UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ADRIANA CABRESTÉ

Estudo comparativo entre as ações do nimesulida, arnica montana homeopática e arnica montana fitoterápica – possíveis aplicações na terapêutica da doença periodontal e na rotina do consultório odontológico

BAURU
2015

ADRIANA CABRESTÉ

Estudo comparativo entre as ações do nimesulida, arnica montana homeopática e arnica montana fitoterápica - possíveis aplicações na terapêutica da doença periodontal e na rotina do consultório odontológico

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, área de concentração Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria

Versão corrigida

BAURU

2015

Cabresté, Adriana

C112e Estudo comparativo entre as ações do nimesulida, arnica montana homeopática e arnica montana fitoterápica – possíveis aplicações na terapêutica da doença periodontal e na rotina do consultório odontológico / Adriana Cabresté. – Bauru, 2015.

190 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-USP

Protocolo nº: 004/2014

Data: 12 de junho de 2014

*“Que os vossos esforços
desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que
as grandes coisas do homem
foram conquistadas
do que parecia impossível.”*

Charlie Chaplin

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à:

- ✓ Deus. Agradeço por sempre iluminar meus caminhos. Obrigada por ter me dado fé e confiança para não desistir e continuar em frente na busca dos meus objetivos.

 - ✓ Aos meus amados pais, **Modesto Cabestré** (*in memoriam*) e **Dirce Dadamos Cabestré** (*in memoriam*), exemplos de humildade, caráter, determinação, amor e acima de tudo de respeito ao próximo. Agradeço pelo convívio, que apesar de abreviado, fez de mim uma pessoa com princípios bem sedimentados para trilhar as trajetórias da vida.

 - ✓ Às minhas queridas irmãs, **Sonia** e **Vera**, pelo incentivo em todos os momentos da minha vida. Sempre auxiliando e norteando as direções a serem seguidas. Vocês são para mim modelos de dedicação e amor, amo vocês! Obrigada por tudo!
-
-

*“Por vezes sentimos
que aquilo que fazemos
não é senão
uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor
se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu amor, **Lázaro**, pela paciência, compreensão, apoio, colo, carinho e amor em todas as ocasiões. Obrigada por fazer parte da minha vida. Te amo!

Aos meus queridos irmãos **Carlos, Paulo e Sérgio**, que mesmo com a distância física, sempre me deram conselhos e força para permanecer nos meus ideais. Amo vocês!

A todos da minha família, em especial **cunhadas, sobrinhos e sobrinhas**. Obrigada pelo carinho!

*“O cientista não é
o homem que fornece
as verdadeiras respostas,
é quem faz
as verdadeiras perguntas”.*

Claude Lévi-Strauss

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria**, meu orientador, obrigada pela oportunidade. Agradeço pelo seu carinho, compreensão, paciência e orientação sempre atenciosa. Obrigada pelo seu desprendimento em relação à transmissão do seu conhecimento. Foi muito bom poder compartilhar da sua sabedoria e experiência que contribuíram muito para a realização deste trabalho. Sou grata pela sua amizade, confiança e por acreditar no meu potencial.

À **Profª. Drª. Camila de Oliveira Rodini**, pela sua simplicidade, amizade, paciência e atenção. Obrigada pela sua fundamental contribuição para a concretização deste trabalho.

Ao profissional e amigo, **Thiago José Dionísio**, pela sua dedicação e presteza. Obrigada pela sua disponibilidade e auxílio em vários momentos desta pesquisa. A sua assistência nessas ocasiões facilitou muito a efetivação deste estudo. Muito obrigada!

Aos demais professores do Departamento de Ciências Biológicas, **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos**, **Profª. Drª. Lucimara Neves**, **Prof. Dr. Leonardo Rigoldi Bonjardim** e **Profª. Drª. Ivy Kiemle Trindade Suedam**, pelo convívio e amizade.

À **Drª. Elza Araújo Torres**, pela sua colaboração, atenção e amizade que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Ma. Camila de Assis Fleury**, colega de profissão e amiga. Obrigada pelos conhecimentos compartilhados, empenho e auxílio nos vários momentos que necessitei. Sou muito grata a você!

Aos pesquisadores, **Drª. Bella Luna Colombini Ishikiriama** e **Dr. Daniel Thomas Brozowski**, pela cooperação, paciência e dedicação. Obrigada pela importante ajuda para a consolidação desta pesquisa.

Aos pesquisadores e colegas da Farmacologia: **Dr^a. Adriana Calvo, Dr^a. Ana Carolina Morandini Ramos, Ma. Lilian Gobbo de Freitas Bueno Gabriele, Ma. Gabriela Pereira de Souza, Paulo Zupelari Gonçalves, Giovana Maria Weckwerth e Clarissa Carolina Fernandes Herculiani**, agradeço pela convivência e ajuda nas diversas ocasiões que precisei.

À **Vera Lúcia Rufino**, secretária aposentada do Departamento de Ciências Biológicas, por estar sempre pronta a atender, pela amizade, carinho e apoio. Muito obrigada!

À **Viviane Aparecida Parisi Santos**, técnica do Laboratório de Farmacologia, pela convivência, amizade e auxílio.

À **Dalva Ribeiro de Oliveira**, secretária, pela atenção e amizade.

Às técnicas do Laboratório de Histologia: **Danielle Santi Ceolin e Patrícia de Sá Mortagua Germino**, pela paciência, assistência e amizade no desenvolvimento dessa pesquisa.

Aos pesquisadores do Departamento de Histologia, em especial, **Nathália Martins Lopes**, pelo carinho, amizade, atenção e ajuda oferecida.

Aos alunos de graduação em odontologia: **Amanda Caetano Severnini, Caroline de Paula Oliveira e Clara Ramos Zampieri**, pelo cuidado e auxílio prestados.

À aluna de graduação em biomedicina, **Gabriela Moraes de Oliveira**, e ao farmacêutico, **André Luís Pinhata**, pela dedicação e contribuição na realização deste estudo.

A todos que cooperaram direta ou indiretamente para o êxito deste trabalho, muito obrigada!

AGRADECIMENTOS ADMINISTRATIVOS

À Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa da senhora diretora, **Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, e da senhora coordenadora do programa de pós-graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, **Prof^a. Dr^a. Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES), pelo apoio financeiro concedido durante a execução deste trabalho.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, pra sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

RESUMO

Trata-se de estudo comparativo para avaliar a atividade dos medicamentos nimesulida, Arnica TM, Arnica 6CH comparados com H₂O no tratamento da Doença Periodontal experimental induzida por ligadura em ratos. Esta doença se caracteriza por processo inflamatório que pode evoluir até ao ligamento periodontal e tecido ósseo provocando perda óssea. Mediadores produzidos pelo hospedeiro e substâncias do biofilme são responsáveis pelos danos que podem levar até a perda do elemento dentário. O objetivo deste trabalho foi desenvolver estudo exploratório-descritivo para analisar, aprofundar e comparar os efeitos das medicações citadas, investigando possíveis inovações no tratamento da doença periodontal. A metodologia consistiu em: 1) colocação, sob anestesia, da ligadura no primeiro molar inferior esquerdo. 2) administração diária por gavagem de H₂O (controle) (1µl/g), nimesulida (1µl/g, de uma suspensão com 5mg/ml), Arnica TM (8µl/300g) ou Arnica 6CH (3,21µl/300g) durante 14, 21 e 28 dias a quatro grupos de ratos Wistar (n=30/ grupo); 3) eutanásia e coleta de material para análises histológica, da perda óssea e RT-PCR (alvos: TNF- α , COX-2, IL-6, OPG e RANKL); 4) análise estatística paramétrica realizada por ANOVA a um ou dois critérios, seguida do teste de Tukey, ou por análise não paramétrica por Kruskal-Wallis, seguido do método de Dunns, nível de significância de 5%. Quanto à perda óssea, não houve diferença estatística entre os grupos e nenhum dos tratamentos foi capaz de contê-la. Os escores para o infiltrado inflamatório não mostraram diferença significativa entre os grupos nos períodos estudados. Quanto ao escore geral, que envolve intensidade do infiltrado inflamatório, migração do epitélio juncional, integridade do cemento e da crista óssea alveolar, não houve diferença significativa entre os grupos nos períodos. Na expressão do RNAm para as citocinas vimos para o TNF- α não haver diferença significativa entre os grupos, quando se analisou isoladamente os períodos de 14 e 28 dias. No entanto, no período de 21 dias, houve redução significativa no grupo nimesulida comparado ao grupo Arnica 6CH (*p<0,05). Para a COX-2, não houve diferença significativa quanto à expressão do RNAm entre os grupos, analisando isoladamente cada período de estudo, sendo nítida a redução desta expressão no grupo Arnica 6CH em todos os períodos; para a IL-6, OPG e RANKL não houve diferença significativa quanto à expressão do RNAm entre os grupos nos períodos estudados. No entanto, no grupo

Arnica 6CH nota-se tendência nítida para o aumento da expressão do RNAm para OPG, ao longo do tempo. Comparando com o grupo H₂O a ação de cada medicamento quanto à expressão do RNAm para todas as citocinas, considerando o conjunto dos 3 períodos, vê-se redução significativa para a expressão de RNAm para COX-2 e RANKL após o tratamento com Arnica 6CH (*p<0,05). O mesmo pode ser visto para a nimesulida quando se estuda a expressão do RNAm para RANKL (*p<0,05). No estudo ficaram destacados os efeitos biológicos da Arnica 6CH sobre a leitura e transcrição do DNA, notadamente sobre genes relacionados à perda óssea, o que vislumbra a possibilidade de sua utilização terapêutica.

Palavras-chave: Doença Periodontal. Reabsorção óssea. Arnica montana. Anti-inflamatórios não esteroides.

ABSTRACT

Comparative study of the actions of nimesulide, homeopathic arnica montana and arnica montana phytotherapic - possible applications in the treatment of periodontal disease and routine dental office

This is a comparative study to evaluate the activity of nimesulide medicines, Arnica TM, Arnica 6CH compared with H₂O in the treatment of experimental periodontal disease induced by ligation in rats. This disease is characterized by an inflammatory process that may progress to the periodontal ligament and bone tissue leading to bone loss. Mediators produced by the host and biofilm substances are responsible for the damage that can lead to tooth loss. The aim of this exploratory and descriptive study was to analyze, deepen and compare the effects of the mentioned medications, investigating possible innovations in the treatment of periodontal disease. The methodology consisted of: 1) placing under anesthesia ligature in the first lower left molar. 2) daily administration by gavage H₂O (control) (1μl/g), nimesulide (1μl/g, a suspension of 5 mg / ml), Arnica TM (8μl/300g) or Arnica 6CH (3,21μl/300g) for 14, 21 and 28 days to four groups of Wistar rats (n = 30 / group); 3) euthanasia and collection of material for histological, bone loss and RT-PCR analysis (targets: TNF-α, COX-2, IL-6, OPG and RANKL); 4) parametric statistical analysis performed by ANOVA to one or two criteria, followed by Tukey test, or nonparametric analysis by Kruskal-Wallis, followed by Dunns method, 5% significance level. Regarding the bone loss, there was no statistical difference between the groups and none of the treatments was able to contain it. The scores for the inflammatory infiltrate showed no significant difference between the groups in the study periods. Regarding the general score, which involves intensity of the inflammatory infiltrate, migration of the junctional epithelium integrity of the cement and the alveolar bone crest, there was no significant difference between groups in the periods. At the mRNA expression for the cytokines we saw for TNF-α no significant difference between groups when analyzed separately periods of 14 and 28 days. However, in the 21day period, there was significant reduction in nimesulide group compared to the Arnica 6CH group (* p <0.05). For COX-2, there was no significant difference in mRNA expression between the groups, separately analyzing each study period, being sharper reduction of this expression in Arnica 6CH group in

all periods; for IL-6, OPG and RANKL no significant difference in mRNA expression between the groups in the study periods. However, it is noted in the Arnica 6CH group a clear tendency to increase of the mRNA expression for OPG over time. Comparing with H₂O group action of each medicine on the mRNA expression for all cytokines, considering the set of three periods, we see a significant reduction in mRNA expression for COX-2 and RANKL after treatment with Arnica 6CH (* p <0.05). The same can be seen for nimesulide when studying the mRNA expression for RANKL (* p <0.05). In the study were highlighted the biological effects of Arnica 6CH about reading and transcription of the DNA, notably about genes related to bone loss, which envisions the possibility of its therapeutic use.

Key words: Periodontal Disease. Bone resorption. Arnica montana. Nonsteroidal anti-inflammatory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1	- Colocação da ligadura no 1º molar inferior	73
Figura 2	- Perda óssea no Grupo H ₂ O, 21dias	89
Figura 3	- Perda óssea no Grupo Arnica 6CH, 21 dias	90
Figura 4	- Perda óssea no Grupo T.M. Arnica, 21 dias	90
Figura 5	- Perda óssea no Grupo nimesulida, 21 dias.....	91
Figura 6	- Representação gráfica da Perda Óssea em todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias	91
Figura 7	- Representação gráfica da Perda Óssea em todos os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias	92
Figura 8	- Representação gráfica do Infiltrado Inflamatório em todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias	93
Figura 9	- Representação gráfica do Infiltrado Inflamatório em todos os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias	94
Figura 10	- Grupo Arnica 6CH, 14dias, face mesial do 1º molar inferior esquerdo com infiltrado inflamatório de moderado a intenso	95
Figura 11	- Grupo H ₂ O, 14 dias, face mesial do 1º molar inferior esquerdo com infiltrado inflamatório intenso e sequestro ósseo.....	96
Figura 12	- Representação gráfica da correspondência entre Perda Óssea e Infiltrado Inflamatório em todos os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias	97
Figura 13	- Representação gráfica do Escore geral em todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias	99

Figura 14 - Representação gráfica do Escore geral em todos os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias	100
Figura 15 - Grupo Arnica 6CH, 21dias, face mesial do 1º molar inferior esquerdo. Escore 3	101
Figura 16 - Grupo H ₂ O, 28 dias, face mesial do 1º molar inferior esquerdo. Escore 4	102
Figura 17 - Representação gráfica da expressão do RNAm para TNF- α em todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias.....	103
Figura 18 - Representação gráfica da expressão do RNAm para TNF- α em todos os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias.....	104
Figura 19 - Representação gráfica da expressão do RNAm para COX-2 em todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias.....	105
Figura 20 - Representação gráfica da expressão do RNAm para COX-2 em todos os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias.....	106
Figura 21 - Representação gráfica da expressão do RNAm para IL-6 em todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias.....	107
Figura 22 - Representação gráfica da expressão do RNAm para IL-6 em todos os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias.....	107
Figura 23 - Representação gráfica da expressão do RNAm para OPG em todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias.....	108

Figura 24 - Representação gráfica da expressão do RNAm para OPG em todos os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias.....	109
Figura 25 - Representação gráfica da expressão do RNAm para RANKL em todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias.....	110
Figura 26 - Representação gráfica da expressão do RNAm para RANKL em todos os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias.....	110
Figura 27 - Representação gráfica da expressão do RNAm no grupo Arnica 6CH para todas as citocinas avaliadas no estudo, nos períodos de 14, 21 e 28 dias, comparadas ao grupo H ₂ O	112
Figura 28 - Representação gráfica da expressão do RNAm no grupo Arnica TM para todas as citocinas avaliadas no estudo, nos períodos de 14, 21 e 28 dias, comparadas ao grupo H ₂ O	113
Figura 29 - Representação gráfica da expressão do RNAm no grupo nimesulida para todas as citocinas avaliadas no estudo, nos períodos de 14, 21 e 28 dias, comparadas ao grupo H ₂ O	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IL	Interleucina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
FOXP3	Forkhead Box P3
IFN- γ	Interferon gama
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa - B
T CD4	Linfócito T auxiliar
PMN	Polimorfonucleares
T CD8	Linfócito T citotóxico
MIF	Fator Inibidor da migração de Macrófagos
AINEs	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
COX	Ciclooxigenase
PGG2	Prostaglandina G2
PGH2	Prostaglandina H2
TXA2	Tromboxano A2
PGI2	Prostaciclina
PGE2	Prostaglandina E2
AMP	Adenosina Monofosfato
SNC	Sistema Nervoso Central
MIP-1 α	Proteína Inflamatória de Macrófagos 1 α
RNA _m	RNA mensageiro
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

IHC	Imuno-histoquímica
NFkB	Fator Nuclear kappa B
s.m.j.	Salvo melhor juízo
AMHB	Associação Médica Homeopática Brasileira
ABFH	Associação Brasileira de Farmacêuticos Homeopatas
AMVHB	Associação Médico-Veterinária Homeopática Brasileira
CH	Escala Homeopática Centesimal Hahnemanniana
X	Escala Decimal Homeopática
D	Escala Decimal Homeopática
SUS	Sistema Único de Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
RE	Resolução Específica
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
NO	Óxido Nítrico
DTM	Disfunção Temporomandibular
OA	Osteoartrite
AP-1	Proteína Ativadora - 1
AIA	Atividade Anti-inflamatória
NF-AT	Fator Nuclear de células T Ativadas
GTDF 6-C-β-D	glucopiranosil -(2S, 3S) - (+) -3 ' , 4 ' , 5 , 7 – tetrahidroxiflavanol
AhR	Receptor de Hidrocarboneto Aromático
AMPc	Adenosina Monofosfato cíclico

GLP	<i>Gu Ling Pian</i>
WESS	<i>Spatholobus suberectus</i>
HE	Hematoxilina-eosina
RT-PCR	Transcrição Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase
FOB – USP	Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo
CEEPA	Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
TM	Tintura-Mãe
PO	Perda Óssea
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
rpm	Rotações por minuto
DEPC	Água com dietil pirocarbonato
DNTP	Deoxinucleotídeo Trifosfato
DTT	Ditiotreitol
RPL13	Proteína Ribossomal L13
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
cDNA	DNA complementar
OPG	Osteoprotegerina
JAC	Junção Amelo-cementária
ii	Infiltrado Inflamatório
Tregs	Células T reguladoras
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante Beta
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa - B
MMPs	Metaloproteinases da matriz

PGF 2 α	Prostaglandina F2 α
PG	Prostaglandina
UV	Ultravioleta
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SOD	Superóxido Dismutase
CAT	Catalase
GSH	Glutathiona reduzida
CD54	Molécula de adesão intercelular
LTB4	Leucotrieno B4
LOX	Lipoxigenase
AMME	Extrato Metanólico da flor de Arnica montana
CIA	Artrite Induzida por Colágeno Tipo II
TRAP	Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato
LPS	Lipopolissacarídeo
GBS	<i>Streptococcus</i> Grupo B

LISTA DE SÍMBOLOS

μl	Microlitro
μm	Micrômetro
°C	Grau Celsius
ng/uL	Nanograma por microlitro
nm	Nanômetro
ug	Micrograma
NaOH	Hidróxido de Sódio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	DOENÇA PERIODONTAL E PERDA ÓSSEA	31
2.2	UTILIZAÇÃO E EFEITOS DOS MEDICAMENTOS ANTI- INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS (AINES)	34
2.2.1	AINES com relativa seletividade para COX-2	41
2.2.2	AINES, Doença Periodontal e Perda Óssea	45
2.3	PESQUISAS E EXPERIMENTOS COM MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS	48
2.3.1	Medicamentos homeopáticos, Doença Periodontal e Perda Óssea	53
2.4	PESQUISAS E EXPERIMENTOS COM MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS.....	55
2.4.1	Medicamentos fitoterápicos, Doença Periodontal e Perda Óssea	60
3	PROPOSIÇÃO	65
4	MATERIAL E MÉTODOS	69
4.1	COLOCAÇÃO DA LIGADURA E ADMINISTRAÇÃO DOS MEDICAMENTOS	71
4.2	EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DE MATERIAL	74
4.2.1	Análise da Perda Óssea	74
4.2.2	Análise Histológica	75
4.2.2.1	Processo de inclusão na parafina.....	76
4.2.2.2	Procedimentos para corte no micrótomo	77
4.2.2.3	Coloração em HE (Hematoxilina-Eosina)	78
4.2.3	RT-PCR (Transcrição Reversa – Reação em Cadeia da Polimerase)	79
4.2.3.1	Isolamento do RNA	80
4.2.3.2	Análise no Nanodrop.....	83

4.2.3.3	Transcrição Reversa	83
4.2.3.4	PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)	84
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	85
5	RESULTADOS	87
5.1	ANÁLISE DA PERDA ÓSSEA.....	89
5.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS CORTES HISTOLÓGICOS.....	93
5.3	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA DOENÇA PERIODONTAL POR RT-PCR	103
6	DISCUSSÃO	117
6.1	A AMOSTRA	119
6.2	METODOLOGIA.....	121
6.3	CARACTERÍSTICAS E PRESSUPOSTOS TEÓRICOS DOS MEDICAMENTOS UTILIZADOS NESTE ESTUDO	126
6.3.1	Nimesulida.....	126
6.3.2	Arnica montana 6CH	130
6.3.3	Tintura-mãe de Arnica montana	132
6.4	RESULTADOS	134
7	CONCLUSÕES	161
	REFERÊNCIAS.....	165
	APÊNDICES.....	183

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

No cenário cotidiano dos consultórios odontológicos a dor e a inflamação são muito comuns, independente da especialidade. Em especial na Doença Periodontal, o paciente já chega à clínica apresentando um quadro inflamatório e muitas vezes, com perda óssea. O dentista, nesses casos, deve utilizar medicamentos anti-inflamatórios e analgésicos para aliviar os sintomas do paciente, além de seus procedimentos operatórios específicos, para poder intervir com mais segurança e eficácia.

Considerando que se trata de uma prática bastante presente nos consultórios odontológicos e que, frequentemente, os profissionais utilizam o fármaco **nimesulida** para tratamento de problemas, conforme o relatado, busca-se avaliar os efeitos adversos desse medicamento anti-inflamatório e, ponderar as vantagens já pesquisadas a respeito da utilização da **Arnica montana homeopática** e da **Arnica montana fitoterápica**, com destaque para as atividades anti-inflamatória e analgésica. Pelo exposto, o foco deste estudo está centrado no seguinte questionamento: **outros medicamentos, além dos tradicionais anti-inflamatórios não esteroidais poderiam ser utilizados, com vantagens na terapêutica da doença periodontal, especificamente para controle e alívio da inflamação e perda óssea, minimizando os efeitos colaterais para o paciente?**

É importante, também, destacar que a população, na atualidade, tem mais acesso às informações e busca orientações em todos os níveis, especificamente no que concerne às questões relativas à saúde. Neste segmento, as pessoas buscam esclarecimentos e novidades a respeito dos medicamentos que sejam eficazes e que apresentem o mínimo de eventos indesejáveis.

Ressalta-se que já existem pesquisas comprovando a eficácia dos medicamentos homeopáticos e fitoterápicos, somado ao interesse da autora deste trabalho em direcionar seus estudos para essas terapêuticas, uma vez que tem larga experiência na atenção farmacêutica aplicada aos medicamentos destes segmentos, o que justifica a necessidade de aprofundamento e maior atenção com estas práticas.

Acredita-se que o presente estudo pode significar uma contribuição na caracterização e identificação de fatores e elementos que possam colaborar com a prática diária odontológica, uma vez que, na trajetória profissional da pesquisadora como farmacêutica, teve-se a oportunidade de trabalhar com a **Homeopatia e Fitoterapia**, bem como de orientar os clientes através da atenção farmacêutica a respeito destas terapêuticas.

Assim, o propósito deste estudo é verificar a efetividade destas terapias “alternativas”, pesquisando a aplicação da **Homeopatia e da Fitoterapia** nas rotinas do tratamento para a Doença Periodontal que envolve inflamação e perda óssea e, a partir desta iniciativa, socializar os conhecimentos e experiências com os profissionais da saúde, em especial os odontólogos.

Com base no exposto, para contextualizar o tema deste estudo, bem como para abordar de forma clara o problema norteador, no capítulo seguinte primeiramente apresentam-se destacados estudos envolvendo a doença periodontal e perda óssea, a utilização e efeitos dos medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais e na sequência os resultados de experimentos e pesquisas com medicamentos homeopáticos e fitoterápicos realizados por pesquisadores renomados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA PERIODONTAL E PERDA ÓSSEA

Na rotina dos consultórios odontológicos, a doença periodontal é bastante comum. Ela provoca um processo inflamatório dentre outras características como será explanado a seguir.

A doença periodontal, segundo Gomes Filho et al. (2006), é caracterizada como o desequilíbrio entre a ação das bactérias, fatores externos e a reação de defesa do organismo. Ela se manifesta pela inflamação da gengiva, podendo progredir até a esfoliação do dente pela reabsorção do tecido ósseo e perda do ligamento periodontal.

De acordo com Kayal (2013), na doença periodontal a infecção começa no epitélio gengival originando a gengivite, e sob certas condições, vai avançar para o tecido conjuntivo subjacente, causando a periodontite. A patogênese da periodontite envolve tanto a resposta imune inata e adquirida. A resposta inflamatória resulta na liberação de uma variedade de citocinas e outros mediadores da inflamação, propagação e recrutamento de células inflamatórias para o tecido gengival. A progressão da inflamação para o tecido conjuntivo adjacente leva à destruição do tecido conjuntivo e do osso alveolar, característica fundamental da doença periodontal.

O epitélio juncional, conforme o estudo de Kayal (2013), separa o tecido conjuntivo do periodonto da cavidade oral. Esse epitélio é fino e permeável que permite o fluxo de toxinas bacterianas e mediadores inflamatórios. A defesa no periodonto ocorre em resposta a um agrupamento de microrganismos que residem no biofilme localizado na superfície do dente. A progressão da lesão da gengiva para o tecido periodontal se dá em quatro fases: inicial, precoce, estabelecida e avançada baseada em achados clínicos e histológicos.

A lesão inicial, segundo o autor, acontece 2 a 4 dias após o acúmulo de placa na gengiva e é localizada no sulco gengival, incluindo o epitélio juncional e a região mais coronal do tecido conjuntivo. Clinicamente há um aumento do fluxo do

fluido crevicular. As células polimorfonucleares (PMN) começam a migrar para a área, seguindo um gradiente quimioatraente, formado por substâncias da placa e das células do hospedeiro. Já a lesão precoce ocorre após vários dias do acúmulo de placa. Nessa fase, há um aumento no número e no tamanho dos vasos, o que acarreta a vermelhidão da gengiva marginal. Linfócitos e PMNs são predominantes nessa fase da gengivite. Essa fase da lesão pode persistir por muito tempo antes de progredir para a lesão estabelecida.

Na lesão estabelecida há um aumento do infiltrado inflamatório no epitélio juncional e no tecido conjuntivo. Em indivíduos jovens há a predominância no infiltrado de linfócitos, já nos mais velhos destacam-se os plasmócitos como dominantes. O epitélio juncional é substituído por epitélio da bolsa fragilmente aderido e possibilita a migração mais profunda do biofilme bacteriano. Nesse epitélio da bolsa há um intenso infiltrado com leucócitos, predominantemente PMNs, é mais permeável permitindo o acesso de substâncias dentro e fora do tecido conjuntivo (KAYAL, 2013).

A lesão avançada, conforme descreve o estudioso, é caracterizada pela predominância das células inflamatórias plasmócitos. Essas células estendem-se mais profundamente para dentro do tecido conjuntivo, há uma severa degradação das fibras de colágeno e migração mais apical do epitélio juncional. A bolsa aprofunda o biofilme e continua a progredir apicalmente em um ambiente anaeróbico. Nessa fase ocorre a perda de inserção de tecido conjuntivo e reabsorção óssea.

Glowacki et al. (2013) relatam que na doença periodontal, a destruição do tecido está associada com uma diminuição em processos reguladores locais, entre os quais há uma diminuição da expressão de FOXP3 (forkhead Box P3) por linfócitos reguladores.

Sima e Glogauer (2013) descrevem que a doença periodontal crônica e agressiva é caracterizada pelo fracasso na resolução da inflamação local contra bactérias periodontopatogênicas localizadas no biofilme subgengival. Afirmam que a reabsorção óssea alveolar é resultado das alterações da resposta imune inata e adaptativa para os patógenos periodontais e que estudos com animais e humanos mostram que as citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento derivados de

macrófagos estão presentes em número elevado nas fases destrutiva e reparadora da periodontite.

O estudo de Papadopoulos et al. (2013), com ratos, aponta que a *Porphyromonas gingivalis* é o agente etiológico primário da doença periodontal crônica e que ratos deficientes em TNF são resistentes à perda do osso alveolar após infecção oral com *P. gingivalis*.

A pesquisa desenvolvida por Arizon et al. (2012), com camundongos deficientes das células de Langerhans, resultou em uma perda aumentada de massa óssea. Os autores revelam o papel imunoregulatório das células de Langerhans inibindo a produção de IFN- γ e a ativação de RANKL em células T CD4 com a função de promover a osteoclastogênese.

Já Han et al. (2013) exibem em seu estudo com ratos, a infecção periodontal por *P. gingivalis* e a associação com a reabsorção óssea dependente de RANKL, pois esta é acompanhada por um aumento da infiltração local de células T e B que expressam RANKL.

A infecção oral por *A.actinomycetemcomitans* (Aa), segundo Bezerra et al. (2012), estimulou uma resposta local com aumento do número de PMN e da expressão de TNF- α no epitélio juncional e perda de inserção. Esse quadro foi revertido por tratamento com antibióticos. A infecção por Aa também aumentou TNF- α no tecido conjuntivo, o número de osteoclastos e das células T CD8 nos linfonodos. Dessa forma, a infecção oral por Aa resulta em características importantes da destruição periodontal.

Em outro estudo, Madeira et al. (2012) demonstram que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) induz à perda do osso alveolar e à produção local de mediadores inflamatórios, incluindo o MIF (fator inibidor da migração de macrófagos). Em uma pesquisa com camundongos *knockout* para MIF, ficou elucidado que o MIF tem função no controle do crescimento bacteriano na doença periodontal, porém, contribui de forma significativa para a progressão da perda óssea ao afetar diretamente a diferenciação da atividade dos osteoclastos.

Bainbridge et al. (2010) relatam em seu estudo que *Porphyromonas gingivalis* produz a enzima serina fosfatase em contato com as células epiteliais gengivais *in vitro*. Em um modelo de doença periodontal em ratos, a serina fosfatase de *P. gingivalis* é necessária para a reabsorção óssea alveolar máxima, e na ausência dessa enzima, mais PMNs são requisitados para os tecidos gengivais .

Queiroz-Junior et al. (2013) descrevem seu experimento com um modelo de doença periodontal em ratos induzida por ligadura: os animais receberam diferentes doses de naloxona (antagonista opióide não-seletivo) ou veículo, localmente no tecido gengival. A naloxona aumentou significativamente a perda do osso alveolar em relação aos ratos tratados somente com o veículo. Em contrapartida, o antagonista opióide não afetou a perda de inserção das fibras, porém, induziu a um aumento significativo nos níveis de mieloperoxidase , no número de osteoclastos e citocinas nos tecidos periodontais. Os autores concluíram com esse estudo que os opióides endógenos protegem o hospedeiro contra a progressão da perda óssea alveolar inflamatória.

Assim, de acordo com os relatos anteriores, a resposta imune frente aos patógenos periodontais tem como consequência a perda óssea alveolar.

2.2 UTILIZAÇÃO E EFEITOS DOS MEDICAMENTOS ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDIAIS (AINES)

Os AINEs (Anti-inflamatórios Não Esteroidais), segundo Rang et al. (2012), são também chamados de medicamentos como a aspirina, ou analgésicos antipiréticos e estão entre os mais amplamente utilizados de todos os agentes. Existem mais de 50 AINEs diferentes no mercado mundial.

De acordo com os autores, os AINEs proporcionam alívio sintomático da dor e inchaço em doenças crônicas como na osteoartrite e artrite reumatóide, bem como nas doenças inflamatórias mais graves, tais como fraturas, entorses, lesões desportivas e de outros tecidos moles. Também são utilizados no tratamento da dor pós-operatória, dentária, menstrual, nas dores de cabeça e enxaquecas, bem como para outros tipos de dores e as de menor intensidade. Os AINEs "tradicionais"

podem ter efeitos indesejáveis, especialmente nos idosos. Os medicamentos mais novos têm menos reações adversas.

Rang et al. (2012) também declaram que o mecanismo primário de ação dos AINEs está relacionado com sua capacidade de inibir a enzima ciclooxigenase (COX), impedindo assim a produção de prostaglandinas e tromboxanos.

Em relação aos AINEs, Burke, Smyth e FitzGerald (in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006), destacam que todos esses medicamentos, incluindo os inibidores seletivos da COX-2, têm ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética. Segundo os autores, houve várias evidências de que as prostaglandinas participam na patogênese da febre e inflamação. Outras observações demonstraram que as prostaglandinas são liberadas quando as células estão danificadas e que os AINEs inibem a sua biossíntese em todos os tipos de células.

Os autores também afirmam que os principais efeitos terapêuticos dos AINEs dependem da inibição da produção de prostaglandinas. A primeira enzima na via de síntese da prostaglandinas é a prostaglandina G / H sintase, também conhecida como ciclooxigenase ou COX. Esta enzima converte o ácido araquidônico para os intermediários instáveis prostaglandina G₂ (PGG₂) e prostaglandina H₂ (PGH₂) e depois, leva à produção de tromboxano A₂ (TXA₂) e a uma variedade de prostaglandinas.

Complementando, Seibert et al. (1997 apud BURKE; SMYTH; FITZGERALD, in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006), descrevem que existem duas formas de ciclooxigenase: a ciclooxigenase-1 (COX-1) e a ciclooxigenase-2 (COX-2). A COX-1 é encontrada de forma constitutiva na maioria das células e tecidos do organismo, enquanto que as citocinas e mediadores inflamatórios, que acompanham a inflamação, estimulam a produção da COX-2.

FitzGerald e Patrono (2001 apud BURKE; SMYTH; FITZGERALD, in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006) explicam que a COX-1 é a isoforma constitutiva em células epiteliais gástricas e é a principal fonte de formação de prostaglandina citoprotetora. A inibição da COX-1 pode levar aos eventos adversos gástricos do tratamento com AINEs.

Rang et al. (2012) relatam que existem duas isoformas comuns da enzima COX: a COX-1 e COX-2. A COX-1 é uma enzima expressa na maioria dos tecidos, incluindo as plaquetas do sangue. Está envolvida na homeostase dos tecidos, e é responsável pela produção de prostaglandinas com propriedades, por exemplo, de citoproteção gástrica, agregação plaquetária, auto-regulação de fluxo do sangue renal e o início do parto.

Estes autores ressaltam que a COX-2 é estimulada em células inflamatórias quando os tecidos estão lesionados ou infectados, por exemplo, após ação das citocinas inflamatórias, interleucina (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α). Assim, a isoforma COX-2 é responsável pela produção dos prostanóides da inflamação.

Ainda, de acordo com Rang et al. (2012), a COX-2 é constitutiva no SNC(Sistema Nervoso Central) e em outros tecidos mas com função não totalmente clara. Também, Breder et al. (1995 apud BURKE; SMYTH; FITZGERALD, in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006) descrevem que a COX-2 é constitutivamente expressa em certas áreas do rim e do cérebro.

Os AINEs, para Rang et al. (2012), têm três ações terapêuticas importantes, resultantes da supressão da síntese de prostanóides em células inflamatórias através do impedimento da isoforma da COX (ciclooxygenase), a COX-2. São elas: ações anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas

A maioria dos AINEs "tradicionais", segundo Rang et al. (2012), impedem tanto a COX-1 quanto a COX-2, mas variam no grau de inibição de cada isoforma. A ação anti-inflamatória (e, provavelmente, as ações analgésicas e antipiréticas) dos AINEs está relacionada com o bloqueio da COX-2. Já os seus efeitos indesejados, especialmente os que atingem o trato gastrointestinal, são em grande parte devidos à inibição da COX-1. Os pesquisadores também enfatizam os efeitos cardiovasculares de todos os AINEs, quando são tomados por um longo período ou em pacientes com risco cardiovascular pré-existente. Esses fármacos podem aumentar a pressão arterial e predispor a eventos adversos cardiovasculares, como acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio.

A ação anti-inflamatória atribuída aos AINEs, de acordo com os autores, é feita pela diminuição da produção de prostaglandina E2 e prostaciclina (PGI2), derivadas principalmente da COX-2, o que provoca redução da vasodilatação e do aumento de permeabilidade vascular, diminuindo assim o edema local.

Burke, Smyth e FitzGerald (in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006) ressaltam que alguns AINEs são inibidores seletivos para a COX-2; são eles: rofecoxib, celecoxib, valdecoxib, etoricoxib e lumiracoxib. Outros também inibem a COX-2, mas com menor seletividade, como o diclofenaco, o meloxicam e o nimesulida.

Os pesquisadores revelam que os AINEs são classificados como analgésicos suaves atuando na dor pós-operatória ou na dor decorrente de inflamação. O quadro doloroso que acompanha a inflamação e lesão dos tecidos provém da estimulação local de fibras da dor e do aumento da sensibilidade (hiperalgesia). Isso acontece em parte como consequência do aumento da excitabilidade de neurônios centrais na medula espinhal. Então, na dor inflamatória, as prostaglandinas sensibilizam os terminais nociceptivos, aumentando sua excitabilidade. A bradicinina e o ácido láctico são agentes que promovem dor pela estimulação destas terminações.

Rang et al. (2012) relatam o processo do efeito analgésico dos AINEs: ocorre a diminuição da produção de prostaglandina o que resulta em menor sensibilização das extremidades nervosas nociceptivas por mediadores inflamatórios, tais como bradicinina e 5-hidroxitriptamina. Em adição a estes efeitos periféricos, existe uma segunda ação central, menos caracterizada, possivelmente na medula espinhal. O processo inflamatório aumenta a produção de COX-2 e a liberação de prostaglandinas na medula, o que facilita a transmissão a partir de fibras aferentes de dor para os neurônios de retransmissão no corno dorsal.

Os AINEs, de acordo com Burke, Smyth e FitzGerald (in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006), também atuam na febre. Este quadro pode refletir infecção ou ser resultado de danos nos tecidos, inflamação, rejeição de enxerto, ou malignidade. A prostaglandina E2 (PGE2) desencadeia o mecanismo da febre, aumentando o AMP cíclico e estimulando o hipotálamo para elevar a temperatura do corpo, o que promove aumento da geração de calor e diminuição da perda do mesmo. Os AINEs suprimem esta resposta por inibir a síntese de PGE2.

Sobre o efeito antipirético dos AINEs, Rang et al. (2012) esclarecem que, no processo inflamatório, a interleucina-1 (liberada pelos macrófagos) estimula a geração, no hipotálamo, de prostaglandinas que elevam o ponto de ajuste da temperatura, causando a febre. Os AINEs impedem este processo.

Burke, Smyth e FitzGerald (in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006) relatam que os sintomas adversos mais comuns associados com os AINEs “tradicionais” são os gastrointestinais, incluindo anorexia, náusea, dispepsia, dor abdominal e diarreia. Estes sintomas podem induzir a úlceras gástricas ou intestinais, ocorrendo entre 15% a 30% dos consumidores desses medicamentos.

Os estudiosos destacam, também, que o risco relativo de eventos gastrointestinais adversos graves é em torno de três vezes mais elevado em comparação aos não usuários de AINEs. Os pesquisadores observam que todos os inibidores seletivos da COX-2 induzem menor número de úlceras gástricas (visualizadas pela endoscopia) do que doses iguais dos AINEs tradicionais.

Em contrapartida, os mesmos autores relatam que, em indivíduos predispostos às doenças cardiovasculares e tratados com inibidores seletivos da COX-2, houve um aumento de cinco vezes na incidência de enfarte do miocárdio, provavelmente refletindo um risco cardiovascular.

Para Rang et al. (2012), a carga de efeitos secundários indesejados em relação aos AINEs é elevada, principalmente porque são muito utilizados pela população idosa mais vulnerável e por períodos prolongados. Quando usados em doenças articulares (doses altas e de uso contínuo), há uma grande incidência de efeitos colaterais, particularmente no trato gastrointestinal, mas também no fígado, rim, baço, sangue e ossos.

A respeito da lesão gástrica pelos AINEs, Burke, Smyth e FitzGerald (in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006) elucidam que a inibição da COX-1 em células epiteliais gástricas deprime a produção de prostaglandinas citoprotetoras da mucosa, especialmente PGI₂ e PGE₂, prejudicando o estômago. Estes eicosanóides inibem a secreção de ácido no estômago, aumentam o fluxo de sangue na mucosa e promovem a secreção de muco no intestino. Há também

alguma evidência para a patologia gástrica em face da inibição ou supressão prolongada da COX-2.

Os efeitos indesejados mais comuns dos AINEs, de acordo com Rang et al. (2012), são os gastrointestinais, e acredita-se, que resultam da inibição na secreção gástrica de COX-1, a qual é responsável pela síntese das prostaglandinas que inibem a secreção de ácido e protegem a mucosa.

Rang et al. (2012) também descrevem que os agentes seletivos para COX-2 proporcionam ações anti-inflamatórias e analgésicas adequadas com menor dano gástrico. Dois grandes estudos prospectivos compararam os efeitos colaterais gastrointestinais do celecoxib e rofecoxib com os outros AINEs em pacientes com artrite e mostraram algum benefício dos inibidores seletivos para COX-2. Wallace (2000 apud RANG et al., 2012) relata que outros experimentos foram realizados e, com base nessas evidências, mostraram que os inibidores seletivos causam menos danos gástricos do que os não seletivos.

Burke, Smyth e FitzGerald (in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006) observam que os inibidores seletivos de COX-2 deprimem a formação de PGI₂ de células endoteliais. McAdam et al.; Catella-Lawson et al. (1999 apud BURKE; SMYTH; FITZGERALD, in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006) em experimentos com ratos sugerem que a PGI₂ restringe os efeitos cardiovasculares da tromboxano A₂ (TXA₂). Dessa forma, com a administração dos inibidores seletivos, pode-se aumentar o risco de trombose.

Cheng e Harris (2004 apud BURKE; SMYTH; FITZGERALD, in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006) descrevem que os AINEs e os inibidores de COX-2 estão associados com efeitos adversos renais e renovasculares: AINEs têm pouco efeito sobre a função renal e pressão sanguínea em indivíduos normais. Porém, em doentes com insuficiência cardíaca congestiva, cirrose hepática, doença renal crônica, hipovolemia, e outros estados de ativação dos sistemas simpático ou renina-angiotensina, a prostaglandina torna-se essencial conforme apontam Patrono e Dunn (1987 apud BURKE; SMYTH; FITZGERALD, in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006). Todo esse processo leva à retenção de sal e água.

E Burke, Smyth e FitzGerald (in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006) relatam que os inibidores seletivos de COX-2 no rim aumentam a probabilidade de incidência da hipertensão e predisposição para a trombose, pois em experimentos com ratos realizados por Qi et al. (2002 apud BURKE; SMYTH; FITZGERALD, in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006) mostraram a geração de prostaglandinas vasodilatadoras (PGE2 e PGI2) a partir da COX-2.

Os AINEs, quando administrados isoladamente, como explicam Rang et al. (2012), podem aumentar a pressão arterial e, portanto, predispor a eventos cardiovasculares adversos, como acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio. Segundo os autores, isso acontece especialmente após o uso prolongado ou em pacientes com risco cardiovascular pré-existente. A explicação mais provável para este efeito é que a hipertensão arterial é secundária à inibição da COX-2 na região da mácula densa do rim, região secretora de renina. Este efeito adverso dos AINEs em aumentar a pressão arterial, depende da dose e do tempo de tratamento.

A nefropatia por analgésicos é uma condição de insuficiência renal lentamente progressiva e, segundo Burke, Smyth e FitzGerald (in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006) há a diminuição da capacidade de concentração de urina no túbulo renal, e piúria estéril. Os estudiosos ressaltam que os fatores de risco são o uso crônico de altas doses de AINEs e infecções do trato urinário. Se descoberta precocemente, a descontinuação de AINEs leva a recuperação da função renal.

As doses terapêuticas de AINEs em indivíduos normais, segundo Rang et al. (2012), representam pouca ameaça para a função renal, porém, em pacientes suscetíveis, podem causar insuficiência renal aguda, que é reversível com a descontinuação do tratamento. Os prostanóides (PGE2 e PGI2) envolvidos na manutenção do fluxo sanguíneo renal, são inibidos pelos AINEs. Os indivíduos mais afetados são os recém-nascidos, idosos, assim como os pacientes com insuficiência cardíaca, doença hepática ou renal.

Os autores alertam que o consumo de AINEs por períodos longos, pode causar nefropatia analgésica, caracterizada por nefrite crônica e necrose papilar renal. O uso regular de doses prescritas de AINEs é menos perigoso para os rins do que o uso em altas doses e por tempo prolongado.

Rang et al. (2012) elucidam que reações cutâneas são efeitos indesejados idiossincráticos comuns dos AINEs, em especial do ácido mefenâmico (frequência de 10-15%) e sulindac (frequência de 5-10%). Podem variar de erupções eritematosas leves, urticária, reações de fotossensibilidade e doenças mais graves, incluindo síndrome de Stevens-Johnson (uma erupção cutânea com bolhas que se estende até o intestino) e necrólise epidérmica tóxica, caracterizada por necrose epitelial generalizada, acontecendo raramente.

Burke, Smyth e FitzGerald (in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006) apontam que certos indivíduos exibem hipersensibilidade à aspirina e outros AINEs. Os sintomas variam de rinite vasomotora com secreção aquosa profusa, angioedema, urticária generalizada, asma brônquica, edema de laringe, broncoespasmo, rubor, hipotensão e choque. A intolerância à aspirina pressupõe contra-indicação para o uso de qualquer outro AINE porque a sensibilidade cruzada pode provocar uma reação fatal parecida com choque anafilático. Apesar da semelhança com a anafilaxia, estas reações não parecem ser de origem imunológica.

Aproximadamente 5% dos pacientes expostos aos AINEs e sensíveis à aspirina podem ter asma, ressaltam Rang et al. (2012). O mecanismo é desconhecido, mas a inibição da COX está relacionada. Outros efeitos indesejáveis dos AINEs, muito menos comuns, são sobre o SNC (Sistema Nervoso Central), distúrbios da medula óssea e distúrbios do fígado (mais provável se já existe insuficiência renal).

2.2.1 AINES COM RELATIVA SELETIVIDADE PARA A COX-2

Conforme já explanado anteriormente, segundo Burke, Smyth e FitzGerald (in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006), alguns AINEs são inibidores seletivos para a COX-2; são eles: rofecoxib, celecoxib, valdecoxib, etoricoxib e lumiracoxib. Outros também inibem a COX-2, mas com relativa seletividade, como o diclofenaco, o meloxicam e o nimesulida. O **nimesulida**, de acordo com os autores, é um composto da classe das sulfonanilidas e tem seletividade para a COX-2 semelhante ao celecoxib. Dentre seus efeitos, destaca-se a inibição da ativação de neutrófilos, diminuição na produção de citocinas, diminuição na produção de

enzimas de degradação e, há a possibilidade também da ativação de receptores de glicocorticóides.

Segundo os estudiosos, o **nimesulida** é anti-inflamatório, analgésico e antipirético e tem uma baixa incidência de efeitos adversos gastrointestinais, mas pode estar associado a eventos cardiovasculares e cerebrovasculares.

Bjarnason (2007) esclarece em seu trabalho que o **nimesulida** é um AINE com atividade preferencial sobre a COX-2. Dessa forma, este fármaco tem uma segurança gastrointestinal maior que os outros AINEs.

Sobre a ação analgésica do **nimesulida**, Tassorelli et al. (2003), relatam em um estudo com modelos animais de dor, que a COX-2 é encontrada no sistema nervoso central com expressão significativa, onde há a possibilidade da COX-2, conjuntamente com o óxido nítrico, ter um papel importante na transmissão nociceptiva espinhal. Com este experimento, foi possível ter informações adicionais sobre as características do efeito analgésico do **nimesulida**, com especificidade central.

Werner, Souza e Zampronio (2006) descrevem a ação do **nimesulida** sobre a febre. Eles avaliam, em um estudo com ratos, a atividade antipirética deste fármaco: houve a redução da febre induzida por MIP-1 α (proteína inflamatória de macrófagos-1 α) e também dos níveis plasmáticos de TNF- α (fator de necrose tumoral α) pela administração do **nimesulida**.

Já Kerola et al. (2009), em seu estudo, descrevem que os inibidores seletivos da COX-2 reduzem o risco de eventos adversos gastrointestinais, mas aumentam o risco de eventos tromboembólicos. Os autores também ressaltam que num estudo randomizado duplo cego cruzado em indivíduos saudáveis, foram colhidas amostras de sangue antes e 1, 3, 6, 24 e 48 horas após a administração das drogas ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, nabumetona e **nimesulida** para a avaliação da atividade da COX-1 e da COX-2. Esse estudo evidenciou que o **nimesulida** causou supressão quase total da atividade da COX-2 e uma redução parcial da atividade da COX-1, confirmando a relativa seletividade do **nimesulida** sobre a COX-2.

O **nimesulida** tem destaque pela sua frequência nas prescrições dos consultórios odontológicos. Segundo Avelar et al. (2012), na remoção de terceiros molares, o **nimesulida** demonstrou ser eficaz contra dor e inchaço com poucos efeitos adversos. Enquanto De Menezes e Cury (2010) afirmam que o **nimesulida** apresentou resultado satisfatório sobre o controle do inchaço e trismo, após a extração de terceiros molares inferiores impactados.

Levrini et al. (2008), em um estudo sobre a prescrição de AINEs para pacientes submetidos à cirurgia de terceiro molar, relatam que o **nimesulida** é o AINE mais prescrito (68%) seguido por diclofenaco, cetoprofeno e ibuprofeno. Os resultados desse estudo apontam para as ações anti-inflamatórias e analgésicas conhecidas do **nimesulida** nesse tipo de cirurgia e também como fármaco de referência para o tratamento da dor pós-operatória dentária.

O **nimesulida**, conforme relatado em um estudo multicêntrico duplo-cego por Binning (2007) em cirurgia artroscópica de joelho, demonstra ser eficaz com atividade anti-inflamatória e analgésica, de ação rápida e bem tolerado.

Também é observado por Rainsford (2006), em uma revisão de estudos com modelos de animais de laboratório e em ensaios clínicos, que o **nimesulida** é um potente analgésico, anti-inflamatório e antipirético. O autor ainda ressalta no estudo que:

Ele foi aprovado para uso em mais de 50 países em todo o mundo (incluindo aqueles na União Europeia, América do Sul e Central, China, Índia e alguns outros do Sudeste Asiático) para o tratamento da dor aguda.(2006, p.120).

No trabalho de Rainsford et al. (2006) foram descritas as atividades analgésicas, anti-inflamatórias e antitérmicas do **nimesulida**. É também ressaltado o mecanismo multifatorial de ação deste fármaco com características farmacocinéticas e químicas únicas. Fica concluído nesse estudo que o **nimesulida** é uma opção eficaz e segura para as condições inflamatórias dolorosas, com rápido início de atividade analgésica e perfil risco/benefício positivo.

Apesar da eficácia do **nimesulida** em relação à dor e à inflamação, são relatadas reações adversas, principalmente hepáticas graves. Mattia et al. (2010, p. 285) descrevem que:

Em relação ao risco de reações hepáticas graves, o perfil de benefício / risco da nimesulida foi considerado por autoridades reguladoras europeias semelhantes a outros AINEs.

Yang et al. (2010), em seu estudo, apontam que o **nimesulida**, um fármaco amplamente utilizado, tem sido associado à rara hepatotoxicidade idiossincrática. A geração de espécies reativas do **nimesulida** pode contribuir para sua toxicidade.

Lee, Wang e Chen (2010) realizaram um estudo para determinar a associação entre o uso de AINEs e aumento de hospitalizações relacionadas com hepatite aguda. Foram incluídos nesse estudo pacientes hospitalizados com diagnóstico principal de necrose aguda ou subaguda do fígado ou hepatite tóxica e de causas virais. Nas hospitalizações relacionadas com hepatite aguda, as por consequência dos AINEs foram significativamente aumentadas. Os resultados desse estudo indicam evidências de um aumento do risco de hospitalizações com hepatite aguda entre os usuários dos AINEs.

De acordo com Licata et al. (2010), a lesão hepática induzida por drogas é a causa mais comum de morte por insuficiência hepática aguda, e é responsável por aproximadamente 13% dos casos de insuficiência hepática aguda nos Estados Unidos. Nesse estudo, os resultados apontam o seguinte: que dos pacientes internados com diagnóstico de lesão hepática induzida por drogas, os que apresentaram icterícia e insuficiência hepática foram todos atribuídos ao **nimesulida**. A icterícia, lesão hepática mais encontrada, foi preponderantemente induzida por **nimesulida** em comparação aos outros fármacos. Os medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais, psicotrópicos e antimicrobianos são as causas mais comuns de lesão hepática induzida por drogas. A lesão hepática induzida pelo **nimesulida** é geralmente reversível com a descontinuação da droga, mas pode evoluir para insuficiência hepática.

Em um estudo de coorte retrospectivo na unidade de transplante de fígado nacional irlandês, realizado por Walker et al. (2008), foram avaliados todos os pacientes que receberam transplante de fígado por insuficiência hepática fulminante. Os casos tinham causa desconhecida e foram observados no período de janeiro de 1994 a março de 2007. Os medicamentos administrados nos 6 meses anteriores ao transplante foram identificados. Em 32 casos de insuficiência hepática fulminante

que evoluíram para o transplante, 6 utilizaram o **nimesulida** nos últimos 6 meses. Os autores observaram que o **nimesulida** pode estar associado à insuficiência hepática fulminante e, dessa forma, é necessária uma investigação mais aprofundada.

A taxa de insuficiência hepática induzida por drogas, de acordo com Dastis et al. (2007) varia entre 1-12% para as indicações de transplante de fígado. As drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs) e os antibióticos são os compostos frequentemente envolvidos. No levantamento desse estudo, com 57 casos de insuficiência hepática aguda, onde houve transplante hepático, cinco foram relacionados a danos no fígado induzidos pelos AINEs, sendo três devido ao uso de **nimesulida**.

Face aos estudos descritos, fica evidenciado que o uso do **nimesulida** é amplo e com ações analgésicas, antipiréticas e anti-inflamatórias. Porém, outros trabalhos relatam os efeitos adversos do **nimesulida**, principalmente em relação ao comprometimento do fígado.

Conforme já foi relatado, os AINEs possuem propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas. Dessa forma, são indicados para a patologia periodontal, doença com características inflamatórias que pode evoluir até ao dano ósseo como será descrito a seguir.

2.2.2 AINEs, DOENÇA PERIODONTAL E PERDA ÓSSEA

Queiroz Junior et al. (2009) investigaram o papel dos inibidores de ciclo-oxigenases (COX - 1 e COX - 2) em um modelo de doença periodontal em ratos: a administração sistêmica e local de inibidores não-seletivos e seletivos da COX-2 resultou em uma significativa diminuição das perdas de fixação de fibras e do osso alveolar e também do número de leucócitos no tecido gengival. Já a inibição seletiva preventiva da COX-1 foi tão eficaz como a da COX-2 na redução da perda de inserção das fibras e da migração de células, mas não evitou a perda óssea alveolar.

Já O'Connor e Lysz (2008) relatam que as ciclooxygenases e as prostaglandinas são reguladores críticos do metabolismo ósseo normal e da inflamação e que o uso ocasional e repetido dos AINEs é prejudicial para a saúde do esqueleto. Eles completam que alguns dados clínicos sugerem que o uso crônico de celecoxib pode levar à diminuição da densidade mineral óssea em indivíduos mais velhos do sexo masculino e que alguns experimentos mostraram os efeitos negativos dos AINEs sobre a cicatrização de tecido esquelético.

Os pesquisadores acrescentam ainda que a inibição pelo celecoxib parece comprometer sensivelmente a consolidação da fratura e a cicatrização do tendão e do osso e que a atividade da ciclooxygenase está relacionada com a cura de vários tecidos esqueléticos, direta ou indiretamente, através da modulação da resposta inflamatória. Assim, a inibição da ciclooxygenase usando AINEs ou o celecoxib pode alterar a saúde do esqueleto.

Os estudiosos Oliveira et al. (2008) realizaram uma pesquisa com 120 ratos Wistar submetidos à colocação de ligadura de seda na margem gengival do primeiro molar inferior direito. Os animais foram separados aleatoriamente em grupos 1 (controle) e 2 (meloxicam, 3 mg / kg / dia, por via intraperitoneal , por 3, 7 , 14 ou 30 dias). Foi observada uma redução na reabsorção óssea alveolar no grupo tratado com meloxicam em comparação com o grupo controle em todos os tempos estudados e o meloxicam reduziu significativamente o aumento da expressão do RNAm do VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular) em tecidos doentes , após 14 dias de tratamento.

Nesse experimento os estudiosos também ressaltam que a análise por IHC (imuno-histoquímica) revela que a expressão da proteína VEGF foi maior em tecidos doentes e diminuiu em tecidos de ratos tratados com meloxicam. Eles sugerem um papel importante para o VEGF na progressão da doença periodontal e que a terapia sistêmica com meloxicam pode reduzir a expressão do VEGF e a perda óssea alveolar.

Os AINEs, quando utilizados por tempo prolongado, segundo Esch, Kool e As (2013), podem ter um papel negativo em fraturas ósseas, interferindo na síntese de prostaglandinas e atuando na promoção da reabsorção óssea. Os autores complementam que vários estudos apontam que os AINEs seletivos ou não

seletivos estão relacionados com perturbações imunológicas, com o metabolismo ósseo e com a inibição da cicatrização óssea.

Já Karakawa et al. (2010) destacam que os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) atuam não só contra a inflamação, mas também na infra-regulação da remodelação óssea. Quando os osteoclastos provenientes de células-tronco hematopoiéticas foram tratados com diclofenaco houve a supressão da reabsorção óssea osteoclástica. Os resultados desse estudo sugerem que o mecanismo do diclofenaco para a remodelação óssea está associado com redução do fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB) fosforilado, que regula a diferenciação e ativação dos osteoclastos.

Um estudo feito por Camilotti et al. (2005) analisou o efeito dos AINES na perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos, através da avaliação radiográfica. Os animais foram submetidos à administração de solução salina, cetoprofeno e meloxicam em diferentes períodos, após a colocação das ligaduras. Decorridos 38 dias, os animais foram eutanasiados, suas mandíbulas foram removidas e radiografadas.

De acordo com os resultados desse experimento, não foi observada diferença estatística significativa entre os diferentes períodos de aplicação para o cetoprofeno e o meloxicam e ambos os medicamentos não alteraram a perda óssea alveolar na periodontite induzida por ligadura em ratos de acordo com avaliação radiográfica.

Diante do cenário apresentado, faz-se necessária a busca de novas terapêuticas eficazes e com o mínimo de efeitos indesejáveis descritos, especialmente porque a sociedade vivencia um contexto em que, a busca por terapias menos agressivas tem sido amplamente divulgada pelos veículos de comunicação.

A respeito de terapêuticas menos agressivas, destaca-se que uma forma de tratamento que pode significar uma opção viável para dor e inflamação representando, s.m.j., uma solução segura e eficaz, é a Homeopatia, cujos fundamentos estão descritos a seguir.

2.3 PESQUISAS E EXPERIMENTOS COM MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS

A **Homeopatia**, terapêutica que teve origem na Alemanha em meados do século XVIII, apresenta um conjunto de princípios, fundamentos e experiências cotidianas. Dessa maneira, são observados os atributos da eficácia e de poucos eventos adversos. Através dessa terapêutica podem ser assegurados resultados satisfatórios, como relatados na sequência.

A **Homeopatia** baseia-se no modelo vitalista, de acordo com Teixeira (2006), Hahnemann atribuiu ao princípio vital o poder de regular as sensações e funções fisiológicas, desde que o organismo permaneça no estado de saúde. A doença estaria relacionada a um desequilíbrio desta força vital e a saúde seria restabelecida com o reequilíbrio vital.

O estudioso acrescenta que, de acordo com Hahnemann, este desequilíbrio vital estaria relacionado às doenças e sua progressão, representado pelos sinais e sintomas observados.

Para Sousa (2012), a **Homeopatia** é citada por Petit Robert, como método terapêutico que trata os doentes com medicamentos em doses infinitesimais obtidas por diluição e que são capazes de produzir num indivíduo são, sintomas semelhantes aos da doença que se quer combater.

Corrêa, Siqueira-Batista e Quintas (1997) relatam que o criador da **Homeopatia**, Hahnemann, clinicou durante algum tempo, mas estava insatisfeito com a medicina tradicional. Dessa forma, optou por trabalhar traduzindo livros médicos.

Segundo os mesmos autores, em 1790, durante a tradução da *Matéria Médica*, de William Cullen, Hahnemann ficou intrigado com os efeitos terapêuticos da quina. Experimentou em si mesmo e teve manifestações muito semelhantes aos sintomas da malária. Assim, ele concluiu que a quina era utilizada no tratamento da malária porque produzia sintomas semelhantes em pessoas saudáveis. Ele utilizou outras substâncias e obteve resultados semelhantes, idealizando, então, uma nova forma de tratamento fundamentada na “Cura pelos Semelhantes”.

Com a descoberta do poder do quinino e do mercúrio de produzirem os sintomas da doença e também o poder de cura, de acordo com Sousa (2012), Hahnemann fez uma reflexão, podendo ser chamada de “lei de cura”.

Teixeira (2006) descreve a **Experimentação no indivíduo sadio** proposta por Hahnemann como o método para se adquirir o conhecimento das propriedades curativas das substâncias, utilizando o princípio da “Cura pelos Semelhantes”.

O autor também destaca em seu estudo o seguinte trecho do Organon (1995, p.209)¹:

Todos os efeitos patogenéticos de cada medicamento precisam ser conhecidos, isto é, todos os sintomas e alterações mórbidas da saúde que cada um deles é especialmente capaz de provocar no homem sadio devem ser primeiramente observados antes de se poder esperar encontrar e escolher, entre eles, o meio de cura homeopático adequado para a maioria das doenças naturais.

Múrias (2009) observa que a **Homeopatia** se baseia também nas doses mínimas, ou seja, na dinamização da substância, onde é possível ter a potência da contra-doença sem prejudicar o organismo.

O estudioso também ressalta que a característica principal das preparações homeopáticas está na administração de doses mínimas e extremamente diluídas e que os princípios ativos exercem sua atividade pela dinâmica do processo da diluição.

Para evitar as intoxicações e as agravações medicamentosas que as substâncias aplicadas de acordo com o princípio da similitude poderiam causar, Teixeira (2006) explica que Hahnemann propôs um método farmacotécnico denominado “dinamização”, onde as substâncias eram diluídas e agitadas sucessivamente, observando a ocorrência da atividade biológica destas preparações nas diversas esferas da individualidade humana.

Sousa (2012) enfatiza que esta nova terapia desenvolvida por Hahnemann fundamenta-se em dois princípios básicos: o princípio dos similares e a

¹ Informações extraídas do livro “Organon da Arte de Curar”, obra fundamental da doutrina homeopática, por seu fundador Samuel Hahnemann.

utilização de diluições chamadas de “infinitesimais”. A autora observa as diferenças entre a medicina convencional e a **Homeopatia**, onde não importa que várias patologias se apresentem com sintomas idênticos, pois a **Homeopatia** trata o doente e não a doença.

Sousa (2012) também destaca que a **Homeopatia** é indicada tanto para casos agudos quanto crônicos, físicos, emocionais ou mentais, sendo utilizadas potências diferentes. A **Homeopatia** auxilia o organismo a curar-se a si mesmo, não bloqueia os sintomas. Os medicamentos estimulam a autodefesa, fortalecendo o sistema imunológico, utilizando produtos com maior ação e mais diluídos, apresentando menor toxicidade e sem efeitos secundários.

Em seu trabalho, Sousa (2012) também ressalta que “A grande popularidade da homeopatia deve-se ao êxito que teve no tratamento de doenças epidêmicas que passaram pelo mundo todo”.

Esta terapêutica teve grande expansão por várias regiões do mundo, e atualmente está firmemente implantada em diversos países da Europa, das Américas e da Ásia. No Brasil, a **Homeopatia** foi trazida por Benoit Mure, em 1840, como uma nova opção de tratamento (POLÍTICA NACIONAL DE PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES NO SUS, 2006).

Ainda, segundo esta política, é importante salientar a história da Homeopatia no Brasil, ou seja:

Em 1979, é fundada a Associação Médica Homeopática Brasileira (AMHB); em 1980, a homeopatia é reconhecida como especialidade médica pelo Conselho Federal de Medicina (Resolução Nº 1000); em 1990, é criada a Associação Brasileira de Farmacêuticos Homeopatas (ABFH); em 1992, é reconhecida como especialidade farmacêutica pelo Conselho Federal de Farmácia (Resolução Nº 232); em 1993, é criada a Associação Médico-Veterinária Homeopática Brasileira (AMVHB); e em 2000, é reconhecida como especialidade pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (Resolução Nº 622). (2006, p. 16).

A **Homeopatia**, de acordo com Sousa (2012), consiste num sistema terapêutico preventivo e funcional abrangendo o Homem como um todo (mente e corpo). A autora acrescenta que o método homeopático é contestado pelos médicos, porque é contrário aos tratamentos tóxicos e apresenta soluções modernas para velhos problemas e uma perspectiva inovadora de tratamento.

Na atualidade, conforme afirma a estudiosa, a popularidade da **Homeopatia** aumenta continuamente, evidenciando um renascimento considerável e cada vez maior entre as populações, principalmente, do ocidente.

Dentre os medicamentos homeopáticos utilizados para dor, inflamação e também com outras indicações, a **Arnica montana** tem mostrado eficácia com resultados satisfatórios.

A **Arnica montana**, de acordo com Allen (1995), é indicada para os efeitos resultantes de traumatismos mecânicos, mesmo quando ocorridos há muitos anos. O autor ressalta ainda:

Sensação dolorosa, de contusão, claudicante, por todo o corpo, como se estivesse sido golpeado; afecções traumáticas dos músculos... Após ferimentos com instrumentos obtusos. Fraturas expostas com supuração profusa. Concussões e contusões, resultantes de choque ou ferimento; sem laceração de partes moles; evita a supuração e condições sépticas, promovendo a absorção. (1995, p. 43)

Cairo (1994) enfatiza que a **Arnica montana** é utilizada para prevenir a supuração, a septicemia e as equimoses resultantes das intervenções cirúrgicas. O estudioso ainda acrescenta que a **Arnica** também tem indicação para a dor odontológica, consequente de operações dentárias.

Robertson, Suryanarayanan e Banerjee (2007), em um estudo duplo-cego randomizado, placebo controlado com 190 pacientes que passaram por amigdalectomia e randomizados em grupos recebendo **Arnica** 30CH e placebo. O grupo que recebeu **Arnica** teve uma queda significativa na pontuação da dor maior a partir do dia 1 ao dia 14, em comparação com o grupo placebo. Os resultados desse estudo sugerem que a **Arnica montana** dada após amigdalectomia oferece uma pequena, mas estatisticamente significativa, diminuição nos escores de dor em relação ao placebo.

Brinkhaus et al. (2006) descrevem três estudos randomizados, duplo-cegos controlados com placebo, em pacientes que sofrem de problemas no joelho que exigiram a cirurgia artroscópica. Antes da cirurgia, os pacientes receberam 5 glóbulos de **Arnica** 30X homeopática (uma diluição de 1:10 homeopática) ou placebo uma vez ao dia. Após a cirurgia, os pacientes receberam 5 glóbulos três

vezes ao dia. Nos resultados, a **Arnica** homeopática teve um efeito benéfico em relação ao placebo na reconstrução do ligamento cruzado e em todos os três estudos, os doentes que tomaram a **Arnica** homeopática mostraram uma menor tendência de inchaço pós-operatório em comparação com pacientes que receberam placebo.

Karow et al. (2008) relatam em um estudo randomizado, duplo-cego, o papel da **Arnica** D4 (tomado por via oral, três vezes por dia) e do diclofenaco sódico, 50 mg (tomado por via oral, três vezes por dia) em cicatrização após cirurgia do Hallux valgus (popularmente conhecido como joanete) . A análise descritiva mostrou que a **Arnica** D4 é superior em relação à mobilidade dos pacientes. Os resultados também mostraram que a **Arnica** D4 foi expressivamente melhor tolerada do que o diclofenaco. Fica concluído nesse estudo, que após as cirurgias de pé a **Arnica** D4 pode ser utilizada em vez de diclofenaco para cicatrização da ferida.

Já Jeffrey e Belcher (2002) fizeram um estudo randomizado duplo-cego de comparação da administração de **Arnica** homeopática com placebo em cirurgia do túnel do carpo. Os autores chegaram em um resultado de redução significativa na dor após 2 semanas da cirurgia no grupo tratado com **Arnica**.

Uma revisão da literatura foi feita por Bevilaqua (2003) sobre o medicamento homeopático **Arnica montana** e seus efeitos no tratamento da dor e edema pós-operatórios de cirurgia buco-maxilo-facial. O pesquisador concluiu que a maioria dos autores consideraram eficiente o medicamento homeopático **Arnica montana** no combate à dor e edema pós-operatórios.

Souza et al. (2011) desenvolveram um trabalho de pesquisa experimental, cruzado, randomizado, duplo-cego, com 30 alunos voluntários do curso de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe, com presença de dentes inclusos bilaterais, perfazendo um total de 120 dentes, onde foi indicada a mesma técnica cirúrgica exodôntica. Procedeu-se à divisão em 2 grupos: Grupo A: os que utilizaram a **Arnica montana 6CH** e Grupo D: os que utilizaram diclofenaco de sódio 50mg. Os pesquisadores concluíram nesse estudo que o medicamento homeopático **Arnica montana 6 CH** possui eficácia no controle do edema pós-extração de terceiros molares inclusos e mostrou equivalência quando comparada ao diclofenaco de sódio 50mg.

Uma revisão de literatura foi realizada por Capote et al. (2009) para aprofundar o conhecimento da terapêutica homeopática e sua aplicação em odontologia, bem como discorrer sobre os princípios básicos que sustentam esta doutrina, os principais medicamentos e suas indicações estomatológicas. Segundo os autores, vários medicamentos homeopáticos são utilizados em odontologia, dentre eles a **Arnica montana**. Este fármaco está indicado para a prevenção e tratamento de contusões, hematomas e sangramento, podendo ser utilizado antes da cirurgia oral e traumas para tecidos duros e moles.

Fernandez et al. (2002) descreveram um experimento em que 45 pacientes de ambos os sexos com idades entre 16 a 49 anos foram tratados. Estas pessoas participaram do Serviço de Cirurgia Maxilofacial com o diagnóstico clínico de edema facial traumático. Trinta pacientes foram tratados com **Arnica** homeopática e quinze pacientes foram tratados com piroxicam (grupo controle). Em relação à redução do edema, a **Arnica** mostrou eficácia em 96,6% e o piroxicam em 66,7% dos pacientes estudados.

A Homeopatia, como já foi explanado anteriormente, através de suas características peculiares pode ser utilizada em casos agudos e crônicos. Dessa forma pode ser empregada como terapêutica na Doença periodontal e na perda óssea como será explanado na sequência.

2.3.1 MEDICAMENTOS HOMEOPÁTICOS, DOENÇA PERIODONTAL E PERDA ÓSSEA

Mourão, Moutinho e Canabarro (2013) tiveram em sua pesquisa o objetivo de avaliar os benefícios da medicina homeopática como um adjuvante ao tratamento periodontal convencional. Sessenta indivíduos de ambos os sexos e idades variando entre 35 e 70 anos, 40 com periodontite crônica (grupo PC - CPG) e 20 sem PC (Grupo saudável - HG) participaram deste "Ensaio Clínico duplo-cego, randomizado e controlado". Os pacientes com PC foram divididos em dois grupos: um foi submetido apenas ao tratamento periodontal convencional e o outro grupo foi submetido ao tratamento periodontal convencional e homeopatia.

Foram utilizados os seguintes medicamentos homeopáticos: *Berberis* 6CH (medicamento depurativo), *Mercurius solubilis/Belladonna/Hepar sulphur* 6CH (para os sinais e sintomas das lesões locais) e *Pyrogenium* 200 CH (para estimulação da energia do indivíduo).

Após 90 dias, em relação ao nível de inserção clínica, houve um ganho significativo para o grupo que teve o tratamento periodontal convencional e homeopatia. A respeito dos outros parâmetros clínicos avaliados (profundidade de sondagem, índice de placa e sangramento à sondagem) houve redução em ambos os grupos com tratamento periodontal convencional tratados com homeopatia e os não tratados.

Dessa forma, concluiu-se nesse estudo que a medicina homeopática pode ser um adjuvante ao tratamento periodontal convencional, e fornecer benefícios adicionais ao mesmo.

Farina (2010) fez um estudo comparativo entre a ação do medicamento homeopático *Calcarea phosphorica* 6CH (CP) e o medicamento alopático alendronato (A) na reparação óssea em ratas ovariectomizadas. Foram utilizados quatro grupos de 30 ratas, sendo três grupos submetidos à ovariectomia (OVZ) e um à cirurgia sham. Após 60 dias procedeu-se a uma lesão mono cortical nas tíbias de todas as ratas e os tratamentos foram iniciados: I- OVZ/tratado com A (1,2 mg/ml, três vezes por semana/animal), II- OVZ/tratado com CP (2 glóbulos/1 ml água/dia/animal), III- OVZ/tratado com água (1 ml/dia/animal) e IV- sham tratado com água (1 ml/dia/animal). Após a eutanásia dos animais, as tíbias foram removidas e fixadas em formol 10%, submetidas à análise radiográfica, descalcificadas e submetidas à análise histológica/histomorfométrica.

O pesquisador observou que a quantidade de osso ao final do experimento foi semelhante entre os grupos. O alendronato estimulou a formação inicial do osso em grande quantidade e também o tecido ósseo apresentou resistência à remodelação. Em relação à *Calcarea phosphorica* houve menor formação óssea inicial, mas aumentou até o final do experimento. Conclui-se nesse estudo que o alendronato foi a melhor escolha para tratar as lesões ósseas, e, a *Calcarea phosphorica* melhor do que a ausência de tratamento.

Conforme a exposição dos autores, a homeopatia pode auxiliar no tratamento periodontal convencional e promover um ganho acessório na terapêutica. Em relação à perda óssea, o medicamento homeopático pode fomentar o aumento do desenvolvimento ósseo.

2.4 PESQUISAS E EXPERIMENTOS COM MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

Outra terapêutica que pode ser uma opção segura e com menos efeitos colaterais que os AINEs é a **Fitoterapia**. A utilização das **plantas medicinais** remonta desde a antiguidade e sempre foi muito difundida na cultura popular, principalmente pelo baixo custo e bons resultados.

A **Fitoterapia** é uma terapêutica que utiliza **plantas medicinais** em suas diferentes formas farmacêuticas, compostas de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal. O uso de **plantas medicinais** é uma forma de tratamento de origem muito antiga, relacionada aos primórdios da medicina e com princípios baseados no acúmulo de informações por sucessivas gerações. Com o passar dos séculos, produtos de origem vegetal constituíram as bases para tratamento de diferentes enfermidades. (POLÍTICA NACIONAL DE PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES NO SUS, 2006).

Tomazzoni, Negrelle e Centa (2006, p.116) descrevem que:

As plantas medicinais representam fator de grande importância para a manutenção das condições de saúde das pessoas. Além da comprovação da ação terapêutica de várias plantas utilizadas popularmente, a fitoterapia representa parte importante da cultura de um povo, sendo também parte de um saber utilizado e difundido pelas populações ao longo de várias gerações.

A história do uso de **plantas medicinais**, segundo os autores, indica que elas fazem parte da evolução e foram as primeiras ferramentas terapêuticas utilizadas pelos povos. Nas antigas civilizações, muito antes de qualquer forma escrita, o homem já utilizava as plantas, algumas como alimento e outras como remédio. Nas suas experiências com ervas, tiveram êxitos e fracassos. Muitas vezes, algumas curavam e outras matavam ou produziam eventos adversos graves.

A utilização da **Fitoterapia**, segundo Rezende e Cocco (2002), que significa o tratamento pelas plantas, vem desde épocas antigas. A referência mais antiga data de mais de sessenta mil anos. As primeiras descobertas foram feitas nas ruínas do Irã em estudos arqueológicos. Na China, em 3.000 a.C., já existiam registros que reuniam as ervas e as suas aplicações terapêuticas. A utilização das **plantas medicinais** faz parte da história da humanidade, com relevância principalmente aos aspectos medicinais e culturais.

No Brasil, de acordo com Tomazzoni, Negrelle e Centa (2006), a história do uso das plantas no tratamento de doenças apresenta influências africana, indígena e européia. Porém, com o advento da industrialização, principalmente quanto à elaboração de fármacos sintéticos, a população aumentou a utilização destes medicamentos, deixando-se de lado o conhecimento tradicional das **plantas medicinais**, vistas como atraso tecnológico.

O surgimento de uma medicina popular com uso das plantas no Brasil, conforme Rezende e Cocco (2002), deve-se aos índios e também com a colaboração dos negros e europeus. A consolidação desta terapia de cura surgiu dos conhecimentos dos indígenas, jesuítas e fazendeiros. Este processo de miscigenação gerou uma valiosa bagagem de usos das **plantas medicinais**, que resistiram até a atualidade.

Atualmente este cenário começa a ser modificado: as drogas sintéticas ainda representam a maioria dos medicamentos utilizados pela população, mas, os **fitoterápicos** têm conseguido novamente lugar na rotina terapêutica das pessoas e isto tem aumentado gradativamente, conforme salientam Tomazzoni, Negrelle e Centa (2006).

Tomazzoni, Negrelle e Centa (2006) destacam a utilização das **plantas medicinais**, onde, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), é considerada a principal opção terapêutica, por aproximadamente 80% da população mundial. O mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de US\$22 bilhões por ano. Em 2000 o setor faturou US\$ 6,6 bilhões nos EUA e US\$ 8,5 bilhões na Europa. No Brasil calcula-se que o comércio de fitoterápicos seja em torno de 5% do mercado total de medicamentos, estimado em mais de US\$ 400 milhões.

O aumento do consumo de **fitoterápicos**, de acordo com os autores, pode estar associado ao fato de que as populações estão mais conscientes dos perigos do uso abusivo e irracional de produtos farmacêuticos e, muitas vezes, optam pelo uso das **plantas medicinais**. A comprovação da ação terapêutica destes fármacos naturais também favorece essa conduta. Os autores acrescentam que, em 1978, a OMS, através de uma Assembléia Geral, determinou o início do programa mundial da chamada “medicina tradicional”. Desta forma, a OMS tem incentivado os países a identificar e explorar os vários aspectos desta medicina tradicional.

Desde 1978, a OMS tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de **plantas medicinais** no âmbito sanitário, pois 80% da população mundial utilizam estes vegetais ou suas preparações na atenção primária de saúde. (POLÍTICA NACIONAL DE PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES NO SUS, 2006).

Rezende e Cocco (2002) ressaltam que a OMS já reconhece na atualidade o valor da **fitoterapia**, por ser uma alternativa viável e importante também para as populações dos países em desenvolvimento, pois seu custo é menor. Os autores destacam que é importante a participação dos profissionais de saúde na **fitoterapia**, proporcionando uma integração do conhecimento do sistema de saúde oficial ao popular, pois as terapias alternativas podem oferecer muito, principalmente com a contribuição para as ciências da saúde.

Nos últimos dez anos, de acordo com Bufaino (2013), a legislação brasileira para medicamentos fitoterápicos evoluiu muito em vários aspectos, aproximando-se das diretrizes internacionais. Dentre as várias regras que demonstram tal progresso, temos: melhor controle de matéria-prima e ervas medicinais, criação de leis para padronizar os estudos de estabilidade (RE 1/2005), orientação para realizar estudos de toxicidade pré-clínica de ervas (RE 90/2004) e bulas padronizadas para medicamentos a base de ervas(RDC 47/09).

Segundo a autora, as iniciativas são muitas a fim de estimular o uso de medicamentos à base de plantas no país: foi aprovada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos - PNPMF (Decreto 5.813/06), a aprovação do programa e criação do Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

(Portaria 2960/08) e a ratificação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (Sistema Único de Saúde) (Portaria 971/2006).

A estudiosa também destaca que a aprovação PNPMF tem motivado uma série de novas diretrizes e iniciativas para apoiar a política e criar uma base técnica, com o propósito de orientar e padronizar os medicamentos fitoterápicos no Brasil.

Com a consolidação da **terapêutica fitoterápica**, principalmente nos aspectos de qualidade e eficácia, é possível a aplicação destes fármacos na prática diária. A **Arnica montana** é uma planta que tem destaque com indicações para dor e inflamação entre outras, como será apresentado a seguir.

Verma et al. (2010) descrevem em seu trabalho uma experiência realizada com 14 extratos de ervas medicinais, entre eles o de **Arnica montana**, onde houve avaliação quanto à atividade anti-inflamatória. Foi observado neste estudo o potencial anti-inflamatório destes extratos de plantas: em quatro extratos (entre eles o de Arnica) houve a inibição do óxido nítrico (NO), da ciclooxigenase-2 (COX-2) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa).

As desordens musculares geralmente estão presentes na Disfunção Temporomandibular (DTM), conforme ressaltam Quinelato, Balduino e Guimarães (2011). Os principais sintomas são dor e edema devido à lesão tecidual e à inflamação. Os autores relatam que a **Arnica montana** tem sido usada para redução de inflamação e dor causada por entorse, contusões e ferimentos. Ela tem como ação principal a inibição da ativação do fator de transcrição celular NF- κ B.

Jäger et al. (2009) destacam, em um estudo, que as preparações de **Arnica** têm sido muito utilizadas para o tratamento das dores reumáticas e ensaios clínicos recentes demonstraram os seus efeitos benéficos no tratamento da osteoartrite (OA). O trabalho foi realizado com culturas de células: condrócitos articulares bovinos e condrócitos articulares humanos. A ação da **Arnica** pode ser devido principalmente às suas propriedades anti-inflamatórias e inibição da ligação ao DNA dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B. Os pesquisadores também apontam que a tintura de **Arnica** reduz a biossíntese de TNF- α e IL-1 β , que são mediadores pró-inflamatórios, e desempenham um papel fundamental na patofisiologia da OA. A inflamação precede a degradação da cartilagem e

preparações com **Arnica** atuam nos dois eventos, inibindo os mediadores envolvidos nestes processos.

Em um estudo realizado por Ghedira, Goetz e Le Jeune (2012), os autores destacam as atividades farmacológicas da **Arnica montana**. São elas: anti-inflamatória, no edema pós-cirúrgico e pós-contusão, anti-equimose, analgésica, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, imunomoduladora, cardiovascular, inibidora da agregação de plaquetas e citotóxica.

Uma revisão sistemática foi feita por Beg et al. (2011) com ervas e seus potenciais agentes anti-inflamatórios. De acordo com os autores, os vegetais contendo atividade anti-inflamatória (AIA) despertam interesse, devido à ausência de vários problemas que são encontrados nas preparações sintéticas. Esta revisão teve como objetivo principal fornecer uma visão profunda dos agentes anti-inflamatórios de origem vegetal pertencentes à várias classes, dentre elas os terpenos. Os Terpenóides estão espalhados em várias famílias do mundo vegetal mostrando AIA, dentre estas famílias, está a Asteraceae. Nesse estudo, foi evidenciado que o extrato etanólico de flores de **Arnica montana** (Asteraceae) contem princípios anti-inflamatórios, como o 1,5-trans-guaianolide com atividade em NF-kB e em IL-8 *in vitro* e *in vivo*.

Já Klaas et al. (2002) realizaram estudos sobre a atividade anti-inflamatória de fitofármacos preparados a partir de flores de **Arnica**. Os fitofármacos preparados a partir de **Arnica montana** foram estudados quanto à sua capacidade para inibição dos fatores de transcrição NF-kB e de NF-AT. Ambas as proteínas são responsáveis pela transcrição de genes que codificam vários mediadores inflamatórios. Além disso, estas proteínas têm influência sobre a liberação de citocinas IL-1 e TNF- α . Os pesquisadores destacam que as atividades inibidoras estão relacionadas com a presença no extrato de **Arnica montana** de lactonas de sesquiterpeno, sendo a 11 α ,13-dihydrohelenalina a principal.

Como já foi abordado anteriormente, a doença periodontal se caracteriza por um processo inflamatório que culmina com a perda dos tecidos de sustentação, entre eles do osso alveolar, podendo progredir até a esfoliação do dente.

Assim, como os fitoterápicos apresentam muitas propriedades, dentre elas para inflamação e perda óssea, podem representar uma opção terapêutica viável como será exposto a seguir.

2.4.1 MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS, DOENÇA PERIODONTAL E PERDA ÓSSEA

Abiramasundari, Sumalatha e Sreeprya (2012) descrevem em seu estudo as propriedades da *Tinospora cordifolia* (Menispermaceae) para a artrite reumatóide e doenças inflamatórias do sistema músculo-esquelético. Foram desenvolvidos dois sistemas *in vitro*: um de osteoblastos humanos e outro de osteoblastos de fêmur de ratos. O extrato alcoólico de *Tinospora cordifolia* estimulou o crescimento de osteoblastos, a diferenciação de células numa linhagem osteoblástica e aumentou a mineralização do osso em ambos os sistemas. Os pesquisadores concluíram com esse estudo que o extrato de *Tinospora cordifolia* tem grande influência sobre a osteogênese podendo ser utilizado para a osteoporose.

Na medicina popular de Taiwan, a *Davallia formosana*, segundo Ko et al. (2012), é utilizada para tratamento de doenças ósseas, incluindo a osteoporose. Neste estudo, foi investigada a ação inibitória *in vitro* do extrato etanólico de *Davallia formosana* na osteoclastogênese em ratas ovariectomizadas, diminuindo a estimulação do RANKL (fator chave para a diferenciação e ativação dos osteoclastos). Dentre os resultados, o extrato de *Davallia formosana* preveniu a perda óssea de maneira significativa e a tomografia microcomputadorizada mostrou que houve um aumento da resistência óssea e inibição da degradação da microarquitetura trabecular. Dessa maneira, os estudiosos sugerem que o extrato de *Davallia formosana* pode ser útil para tratamento de doenças de reabsorção óssea, como a osteoporose.

Sharan et al. (2011) elucidam em seu experimento com ratas ovariectomizadas que o extrato obtido da casca do caule de *Ulmus wallichiana* promove pico de massa óssea em ratas em crescimento e preserva a massa óssea trabecular e a força do osso cortical. O GTDF (6-C- β -D - glucopiranosil -(2S, 3S) - (

+) -3', 4', 5, 7 - tetrahidroxiflavanol) é o princípio ativo isolado a partir do extrato e estimulou a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos através da ativação do receptor de hidrocarboneto aromático (AhR). O GTDF também estimulou a produção de AMPc, que medeia a expressão gênica na osteogênese.

Nesse estudo, quanto ao crescimento das ratas, o GTDF promoveu aumento do crescimento longitudinal dos ossos, da densidade mineral óssea, da taxa de formação óssea, a deposição cortical, e a força dos ossos. Os dados do estudo sugerem que o GTDF acelera a cicatrização óssea após a lesão e exerce efeitos anabólicos em ratas osteopênicas sendo um potente agente anabólico ósseo.

Os osteoclastos, de acordo com Penolazzi et al. (2008), estão implicados na artrite reumatóide e em várias doenças relacionadas com a perda óssea. Os autores verificaram através de um estudo que o extrato de *Emblica officinalis* pode ser utilizado para o tratamento da artrite reumatóide e a da osteoporose, ativando a morte celular programada dos osteoclastos primários humanos. Esse extrato também age interferindo com a atividade do NF- κ B, um fator de transcrição envolvido na biologia dos osteoclastos.

Concluiu-se nesse estudo, que o extrato de *Emblica officinalis* pode intervir nas complicações da artrite reumatóide, como na destruição da articulação, e, no esqueleto ósseo, através da prevenção e redução da osteoporose. Assim, o seu uso pode ser sugerido como terapia aplicada às doenças ósseas.

Botelho et al. (2008) pesquisaram em seu trabalho o carvacrol e as chalconas diméricas componentes ativos respectivamente da *Lippia sidoides* e da *Myracrodruon urundeuva*, plantas medicinais populares do Nordeste do Brasil com propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias comprovadas. O estudo teve como objetivo averiguar o efeito de um gel de uso tópico com carvacrol e chalconas na doença periodontal experimental em ratos. A perda óssea alveolar foi significativamente inibida pelo gel com carvacrol e chalconas em comparação com o grupo controle e com os não tratados. Concluiu-se nesse estudo que a utilização do gel com carvacrol e chalconas reduziu a lesão tecidual, diminuiu o influxo de neutrófilos no tecido gengival e inibiu o crescimento de microrganismos orais, tendo efeito benéfico sobre a doença periodontal experimental.

O estudo de Zhao et al. (2007) demonstrou que *Gu Ling Pian* (GLP) , uma fórmula da medicina tradicional chinesa à base de plantas , foi empregada para prevenir a osteoporose através do aumento da densidade mineral óssea. Foi investigado o efeito de GLP em osteoblastos , sobre a proliferação e diferenciação celular, a síntese de osteoprotegerina (fator inibidor osteoclastogênese) / RANKL em células expostas ao soro de ratos alimentados com GLP ou não. Os resultados mostraram que o GLP promoveu significativamente a proliferação e diferenciação celular, a regulação de osteoprotegerina e a infra-regulação de RANKL, o que pode atribuir à GLP a indução de formação óssea, sendo benéfica para pacientes com osteoporose.

O trabalho de revisão bibliográfica de Putnam et al. (2007) descreve que produtos provenientes de plantas podem influenciar os processos de deposição da matriz, mineralização e inibição da reabsorção óssea , promovendo benefícios para o esqueleto. Vegetais comuns como a cebola , alho , salsa , podem inibir a reabsorção óssea em ratas ovariectomizadas. Os óleos essenciais da salvia, alecrim, tomilho e outras ervas diminuem a atividade dos osteoclastos *in vitro* e *in vivo* o que proporciona um aumento na densidade mineral óssea . Já a soja, que é rica em isoflavonas, tem sido apontada para sua utilização na manutenção da saúde óssea.

Jeong et al. (2005) investigaram em seu experimento os efeitos do extrato de *Drynariae Rhizoma*, erva tradicional coreana , na proliferação e diferenciação osteoblástica. O estudo foi feito *in vitro* com células pré-odontoblásticas derivadas da calvaria de ratos recém-nascidos onde foi introduzido o extrato de *Drynariae Rhizoma*. Os resultados apontaram para um aumento da síntese de DNA e aumento da fosfatase alcalina com a administração de *Drynariae Rhizoma*, o que sugere que o extrato dessa erva tem ação anti-reabsorção para o osso.

Os medicamentos tradicionais chineses *Hachimi - jio - gan* , *Juzen - taiho - to* e *Unkei - to* foram avaliados no estudo de Chen et al. (2005) em relação à perda óssea em modelo murino de osteoporose senil. Os animais foram divididos em grupo controle e experimental, sendo que o grupo controle só recebeu água como fluido para beber, enquanto que o grupo experimental recebeu solução aquosa a 0,05% dos extratos dos vegetais por três meses.

Nessa pesquisa os ossos foram estudados morfolologicamente e histomorfometricamente: no grupo controle a densidade mineral óssea e a quantidade de osso formado na superfície foram baixos; no grupo *Unkei - to* não foram encontradas alterações significativas dos ossos; nos grupos *Hachimi - jio - gan* e *Juzen - taiho - to*, a massa óssea e a quantidade de osso formado na superfície aumentaram. Esse estudo traz evidências de que *Hachimi - jio - gan* e *Juzen - taiho - to* são eficientes na prevenção da perda óssea em modelo murino de osteoporose senil.

Lee et al. (2010) investigaram o alisol-B, um fitoesteróide da *Alisma orientale Juzepczuk*, com efeitos inibitórios sobre a osteoclastogênese *in vitro* e *in vivo*. O alisol-B adicionado em co-culturas de células da medula óssea de ratos e de osteoblastos primários causou diminuição significativa da osteoclastogênese. Esse fitoesteróide também impediu a formação de osteoclastos induzida por RANKL quando adicionado durante a fase inicial da cultura, o que propõe uma ação do alisol-B sobre os precursores de osteoclastos, inibindo a sinalização de RANKL / RANK. Dessa forma, o alisol-B pode ter um potencial terapêutico para as doenças ósseas, agindo sobre a diferenciação e função dos osteoclastos.

O estudo de Ha et al. (2013) analisa os efeitos e mecanismos do extrato aquoso do caule de *Spatholobus suberectus* (WESS) na diferenciação e no papel dos osteoclastos. O experimento foi desenvolvido *in vitro* com um sistema de macrófagos derivados da medula óssea e um sistema de co-cultura de osteoblastos da medula óssea de murinos. Houve a inibição por WESS da diferenciação dos osteoclastos a partir dos seus precursores e isso ocorreu pela supressão dos fatores de transcrição osteoclastogênicos. Além disso, WESS suprimiu a atividade de reabsorção óssea dos osteoclastos. Assim, conclui-se que WESS pode ser uma terapêutica potencial para as patologias ósseas causadas por reabsorção óssea excessiva.

Face ao exposto e, considerando os efeitos adversos do **nimesulida**, as vantagens da utilização da **Arnica montana homeopática** e da **Arnica montana fitoterápica** com destaque para as atividades anti-inflamatória e analgésica, o foco deste estudo está centrado na seguinte pergunta: **outros medicamentos, além dos tradicionais anti-inflamatórios não esteroidais poderiam ser utilizados, com**

vantagens na terapêutica da doença periodontal, especificamente para controle e alívio da inflamação e perda óssea, minimizando os efeitos colaterais para o paciente?

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

De acordo com o que foi apresentado no capítulo anterior em relação à utilização do **nimesulida** e seus efeitos colaterais, bem como a eficácia do emprego da **Arnica montana homeopática** e da **Arnica montana fitoterápica** com ênfase para as atividades anti-inflamatória e analgésica, o presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver um estudo exploratório-descritivo com o intuito de analisar, aprofundar e comparar as atividades das medicações em questão e propor alternativas no tratamento da dor, inflamação e perda óssea na saúde em geral e, principalmente, na doença periodontal.

A pesquisa também aspirou agregar através de seus objetivos específicos:

- a) Identificar as ações dos fármacos **nimesulida**, **Arnica montana homeopática** e **Arnica montana fitoterápica** propostos no estudo
 - b) Comparar e analisar as propriedades das três linhas terapêuticas envolvidas no experimento
 - c) Sistematizar as informações obtidas e estabelecer, em função dos resultados obtidos na pesquisa (Análise da perda óssea alveolar, Análise microscópica dos cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina (HE) e Expressão de RNAm para mediadores do processo inflamatório por RT-PCR), orientações a respeito da aplicabilidade das terapêuticas estudadas em relação à eficácia e segurança.
-
-

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLOCAÇÃO DA LIGADURA E ADMINISTRAÇÃO DOS MEDICAMENTOS

Para a realização do estudo, foram utilizados 120 ratos Wistar machos com aproximadamente 60 dias de vida. Estes animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB – USP) após a aprovação pela Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA), protocolo nº 004/2014.

Estes animais foram distribuídos em 24 caixas (6 caixas por grupo) e cada caixa continha 5 ratos. Os grupos foram assim divididos (n=30):

- 30 ratos do grupo **Água (H₂O)** – administração diária por gavagem de água destilada. O volume administrado era de 1µl por grama de peso do animal.
- 30 ratos do grupo **nimesulida** – administração diária por gavagem de suspensão do nimesulida (5mg/ml). O volume administrado era de 1µl por grama de peso do animal. A posologia recomendada do nimesulida é: 5mg/kg/dia.
- 30 ratos do grupo **Tintura-mãe de Arnica montana (Arnica TM)** – administração diária por gavagem de T.M. de Arnica. A posologia recomendada da T.M. de Arnica é: 2ml/70Kg/dia.

Seguimos o cálculo da administração de 8µl de T.M. de Arnica pura para um animal de 300g. Diluímos 20 vezes (em água destilada para resultar em um volume maior de fácil medição na seringa), assim, para um animal de 300g administramos 160µl. Foi elaborada uma tabela com os possíveis pesos dos animais (de 110g a 400g) e o volume da T.M. de Arnica diluída 20 vezes a ser administrado, conforme consta no Apêndice A.

- 30 ratos do grupo **Arnica montana 6CH (Arnica 6CH)** – administração diária por gavagem de Arnica 6CH. A posologia recomendada da Arnica 6CH é: 0,75ml ou 750µl/70kg/dia.
-
-

Seguimos o cálculo da administração de 3,21µl de Arnica 6CH para um animal de 300g. Diluímos 100 vezes (em água destilada para resultar em um volume maior de fácil medição na seringa), assim, para um animal de 300g administramos 321µl. Foi desenvolvida uma tabela com os possíveis pesos dos animais (de 110g a 420g) e o volume de Arnica 6CH diluída 100 vezes a ser administrado, conforme relacionado no Apêndice B.

É importante ressaltar que cada caixa foi devidamente identificada com seu número (de 1 a 6), grupo (Água, nimesulida, T.M. de Arnica e Arnica 6CH) e dias de tratamento (14, 21 e 28 dias). Os ratos também foram identificados de 1 a 5 (marcados na cauda com caneta) em cada caixa.

No 1º dia, inicialmente, foi feita a pesagem de cada animal e a administração por gavagem das medicações específicas. Na sequência, foi colocada a ligadura nos animais: primeiramente os animais foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina a 2% (ANASEDAN) e Cloridrato de Ketamina a 1% (DOPALEN) em partes iguais, aplicando cerca de 200µl em cada animal por via intramuscular. Em seguida, foi feita a colocação da ligadura com fio estéril de seda preta trançada 3-0, amarrada ao redor do primeiro molar inferior esquerdo com nó na região mesial. Nas faces vestibular, lingual e distal do dente, o fio foi colocado em posição subgingival, enquanto que na face mesial, permaneceu instalado de maneira supragingival, conforme a Figura 1.

É importante salientar que diariamente (desde o 1º dia), antes da gavagem, os animais foram pesados para o ajuste da dose de cada medicamento.

Fonte: LIMA, 2011

Figura 1 – Colocação da ligadura no 1º molar inferior

4.2 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA DE MATERIAL

Os animais foram eutanasiados nos 15º dia (com 14 dias de tratamento), 22º dia (com 21 dias de tratamento) e 29º dia (com 28 dias de tratamento) por meio de dose excessiva dos anestésicos cloridrato de Xilazina a 2% (ANASEDAN) e Cloridrato de Ketamina a 1% (DOPALEN), em partes iguais, administrados 200µl iniciais por via intramuscular e depois mais 200µl por via intravascular.

Em cada dia de eutanásia, 40 ratos foram eutanasiados, conforme demonstrado na sequência:

- No 15º dia foram os ratos das caixas 1 e 2 de cada grupo (10 ratos por grupo)
- No 22º dia foram os ratos das caixas 3 e 4 de cada grupo (10 ratos por grupo)
- No 29º dia foram os ratos das caixas 5 e 6 de cada grupo (10 ratos por grupo)

Após a eutanásia dos animais, foi feita a extração da hemimandíbula esquerda dos ratos. O material foi colocado em tubos identificados (grupo, nº da caixa, nº do rato, nº dias de tratamento) para Análise Histológica, Análise da perda óssea e para RT-PCR (Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase) como será descrito a seguir.

4.2.1 ANÁLISE DA PERDA ÓSSEA

Para a análise da perda óssea foram utilizados os ratos das caixas 2, 4 e 6 em cada dia de eutanásia, totalizando 59 ratos, pois um rato morreu (o rato 1 da caixa 6 do grupo Arnica 6CH morreu logo após a colocação da ligadura, no 1º dia). A preparação das peças consistiu em separar o osso da hemimandíbula da gengiva.

O osso da hemimandíbula removido para análise da perda óssea foi colocado em um tubo de microcentrifuga de 2ml com 1,5ml de água oxigenada 10 volumes, permanecendo por 6 dias. No 7º dia, as peças foram limpas (os tecidos moles que ainda restavam junto ao osso foram retirados). O tubo foi lavado com

álcool 70% e a hemimandíbula foi colocada novamente e preenchida com álcool 70% (para não fungar).

Trinta e sete dias após a última eutanásia todas as hemimandíbulas dos tubos para análise da perda óssea foram coradas. O álcool 70% foi desprezado, as peças foram secas com gaze (para tirar o excesso de álcool 70%) e depois mergulhadas uma a uma em azul de metileno 0,1% por um minuto. Após, as peças foram secas e colocadas nos mesmos tubos secos.

Seis dias após a coloração das hemimandíbulas foram realizadas as fotos das 59 peças. Essas imagens receberam um código aleatório, ou seja, os pesquisadores não sabiam a qual animal pertencia a amostra (grupo, nº da caixa, nº do rato, nº de dias de tratamento)².

Depois, através do programa ImageJ, foi efetuada a medição da perda óssea por quatro pesquisadores diferentes. Os dados foram lançados em uma tabela do Excel para o cálculo da média e do desvio padrão. A partir daí esses dados foram transpostos para o programa GraphPad Prism 5 for Windows para a análise estatística e composição dos gráficos referentes à perda óssea .

4.2.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para a análise histológica foram utilizados os ratos das caixas 1, 3 e 5 em cada dia de eutanásia, totalizando 60 ratos. A preparação de cada peça consistiu na retirada das estruturas que ficam abaixo da junção muco-gengival, preservando a mucosa ceratinizada. Em seguida, as peças foram colocadas em um tubo de centrífuga de 50ml com 15ml de formol, permanecendo por 6 dias.

Seis dias após, o formol foi desprezado e foi colocado 30 ml de solução de EDTA 4,13% com NaOH 0,44% com a finalidade de descalcificação. A cada semana essa solução de EDTA foi trocada sempre no mesmo dia (toda 2ª feira) até completar 45 dias. No 46º dia a solução de EDTA foi desprezada e colocado 20ml de álcool 70%.

² Esse procedimento foi retirado da Monografia de CENTURION, B.S. **Análise da perda óssea alveolar na doença periodontal induzida experimentalmente em ratos tratados com homeopatia e AINE**. 2007. 74p (p.40). Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

Para confirmar se as peças foram descalcificadas, foram realizadas radiografias de todas as peças e comparação com a radiografia de uma mandíbula que vamos avaliar a perda óssea (sem descalcificar). Nas radiografias, a mandíbula que não foi descalcificada foi a única que tornou-se visível, ou seja, as outras já estavam descalcificadas.

Para comprovar a descalcificação das peças, foi efetuado também o teste com a agulha em algumas peças (escolhidas aleatoriamente). Os dentes e o osso foram furados sem resistência, ou seja, as peças foram descalcificadas.

A partir da ratificação da descalcificação das peças, os 60 tubos com as peças embebidas em álcool 70% foram encaminhados para o Laboratório de Histologia (FOB - USP) para os procedimentos histológicos e posterior análise.

4.2.2.1 PROCESSO DE INCLUSÃO NA PARAFINA

Para inclusão das peças em parafina são necessários alguns procedimentos³:

- 3 banhos em álcool absoluto (para desidratar): álcool 1 (pela manhã), álcool 2 (no almoço) e álcool 3 (fim da tarde até o dia seguinte)
- 3 banhos em Xilol (para diafanizar, clarear; também facilita a inclusão da parafina): as peças são colocadas em potes de vidro e imersas no xilol 1, depois xilol 2 e por último o xilol 3 (em torno de 1 hora em cada xilol)
- As peças foram colocadas em potes com parafina na estufa por 1 hora. Em seguida, a parafina foi trocada e deixada até o fim da tarde
- Inclusão na parafina: a parafina foi colocada em caixinhas de papel e depois a peça foi posicionada, por último a etiqueta. A etiqueta, sempre escrita à lápis, acompanhou a peça em todo processo.

³ Procedimentos recomendados pelo Laboratório de Histologia (FOB – USP)

4.2.2.2 PROCEDIMENTOS PARA CORTE NO MICRÓTOMO

Após o processo de inclusão das peças em parafina devidamente identificadas, realizamos os cortes dos blocos no equipamento chamado micrótomo conforme a técnica que segue⁴:

- 1) Travar a manivela
- 2) Colocar o bloco (observando que deve estar afastado da navalha e com a etiqueta de identificação do bloco para trás)
- 3) Tirar as extremidades do bloco com uma navalha usada (para delimitar a peça)
- 4) Nivelar o bloco com a navalha
- 5) Trazer o bloco cuidadosamente para frente
- 6) Desbastar com 10µm até chegar próximo à região de interesse (deve-se observar de vez em quando os cortes de 4µm na objetiva de menor aumento do microscópio óptico)
- 7) Ao chegar próximo da região de interesse é recomendável manter 4µm

É importante salientar que à medida que rodamos a manivela, os cortes vão saindo de maneira contínua (em série) e uma pinça é utilizada para segurar a sequência de cortes

- 8) Colocar, com o auxílio da pinça, os cortes seriados em água (41°C, no banho-maria). Assim os cortes irão se distender
- 9) Romper as junções entre cada dois cortes com a ajuda da pinça. Dessa forma alguns pares de cortes ficam juntos
- 10) Colocar a lâmina de vidro perpendicular e próximo aos cortes selecionados. Mergulhar a lâmina (perpendicularmente) na água. Os cortes se aderem à lâmina

⁴ Procedimentos recomendados pelo Laboratório de Histologia (FOB – USP)

- 11) Levar a lâmina ao microscópio óptico (objetiva de menor aumento) e verificar se já é a região de interesse
- 12) Caso ainda não seja a região de interesse, continuar com os cortes no micrótomo (4 μm) e de vez em quando levar os cortes ao microscópio para observar
- 13) Ao chegar na região de interesse (1º molar bem evidente e aparecendo as raízes) devemos ter mais atenção:
 - trocar a navalha
 - colocar os cortes em 3 lâminas devidamente identificadas: primeiramente na lâmina nº 1, desbastar 8 vezes com 4 μm e colocar os cortes na lâmina nº 2, desbastar 8 vezes com 4 μm e levar os cortes sequenciais na lâmina nº 3. Dessa maneira, as lâminas 1, 2 e 3 da mesma peça vão mostrar os cortes de modo sequencial e com um pequeno intervalo (desbastado 8 vezes em 4 μm) entre elas
- 14) Após colocar os cortes nas respectivas lâminas, deixar escorrer a água no suporte para lâminas e levar à estufa por no mínimo 3 horas ou de um dia para outro
- 15) Depois que tirar as lâminas da estufa, guardá-las em uma caixa para lâminas identificadas

4.2.2.3 COLORAÇÃO EM HE (HEMATOXILINA-EOSINA)

Conforme recomendação do Laboratório de Histologia (FOB –USP), seguem os procedimentos utilizados para a coloração dos cortes em HE:

- a) Para desparafinar: Três banhos de 15 minutos com xilol (xilol 1, 2 e 3)
 - b) Hidratar: Três banhos de 5 minutos com álcool (álcool 1, 2 e 3) e mais um banho com álcool 70% por 5 minutos
-

- c) Lavagem por 10 minutos em água de torneira
- d) Hematoxilina: Em torno de 50 segundos em hematoxilina (filtrada). Após, banho de 10 minutos em água de torneira
- e) Eosina: Cerca de 1 minuto em eosina. A seguir, lavagem rápida em água
- f) Desidratar: Banho rápido com álcool 70%. Seguido de um banho rápido em álcool 1 e mais dois banhos de 3 minutos em álcool 2 e 3
- g) Diafanizar: Três banhos de 3 minutos em xilol 1, 2 e 3. Deixar até montar a lâmina
- h) Montagem da lâmina: Não deixar secar o xilol. Passar a resina na lamínula e colocar sobre a lâmina.
- i) Leitura das lâminas: os dados avaliados foram colocados em uma planilha do excel.
- j) Depois esses dados foram transferidos para o programa GraphPad Prism 5 for Windows para a análise estatística e composição dos gráficos referentes aos parâmetros estudados nas lâminas.

4.2.3 RT-PCR (TRANSCRIÇÃO REVERSA – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)

Para a RT-PCR foram utilizados os mesmos ratos para a Análise da perda óssea (caixas 2, 4 e 6, totalizando 59 ratos). Utilizamos a gengiva removida da hemimandíbula.

A gengiva removida para a RT-PCR foi colocada em um tubo de microcentrífuga de 2ml com 500µl de RNA later solution (inativa a RNase imediatamente evitando a degradação do RNA). Os 59 tubos ficaram organizados em um rack devidamente identificado e colocado no freezer a -80°C.

Para o procedimento da RT-PCR é necessário primeiramente o isolamento do RNA, descrito a seguir.

4.2.3.1 ISOLAMENTO DO RNA

Para o isolamento do RNA seguimos os procedimentos recomendados pelo protocolo “RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Tissues”.⁵

Primeiramente numeramos todos os tubos da seguinte forma:

- 1- Grupo Água, caixa 2, rato 1, 14 dias
- 2- Grupo Água, caixa 2, rato 2, 14 dias
- 3- Grupo Água, caixa 2, rato 3, 14 dias
- 4- Grupo Água, caixa 2, rato 4, 14 dias
- 5- Grupo Água, caixa 2, rato 5, 14 dias
- 6- Grupo Nimesulida, caixa 2, rato 1, 14 dias
- 7- Grupo Nimesulida, caixa 2, rato 2, 14 dias
- 8- Grupo Nimesulida, caixa 2, rato 3, 14 dias
- 9- Grupo Nimesulida, caixa 2, rato 4, 14 dias
- 10- Grupo Nimesulida, caixa 2, rato 5, 14 dias
- 11- Grupo T.M. de Arnica, caixa 2, rato 1, 14 dias
- 12- Grupo T.M. de Arnica, caixa 2, rato 2, 14 dias
- 13- Grupo T.M. de Arnica, caixa 2, rato 3, 14 dias
- 14- Grupo T.M. de Arnica, caixa 2, rato 4, 14 dias
- 15- Grupo T.M. de Arnica, caixa 2, rato 5, 14 dias
- 16- Grupo Arnica 6CH, caixa 2, rato 1, 14 dias
- 17- Grupo Arnica 6CH, caixa 2, rato 2, 14 dias
- 18- Grupo Arnica 6CH, caixa 2, rato 3, 14 dias
- 19- Grupo Arnica 6CH, caixa 2, rato 4, 14 dias
- 20- Grupo Arnica 6CH, caixa 2, rato 5, 14 dias
- 21- Grupo Água, caixa 4, rato 1, 21 dias
- 22- Grupo Água, caixa 4, rato 2, 21 dias
- 23- Grupo Água, caixa 4, rato 3, 21 dias
- 24- Grupo Água, caixa 4, rato 4, 21 dias
- 25- Grupo Água, caixa 4, rato 5, 21 dias

⁵ Este protocolo faz parte do “RNeasy Mini Handbook” da QIAGEN Distribuidores.

- 26- Grupo Nimesulida, caixa 4, rato 1, 21 dias
 - 27- Grupo Nimesulida, caixa 4, rato 2, 21 dias
 - 28- Grupo Nimesulida, caixa 3, rato 3, 21 dias
 - 29- Grupo Nimesulida, caixa 4, rato 4, 21 dias
 - 30- Grupo Nimesulida, caixa 4, rato 5, 21 dias
 - 31- Grupo T.M. de Arnica, caixa 4, rato 1, 21 dias
 - 32- Grupo T.M. de Arnica, caixa 3, rato 2, 21 dias
 - 33- Grupo T.M. de Arnica, caixa 4, rato 3, 21 dias
 - 34- Grupo T.M. de Arnica, caixa 3, rato 4, 21 dias
 - 35- Grupo T.M. de Arnica, caixa 4, rato 5, 21 dias
 - 36- Grupo Arnica 6CH, caixa 4, rato 1, 21 dias
 - 37- Grupo Arnica 6CH, caixa 4, rato 2, 21 dias
 - 38- Grupo Arnica 6CH, caixa 4, rato 3, 21 dias
 - 39- Grupo Arnica 6CH, caixa 4, rato 4, 21 dias
 - 40- Grupo Arnica 6CH, caixa 3, rato 5, 21 dias
 - 41- Grupo Água, caixa 6, rato 1, 28 dias
 - 42- Grupo Água, caixa 6, rato 2, 28 dias
 - 43- Grupo Água, caixa 6, rato 3, 28 dias
 - 44- Grupo Água, caixa 6, rato 4, 28 dias
 - 45- Grupo Água, caixa 6, rato 5, 28 dias
 - 46- Grupo Nimesulida, caixa 6, rato 1, 28 dias
 - 47- Grupo Nimesulida, caixa 6, rato 2, 28 dias
 - 48- Grupo Nimesulida, caixa 6, rato 3, 28 dias
 - 49- Grupo Nimesulida, caixa 6, rato 4, 28 dias
 - 50- Grupo Nimesulida, caixa 6, rato 5, 28 dias
 - 51- Grupo T.M. de Arnica, caixa 6, rato 1, 28 dias
 - 52- Grupo T.M. de Arnica, caixa 6, rato 2, 28 dias
 - 53- Grupo T.M. de Arnica, caixa 6, rato 3, 28 dias
 - 54- Grupo T.M. de Arnica, caixa 6, rato 4, 28 dias
 - 55- Grupo T.M. de Arnica, caixa 6, rato 5, 28 dias
 - 56- Grupo Arnica 6CH, caixa 6, rato 2, 28 dias
 - 57- Grupo Arnica 6CH, caixa 6, rato 3, 28 dias
 - 58- Grupo Arnica 6CH, caixa 6, rato 4, 28 dias
 - 59- Grupo Arnica 6CH, caixa 6, rato 5, 28 dias
-
-

Quarenta e nove dias após a última eutanásia fizemos os procedimentos para o isolamento do RNA dos tubos de 1 a 12 e no dia seguinte (50 dias após a última eutanásia) fizemos do 13 ao 59, como segue:

Obs.: Os tubos utilizados foram os de 2ml para microcentrífuga. Somente na última etapa utilizamos tubos para microcentrífuga de 1,5ml

- a) Cortamos uma parte do tecido gengival e pesamos. A amostra do tecido deve ter um peso aproximado de 20 a 25mg
 - b) O tecido foi colocado em 350µl da mistura Lysis Buffer RLT com Beta mercaptoetanol (30ml para 300 µl respectivamente)
 - c) Homogeneização com o rotor (entre cada tecido que foi homogeneizado pelo rotor, foi feita a lavagem da haste do rotor em dois béqueres com água Milli – Q e quando mudou o grupo, a água de cada béquer foi renovada)
 - d) Os tubos com os tecidos homogeneizados ficaram armazenados no gelo
 - e) Levamos os tubos para a centrífuga em rotação 15000 rpm, temperatura 20°C, por 3 minutos
 - f) O sobrenadante foi coletado cuidadosamente por pipetagem e colocado em outro tubo com 350µl de álcool 70% em DEPC. A seguir, misturamos por pipetagem.
 - g) Transferimos o conteúdo para um tubo de microcentrífuga com coluna e levamos para a centrífuga em rotação 15000 rpm, temperatura 20°C, por 20 segundos
 - h) Descartamos o conteúdo do tubo coletor e trocamos por outro tubo
 - i) Adicionamos 700µl de Buffer RW1 na coluna e levamos para a centrífuga em rotação 15000 rpm, temperatura 20°C, por 20 segundos
 - j) Descartamos o conteúdo do tubo coletor e trocamos por outro tubo
 - k) Adicionamos 500µl de Buffer RPE na coluna e levamos para a centrífuga em rotação 15000 rpm, temperatura 20°C, por 20 segundos
 - l) Descartamos o conteúdo do tubo coletor e trocamos por outro tubo
-

- m) Adicionamos 500µl de Buffer RPE na coluna e levamos para a centrífuga em rotação 15000 rpm, temperatura 20°C, por 2 minutos
- n) Descartamos o conteúdo do tubo coletor e trocamos por outro tubo
- o) Levamos para a centrífuga em rotação 15000 rpm, temperatura 20°C, por 1 minuto, **a seco** (sem adição de nada)
- p) Para eluir, transferimos a coluna para um tubo de microcentrífuga de 1,5ml e pipetamos bem no centro da coluna 30 µl de RNase free water. A seguir, levamos para a centrífuga em rotação 15000 rpm, temperatura 20°C, por 1 minuto
- q) Descartamos a coluna, organizamos os tubos (devidamente identificados) em um rack também identificado e levamos ao freezer a -80°C.

4.2.3.2 ANÁLISE NO NANODROP

- 1) Características do equipamento:
 - a) Esse equipamento é um mini espectrofotômetro que checa a qualidade e a quantidade do RNA ou DNA.
 - b) Os dados de quantidade são expressos em ng/uL.
 - c) Os dados de qualidade são checados nas razões entre as absorbâncias 260/280 nm (a razão deve estar entre 1,9 e 2,1) e 260/230 nm (ideal que seja igual a 2, não pode ser menor que 1,7). Esta última razão verifica se há contaminantes na amostra, tais como clorofórmio e trizol por exemplo.
- 2) Foram analisadas as 59 amostras e os dados transcritos para uma tabela.

4.2.3.3 TRANSCRIÇÃO REVERSA

- a) Em uma placa de 96 poços foram pipetados no máximo 5 ug de RNA total de cada amostra
 - b) Completamos o volume para 12 uL em cada amostra com H₂O em
-
-

DEPC

- c) Acrescentamos 2 uL de DNase
- d) Levamos à centrífuga por 10 segundos, 2000 rpm
- e) 2 minutos a 42°C no Termociclador Verit
- f) 1 minuto no gelo
- g) Pipetamos 1 uL dos DNTPs + 1 uL do oligo dT nas amostras
- h) Levamos à centrífuga por 10 segundos, 2000 rpm
- i) 5 minutos a 65°C no Termociclador Verit
- j) As amostras foram colocadas imediatamente no gelo por 1 minuto
- k) Preparamos um MIX contendo para cada reação: 4 uL do Buffer + 1 uL do DTT + 1 uL da transcriptase reversa. A função do DTT é desenovelar a molécula durante a transcrição e o Buffer tem o papel de manter as condições de pH e salinidade
- l) Pipetamos 6 uL deste mix em cada amostra
- m) Levamos à centrífuga por 10 segundos, 2000 rpm
- n) 60 minutos a 50°C e em seguida por 15 minutos a 70°C no Termociclador Verit (nome do ciclo: Transcrição reversa Invitrogen)
- o) O volume final da reação é 20 uL

4.2.3.4 PCR (REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE)

É importante salientar que o controle negativo foi feito com água Milli – Q e o gene de referência utilizado foi o RPL13.

- 1) Retiramos as amostras que ficaram no Termociclador e diluímos em água (4 vezes: para 20 uL de amostra, acrescentamos 60 uL de água)
 - 2) Levamos ao agitador de placa
 - 3) Centrífuga por 10 segundos e 2000 rpm
 - 4) 2 uL de cada amostra foram colocados em duas placas de 384 poços para PCR (foi feita uma duplicata para cada amostra). As amostras ficaram distribuídas da seguinte forma:
 - Placa 1: da amostra 1 até a 31
 - Placa 2: da amostra 32 até a 59
-

- 5) Preparamos a mistura de reagentes

Para 1 reação: 2,5 uL de Taqman Gene Expression Master Mix + 0,25 uL do Ensaio (20X) + 0,25 uL de H₂O

Calculamos para 60 amostras em duplicata, ou seja 120. Para não correr o risco de faltar, fizemos para 130 amostras.

Dessa forma: - Taqman = 2,5 uL X 130 = 325 uL

- Ensaio 20X = 0,25 uL X 130 = 32,5 uL

- H₂O = 0,25 uL X 130 = 32,5 uL

Os alvos escolhidos para a reação foram: TNF- α , RANKL, OPG, COX-2 e IL-6

- 6) Em cada poço da placa foi colocado 3 uL da mistura de reagentes
- 7) Selamos a placa com selo óptico (Applied Biosystems) com cuidado para não haver rugas
- 8) Centrifuga por 10 segundos e 2000 rpm
- 9) As placas foram colocadas no aparelho de PCR em tempo real (marca: Applied Biosystems, modelo Viia 7)
- 10) Após o processamento de cada placa no equipamento acima citado, os dados por ele obtidos foram transferidos para uma planilha do excel.
- 11) Depois esses dados foram transpostos para o programa GraphPad Prism 5 for Windows para a análise estatística e composição dos gráficos referentes à expressão do RNAm para as citocinas.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 5 for Windows. Os resultados obtidos, quando tinham distribuição normal, foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critério ou dois critérios de classificação, seguida do teste de Tukey. Aos resultados em que não apresentaram distribuição normal, foram aplicados o teste de Kruskal-Wallis acompanhado do método de Dunns. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA PERDA ÓSSEA

Através do programa ImageJ, foi feita a medição da perda óssea por quatro pesquisadores diferentes. Conforme a metodologia do estudo de Centurion (2007, p.40), os pesquisadores não sabiam a qual animal pertenceu a amostra (grupo, nº da caixa, nº do rato, nº de dias de tratamento).

Ainda, segundo a técnica da autora, esta medição foi da área compreendida entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar, em milímetros quadrados. A média da área total entre a junção amelo-cementária e a crista óssea alveolar ficou estabelecida como a perda óssea.

Abaixo seguem as figuras relacionadas à perda óssea. As figuras 2, 3, 4 e 5 são fotos das hemimandíbulas com tratamento de 21 dias e coradas com azul de metileno 0,1%. Já as figuras 6 e 7 são as representações gráficas da perda óssea de todos os grupos nos períodos de 14, 21 e 28 dias.

Figura 2 - Perda óssea no Grupo H₂O, 21dias.

Figura 3 - Perda óssea no Grupo Arnica 6CH, 21 dias.

Figura 4 - Perda óssea no Grupo T.M. Arnica, 21 dias.

Figura 5 - Perda óssea no Grupo nimesulida, 21 dias.

Figura 6 - Representação gráfica da Perda Óssea no grupo H₂O e nos grupos de animais tratados nos períodos de 14, 21 e 28 dias de tratamento.

Perda Óssea

Figura 7 - Representação gráfica da Perda Óssea no grupo H₂O e nos grupos de animais tratados, separados por medicamento, nos períodos de 14, 21 e 28 dias de tratamento. *p<0,05

Na figura 6 estão destacados todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias em relação à perda óssea. Observa-se que a perda óssea teve distribuição normal nos grupos avaliados, dessa forma, escolheu-se como processo estatístico a análise de variância a um critério de classificação (ANOVA one way). Pela análise, não houve diferença estatística entre os grupos e nenhum dos tratamentos foi capaz de conter a perda óssea. Contudo, o nimesulida, no período de 14 dias, parece mostrar uma tendência para redução da perda óssea dos animais.

A figura 7 apresenta os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias, agrupados de acordo com o tratamento. Nota-se que os medicamentos utilizados não evitaram a perda óssea. Dentro do grupo nimesulida ressalta-se uma perda óssea significativa no tratamento de 28 dias em relação ao de 14 dias (*p<0,05).

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA DOS CORTES HISTOLÓGICOS

Foram avaliados os seguintes parâmetros: junção dentogengival, em especial a relação entre o epitélio juncional e a junção cimento-esmalte, ligamento periodontal bem como a presença e extensão da reabsorção óssea alveolar, presença de infiltrado inflamatório e integridade do cimento nos diferentes períodos de indução da doença periodontal (LIMA et al., 2000; RODINI, 2005; CENTURION, 2007). A análise das lâminas foi sempre feita na face mesial do 1º molar inferior esquerdo, devido a localização do nó da ligadura ter sido nessa região.

Quanto ao infiltrado inflamatório, seguem as figuras 8 e 9 que são representações gráficas das análises das lâminas quanto aos escores relacionados ao infiltrado: discreto (1), moderado (2) e intenso (3).

Figura 8 - Representação gráfica do Infiltrado Inflamatório no grupo H₂O e nos grupos de animais tratados nos períodos de 14, 21 e 28 dias de tratamento.

Infiltrado Inflamatório (Escore)

Figura 9 - Representação gráfica do Infiltrado Inflamatório no grupo H₂O e nos grupos de animais tratados, separados por medicamento, nos períodos de 14, 21 e 28 dias de tratamento. ii *infiltrado inflamatório*. * $p < 0,05$

A figura 8 apresenta todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias em relação ao infiltrado inflamatório. Não há diferença significativa quanto ao infiltrado inflamatório entre os grupos nos períodos estudados. Curiosamente, nota-se que no período de 21 dias de tratamento, o grupo H₂O exibe redução do infiltrado inflamatório, apresentando escore moderado (2).

A figura 9 mostra os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias. Ressalta-se que no grupo H₂O, após análise estatística pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, acompanhado do método de Dunns, há alteração significativa do infiltrado inflamatório, quando se comparam os três períodos de estudo, havendo diferença entre 21 e 28 dias de tratamento (* $p < 0,05$). Já no grupo nimesulida há infiltrado inflamatório expressivo aos 21 dias de tratamento comparando-se com 28 dias (* $p < 0,05$). Neste grupo houve redução do infiltrado inflamatório na fase mais tardia estudada (28 dias).

Houve predomínio no estudo, em todos os períodos e com todos os tipos de tratamento, de infiltrado inflamatório de moderado a intenso, com grande percentual de células mononucleares, conforme se pode verificar no Apêndice C. As figuras 10 e 11 seguintes (lâminas coradas em HE com aumento 10X) exemplificam os infiltrados principais.

Figura 10 - Grupo Arnica 6CH, 14dias, face mesial do 1º molar inferior esquerdo (aumento 10X) com infiltrado inflamatório de moderado a intenso. Destaque para uma área do infiltrado inflamatório.

Figura 11 - Grupo H₂O, 14 dias, face mesial do 1º molar inferior esquerdo (aumento 10X) com infiltrado inflamatório intenso e sequestro ósseo. Destaque para uma área do infiltrado inflamatório.

A figura 12 a seguir aponta a correlação entre os parâmetros avaliados Perda Óssea e Infiltrado Inflamatório (ii) nos tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias.

Figura 12 - Representação gráfica da correspondência entre Perda Óssea e Infiltrado Inflamatório no grupo H₂O e nos grupos de animais tratados, separados por medicamento, nos períodos de 14, 21 e 28 dias de tratamento. ii *infiltrado inflamatório*. * $p < 0,05$

Na figura 12 acima, quando se compara a perda óssea com o infiltrado inflamatório, percebe-se que nos animais do grupo H₂O (parte A da figura), ocorreu redução significativa do infiltrado aos 21 dias de tratamento sem alteração da perda óssea. Contudo, no grupo de animais tratados com nimesulida (parte D da figura), a perda óssea continua a aumentar significativamente (* $p < 0,05$) com o decorrer do tempo, mesmo havendo redução significativa do infiltrado (* $p < 0,05$) aos 28 dias.

Para os animais tratados com Arnica 6CH ou Arnica TM, tanto a perda óssea como o infiltrado inflamatório se mantiveram estáveis nos três períodos de estudo.

Na análise histológica, ainda foi possível estabelecer um escore geral do quadro observado, sendo importante salientar que esta análise se baseou nos fatores abaixo descritos:

- ✓ Infiltrado Inflamatório:
 - Presença (sim ou não)
 - Intensidade (1 discreto, 2 moderado, 3 intenso)
 - Qualidade (Mononuclear ou Polimorfonuclear ou Misto)
 - Extensão (Superficial ou Profundo)
- ✓ Epitélio juncional:
 - Extensão normal (sim ou não)
 - Migração apical (sim ou não)
- ✓ Cimento:
 - Preservado (sim ou não)
 - Alteração (1 mínima, 2 parcial, 3 grave)
- ✓ Crista óssea alveolar:
 - Íntegra (sim ou não)
 - Reabsorção (1 discreta, 2 moderada, 3 intensa)

Tais critérios foram definidos por Lima et al. (2000) e estão descritos a seguir:

- ✓ **Escore 1:**
 - Infiltrado inflamatório ausente
 - Epitélio juncional normal
 - Cimento preservado ou com áreas eventuais de reabsorção cervical
 - Crista óssea alveolar preservada
 - ✓ **Escore 2:**
 - Infiltrado inflamatório leve (1)
 - Epitélio juncional normal
 - Cimento parcialmente destruído (1-2)
 - Crista óssea alveolar com reabsorção mínima (1)
 - ✓ **Escore 3:**
 - Infiltrado inflamatório moderado (2)
 - Epitélio juncional apical
-

- Cimento parcialmente destruído (1-2)
 - Crista óssea alveolar com reabsorção moderada (2)
- ✓ **Escore 4:**
- Infiltrado inflamatório intenso (3)
 - Epitélio juncional apical
 - Cimento gravemente destruído (3)
 - Crista óssea alveolar com reabsorção intensa (3), ocasionalmente com sequestro ósseo

Dessa maneira, com relação ao escore geral, seguem as figuras 13 e 14 que são representações gráficas das análises das lâminas em relação a esta característica.

Figura 13 - Representação gráfica do Escore geral no grupo H₂O e nos grupos de animais tratados nos períodos de 14, 21 e 28 dias de tratamento.

Figura 14 - Representação gráfica do Escore geral no grupo H₂O e nos grupos de animais tratados, separados por medicamento, nos períodos de 14, 21 e 28 dias de tratamento.

A figura 13 mostra todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias em relação ao escore geral. É importante lembrar que o escore geral envolve os critérios: infiltrado inflamatório, epitélio juncional, cemento e crista óssea alveolar. Não há diferença significativa quanto ao escore geral entre os grupos nos períodos considerados.

A figura 14 exhibe os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias, não havendo diferença expressiva em relação ao escore geral nos grupos.

Os gráficos apontam que houve uma tendência para o escore 3. Na sequência seguem as figuras 15 e 16 (lâminas coradas em HE) que exemplificam os escores.

Figura 15 - Grupo Arnica 6CH, 21dias, face mesial do 1º molar inferior esquerdo (aumento 10X).
Escore 3: infiltrado inflamatório de moderado a intenso (destaque para uma área), epitélio juncional com migração apical, cimento parcialmente destruído e crista óssea alveolar com reabsorção moderada.

Figura 16 - Grupo H₂O, 28 dias, face mesial do 1º molar inferior esquerdo (aumento 4X). Escore 4: infiltrado inflamatório intenso (destaque para uma área), epitélio juncional com migração apical, cimento destruído e crista óssea alveolar com reabsorção intensa e formação de sequestro ósseo.

5.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA DOENÇA PERIODONTAL POR RT-PCR

Esta análise baseou-se na relação entre os alvos TNF- α , COX-2, IL-6, OPG e RANKL e o gene de referência RPL13.

O processamento das placas foi feito no equipamento de PCR em tempo real (marca: Applied Biosystems, modelo Viia 7). Os resultados obtidos, quando tinham distribuição normal, foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) a um critério ou dois critérios de classificação, seguida do teste de Tukey. Aos resultados em que não apresentaram distribuição normal, foram aplicados o teste de Kruskal-Wallis acompanhado do método de Dunns. As figuras a seguir mostram estes resultados.

Figura 17 - Representação gráfica da expressão do RNAm para TNF- α no grupo H₂O e nos grupos de animais que receberam outros tratamentos nos períodos de 14, 21 e 28 dias. *p<0,05

PCR TNF α

Figura 18 - Representação gráfica da expressão do RNAm para TNF- α no grupo H₂O e nos grupos de animais que receberam os demais tratamentos, separados por medicamento utilizado, nos períodos de 14, 21 e 28 dias.
* $p < 0,05$.

A figura 17 mostra todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias em relação à expressão do RNAm para TNF- α . Não há diferença significativa quanto à expressão dessa citocina entre os grupos, quando se analisam isoladamente os períodos de 14 e 28 dias. No entanto, no período de 21 dias, há uma diferença expressiva entre o grupo nimesulida e o grupo Arnica 6CH (* $p < 0,05$).

Também se observa nesta figura, aos 14 dias de tratamento, uma tendência para redução da expressão do RNAm para TNF- α com o tratamento de Arnica TM, o que pode também ser bem visualizado na figura 18.

A figura 18 exhibe os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias. Não há diferença significativa em relação à expressão do RNAm para TNF- α nos grupos H₂O, Arnica TM e nimesulida. Contudo, para o medicamento Arnica 6CH, há diferença significativa entre os períodos de 21 e 14 dias (* $p < 0,05$).

Analisando o grupo H₂O nesta figura 18, percebe-se tendência para aumento da expressão do TNF- α aos 21 dias. Neste mesmo período, o tratamento com Arnica 6CH parece seguir padrão semelhante, observando-se inclusive aumento significativo da expressão do RNAm desta citocina inflamatória, ao contrário do que se verificou nos outros grupos de tratamento.

Na figura 18 também se observa a tendência para redução progressiva da expressão do RNAm desta citocina com o tratamento de nimesulida, ao longo dos três períodos.

Na análise destas duas figuras (17 e 18) percebe-se certa diferença com relação aos efeitos da Arnica TM e da Arnica 6CH, no que diz respeito à expressão do RNAm para TNF- α .

Figura 19 - Representação gráfica da expressão do RNAm para COX-2 no grupo H₂O e nos grupos de animais que receberam os demais tratamentos nos períodos de 14, 21 e 28 dias.

PCR COX-2

Figura 20: Representação gráfica da expressão do RNAm para COX-2 no grupo H₂O e nos grupos de animais tratados, separados por medicamento, nos períodos de 14, 21 e 28 dias.

A figura 19 mostra todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias em relação à expressão do RNAm para COX-2. Não há diferença significativa quanto à expressão dessa citocina entre os grupos, quando se analisam isoladamente cada período de estudo. Entretanto, no período de 14 dias, percebe-se que os três medicamentos apresentaram tendência para reduzir a expressão do RNAm desta citocina, quando comparado com o grupo H₂O, especialmente a Arnica 6CH. Ainda nesta figura, no período de 21 dias, comparando-se com o grupo H₂O, a Arnica 6CH também parece exibir tendência para reduzir a expressão do RNAm para a COX-2.

A figura 20 apresenta os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias. Não há diferença significativa em relação à expressão do RNAm para COX-2 nos grupos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias. No entanto fica nítido a expressiva redução da expressão do RNAm para esta citocina com o tratamento por Arnica 6CH em todos os períodos estudados. Se analisarmos o grupo H₂O, veremos

que a expressão do RNAm parece estar aumentada aos 14 dias da doença periodontal, havendo depois redução, com tendência de estabilidade já aos 21 dias.

Nesta mesma figura é interessante observar que a Arnica TM e o nimesulida, respectivamente um fitoterápico e um conhecido anti-inflamatório não esteroidal, parecem apresentar perfil semelhante, com ligeira tendência de aumento da expressão do RNAm aos 21 dias da doença inflamatória.

Figura 21 - Representação gráfica da expressão do RNAm para IL-6 no grupo H₂O e nos grupos de animais tratados nos períodos de 14, 21 e 28 dias.

PCR IL-6

Figura 22 - Representação gráfica da expressão do RNAm para IL-6 no grupo H₂O e nos grupos de animais tratados, separados por medicamento, nos períodos de 14, 21 e 28 dias.

A figura 21 exibe todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias em relação à expressão do RNAm para IL-6. Não há diferença significativa quanto à expressão dessa citocina entre os grupos nos períodos estudados.

A figura 22 representa os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias. Não há diferença significativa em relação à expressão do RNAm para IL-6 nos grupos separados nos períodos de 14, 21 e 28 dias. Chama a atenção certa tendência para aumento progressivo da expressão do RNAm ao longo dos períodos estudados, em todos os tratamentos, exceto com a Arnica 6CH, que mostra expressão ligeiramente aumentada no período de 14 dias.

Figura 23 - Representação gráfica da expressão do RNAm para OPG no grupo H₂O e nos grupos de animais tratados nos períodos de 14, 21 e 28 dias.

PCR OPG

Figura 24 - Representação gráfica da expressão do RNAm para OPG no grupo H₂O e nos grupos de animais tratados, separados por medicamento, nos períodos de 14, 21 e 28 dias.

A figura 23 apresenta todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias em relação à expressão do RNAm para OPG. Não há diferença significativa quanto à expressão dessa citocina entre os grupos nos períodos estudados. Parece evidente, embora não exista diferença significativa, a marcante redução da expressão do RNAm aos 14 dias, com o tratamento de Arnica 6CH. Chama a atenção a grande expressão do RNAm para esta citocina produzida pelo tratamento com Arnica TM, também aos 14 dias, embora o desvio padrão seja elevado.

A figura 24 exhibe os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias. Não há diferença significativa em relação à expressão do RNAm para OPG nos grupos separados nestes períodos. Entretanto, os resultados do grupo H₂O mostram certa redução da expressão ao longo da evolução da doença e o mesmo perfil de expressão é verificado com o tratamento de Arnica TM. Quando se analisam os resultados do tratamento com Arnica 6CH, o padrão de expressão é completamente diferente, mostrando tendência nítida para o aumento da expressão do RNAm para

esta citocina, ao longo do tempo. Padrão diferente também é visto com o tratamento de nimesulida, havendo aumento da expressão aos 21 dias, não havendo praticamente diferença entre os valores aos 14 e 28 dias.

Figura 25 - Representação gráfica da expressão do RNAm para RANKL no grupo H₂O e nos grupos de animais tratados nos períodos de 14, 21 e 28 dias.

PCR RANKL

Figura 26 - Representação gráfica da expressão do RNAm para RANKL no grupo H₂O e nos grupos de animais tratados, separados por medicamento, nos períodos de 14, 21 e 28 dias.

A figura 25 aponta todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias em relação à expressão do RNAm para RANKL. Não há diferença significativa quanto à expressão dessa citocina entre os grupos nos períodos estudados. Verifica-se também que todos os tratamentos mostraram tendência para redução da expressão do RNAm para esta citocina aos 14 e 21 dias, quando comparados ao grupo H₂O. Parece que aos 28 dias, a expressão do RNAm já estava estabilizada e reduzida para todos os grupos.

A figura 26 mostra os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias. Não há diferença significativa em relação à expressão do RNAm para RANKL nos grupos separados nos períodos de 14, 21 e 28 dias. O tratamento do grupo H₂O mostra tendência para redução progressiva da expressão do RNAm, ao contrário dos demais tratamentos, onde a expressão já parecia estar estabilizada logo aos 14 dias.

As figuras 27, 28 e 29 a seguir apontam a correspondência entre todas as citocinas avaliadas, comparadas ao grupo H₂O, respectivamente nos períodos de 14, 21 e 28 dias.

Figura 27 - Representação gráfica da expressão do RNAm no grupo Arnica 6CH para todas as citocinas avaliadas no estudo, nos períodos de 14, 21 e 28 dias, comparadas ao grupo H₂O. * $p < 0,05$ quando se compara o conjunto dos três períodos nos dois grupos.

A figura 27 acima mostra os resultados da expressão do RNAm para as diferentes citocinas, no grupo que recebeu tratamento com Arnica 6CH, comparados com os resultados do grupo H₂O. Este último grupo foi agora considerado como padrão de referência da evolução da doença periodontal.

Nas figuras mais à direita, vemos as curvas comparativas mostrando a tendência de evolução da expressão do RNAm para cada citocina estudada. Nota-se que no caso da COX-2 (parte B da figura) e do RANKL (E) existe diferença significativa entre os tratamentos quando se compara o conjunto dos três períodos de estudo, 14, 21 e 28 dias (* $p < 0,05$). Embora não se tenha encontrado diferença significativa, o caso da OPG (parte D da figura) também é interessante, pois a curva de expressão após tratamento com Arnica 6CH mostra nítida tendência para

aumento da expressão com o tempo de administração. A expressão do RNAm para TNF- α e IL-6 parece seguir o mesmo padrão, independentemente do tratamento utilizado (H₂O ou Arnica 6CH).

Figura 28 - Representação gráfica da expressão do RNAm no grupo Arnica TM para todas as citocinas avaliadas no estudo, nos períodos de 14, 21 e 28 dias, comparadas ao grupo H₂O.

A figura 28 acima mostra os resultados da expressão do RNAm para as diferentes citocinas no grupo que recebeu tratamento com Arnica TM, comparados com os resultados do grupo H₂O. Não foram encontradas diferenças significativas quanto à expressão das citocinas estudadas. Contudo, nas figuras mais à direita, pode-se perceber grande redução da expressão do RNAm para a COX-2 no grupo tratado com Arnica TM aos 14 dias de experimentação (parte B da figura), embora

não se tenha encontrado diferença significativa. Da mesma forma, na parte E da figura, quando se comparam as expressões do RNAm para RANKL nos dois grupos de tratamento, percebe-se grande redução, em todas as fases do estudo, naqueles animais que receberam tratamento com Arnica TM ($p=0,06$).

Nesta mesma figura percebe-se ainda que o padrão de expressão do RNAm para as demais citocinas (TNF- α , IL-6 e OPG) foi semelhante nos animais tratados com H₂O ou Arnica TM.

Figura 29 - Representação gráfica da expressão do RNAm no grupo nimesulida para todas as citocinas avaliadas no estudo, nos períodos de 14, 21 e 28 dias, comparadas ao grupo H₂O. * $p<0,05$, quando se compara o conjunto dos três períodos nos dois grupos.

A figura 29 acima mostra os resultados da expressão do RNAm para as diferentes citocinas no grupo que recebeu tratamento com nimesulida, comparados com os resultados do grupo H₂O. Foi encontrada diferença significativa apenas na comparação da expressão do RNAm para RANKL (*p<0,05). Entretanto, analisando-se a parte A da figura, percebe-se a grande redução da expressão do RNAm para TNF- α aos 21 de tratamento, após a administração de nimesulida. Ainda na parte B da figura, também houve importante redução da expressão do RNAm para COX-2, logo aos 14 dias, após tratamento com este AINE. Fica também claro que o padrão de expressão do RNAm para IL-6 e OPG é bastante semelhante após os dois tratamentos.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Com a finalidade de melhor interpretação dos resultados obtidos neste estudo, apresenta-se na sequência primeiramente as características em relação à amostra, à metodologia aplicada e à medicação empregada para o alcance dos resultados. Em seguida, discorreremos sobre os resultados, a partir da apreciação dos dados e correlacionando-os com outros estudos realizados por pesquisadores renomados.

6.1 A AMOSTRA

Oliveira (2007, p. 16 -17) em seu trabalho descreve que a indução da Doença Periodontal em humanos não significa um processo ético e que os modelos em animais são imprescindíveis para avaliar esta doença. O rato é utilizado pelo baixo custo, pelo período reduzido de estudo e pela facilidade de manipulação.

De acordo com a estudiosa, a anatomia da junção dentogengival das regiões dos molares do rato é muito semelhante à do homem. Em ratos, essa doença pode ser induzida pela dieta, inoculação de microorganismos periodontopatogênicos ou de seus produtos, ou ainda pela colocação de ligaduras na região cervical do primeiro molar superior ou inferior que funcionam como ambiente para a instalação de bactérias.

A pesquisadora também relata que a colocação de ligaduras é a técnica mais utilizada para indução da Doença Periodontal experimental. O início da Doença Periodontal inflamatória propriamente dita ocorre em resposta à agressão mecânica e ao acúmulo de biofilme em torno da ligadura.

Deste modo, neste estudo, para a composição da amostra, foram utilizados 120 ratos Wistar, nos quais a indução da Doença Periodontal foi realizada pela colocação de ligadura na região cervical do primeiro molar inferior.

Ainda, segundo Oliveira (2007, p. 105 -106), a erupção dos molares em ratos Wistar acontece para o 1º aos 19 dias, para o 2º aos 22 dias e para o 3º aos 35 dias de vida. A função oclusal se define em 25, 28 e 40 dias de vida

respectivamente. Dessa forma, para a realização do presente trabalho, foram utilizados ratos Wistar machos com aproximadamente 60 dias de vida, quando o ponto de contato de todos os molares já está estabelecido.

A autora descreve que a colocação da ligadura ocorre sem o menor trauma possível, possibilitando o acúmulo crescente de biofilme. A indução da doença não é espontânea e feita uma única vez, e, a partir de então, a doença progride naturalmente.

Assim, no atual trabalho, ocorreu a instalação da ligadura nos animais. Para isso, os ratos foram anestesiados com Cloridrato de Xilazina a 2% (ANASEDAN) e Cloridrato de Ketamina a 1% (DOPALEN) em partes iguais, e dessa mistura foi aplicada cerca de 200µl em cada rato por via intramuscular. Esse procedimento está de acordo com Souza (2014, p. 49) que descreve esta mistura de fármacos para o processo da anestesia nos ratos.

Também seguimos o procedimento para a colocação da ligadura como Souza (2014, p. 49) o qual consistiu em um fio estéril de seda preto trançado 3-0, amarrado ao redor do primeiro molar inferior esquerdo com nó na região mesial. Nas faces vestibular, lingual e distal do dente, o fio foi colocado em posição subgengival, enquanto que na face mesial, permaneceu instalado de maneira supragengival.

Oliveira (2007, p. 107), em seu trabalho, elucida que dentre as várias vantagens da pesquisa com a doença experimentalmente induzida é poder observar seu curso ao longo do tempo, para a compreensão da sua patogênese e definição do melhor tratamento a ser empregado.

Desse modo, com o propósito de posicionar a eficácia dos medicamentos envolvidos nesse estudo na redução da doença periodontal inflamatória, e, também, cientes das limitações inerentes desse modelo experimental, optamos por este padrão de estudo com a finalidade de avaliar o processo inflamatório, a perda óssea e a expressão de algumas moléculas características desse processo.

6.2 METODOLOGIA

Este estudo foi desenvolvido em três etapas: análise da perda óssea, análise histológica e RT-PCR.

Para a análise da perda óssea, efetuamos fotos das 59 peças coradas em azul de metileno 0,1%. Segundo as metodologias dos trabalhos de Centurion (2007, p. 40) e de Lima (2011), essas imagens receberam um código aleatório, ou seja, os pesquisadores não sabiam a qual animal pertencia a amostra (grupo, nº da caixa, nº do rato, nº de dias de tratamento).

Ainda, de acordo com Lima (2011), com o auxílio de um programa de análise de imagens, foi efetuada a medição da área envolvida entre a junção amelo-cementária (JAC) e as cristas ósseas alveolares mesial e distal em mm². Para cada amostra, a perda óssea foi determinada como a área total entre a JAC e as cristas ósseas alveolares mesial e distal da face vestibular do primeiro molar inferior. É importante ressaltar que no presente trabalho utilizamos o programa ImageJ para a medição da perda óssea, e o elemento dentário foi o primeiro molar inferior esquerdo.

Todas as técnicas para a análise histológica, como a inclusão na parafina, cortes no micrótomo, coloração em HE, e posterior leitura das lâminas foram de acordo com os Procedimentos recomendados pelo Laboratório de Histologia (FOB – USP).

A avaliação das lâminas compreendeu o estudo dos seguintes parâmetros: junção dentogengival, em especial a relação entre o epitélio juncional e a junção cimento-esmalte, ligamento periodontal bem como a presença e extensão da reabsorção óssea alveolar, presença de infiltrado inflamatório e integridade do cimento nos diferentes períodos de indução da doença periodontal (LIMA et al., 2000; RODINI, 2005; CENTURION, 2007).

A análise histológica incluiu critérios quanto ao infiltrado inflamatório discreto (1), moderado (2) e intenso (3), à porcentagem de PMN e ao escore geral. Para a definição desses critérios, em especial a descrição dos escores, utilizou-se os procedimentos estudados pela Prof^a Dra. Camila de Oliveira Rodini da disciplina

de Histologia (FOB-USP). A metodologia baseou-se no estudo de Lima et al.(2000), conforme já descrito no tópico 5 (Resultados).

Quanto ao processo de RT-PCR (Transcrição Reversa- Reação em Cadeia da Polimerase), de acordo com Santos et al. (2004, p.2), ele é utilizado para adquirir informações sobre a expressão gênica em células ou tecidos.

Os autores esclarecem que a RT-PCR, associa a síntese de cDNA a partir de moldes de RNA, e fornece uma técnica rápida e sensível para a análise da expressão de genes. A RT-PCR é utilizada para detectar ou quantificar a expressão de RNAm a partir de uma pequena concentração de RNA alvo.

No presente trabalho, o gene de referência (controle positivo) utilizado para todos os alvos (TNF- α , RANKL, OPG, COX-2 e IL-6) foi o RPL13. Esse gene, pelas experiências no Laboratório de Farmacologia da FOB-USP, tem pouca variação nas amostras de gengiva.

De acordo com Curtis et al. (2010), a legitimidade dos dados de expressão de genes definidos pela RT-PCR é condicionada à seleção ótima de genes de referência para a normalização, caracterizados por níveis elevados de expressão e baixa variabilidade.

Os pesquisadores descrevem sobre o RPL13: seu nome completo é proteína ribossomal L13 e que é adequado e validado, podendo ser utilizado para a normalização dos dados de RT-PCR. Eles apontam também que o RPL13 é o gene específico para normalização da RT-PCR em ratos.

Quanto aos alvos escolhidos para os ensaios de RT-PCR: TNF- α , RANKL, OPG, COX-2 e IL-6, foram propostos porque estão direta ou indiretamente envolvidos nos processos inflamatórios com perda óssea, conforme descrevem os trabalhos a seguir.

A Doença Periodontal, de acordo com Gomes Filho et al. (2006), é caracterizada como o desequilíbrio entre a atuação das bactérias, fatores externos e o processo de defesa do organismo. Essa patologia desponta pela inflamação da gengiva, podendo evoluir até a esfoliação do dente pela perda do tecido ósseo e dano ao ligamento periodontal.

Dessa forma, a Doença Periodontal, como uma patologia inflamatória, produz vários mediadores inflamatórios, conforme demonstrado na sequência.

Oliveira (2007, p.8) em seu trabalho descreve que a inflamação e a destruição dos tecidos são acontecimentos promovidos pelo hospedeiro em resposta ao processo infeccioso. Os fosfolipídeos da membrana por meio da ação da enzima fosfolipase A2 resultam na ativação da cascata do ácido araquidônico e provocam a síntese de metabólitos com propriedades pró-inflamatórias.

A autora completa que o ácido araquidônico pode servir como substrato para duas vias enzimáticas: a via das ciclooxigenases e a via das lipoxigenases. Uma das isoformas da COX, a COX-2, se apresenta em níveis desprezíveis ou não detectáveis em tecidos saudáveis, sendo altamente expressa em tecidos inflamados.

A COX-2, Segundo Rang et al. (2012), é impulsionada em células inflamatórias quando os tecidos estão injuriados ou infectados após a ação das citocinas inflamatórias, em especial, a interleucina (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α). Assim, a COX-2 é responsável pela síntese dos prostanóides da inflamação.

Glowacki et al. (2013) apontam em seu estudo que os linfócitos chamados células T reguladoras (Tregs) podem se aglomerar nos tecidos gengivais durante a doença periodontal em humanos e em modelos experimentais. Essas células ajudam a defender o hospedeiro de uma inflamação danosa. Porém, foi constatado que quando Tregs estão escassas, a progressão da doença é acelerada.

Nesse trabalho foi observado que camundongos que receberam as micropartículas de liberação de CCL22 (formulação de recrutamento de Treg) apresentaram menos reabsorção do osso alveolar, pois produziram níveis mais elevados de proteínas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) e sub-regulação das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-2, IL-12, IL-17, IFN- γ e TNF- α .

Ainda, de acordo com essa pesquisa, ocorreu uma infra-regulação significativa de RANK e RANKL, importantes para a osteoclastogênese levando à reabsorção óssea, após a administração das micropartículas de CCL22. Em

contrapartida, a osteoprotegerina (OPG) foi moderadamente supra-regulada, embora não expressivamente.

O estudo de Papadopoulos et al. (2013) descreve que a produção demasiada de TNF acompanha vários distúrbios inflamatórios e está envolvida no metabolismo ósseo acelerado. Porém, a infecção por *P. gingivalis* em camundongos deficientes em TNF não conseguiu motivar a perda óssea em comparação com seus respectivos controles. Estes dados apontam que o TNF é uma citocina chave para conduzir a perda óssea bucal in vivo.

Segundo os estudiosos, os macrófagos são a fonte primária de TNF em resposta a *P. gingivalis* e essa citocina é um mediador importante da resposta inflamatória inata frente a esse agente infeccioso. O TNF coordena a ativação dos macrófagos e a síntese de citocinas inflamatórias após a exposição primária a *P. gingivalis*. Os autores acrescentam que TNF funciona em sinergia com RANKL para impulsionar a ativação e a diferenciação de osteoclastos.

Em relação ao RANKL, os pesquisadores Han et al. (2013) descrevem em seu estudo que essa citocina está relacionada com o fator de necrose tumoral (TNF) e tem envolvimento na osteoclastogênese fisiológica e também na reabsorção óssea patológica. O RANKL é expresso não só em osteoblastos e células do estroma de medula óssea, mas também em células T e células B.

São relatadas nesse trabalho outras pesquisas que sugerem uma maior contribuição de células imunes à reabsorção do osso periodontal, propondo que o excesso de RANKL desloca o equilíbrio do metabolismo ósseo na direção do catabolismo e conduz à reabsorção óssea periodontal.

Os resultados desse estudo indicam que a resposta imunológica através das células T e B para *P. gingivalis* pode ser observada cedo, 7 dias após a infecção, e se eleva significativamente 28 dias após a infecção.

Os estudiosos Dosseva-Panova, Popova e Panov (2014) relatam que no tecido gengival e no fluido gengival de pacientes com periodontite crônica são encontradas grandes quantidades de fatores pró-inflamatórios (RANKL), citocinas

pró-inflamatórias, tais como IL-1 e IL-6, TNF- α , quimiocinas tais como a IL-8 e outros mediadores inflamatórios em comparação com indivíduos saudáveis.

De acordo com os autores a IL-1 e TNF- α estão implicadas na reabsorção óssea, pois provocam a diferenciação de precursores dos osteoclastos e a subsequente ativação dos osteoclastos. Estudos recentes descritos por esses pesquisadores apontam que também a IL-6, produzida por osteoblastos, mostrou a capacidade de motivar a perda óssea. Eles acrescentam que as citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, TNF- α e IL-6 são as primeiras na sinalização e são predominantes na lesão periodontal.

Conforme Kayal (2013), a associação entre a IL-6 e a perda óssea alveolar em doenças periodontais foi estabelecida em modelos animais, ocorrendo aumento da imunomarcagem para IL-6 e maior número de osteoclastos. O autor acrescenta que esses estudos sugerem que a produção de IL-6 (pró-inflamatória) contribui para periodontite e induz à perda óssea.

Esse trabalho também descreve que RANK é um receptor presente na superfície dos precursores dos osteoclastos, e quando RANK se liga a RANKL seu ligante, estimula a diferenciação destas células precursoras em osteoclastos maduros. OPG compete com RANKL para a ligação com RANK sem estimular qualquer diferenciação.

O autor comenta que num estudo da progressão da doença periodontal em camundongos, no período mais tardio da doença, as concentrações de citocinas pró-inflamatórias, MMPs e RANKL diminