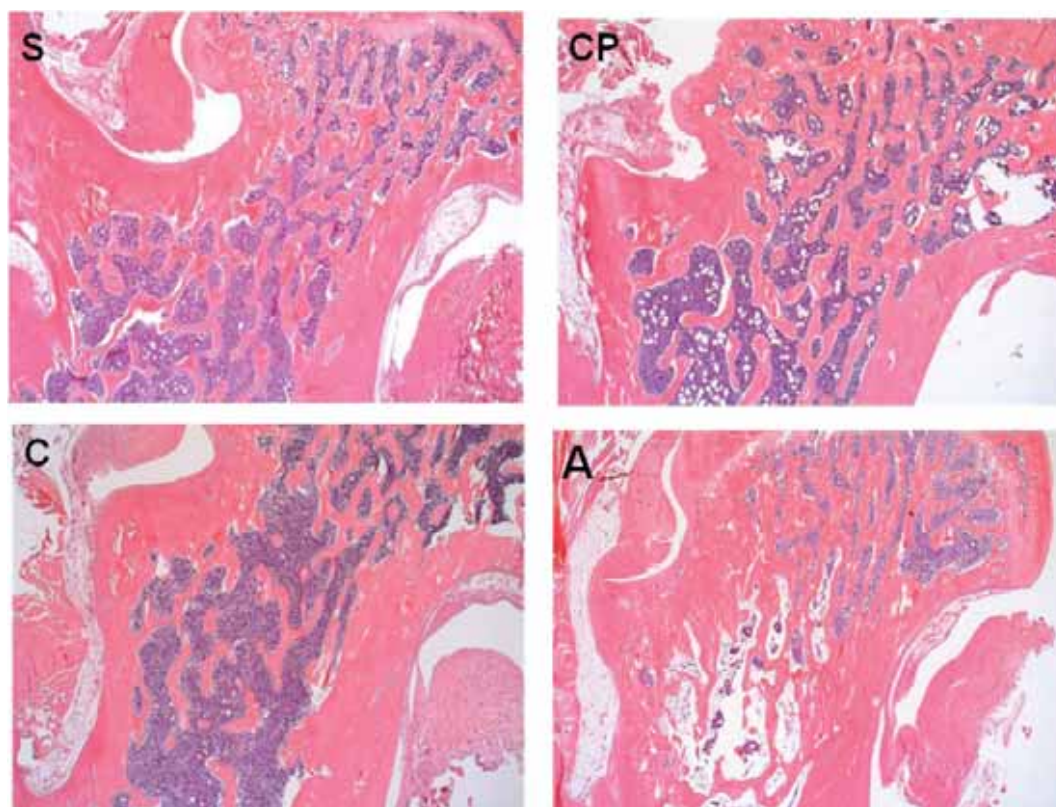


Figura 9- Aspecto microscópico do colo do fêmur aos 28 dias de tratamento: S (Sham-placebo) e CP (OVZ- *Calcareia phosphorica*) ambos com trabéculas numerosas, espessas e com pouco espaçamento; C (OVZ-placebo) com trabéculas curtas com pouca conexão e mais espaçadas; A (OVZ-alendronato) com trabéculas mais espessas que os outros grupos. HE, aumento original 25X.

Diferenças histológicas entre os tratamentos ao longo dos cinco períodos de observação no colo do fêmur estão a seguir.

Aos 3 dias não houve diferenças microscópicas na quantidade do osso trabecular entre os quatro tratamentos. Observaram-se trabéculas pequenas entrelaçadas, distribuídas homoganeamente (Figura 5).

Aos 6 dias houve pouca diferença na quantidade de osso trabecular em relação ao observado aos 3 dias nos grupos ovariectomizados, independente de tratamento. O grupo sham-placebo apresentou mais osso trabecular que os demais grupos e foi o único que aumentou a quantidade de osso em relação aos 3 dias (Figura 6)

Aos 10 dias a quantidade de osso trabecular foi maior que nos dias anteriores nos grupos Sham-placebo, OVZ-Calcareia phosphorica e OVZ-alendronato. O grupo Sham-placebo foi o que apresentou mais trabéculas ósseas e o grupo OVZ-Placebo foi o que apresentou a menor quantidade de trabéculas ósseas (Figura 7).

Aos 17 e 28 dias o grupo OVZ-placebo exibiu aspecto microscópico semelhante ao dos dois períodos iniciais do estudo, mantendo a menor quantidade de osso trabecular em comparação aos demais grupos. Os grupos OVZ-Calcareia phosphorica e Sham-placebo apresentaram discreta diminuição de osso trabecular em relação ao encontrado aos 10 dias e aspecto microscópico semelhante entre si. O grupo OVZ-alendronato aumentou progressivamente a quantidade de osso, mostrando aos 28 dias, trabéculas ósseas mais espessas e em maior número (Figuras 8 e 9).

O grupo OVZ-placebo foi o que apresentou a menor quantidade de osso no colo do fêmur durante todo o experimento, com trabéculas ósseas finas, entrelaçadas e bem espaçadas, praticamente com o mesmo aspecto microscópico ao longo dos cinco tempos de observação. O grupo Sham-placebo mostrou um pico de aumento de volume ósseo de 3 para 10 dias e depois diminuiu mas ficou com um

volume maior que no início do experimento. As trabéculas eram finas e entrelaçadas, porém mais numerosas e com menor espaçamento entre si e após 10 dias ficaram mais espessas. O grupo OVZ-*Calcareo phosphorica* apresentou comportamento semelhante ao sham-placebo. O grupo OVZ-alendronato inicialmente tinha trabéculas finas, entrelaçadas e bem espaçadas, mas estas foram ficando progressivamente mais espessas ao longo do experimento.

5.2 Imunohistoquímica e estatística

Para análise imunohistoquímica cortes finos selecionados foram tratados com anticorpo anti-osteocalcina. Foram contados, em três regiões predeterminadas e padronizadas na epífise proximal do fêmur, osteoblastos positivos e negativos, osteócitos positivos e negativos, osteoclastos positivos e megacariócitos positivos para osteocalcina. Os dados obtidos estão dispostos nas tabelas e figuras a seguir.

Tabela 4 - Estatística descritiva da quantidade média de osteoblastos positivos para osteocalcina localizados na região epifisária proximal do fêmur, de acordo com os diferentes tipos de tratamento nos diferentes tempos de observação

Tratamento / quantidade de osteoblastos		Tempo de observação em dias				
		3	6	10	17	28
SHAM- placebo	Média	7,80	3,28	3,92	28,67	29,55
	*DP	8,30	2,02	5,38	17,74	15,50
OVZ- Placebo	Média	9,22	2,8	12,17	29,93	5,97
	*DP	10,82	1,38	11,96	13,97	7,89
OVZ- Calcareia phosphorica	Média	32,92	19,13	22,79	5,32	8,12
	*DP	19,85	10,93	18,99	6,96	8,33
OVZ- Alendronato	Média	11,73	6,98	0,217	0	17,95
	*DP	10,48	10,49	0,531	0	19,12

*DP = Desvio Padrão

Foram observados osteoblastos com marcação para osteocalcina positiva e negativa em quantidade variável entre os grupos (Tabela 4 e Figura 10). A comparação por ANOVA dois fatores (tempo de observação e tipo de tratamento) para a quantidade média de osteoblastos positivos para osteocalcina presentes entre os grupos revelou como efeito significativo o fator tratamento analisado, não significativo o fator tempo e significativa a interação entre tratamento e tempo ($p=0,008$, $p=0,054$ e $p=0,001$, respectivamente). Os testes de Tukey comparando somente o tempo ou o tratamento e o de comparação múltipla dos grupos, realizado para complementação mostrou que o tempo de tratamento não interferiu nos resultados, mas que o tipo de tratamento sim. O tratamento com Calcareia phosphorica apresentou mais

osteoblastos positivos para osteocalcina que o tratamento com alendronato (Tabelas 5 e 6 e Figura 11).

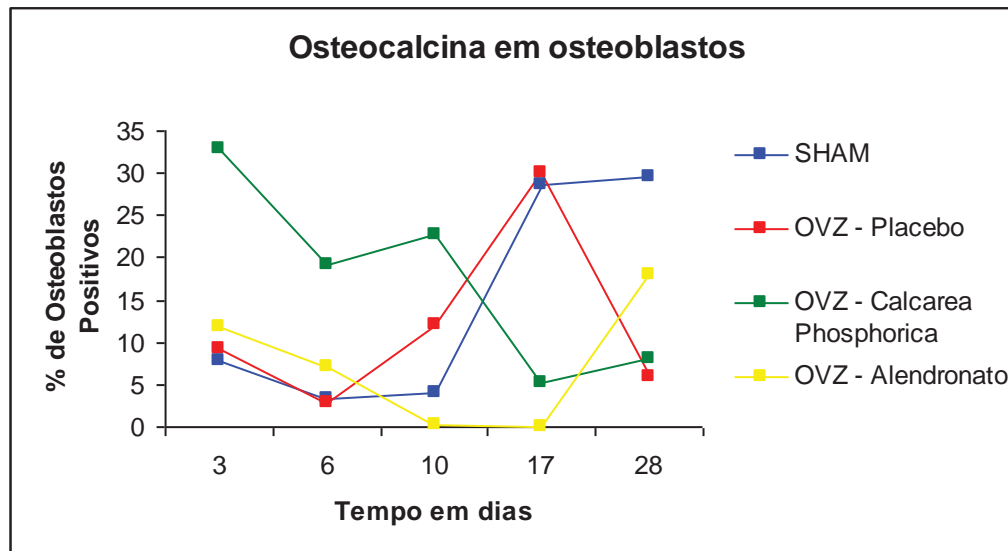


Figura 10 – Distribuição gráfica da quantidade média de osteoblastos positivos para osteocalcina, localizados na região epifisária proximal do fêmur, de cada grupo experimental, de acordo com os diferentes tipos de tratamento, em cada período de observação.

Tabela 5 - Teste de Tukey para a quantidade média de osteoblastos positivos para a osteocalcina localizados na região epifisária proximal do fêmur, em todos os grupos, de acordo com os diferentes tempos de observação

Tempo de observação (dias)	Quantidade média de osteoblastos	Grupos Homogêneos
17	15,979	A
3	15,417	A
28	15,396	A
10	9,772	A
6	8,050	A

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

Tabela 6 - Teste de Tukey para a quantidade média de osteoblastos positivos para a osteocalcina, localizados na região epifisária proximal do fêmur, em todos os períodos de observação, de acordo com os diferentes tipos de tratamento

Tipos de tratamentos	Quantidade	
	média de	Grupos homogêneos
	osteoblastos	
OVZ-Calcareia Phosphorica	17,655	A
SHAM	14,643	AB
OVZ-Placebo	12,017	AB
OVZ-Alendronato	7,377	B

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

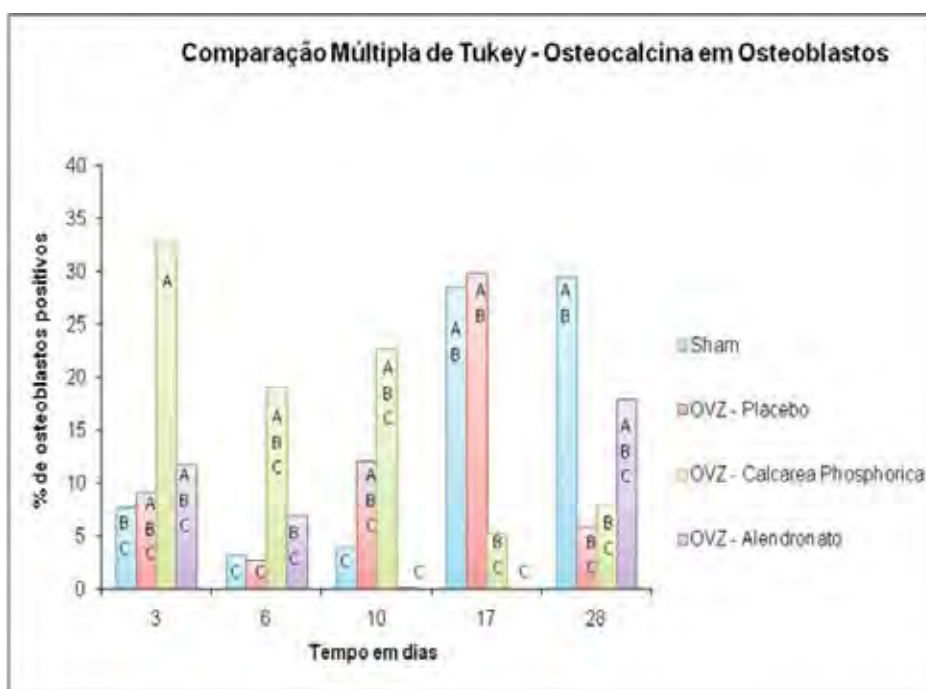


Figura 11 - Resultados do teste de Comparação Múltipla de Tukey para a quantidade média de osteoblastos positivos para a osteocalcina, localizados na região epifisária proximal do fêmur, de acordo com os diferentes tipos de tratamento e diferentes períodos de observação. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

A análise de osteócitos presentes nas trabéculas ósseas localizadas na epífise proximal do fêmur mostrou que a grande maioria foi negativa para osteocalcina. A quantidade média de osteócitos (positivos + negativos) variou entre os diferentes tratamentos e diminuiu de 3 dias para 28 dias (Tabelas 7 e 8, Figura 12). A comparação por ANOVA dois fatores (tempo de tratamento e tipo de tratamento) para osteócitos entre os grupos revelou como efeitos significativos ambos os fatores analisados ($p=0,001$ e $p=0,001$ respectivamente) (Tabelas 8 e 9 e Figura 13). Segundo os testes de Tukey, não se levando em consideração o tempo de tratamento, verificou-se que o grupo OVZ tratado com alendronato apresentou mais osteócitos que o tratado com *Calcareia phosphorica* (Tabela 9 e Figura 13).

Tabela 7 - Estatística descritiva da quantidade média de osteócitos localizados nas trabéculas ósseas na região epifisária proximal do fêmur, de acordo com o tipo de tratamento nos diferentes tempos de observação

Tratamentos / quantidade média de osteócitos		Tempo de observação (dias)				
		3	6	10	17	28
SHAM-placebo	Média	106,33	85,83	116,0	82,00	74,33
	DP	16,72	17,05	35,0	12,23	11,59
OVZ- Placebo	Média	100,5	81,50	76,0	87,17	72,67
	DP	41,1	19,75	33,8	11,63	12,61
OVZ-Calcareia phosphorica	Média	82,67	53,17	64,83	59,17	61,17
	DP	22,46	23,69	13,20	13,93	6,52
OVZ- Alendronato	Média	98,3	73,17	107,83	94,3	74,3
	DP	32,8	21,00	20,15	25,3	27,3

*DP = Desvio Padrão

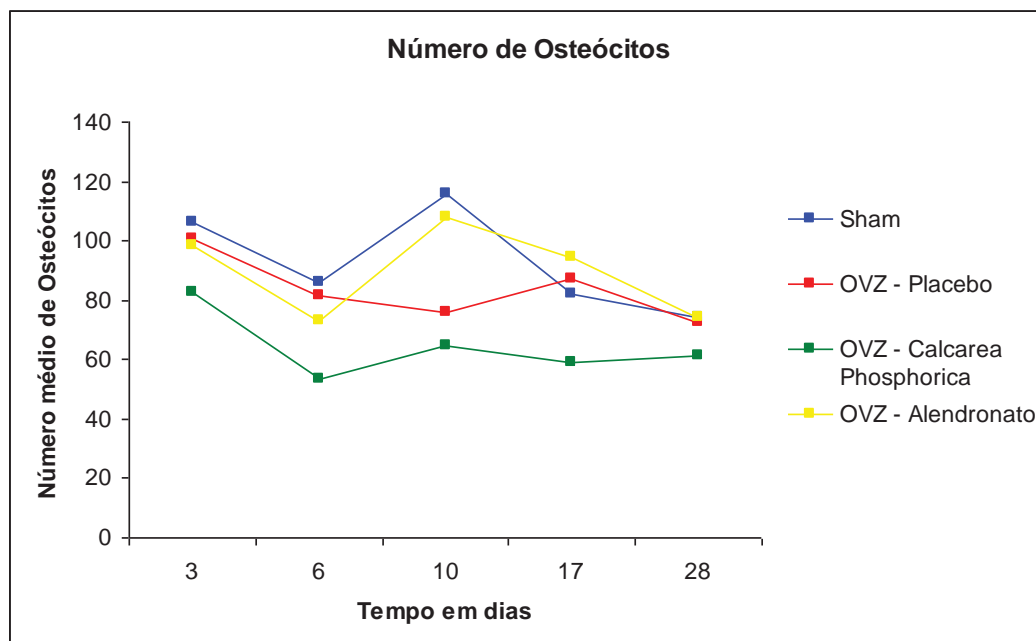


Figura 12 – Valores da quantidade média de osteócitos localizados nas trabéculas ósseas na região epifisária proximal do fêmur em cada grupo, de acordo com os diferentes tipos de tratamento nos diferentes períodos de observação experimental

Tabela 8 – Teste de Tukey para a quantidade média de osteócitos localizados nas trabéculas ósseas na região epifisária proximal do fêmur, em todos os grupos, de acordo com os diferentes tempos de observação

Tempo de observação (dias)	Quantidade média de osteócitos	Grupos Homogêneos
3	96,958	A
10	91,167	AB
17	80,667	ABC
6	73,417	BC
28	70,625	C

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

Tabela 9 - Teste de Tukey para a quantidade média de osteócitos localizados nas trabéculas ósseas na região epifisária proximal do fêmur, em todos os tempos de observação, de acordo com os diferentes tratamentos

Tipos de tratamentos	Quantidade	
	média de osteócitos	Grupos homogêneos
SHAM-placebo	92,900	A
OVZ–Alendronato	89,600	A
OVZ–Placebo	83,567	A
OVZ–Calcarea phosphorica	64,200	B

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

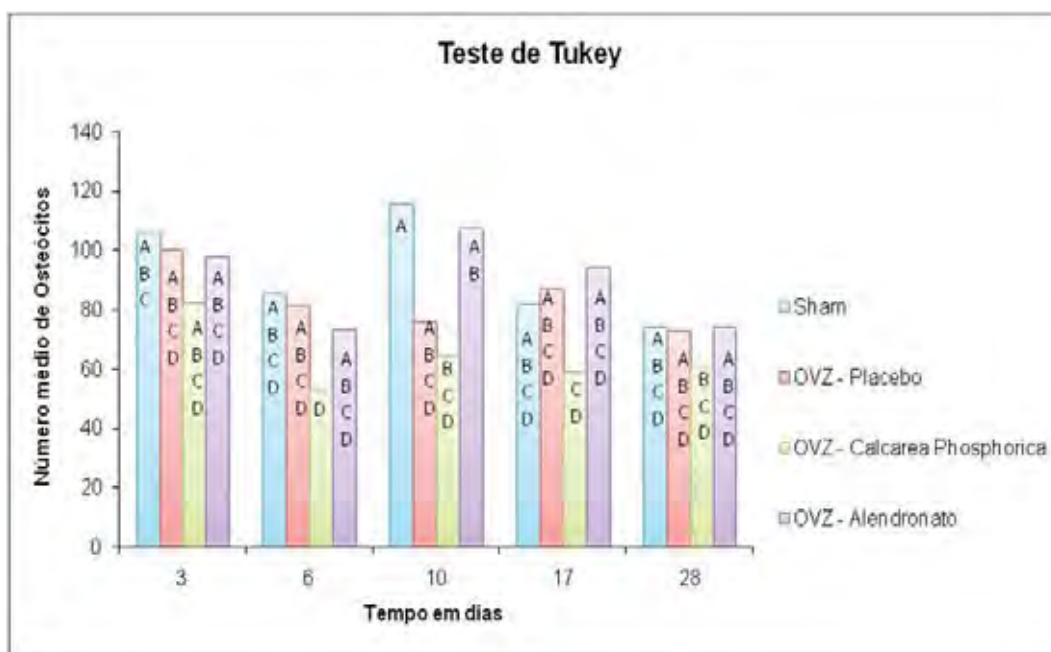


Figura 13 - Resultados do teste de Comparação Múltipla de Tukey. para a quantidade média de osteócitos localizados nas trabéculas ósseas na região epifisária proximal do fêmur, de acordo com todos os diferentes tempos de observação e diferentes tipos de tratamento.

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

Vários megacariócitos localizados entre as trabéculas ósseas na região epifisária proximal do fêmur mostraram marcação positiva para osteocalcina e foram contados para análise (Tabela 10, Figura 14). A comparação por ANOVA dois fatores (tempo de tratamento e tipo de tratamento) para megacariócitos positivos para osteocalcina distribuídos entre os grupos revelou como efeito significativo o tipo de tratamento, insignificativo o tempo de tratamento e significativa a interação entre ambos ($p=0,001$, $p=0,318$ e $p=0,015$, respectivamente). O teste Tukey de comparação múltipla dos grupos, realizado para complementação confirmou esses resultados (Figura 15).

Tabela 10 - Estatística descritiva da quantidade média de megacariócitos localizados entre as trabéculas ósseas na região epifisária proximal do fêmur, de acordo com os diferentes tipos de tratamento, nos diferentes tempos de observação

Tratamento / quantidade de megacariócitos		Tempo de observação (dias)				
		3	6	10	17	28
SHAM	Média	4,833	2,500	4,00	7,17	6,50
	*DP	0,983	1,761	2,45	3,60	4,23
OVZ Placebo	Média	1,667	2,33	5,00	4,33	1,000
	*DP	1,751	2,88	5,25	2,94	1,549
OVZ - Calcareo Phosphorica	Média	8,00	7,17	5,17	5,83	4,00
	*DP	5,40	2,71	4,49	3,06	2,76
OVZ Alendronato	Média	6,33	3,17	0,500	2,500	4,167
	*DP	4,89	3,43	0,837	2,074	1,472

*DP = Desvio Padrão

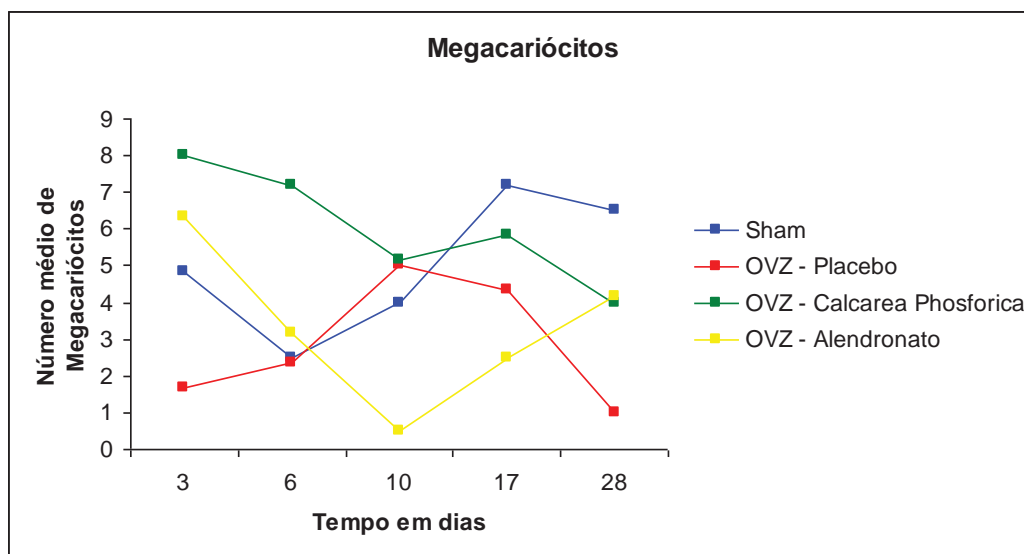


Figura 14 – Valores da quantidade média de megacariócitos localizados entre as trabéculas ósseas na região epifisária proximal do fêmur, em todos os grupos, de acordo com os diferentes tipos de tratamento, nos diferentes tempos de observação.

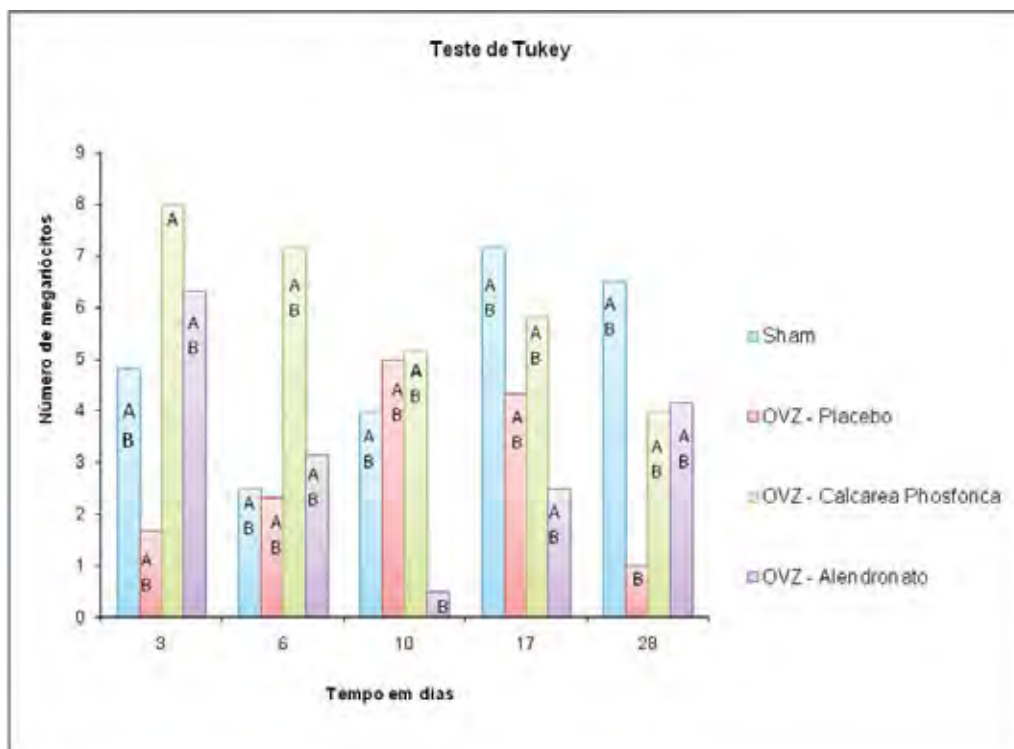


Figura 15 - Resultados do teste de Comparação Múltipla de Tukey para a quantidade média de megacariócitos localizados entre as trabéculas ósseas na região epifisária proximal do fêmur, de acordo com os diferentes tipos de tratamento, nos diferentes tempos de observação. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente.

As fotomicrografias imunohistoquímicas possibilitam a visualização desses resultados. Nos períodos iniciais do experimento o grupo OVZ-*Calcareia phosphorica* foi o que apresentou maior quantidade de marcação pela osteocalcina em osteoblastos e em megacariócitos e o grupo OVZ-placebo o que mostrou menor marcação nessas células. O grupo OVZ-alendronato manteve baixa quantidade ou ausência de expressão de osteocalcina em osteoblastos até 17 dias e somente aos 28 dias apresentou marcação de osteocalcina em osteoblastos em quantidade maior que o grupo tratado com *Calcareia phosphorica*. A quantidade de osteócitos não variou muito entre os grupos (Figuras 16 – 20).

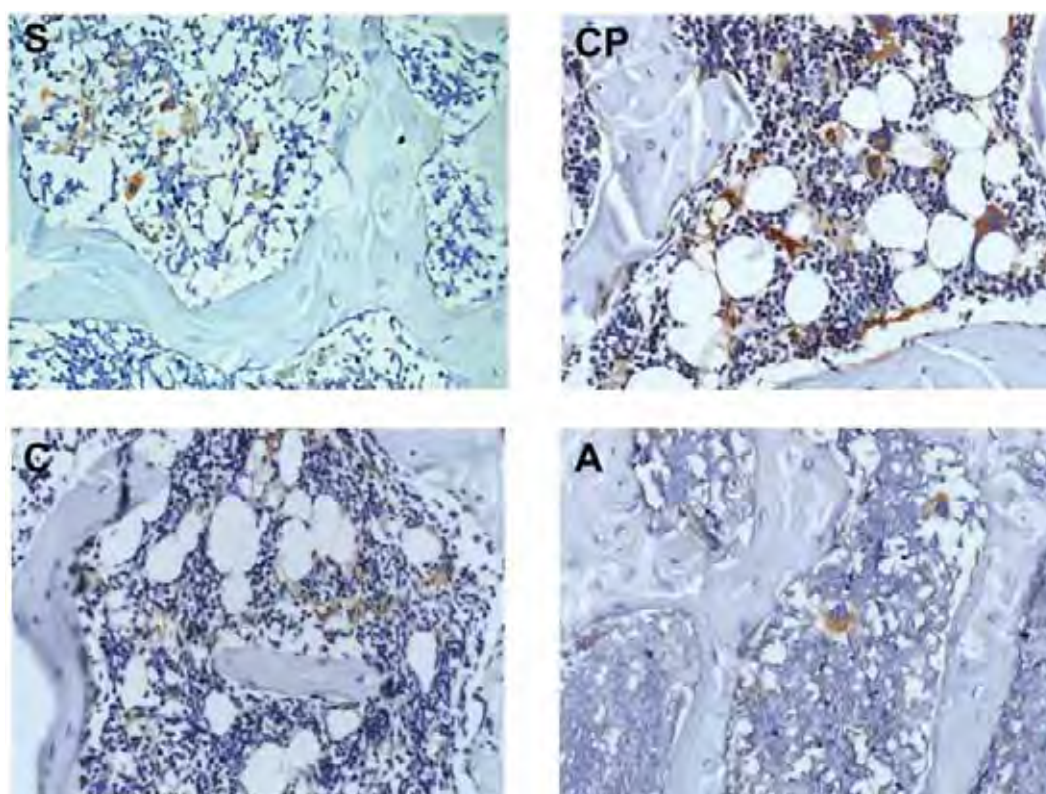


Figura 16-Aspecto microscópico da marcação imunohistoquímica para osteocalcina na região epifisária proximal do fêmur aos 3 dias de tratamento. S (sham-placebo); CP (OVZ-*Calcareia phosphorica*); C (OVZ-placebo); A (OVZ-alendronato). Osteoblastos positivos foram bem evidentes em CP e pouco marcados nos outros grupos; megacariócitos foram mais marcados em CP e menos marcados em C e a quantidade de osteócitos foi semelhante entre os grupos. Aumento original 400X.

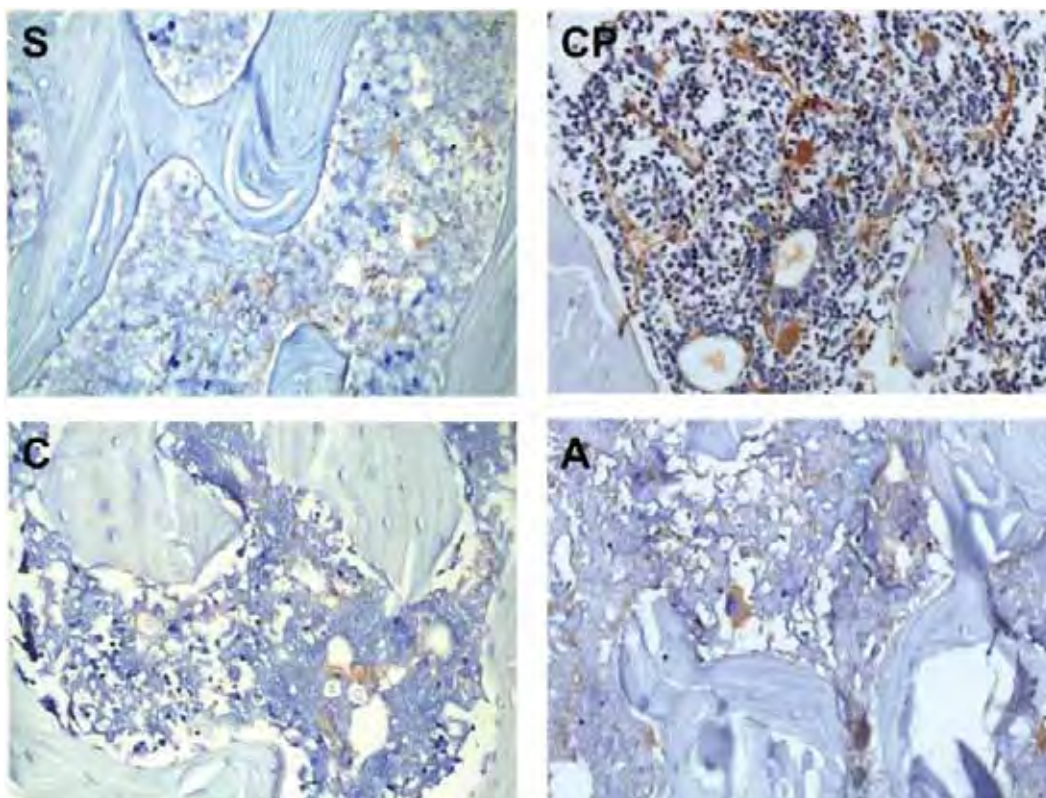


Figura 17- Aspecto microscópico da marcação imunohistoquímica para osteocalcina na região epifisária proximal do fêmur aos 6 dias de tratamento. S (sham-placebo); CP (OVZ-*Calcareo phosphorica*); C (OVZ-placebo); A (OVZ-alendronato). Osteoblastos positivos foram bem evidentes em CP e muito pouco marcados nos outros grupos; megacariócitos foram mais marcados em CP e menos marcados em C e a quantidade de osteócitos foi semelhante entre os grupos. Aumento original 400X.

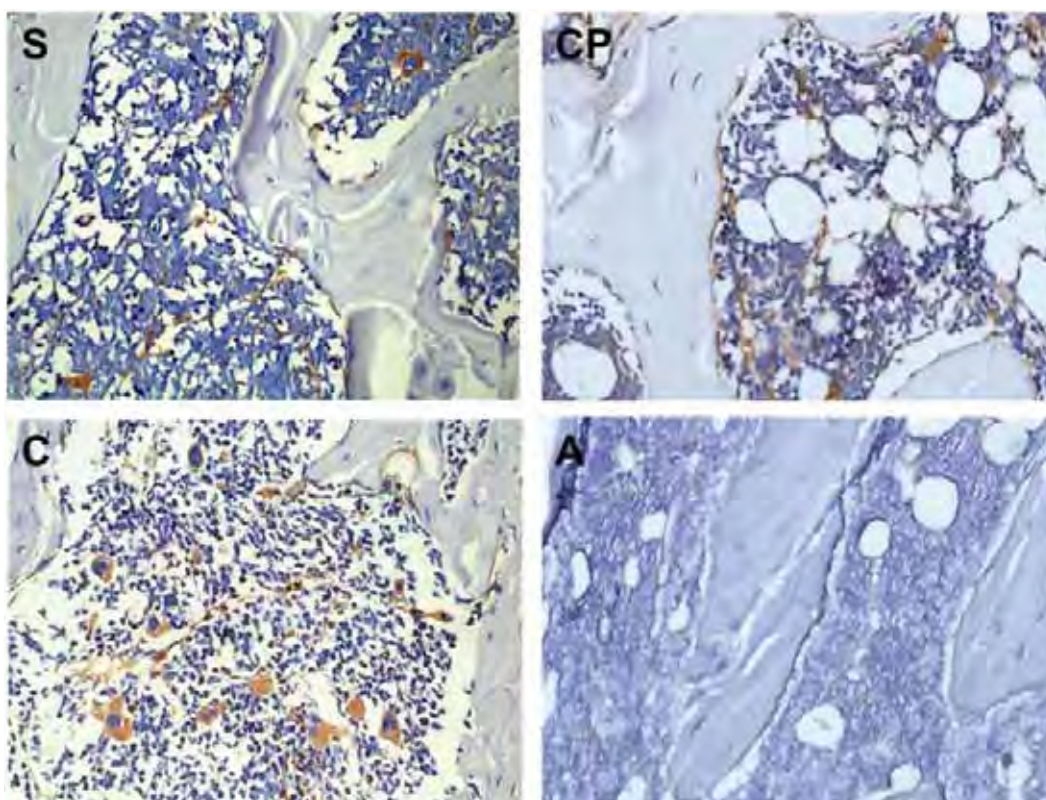


Figura 18- Aspecto microscópico da marcação imunohistoquímica para osteocalcina na região epifisária proximal do fêmur aos 10 dias de tratamento. S (sham-placebo); CP (OVZ-*Calcareo phosphorica*); C (OVZ-placebo); A (OVZ-alendronato). Osteoblastos positivos foram mais marcados em CP, pouco marcados em C e muito pouco marcados em A e S; megacariócitos foram muito pouco marcados em A e pouco marcados nos demais grupos sem diferença entre si; a quantidade de osteócitos foi semelhante entre os grupos CP e C e A e S, sendo maior nos 2 últimos grupos. Aumento original 400X.

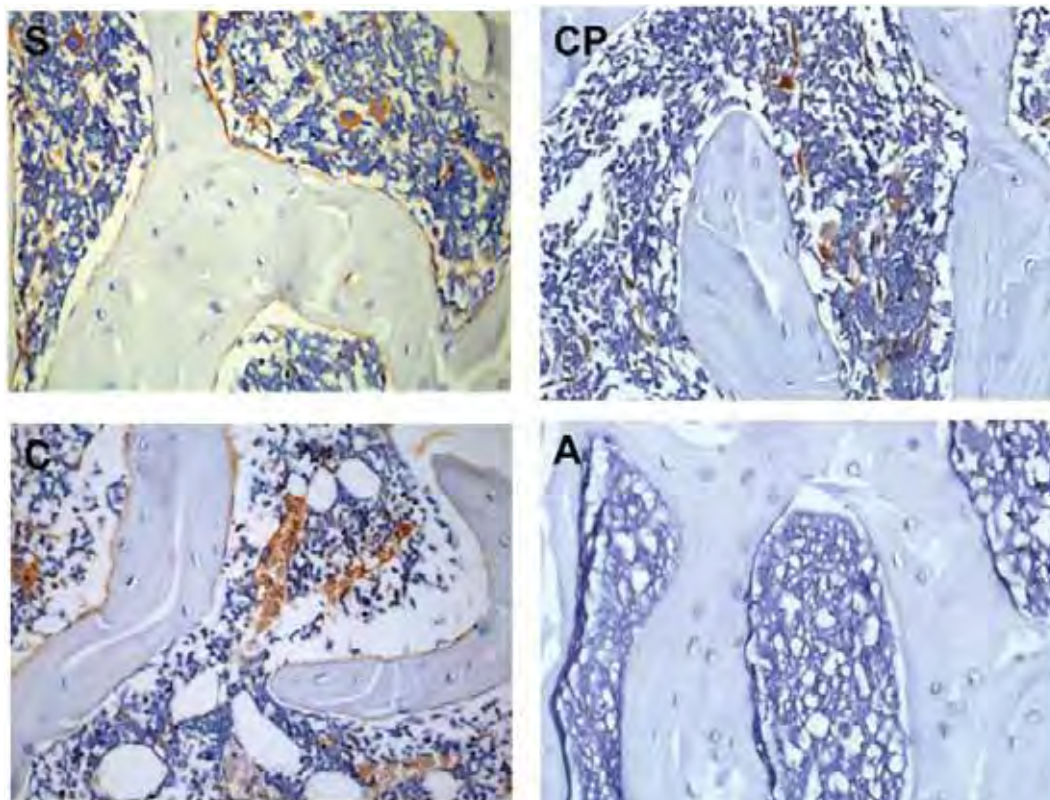


Figura 19- Aspecto microscópico da marcação imunohistoquímica para osteocalcina na região epifisária proximal do fêmur aos 17 dias de tratamento. S(sham-placebo); CP (OVZ-*Calcareo phosphorica*); C (OVZ-placebo); A (OVZ-alendronato). A expressão de osteoblastos positivos aumenta para C e S e diminui para CP e A em relação aos dias anteriores, invertendo o aspecto do 3^o. dia; a marcação de megacariócitos é maior para S e menor para A; a quantidade de osteócitos não varia muito entre os grupos. Aumento original 400X.

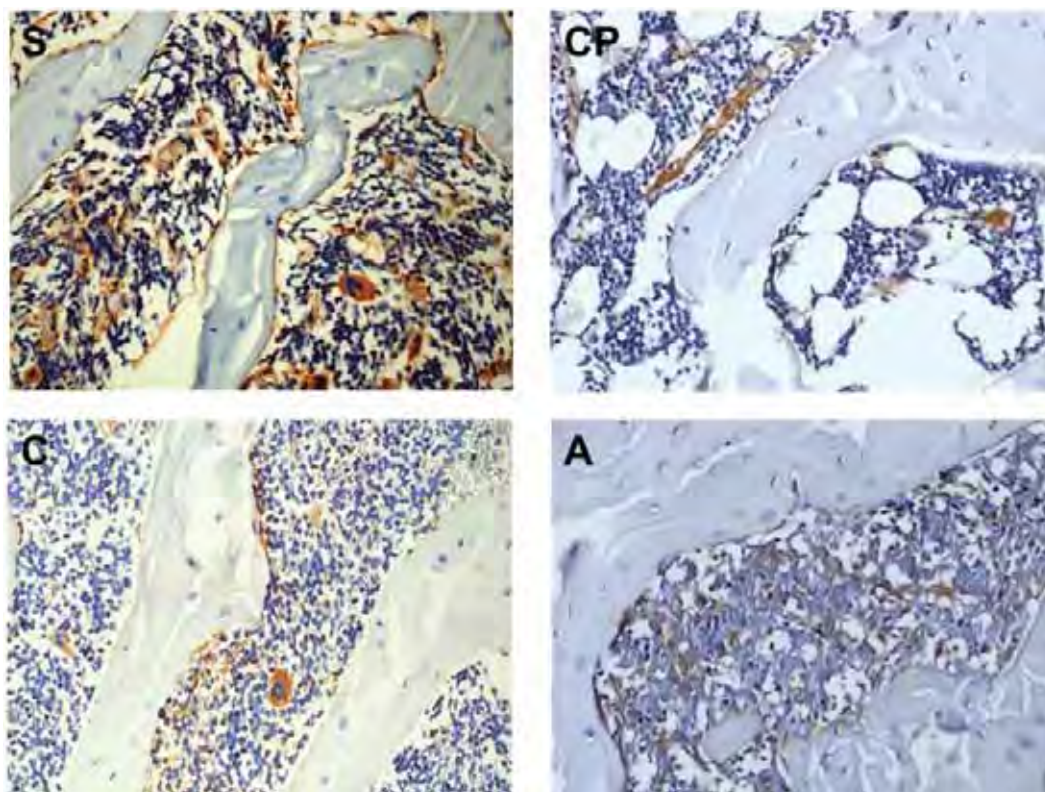


Figura 20- Aspecto microscópico da marcação imunohistoquímica para osteocalcina na região epifisária proximal do fêmur aos 28 dias de tratamento. S(sham-placebo); CP (OVZ-*Calcareo phosphorica*); C(OVZ-placebo); A (OVZ-alendronato) O grupo S manteve a quantidade de osteoblastos positivos dos 17 dias e o maior valor nesse período, enquanto os grupos CP e C apresentaram a menor quantidade de osteoblastos positivos e A ficou com valores intermediários; a quantidade de megacariócitos foi semelhante entre CP e A e muito baixa para C; a quantidade de osteócitos não exibiu variações entre os grupos. Aumento original 400X.

6 DISCUSSÃO

O aumento da população de idosos e conseqüentemente da incidência de doenças crônicas e degenerativas como a osteoporose é uma realidade mundial. A osteoporose é caracterizada pela deterioração progressiva dos ossos devido à remodelação óssea desequilibrada com predomínio de fenômenos reabsortivos levando a maior fragilidade óssea. Esta doença constitui um problema de saúde pública de grande impacto social e econômico (Mesquita et al., 2009; Bandeira et al., 2000; Szejnfeld, 2000).

Numerosas pesquisas são desenvolvidas nesta área, pois a perda de massa óssea, principalmente de osso trabecular, é grande e traz sérias conseqüências aos idosos, como um maior risco da ocorrência de fraturas, principalmente nas vértebras lombares e no colo do fêmur (Bandeira et al., 2000; Szejnfeld, 2000). As fraturas osteoporóticas vertebrais são responsáveis por dor de difícil tratamento e pelo comprometimento estético causando envergadura nas costas. As fraturas que atingem a região proximal do fêmur merecem atenção pelo número elevado de sequelas, levando à incapacidade de autonomia e até à morte. Todas essas conseqüências levam à necessidade de mais atendimento médico, ao consumo de muitos medicamentos e à perda da qualidade de vida (Mesquita et al., 2009; Gameiro, Schott, 2006). Por isso justifica-se a necessidade de pesquisas na busca de medicamentos que possam contribuir na modificação desse quadro.

A osteoporose é mais frequente em mulheres pós-menopausa e em idosos de ambos os sexos. Na idade avançada, os principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença e de suas complicações são deficiência de estrógeno, deficiência na absorção de

cálcio e vitamina D, o uso de alguns medicamentos (quimioterápicos antineoplásicos e imunossupressores), depressão, pouca atividade física e predisposição a quedas facilitando fraturas (Morais, Burgos, 2007; Gomes, Guimarães, 2006; Ocarino, Serakides, 2006; Jovine et al., 2006; Bandeira et al., 2000).

Na literatura científica a rata ovariectomizada é um modelo bastante utilizado por muitos pesquisadores para o estudo da osteoporose pelo fato das perdas ósseas nestes animais serem semelhantes às ocorridas em mulheres pós-menopausa (Frost, Jee, 1992; Wronski, Yen, 1991). Porém outros autores utilizaram modelos como primatas (Carlson et al., 1993) e camundongos (Ono et al., 2008; Shimizu-Ishiura et al., 2002; Yao et al., 2006).

Os efeitos da ovariectomia no metabolismo ósseo de ratas já podem ser observados após 60 dias da cirurgia, tempo escolhido para este estudo. Segundo Cardoso et al. (2006), ocorre redução significativa na concentração sérica de estrógeno, diminuição no conteúdo de cálcio nos ossos e aumento da atividade da fosfatase alcalina indicando processo de perda óssea. As propriedades biomecânicas do fêmur demonstraram mais fragilidade e a microscopia eletrônica de varredura das tíbias apresentaram várias lacunas de reabsorção profundas.

A DMO do fêmur de ratas avaliada seis e oito semanas após a ovariectomia, através do DEXA, foi significativamente menor nestes animais com deficiência estrogênica que no grupo que não sofreu a retirada dos ovários (Park et al., 2010).

Um estudo histomorfométrico no colo do fêmur em ratas ovariectomizadas mostrou diminuição significativa no número de trabéculas ósseas com maior separação entre elas, sendo essas alterações dependentes do tempo de sacrifício, principalmente após 60 dias. Diminuição significativa da espessura das trabéculas e da cortical

óssea foi observada, principalmente após 180 e 360 dias, respectivamente (Shen, Wronski, 1997).

No presente estudo foram utilizadas ratas da linhagem Wistar submetidas à ovariectomia bilateral. Aguardou-se 60 dias para o início dos tratamentos que duraram de 3 a 28 dias. A redução nos níveis de estrógeno foi comprovada pela atrofia dos cornos uterinos no momento do sacrifício dos animais. Corroborando com os nossos estudos, outros autores esperaram o mesmo período para que os animais desenvolvessem as alterações esperadas como a diminuição da conectividade intertrabecular e afinamento trabecular pela falta do estrógeno (Cardoso et al., 2006; Yao et al., 2006; Shen, Wronski, 1997; Bagi et al., 1997; Park et al., 2010; Simic et al., 2006; Asawa et al., 2004). Alguns autores utilizaram tempos diferentes como Nakamura et al. (2008) que usaram 12 semanas, Saleh e Sahle (2011) que usaram 4 semanas, Bitto et al. (2008) que usaram seis meses, Wang et al. (2008) e Potu et al. (2009; 2010) que usaram uma semana. Já outros autores como Tsuang et al. (2008), Tezval et al. (2010), Huang et al. (2008), Ono et al. (2008) e Ho et al. (2009) não esperaram tempo algum e logo após a cirurgia começaram o tratamento com enfoque preventivo.

A região proximal do fêmur e o colo femoral foram escolhidos para verificar o efeito dos medicamentos porque representam áreas críticas para análise de comprometimento pela osteoporose. A deficiência estrogênica desenvolve alterações ósseas trabeculares e corticais nessas áreas tanto em humanos quanto em ratos (Bandeira et al., 2000; Szejnfeld, 2000; Shen, Wronski, 1997; Mesquita et al., 2009). Tais alterações podem ser avaliadas por diversas metodologias, entre elas por análise microscópica e histomorfométrica do volume ósseo e por análise imunohistoquímica para osteocalcina que é um marcador de atividade formadora de osso, análises estas adotadas no presente estudo.

O estrogênio possui ação anti-reabsortiva; este se liga aos osteoblastos através de receptores, o que dificulta a reabsorção

óssea e favorece a formação óssea. Dentre as alterações hormonais relacionadas ao processo de remodelação óssea destaca-se o declínio de estrógenos que ocorre na menopausa e pós-menopausa, que leva a um desequilíbrio na remodelação óssea com perda da massa óssea e ao desenvolvimento da osteoporose, pois a taxa de reabsorção supera a taxa de aposição óssea. (McCormick, 2007)

Com a deficiência estrogênica há um aumento na produção de certas citocinas envolvidas na reabsorção óssea como a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) o fator de necrose tumoral (TNF) que estimulam os osteoclastos à reabsorção. Na presença do estrógeno, algumas citocinas e fatores de crescimento produzidos por osteoclastos e osteoblastos como IGF I e II, TGF β e PDGF possuem ação autócrina e parácrina (Raisz, 1999; McCormick, 2007).

Existem várias formas de tratamento para a osteoporose e suas complicações tanto com enfoque curativo quanto preventivo. São indicados tratamentos alopáticos, reposição hormonal, fitoterápicos, dieta com quantidade adequada de cálcio e vitamina D, osteopatia, acupuntura, medicina chinesa, exercícios físicos específicos, e outros. A terapia alopática com bifosfonatos, entre eles o alendronato, é uma das mais utilizadas mundialmente, porém pode ocasionar alguns efeitos colaterais principalmente em tratamentos de longa duração (McClung, 2006).

Por ser bastante usado clinicamente no tratamento da osteoporose e por ser frequentemente usado como parâmetro de comparação com diversos tratamentos experimentais, o alendronato foi escolhido neste estudo para avaliação comparativa com o medicamento homeopático *Calcarea phosphorica* o qual pode ser indicado no tratamento da osteoporose.

Na homeopatia há vários medicamentos que tem aplicação no tratamento da osteoporose. No entanto, a literatura científica atual não explora muito essa área e existe pouca divulgação sobre o efeito de medicamentos homeopáticos nesse assunto.

Ceticismo, descrédito, pouco conhecimento sobre os fundamentos da homeopatia, tabus, misticismo e outros fatores estão entre os motivos que justificam a pouca divulgação. A homeopatia propõe uma forma de tratamento diferente da alopatia, pelo estímulo reativo do próprio organismo. A ação dos medicamentos homeopáticos nem sempre é bem compreendida pela população que está acostumada aos tratamentos alopáticos antagonistas aos sintomas da doença (Lansky, 2009).

Os resultados de nosso estudo permitem algumas reflexões, pois foi possível verificar que o medicamento homeopático *Calcareo phosphorica* 6 CH interferiu na remodelação óssea do fêmur das ratas ovariectomizadas e apresentou efeitos diferentes em comparação ao alendronato, tanto na análise histomorfométrica do volume ósseo no colo do fêmur quanto na análise imunohistoquímica para a osteocalcina.

De acordo com as figuras 3 e 4, o grupo OVZ-placebo que foi o controle de deficiência estrogênica sem tratamento apresentou o menor volume ósseo no colo do fêmur durante todo o experimento confirmando que o modelo experimental escolhido foi adequado para produzir alterações ósseas como esperado na menopausa. Os grupos OVZ tratados exibiram volume ósseo igual, menor ou maior que o grupo sham-placebo, que foi o controle sem ovariectomia e sem tratamento, na dependência da resposta aos tratamentos.

No período de 3 dias não havia diferença no volume ósseo no colo do fêmur entre os grupos sham, OVZ-*Calcareo phosphorica* e OVZ-alendronato, mas os três grupos mostravam valor numérico de volume ósseo maior que o OVZ-placebo embora essa diferença fosse muito pequena e não significativa na avaliação estatística.

Aos seis dias foi possível observar que a ovariectomia reduziu a capacidade de formação de osso, pois, o volume ósseo no grupo sham aumentou bastante enquanto nos 3 grupos OVZ o aumento em relação ao terceiro dia foi muito pequeno e sem valor estatístico,

independente do tipo de tratamento. A diferença do grupo sham para os 3 grupos ovariectomizados foi significativamente maior. Os grupos OVZ tratados com *Calcareia phosphorica* e alendronato não mostraram diferença entre si, mas mostraram valor numérico discretamente maior de volume ósseo que o OVZ-placebo, sem diferença estatística.

Apesar de até o 6º dia os valores de volume ósseo nos grupos OVZ tratados terem mostrado diferença não significativa em relação ao grupo OVZ-placebo e no aumento do 3º para o 6º dia, levando em consideração os resultados dos dias seguintes pode se conjecturar que talvez os tratamentos já estivessem atuando.

Aos 10 dias ocorreu um pico de aumento no volume ósseo em todos os grupos. O teste de Tukey (Tabela 2) que considera apenas o tempo de tratamento mostrou que nesse período foi alcançado o maior volume ósseo do experimento. Considerando os dois tratamentos verificou-se que ambos foram eficazes uma vez que o volume ósseo formado foi maior que no grupo OVZ-placebo. Mesmo com deficiência estrogênica as ratas responderam aos tratamentos aumentando o volume ósseo e se aproximando do comportamento do grupo sham-placebo. A *Calcareia phosphorica* foi mais eficiente que o alendronato nesse período de observação (Figuras 3 e 4). Um dos motivos para esse comportamento pode ser seu mecanismo de ação como discutiremos adiante com os dados da osteocalcina.

Como mencionado na metodologia deste estudo, todos os animais foram submetidos à perfuração de defeitos ósseos na tíbia no primeiro dia de tratamento para avaliação simultânea do efeito destes mesmos tratamentos na reparação óssea. O processo inflamatório que ocorreu nos dias que se seguiram à lesão óssea provavelmente serviu de estímulo indireto às modificações observadas na remodelação óssea do fêmur, estimulando um aumento da formação de osso trabecular que repercutiu no aumento de volume ósseo em todos os grupos, inclusive no Sham-placebo.

Aos 17 dias houve uma desaceleração no ganho de volume ósseo em todos os grupos exceto no tratado com alendronato. O grupo OVZ-placebo voltou aos valores dos seis dias confirmando que a ovariectomia influenciou na capacidade de formar osso aumentando o *turnover* ósseo no colo do fêmur. O grupo sham-placebo que é nosso controle normal embora tenha mostrado diferença estatística na perda de volume ósseo de 10 para 17 dias, continuou com volume ósseo significativamente maior que o OVZ-placebo. O grupo OVZ-*Calcareia phosphorica* se equiparou ao grupo sham-placebo comprovando que o tratamento foi eficaz pois apesar da deficiência estrogênica mostrou volume ósseo igual ao grupo normal (Sham-placebo). O grupo que recebeu o alendronato mostrou um pequeno aumento numérico dos 10 dias para os 17 dias, mas sem diferença estatística. A partir desse período de observação começa a se evidenciar que o mecanismo de ação da *Calcareia phosphorica* é diferente do alendronato.

O estímulo decorrente do processo inflamatório deste período em diante deve deixar de existir, pois as lesões ósseas produzidas na tíbia aos 21 dias entraram nas fases finais da reparação óssea apresentando diminuição intensa ou ausência da inflamação e sendo observado o desenvolvimento das fases finais de maturação e remodelação óssea (Farina, 2010).

Aos 28 dias, o volume ósseo encontrado no grupo ovariectomizado que recebeu o alendronato continuou aumentando e foi o maior de todos, com diferença estatisticamente significativa de todos os outros grupos. Outros autores também verificaram que os animais que foram medicados com alendronato tiveram aumento significativo no volume ósseo (Da Paz et al., 2001; Pytlik et al., 2004; Sliwinski et al., 2004; Iwamoto et al., 2006; Tsuang et al., Nakamura et al., 2008, Wang et al., 2008; Bitto et al., 2008; Xiong et al., 2007; Ho et al., 2009; Machado et al., 2006 ; Farina, 2010). A resposta ao alendronato foi mais tardia, mas foi eficaz e nesse período superou o resultado do medicamento

homeopático. Os animais que receberam a *Calcarea phosphorica* mostraram volume ósseo menor que os que receberam alendronato e discretamente maior que os animais do grupo sham, mostrando que o efeito da medicação homeopática foi suficiente para manter o volume ósseo alcançado. O grupo OVZ-placebo perdeu todo o volume ósseo ganho ao longo do experimento.

A partir da análise histomorfométrica do volume ósseo do colo do fêmur, segundo o teste de Tukey que considera apenas a variável tipo de tratamento (Tabela 3), pode se afirmar que os tratamentos com *Calcarea phosphorica* e alendronato controlaram o *turnover* ósseo. Os animais tratados com alendronato aumentaram o volume de osso trabecular mais tardiamente e os tratados com *Calcarea phosphorica* mais precocemente, mas todos os tratamentos fizeram diferença.

O grupo tratado com alendronato mostrou um aumento progressivo de volume ósseo até o final do experimento (Figuras 3 e 4 e Tabelas 1 e 2) enquanto o tratado com *Calcarea phosphorica* formou bastante osso, mas apresentou reabsorção parcial do mesmo.

Nos estudos de Werkman et al. (2006) em ratos castrados, os autores puderam observar que a *Calcarea phosphorica* estimulou a neoformação óssea nos períodos iniciais do reparo ósseo e sofreu remodelação posterior. O mesmo foi visto por Farina (2010) em ratas ovariectomizadas.

Pode-se dizer que essas diferenças estão ligadas aos mecanismos de ação dos dois medicamentos escolhidos. O alendronato atua inibindo a ação de osteoclastos e diminuindo a reabsorção óssea (Castro et al., 2004; Mc Clung, 2006; Cruz et al., 2011). O mecanismo de ação da *Calcarea phosphorica* homeopática ainda não é conhecido, mas como veremos a partir dos resultados da análise da osteocalcina sua ação se reflete na proliferação e atividade de osteoblastos.

O teste de Tukey considerando o volume ósseo apenas nos períodos de observação e não segundo os tipos de tratamento

mostrou que no décimo dia houve um pico de aumento de volume ósseo, estatisticamente significativo, independente do tipo de tratamento. No período de seis e três dias, ocorreu o menor volume ósseo o que pode demonstrar que foi necessário um período de tempo para a ação dos tratamentos estudados repercutirem na formação óssea, independente de seu mecanismo de ação.

A microscopia descritiva contribuiu para avaliar os efeitos dos tratamentos, mas a complementação com análise de dados mensuráveis forneceu dados numéricos que permitiram análise estatística e definiram os resultados de modo mais concreto. A análise imunohistoquímica foi de grande valia e a escolha da expressão de osteocalcina permitiu avaliar o mecanismo de ação da *Calcareo phosphorica*.

A osteocalcina é uma proteína não colágena do osso secretada por osteoblastos, que se deposita na matriz óssea recém-formada. Ela interage com a hidroxiapatita que é o mineral que confere resistência ao osso. A quantificação desta proteína é bastante usada para monitorar os níveis de formação óssea, refletindo no *turnover* ósseo (Prince et al., 1983; Bronckers et al., 1987; Parisi, 2002; Scarfati, 2004).

Ossos com osteoporose apresentam conteúdo reduzido de osteocalcina devido à baixa atividade osteoblástica (Grynpas et al., 1994; Lee et al., 2000).

Durante o processo de reparo ósseo alveolar em ratas ovariectomizadas, a osteocalcina estava fortemente marcada em animais tratados com raloxifeno e estradiol. A imunomarcacão foi observada nos osteoblastos, osteócitos, células da linhagem osteoblástica e trabéculas ósseas e serviu para comprovar que os tratamentos usados estimularam a formação óssea (Luvizuto et al., 2010).

Segundo Tera (2010), durante a reparação de lesões ósseas em mandíbulas de ratas ovariectomizadas a expressão imunohistoquímica de osteocalcina foi observada. Houve marcação de

osteoblastos, osteócitos, trabéculas ósseas e megacariócitos no osso neoformado em todos os períodos de observação, de 7 a 60 dias, indicando atividade de formação óssea.

Avaliação de efeitos da movimentação ortodôntica durante um a oito semanas também demonstrou imunomarcação para osteocalcina em células do ligamento periodontal, osteoblastos e cementoblastos nas regiões de tensão óssea. Nas regiões de compressão, a osteocalcina ficou evidente na matriz extracelular do ligamento periodontal e foi significativamente maior do que nas regiões de tensão, porém mostrou um pico de intensidade na quarta semana e um declínio drástico na oitava semana. A marcação celular nas regiões de tensão indicou estímulo à proliferação e atividade das células e nos osteoblastos indicou formação de osso novo (Han et al., 2008).

Nos estágios iniciais da osseointegração ao redor de implantes na mandíbula e na maxila de cães os primeiros sinais de formação óssea ocorreram aos sete dias. Na análise imunoistoquímica, a osteocalcina já se encontrava no tecido ósseo trabecular neoformado o que indica que este marcador pode ser usado em fases precoces do processo de formação óssea (Schwarz et al., 2007).

Em nosso estudo a quantidade média de osteoblastos positivos para osteocalcina presentes entre os grupos revelou como efeito significativo o fator tratamento analisado e a interação entre tratamento e tempo ($p=0,008$ e $p=0,001$, respectivamente). O fator tempo isoladamente não foi significativo ($p=0,054$).

Os testes de Tukey comparando somente o tempo ou somente o tipo de tratamento e o de comparação múltipla dos grupos, realizado para complementação da análise estatística, mostraram que o tempo de tratamento não interferiu nos resultados, mas que o tipo de tratamento sim. O tratamento com *Calcareo phosphorica* apresentou mais osteoblastos positivos para osteocalcina que o tratamento com alendronato (Tabelas 5 e 6 e Figura 11). Nas fases iniciais do estudo (3, 6

e 10 dias) o grupo OVZ-*Calcareia phosphorica* foi o que apresentou a maior quantidade de osteoblastos marcados para osteocalcina. Aos 17 dias ocorreu uma mudança drástica, a quantidade de osteoblastos positivos diminuiu intensamente no grupo *Calcareia phosphorica* e aumentou intensamente nos grupos sham-placebo e ovz-placebo. Aos 28 dias o grupo sham-placebo continuou com muitos osteoblastos positivos, OVZ-placebo mostrou intensa diminuição e o grupo OVZ-alendronato começou a apresentar aumento no número de osteoblastos positivos para osteocalcina.

Estes resultados indicam que o tratamento com *Calcareia phosphorica* estimulou a proliferação de osteoblastos e talvez sua atividade no início do tratamento, pois aos 3, 6 e 10 dias este foi o grupo com a maior expressão de osteocalcina em osteoblastos. No entanto, como aos 17 e 28 dias a quantidade de osteoblastos positivos diminuiu é possível que o estímulo do tratamento sobre os osteoblastos tenha sido temporário. Esta ação foi oposta à ação do alendronato tanto em relação à célula alvo quanto em relação ao tempo de ação do tratamento.

Grande quantidade de osteoblastos marcados nos períodos iniciais, também foi visto nos estudos de Aizawa et al (1998) no fêmur de coelhos, em Han et al. (2008) na movimentação ortodôntica em cães e em ratas ovariectomizadas nos achados de Luvizuto et al. (2010) e Tera (2010).

Os grupos sham-placebo e OVZ-placebo só mostraram aumento significativo da expressão de osteocalcina em osteoblastos aos 17 dias, sendo que aos 28 dias o primeiro grupo manteve a marcação e o segundo não. Como estes 2 grupos não receberam tratamento além de placebo é possível que o estímulo inflamatório devido ao reparo das lesões na tíbia tenham sido responsável pela resposta dos osteoblastos. O grupo sham que é nosso controle normal manteve a resposta e o grupo OVZ-placebo não conseguiu devido às alterações decorrentes da osteoporose pós-deficiência estrogênica.

Comparando com os dados da análise imunohistoquímica da osteocalcina que mostrou as variações de aumento e diminuição da quantidade de osteoblastos ativos com os dados da análise histomorfométrica do aumento de volume ósseo foi possível verificar que há relação entre esses dois parâmetros, pelo menos parcial.

Sem considerar o tempo de tratamento o grupo sham formou o maior volume ósseo, mas foi o segundo em aumento do número de osteoblastos e tanto o aumento de volume ósseo quanto o número de osteoblastos foi mantido de 17 para 28 dias.

Sem considerar a duração do tratamento o grupo OVZ-*Calcareia phosphorica* foi o que mostrou maior número de osteoblastos positivos e aos 10, 17 e 28 dias mostrou intenso aumento de volume ósseo se equiparando ao exibido pelo grupo sham. Apesar da osteoporose este tratamento gerou um grande estímulo à proliferação e ativação dos osteoblastos que resultou em resposta positiva no aumento de volume ósseo.

O tratamento com alendronato desenvolveu aumento progressivo de volume ósseo e aos 28 dias continuou apresentando aumento, mas foi o grupo com menor número de osteoblastos positivos para osteocalcina. Como já é conhecido o alendronato atua impedindo ou dificultando a ação dos osteoclastos e não estimulando osteoblastos. Mesmo assim foi possível observar que aos 28 dias houve um pequeno aumento na quantidade destas células.

O grupo OVZ-placebo reagiu discretamente ao estímulo (provavelmente inflamatório), mas não conseguiu manter o aumento de massa óssea nem o aumento da quantidade de osteoblastos ativos. As alterações osteoporóticas devem ter sido as responsáveis por esse fato. Os animais com deficiência estrogênica não perderam a capacidade de formar osso, mas a intensidade da resposta foi pequena, a quantidade de osso formado foi menor e não sustentada. Resultados semelhantes foram

observados em estudos sobre reparação óssea em ratas ovariectomizadas (Farina, 2010).

A análise dos osteócitos presentes nas trabéculas ósseas localizadas na epífise proximal do fêmur mostrou que a grande maioria dessas células foi negativa para osteocalcina. A quantidade média de osteócitos variou entre os diferentes tratamentos e diminuiu de três dias para 28 dias. A comparação por ANOVA dois fatores (tempo de tratamento e tipo de tratamento) para a quantidade de osteócitos foi significativa para ambos os fatores analisados ($p=0,001$ e $p=0,001$ respectivamente). Segundo os testes de Tukey, não se levando em consideração o tempo de tratamento, verificou-se que o grupo OVZ tratado com alendronato apresentou mais osteócitos que o tratado com *Calcareo phosphorica*, mostrando diferentes mecanismos de ação entre os dois medicamentos testados.

Vários megacariócitos localizados entre as trabéculas ósseas na região epifisária proximal do fêmur mostraram marcação positiva para osteocalcina. A comparação por ANOVA dois fatores (tempo de tratamento e tipo de tratamento) revelou como significativo o tipo de tratamento e a interação entre os fatores ($p=0,001$ e $p=0,015$, respectivamente) e como não significativo o tempo de tratamento ($p=0,318$). O teste Tukey de comparação múltipla dos grupos, realizado para complementação da análise estatística confirmou esses resultados.

Talvez os megacariócitos possam ser considerados como precursores de osteoblastos.

De acordo com os resultados observados é indiscutível que os animais responderam ao tratamento com a *Calcareo phosphorica* 6 CH. A resposta foi boa porque foi rápida, aumentou a quantidade de osteoblastos e sua atividade, desencadeou aumento de volume ósseo no colo do fêmur, equiparou a resposta a do grupo sham (controle sem ovariectomia) e manteve o volume ósseo formado.

No contexto geral os animais tratados com *Calcarea phosphorica* formaram menos osso que os animais tratados com alendronato, mas a diferença foi pequena. Foi possível verificar através da expressão de osteocalcina que a célula alvo para a *Calcarea phosphorica* foi o osteoblasto e não o osteoclasto. Esse dado é de fundamental importância porque em tratamentos de longa duração o medicamento homeopático não deverá interferir na renovação óssea enquanto o alendronato devido a sua ação em osteoclastos pode acarretar em acúmulo de osso velho sem renovação.

A terapia homeopática promete tratar o paciente dentro de princípios nos quais o próprio paciente através de sua energia vital encontra formas fisiológicas de se recuperar. O fato do grupo OVZ-*Calcarea phosphorica* ter se equiparado à resposta e comportamento do grupo sham-placebo pode ser uma prova disto.

Nossos resultados permitem validar a utilização da *Calcarea phosphorica* 6 CH como medicação para minimizar os efeitos causados na epífise femoral pela falta do estrogênio, como na osteoporose em mulheres pós-menopausadas. Porém, neste estudo, seu efeito ficou evidente nos períodos iniciais de tratamento. Mais estudos avaliando diferentes tempos de duração do tratamento e diferentes posologias devem ser testados.

7 CONCLUSÃO

A partir da análise histomorfométrica do volume ósseo do colo do fêmur e da análise imunohistoquímica para osteocalcina na região da epífise proximal do fêmur, nas condições adotadas nesse experimento foi possível concluir que:

1. A rata ovariectomizada é um modelo experimental adequado para o estudo da remodelação óssea na osteoporose;
2. O tratamento com *Calcareea phosphorica* é válido no controle do *turnover* ósseo e na recuperação do volume ósseo no fêmur na vigência de osteoporose por deficiência estrogênica;
3. A *Calcareea phosphorica* 6 CH influenciou a remodelação óssea e o controle do *turnover* ósseo no fêmur de ratas com deficiência estrogênica, aumentando o volume ósseo provavelmente por estímulo da diferenciação, proliferação e ativação de osteoblastos e não impediu a ação osteoclástica de reabsorção óssea;
4. O tempo de resposta ao tratamento com *Calcareea phosphorica* foi mais rápido que ao tratamento com alendronato;
5. O comportamento do grupo ovariectomizado tratado com *Calcareea phosphorica* 6 CH em relação ao aumento de volume ósseo no colo do fêmur foi semelhante ao do grupo Sham tratado com placebo;

6. O mecanismo de ação da *Calcareia phosphorica* 6 CH foi oposto ao do alendronato uma vez que estimulou o ganho ósseo na remodelação do fêmur por atividade osteoblástica formadora de osso e não por impedir a reabsorção óssea pelos osteoclastos;
7. O volume ósseo no colo do fêmur no tratamento com alendronato aumentou progressivamente e não apresentou reabsorção dentro dos períodos de observação propostos neste estudo;
8. O fato dos animais estarem em fase de reparação óssea, embora em outro osso, provavelmente influenciou na remodelação óssea no fêmur, estimulando a formação óssea, independente do tipo de tratamento;
9. Este estudo colaborou para elucidar o mecanismo de ação da *Calcareia phosphorica* na remodelação óssea.

8 REFERÊNCIAS *

Aizawa T, Roach HI, Kokubun, Tanaka Y. Changes in the expression of Fas, osteonectin and osteocalcin with age in the rabbit growth plate. J. Bone Joint Surg. 1998; 80 (5):880-7.

Almeida JD, Arisawa EAL, Lima AP, Rocha RF, Carvalho YR. Estudo do efeito do plumbum metallicum 30 ch na reparação óssea em mandíbula de ratos sem barreira mecânica. Cien Odontol Bras. 2006;9(1):69-76.

Amalcaburio R, Machado LCP, Honorato LA, Menezes NA. Homeopathic remedies in a semi-intensive alternative system of broiler production. Int J High Dilution Res. 2009;8(26):33-9.

Andrade PM, Marino M, Carillo R, Pinto LF. Abordagem multifatorial da constituição fosfórica. Braz Homeopat J. 2000;6(1):47-56.

Asawa Y, Amizuka N, Hara K, Kobayashi M, Aita M, Li M, et al. Histochemical evaluation for the biological effect of menatetrrnone on metaphyseal trabeculae of ovariectomized rats. Bone. 2004; 35: 870-80.

Azpeitia FIPP. Química *versus* homeopatia. An. Quim. 2006;102(3):50-4.

Bandeira F, Macedo G, Caldas G, Griz L, Faria M. Osteoporose: epidemiologia, genética e patogênese da Osteoporose. Rio de Janeiro: Medsi; 2000.

Bagi CM, Ammann P, Rizzoli R, Miller SC. Effect of estrogen deficiency on cancellous and cortical bone structure and strength of femoral neck in rats. Calcif Tissue Int. 1997;61(4):336-44.

Bear J, Bellucco W. Florais de Bach e Homeopatia: uso sinérgico de dois sistemas vibracionais de cura. São Paulo: Pensamento; 2006.

* 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 nov; citado em 28 nov.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bordet MF, Colas A, Marijnen P, Masson JL, Trichard M. Treating hot flushes in menopausal women with homeopathic treatment: Results of an observational study. *Homeopathy*. 2008;97(1):10-5.

Bitto A, Burnett BP, Polito F, Marini H, Levy RM, Armbruster MA et al. Effects of genistein aglycone in osteoporotic, ovariectomized rats: a comparison with alendronate, raloxifene and oestradiol. *Br J Pharmacol*. 2008;155(6):896-905.

Bronckers AL, Gay S, Finkelman RD, Butler Wt. Developmental appearance of Gla proteins (osteocalcin) and alkaline phosphatase in tooth germs and bones of rat. *Bone Miner*. 1987;2(5):361-73.

Bradaschia-Correa V, Massa LF, Arana-Chavez V. Effects of alendronate on tooth eruption and molar root formation in Young growing rats. *Cell Tissue Res*. 2007;330(3):475-85.

Cardoso C, Franco M, Cunha MSCA, Miyasaka. Efeitos da ovariectomia experimental no metabolismo ósseo de ratas wistar adultas: um modelo para estudo da osteoporose. *R Med Biol*. 2006;5(3):231-8.

Cardoso OP, Concepción RS. Empleo de calcarea phosphorica como coadyuvante de la consolidación ósea en pacientes con fractura de Colles. *Gac Homeopat Caracas*. 2008;6(1):4-11.

Carlson CS, Tulli HM, Jayo MJ, Loeser RF, Tracy RP, Mann KG, et al. Immunolocalization of noncollagenous bone matrix proteins in lumbar vertebrae from intact and surgically menopausal cynomolgus monkeys. *J Bone Min Res*. 1993;8(1):71-81.

Carvalho VC, Celestino CA, Halbe HW, Hotta EH, Lopes CMC. Efeito do alendronato de sódio em dose única de 30 mg semanais, isolado ou associado ao 17-b-estradiol, sobre a densidade mineral óssea da coluna lombar e do colo do fêmur. *RBM*. 2002;59(10):712-17.

Castro LF, Silva ATA, Chung MC. Bifosfonatos (Bfs) como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. *Qui. Nova*. 2004;27(3):465-60.

Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008; 3: S131-9.

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 Assc Med Brasil. 1997;43(4):347-51.

Costa-Paiva L, Horovitz AP, Santos AO, Fonsechi-Carvasan GA, Pinto-Neto AM. Prevalência de osteoporose em mulheres na pós-menopausa e associação com fatores clínicos e reprodutivos. RBGO. 2003;25(7):507-12.

Cruz AF, Buchpiguel C, Guarniero R, Barbieri A. Pamidronate and zoledronate effects in the incremento f bone mineral density and histomorphometry in rats. Acta Cir Bras. 2011;26(2):114-20.

Da Paz LHBC, Falco V, Teng NC, Dos Reis LM, Pereira RMR, Jorgetti V. Effect of 17 β -estradiol or alendronate on the bone densitometry, boné histomorphometry and bone metabolism f ovariectomized rats. Braz J Med Biol Res. 2001;34:1015-22.

Del Fattore A, Teti A, Rucci N. Osteoclast receptors and signaling. Arch Bioch Biophy. 2008;473(2):147-60.

Dequeker J, Ortner DJ, Stix AI, Cheng XG, Brys P, Boonen S. Hip fracture and osteoporosis in a XIIth Dynastiyy female skeleton from Lisht, upper Egypt. J Bone Min Res. 1997;12(6):881-88.

Diehl E, Sonaglio D, Lima NF, Backes S. Estudo dos fatores impregnação e secagem nas características de globulos utilizados em homeopatia. Braz J Pharm Sc. 2008; 44(1):143-50.

Estrada C, Larrent N, Marroquin TA, Cos DY, Barzaga GR. La calcárea phoshórica em el mejoramiento de la calidad de la cáscara Del huevo em gallinhas ponedoras. REDVET. 2008;9(3):1-5.

Farina VH. Efeitos da *Calcarea phosphoric* 6CH e do alendronato na reparação de lesões ósseas em ratas ovariectomizadas [tese]. São José dos Campos (SP):Faculdade de Odontologia de São José dos Campos: Univ Estadual Paulista – Unesp, 2010.

Fitzpatrick LA. Estrogen therapy for postmenopausal osteoporosis. Arq Bras Endocrinol Metab. 2006;50(4):705-19.

Folwarczna J, Pytlik M, Janiec W. Effects of doxycycline on devepment of changes in histomorphometric parameters of bones induced by bilateral ovariectomy in rats. Pol J Pharmacol. 2003; 55(3):433-41.

Frazão P, Naveira M. Prevalência de osteoporose: uma revisão crítica. Rev Bras Epidemiol. 2006; 9(2):206-14.

Frost HM, Jee WSS. On the rat model of human osteopenia and osteoporosis. Bone Mine. 1992;18(3):227-236.

Gameiro VS, Schott PCM. A osteoporose em fraturas proximais do fêmur: estudo histomorfométrico. Rev Bras Ortop. 2006;41(3):61-9.

Gomes CRG, Guimarães LA. Importância da atividade física na prevenção da perda de massa óssea e na osteoporose. Arq Mudi. 2006;10(1):11-6.

Grynblas MD, Tupy JH, Sodek J. The distribution of soluble, mineral-bound, and matrix-bound proteins in osteoporotic and normal bones. Bone. 1994;15(5):505-13.

Guarniero R. Osteoporose na mulher. RBM. 2008;65(6):179-85.

Guo HY, Jiang L, Ibrahim SA, Zhang L, Zhang H, Zhang M et al. Orally administered lactoferrin preserves bone mass and microarchitecture in ovariectomized rats. J Nutr. 2009;139(5):958-64.

Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.

Hadipour MM, Habibi GH, Ghrashinejad A, Olyaie A, Tork M. Evaluation of the homeopathic remedies medication on commercial broiler chickens performance. J Anim Veter Adv. 2011;10(16):2102-5.

Han XL, Meng Y, Kang N, Lv T, Bai D. Expression of osteocalcin during surgically assisted rapid orthodontic tooth movement in beagle dogs. J. Oral Maxillofac Surg. 2008;66(1):2467-75.

Ho HY, Wu JB, Lin WC. *Flemingia macrophylla* extract ameliorates experimental osteoporosis in ovariectomized rats. CAM. 2009;26:1-9

Hodgson JM, Devine A, Burke V, Dick IM, Prince RL. Chocolate consumption and bone density in older women. Am J Clin Nutr. 2008;87(1):175-80.

Huang TH, Muhlbauer RC, Tang CH, Chen HI, Chang GL, Huang YW, et al. Onion decreases the ovariectomy-induced osteopenia in young adult rats. Bone. 2008;42(6):1154-63.

Ippolito E, Mickelson MR, Ponseti IV. A histochemical study of slipped capital femoral epiphysis. J Bone Joint Sur Am. 1981; 63- A (7):1109-13.

Iwamoto J, Seki A, Takeda T, Sato Y, Yamada H, Yeh JK. Comparative effects of alendronate and alfacalcidol on cancellous and cortical bone mass and bone mechanical properties in ovariectomized rats. *Exp Anim.* 2006;55(4):357-67

Jenkins MR, Denison AV. Smoking status as a predictor of hip fracture risk in postmenopausal women of northwest texas. *Prev Chronic Dis.* 2008;5(1):1-8.

Jovine MS, Buchalla CM, Santarém EMM, Santarém JM, Aldrighi JM. Efeito do treinamento resistido sobre a osteoporose após a menopausa: estudo de atualização. *Rev Bras Epidemiol.* 2006;9(4):493-505.

Junqueira LC, Carneiro J, *Histologia básica.* Rio de Janeiro:Guanabara Koogan; 2008.

Kaczmarczyk-Sedlak I, Folwarczna J, Trzeciak HI. Thalidomide affects the skeletal system of ovariectomized rats. *Pharmacol Rep.* 2009;61:529-38.

Kavukcuoglu NB, Buckendahl P, Mann AB. Effect of osteocalcin deficiency on the nanomechanics and chemistry of mouse bones. *Mech Behavior Biom Mater.* 2009;2(4):348-54.

Keith McCormick R. Osteoporosis: Integrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility. *Altern Med Rev.* 2007;12(2):113-45.

Kennel KA, Drake MT. Adverse effects of bisphosphonates: implications for osteoporosis management. *Mayo Clin Proc.* 2009;84(7):632-8.

Keramat A, Patwardhan B, Larijani B, Chopra A, Mithal A, Chakravarty D, et al. The assessment of osteoporosis risk factors in Iranian women compared with Indian women. *BMC Musculoskelet Disord.* 2008;9(28):1-10.

Kierszenbaum AL. *Histologia e biologia celular : uma introdução à patologia.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

Kim HK, Kim JH, Abbas AA, Yoon TR. Alendronate enhances osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Clin Orthop Relat Res.* 2009; 467(12): 3121-8.

Lansky AL. *Impossible cure: the promise of homeopathy.* California: Press; 2009.

Lekic P, Sodek J, McCulloch CAG. Osteopontin and bone sialoprotein expression in regenerating rat periodontal ligament and alveolar bone. *Anat Rec.* 1996;244(1):50-8.

Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem.* 2000;37:432-46.

Lee YHD, Lim YW, Ling PS, Tan YY, Cheong M, Lam KS. Inadequate dietary calcium intake in elderly patients with hip fractures. *Singapore Med J.* 2007;48(12):1117-21.

Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas I. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Compar Med.* 2008;58(5):424-30.

Li M, Shen Y, Wronski TJ. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone.* 1997;20(1):55-61.

Lian J, Stewart C, Puchacz E, Mackowiak S, Shalhoub V, Collart D, et al. Structure of the rat osteocalcin gene and regulation of vitamin D-dependent expression. *Proc Natl Acad. Sci.* 1989;86(4):1143-7.

Luvizuto ER, Dias SMD, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia IR, Okamoto R, et al. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone.* 2010;46(4):1021-9.

Machado ALSM, Silva CMOM, Brandão AAH, Arisawa EAL, Rocha, RF. Evaluation of sodium alendronate activity on bone repair under hormones absence. *Cienc Odontol Bras.* 2006;9(3):6-12

Mahl CRW, Licks R, Fontanella VRC. Comparação de índices morfométricos obtidos na radiografia odontológica panorâmica na identificação de indivíduos com osteoporose/osteopenia. *Radiol Bras.* 2008;41(3):183-7.

Martelli A, Teixeira LBC, Santos Jr AR. Aspectos histopatológicos e histoquímico de osteossarcomas em cães. *Estud. Biol.* 2007;29(67):179-89.

McClung M. Bisfosfonates. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50(4):735-44.

McCormik RK. Osteoporosis: Integrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility. *Alter Med Rev.* 2007;12(2):113-45.

Mesquita GV, Lima MALTA, Santos AMR, Alves ELM, Brito JNPO, Martins MCC. Morbimortalidade em idosos por fratura proximal do fêmur. *Tex Cont Enferm.*, 2009;18(1):67-73.

Monteiro DA, Iriart JAB. Homeopatia no sistema único de saúde: representações dos usuários sobre o tratamento homeopático. *Cad Saúde Publica.* 2007;23(8):1903-12.

Morais GQ, Burgos MGPA. Impacto dos nutrientes na saúde óssea: novas tendências. *Rev Bras Ortop.* 2007;42(7):189-94.

Nakamura Y, Naito M, Hayashi K, Fotovati A, Abu-Ali S. Effect of combined treatment with alendronate and calcitriol on femoral neck strength in osteopenic rats. *J Orth Surg Res.* 2008;3:51-60.

Ocarino NM, Gomes MG, Melo EG, Serakides R. Técnica histoquímica aplicada ao tecido ósseo desmineralizado e parafinado para estudo do osteócito e suas conexões. *J Bras Patol Med Lab.* 2006;42(1):37-9.

Ocarino NM, Serakides R. Efeito da atividade física no osso normal e na prevenção e tratamento da osteoporose. *Rev Bras Med Esporte.* 2006;12(3):164-68.

Ono Y, Fukaya Y, Imai S, Yamakuni T. Beneficial effects of *Ajuga decumbens* on osteoporosis and arthritis. *Biol Pharm Bull.* 2008;31(16):1199-204.

Parisi PD. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea. *RBM.* 2002;3(2):52-8.

Park SB, Le YJ, Chung CK. Bone mineral density changes after ovariectomy in rats as an osteopenic model: stepwise description of Double dorso-lateral approach. *J Koren Neurosurg.* 2010;48(4):309-12.

Pinto Neto AM, Soares A, Urbanetz AA, Souza ACA, Ferrari AEM, Amaral B, et al. Consenso brasileiro de osteoporose 2002. *Rev Bras Reumatol.* 2002;42(6):343-54.

Potu BK, Rao MS, Nampurath GK, Chamallamudi MR, Prasad K, Nayak SR, et al. Evidence-based assessment of antiosteoporotic activity of petroleum-ether extract of *Cissus quadrangularis* Lin. *Up Med Sc.* 2009;114(3):140-8.

Potu BK, Rao MS, Nampurath GK, Chamallamudi MR, Nayak R, Thomas H. Anti-osteoporotic activity of the petroleum ether extract of *Cissus quadrangularis* Linn. in ovariectomized Wistar rats. *Chang Gung Med J.* 2010;33:252-7.

Prince PA, Urist MR, Otawara Y. Matrix GLA protein, a new γ -carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Bioch Bioph Res.* 1983;117(3):765-71.

Pytlik M, Kaczmarczyk-Sedlak I, Sliwinski L, Janiec W, Rymkiewicz I. Effect of concurrent administration of alendronate sodium and retinol on development of changes in histomorphometric parameters of bone induced by ovariectomy in rats. *Pol J Pharmcol.* 2004;56(5):571-9.

Rauner M, Sipos W, Peitschamann P. Osteoimmunology. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;143:31-48.

Raisz L. Physiology and Pathophysiology of bone remodeling. *Clinl Chem.* 1999;45(8B):1353-8.

Ribeiro AF, Volpato NM. Alendronato de sódio: metodologias para análise quantitativa. *Quim Nova.* 2005;28(5):852-8.

Saleh NK, Sahel HA. Olive oil effectively mitigates ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *BMC Complem Altern Med.* 2011;11(10) [Epub ahead of print].

Sarfati J. Bone building: perfect protein. *TJ.* 2004;18(1):11-2.

Schwarz F, Herten M, Sager M, Wieland M, Dard M, Becker J. Histological and immunohistochemical analysis of initial and early osseous integration at chemically modified and conventional SLA titanium implants: preliminary results of a pilot study in dogs. *Clin Oral Impl Res.* 2007;18(4):481-8.

Shimizu-Ishiura M, Kawana F, Sasaki T. Osteoprotegerin administration reduces femoral bone loss in ovariectomized mice via impairment of osteoclast structure and function. *J Elec Micr.* 2002;51(5):315-25.

Shen MIY, Wronski TJ. Time course of femoral neck osteopenia in ovariectomized rats. *Bone.* 1997;20(1):55-61.

Simic P, Culeij JB, Orlic I, Grgurevic L, Draca N, Spaventi R, et al. Systemically administered bone morphogenetic protein-6 restores bone in aged ovariectomized rats by increasing bone formation and suppressing bone resorption. *J Biol Chem.* 2006;281(35):25509-21.

Sliwinski L, Janiec W, Pytlik M, Folwarczna J, Kaczmarczyk-Sedlak I, Pytlik W, et al. Effect of administration of alendronate sodium and retinol on the mechanical properties of the femur in ovariectomized rats. *Pol J Pharmacol.* 2004;56(6):817-24.

Spolidorio LC, Marcantonio Jr E, Spolidorio DMP, Nassar CA, Nassar PO, Marcantonio RA, et al. Alendronate therapy in cyclosporine-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodont Res.* 2007;42(5):466-73.

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

Teixeira MZ. Distúrbios do climaterio e tratamento homeopático. *Homeopat Bras.* 2002;8(1):29-43.

Teixeira MZ. Possíveis contribuições do modelo homeopático à humanização da formação médica. *Rev Bras Educ Med.* 2009;33(3):454-63.

Tera TM. *Imunolocalização dos marcadores de formação e reabsorção óssea guiada em ratas com deficiência estrogênica [dissertação]* São José dos Campos (SP): Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP- Univ. Estadual Paulista; 2010.

Tezval M, Sehmisch S, Seidlová-Wuttke D, Rack T, Kolios L, Wuttke W, et al. Changes in the histomorphometric and biomechanical properties of the proximal femur of ovariectomized rat after treatment with the Phytoestrogens genistein and equol. *Planta Med.* 2010;76(3):235-40.

Tingart M, Bechmann J, Opolka A, Matsuura M, Weich O, Grifka J, et al. Influence of factors regulating bone formation and remodeling on bone quality in osteonecrosis of the femoral head. *Calcif Tissue Int.* 2008;82(4):300-8.

Tsuang YH, Chen LT, Chiang CJ, Wu LC, Chiang YF, Chen PY. Isoflavones prevent bone loss following ovariectomy in young adult rats. *J Orth Surg Res.* 2008;3(12):1-9.

Wang J, Shang F, Mei Q, Wang J, Zhang R, Wang S. NO-donating genistein prodrug alleviates bone loss in ovariectomised rats. *Swiss Med Wkly.* 2008;138(41):602-7.

Wang Y, Hung P, Tang PF, Chan KM, Li G. Alendronate (ALN) combined with osteoprotegerin (OPG) significantly improves mechanical properties of long bone than the single use of ALN or OPG in the ovariectomized rats. *J Orth Surg Res.* 2011;6(34):2-8.

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

Wronski TJ, Yen CF. The ovariectomized rat as an animal model for postmenopausal bone loss. *Cell Mater.* 1991;1: 69-74.

Xiong H, Peng B, Wei L, Zbang X, Wang L. Effect of an estrogen-dificient state and alendronate therapy on bone loss resulting from experimental periapical lesions in rats. *J Endod.* 2007;33(11):1304-8.

Yamazaki H, Sasaki T. Effects of osteoprotegerin administration on osteoclast differentiation and trabecular bone structure in osteoprotegerin-deficient mice. *J Elec Micr.* 2005;54(5):467-77.

Yao X, Chen H, Ohtake N , Shoumura S. Morfological alterations in growth plate cartilage of ovariectomized mice. *Med Mol Morphol.* 2006;39(4):193-7

Zerbo RI, Bronckers ALJJ, Lange G, Burger EH. Localization of osteogenic and osteoclastic cells in porus β -tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials.* 2005;26:1445-51.

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

 **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) 3947-9028 / 9037
Fax: (12) 3947-9010 / mgcti@focj.unesp.br / Oncides@focj.unesp.br



CERTIFICADO **Comitê de Ética em Pesquisa** **Envolvendo Animais**

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 20/2009-PA/CEP, sobre "Influência da calcarea fosforica e do alendronato sódico na remodelação óssea de ratas ovariectomizadas" sob responsabilidade de **ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO**, tendo como orientados os alunos Ana Lourdes da Silva Machado e Vitor Hugo Farina, 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, 19 de agosto de 2009

Profa.Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora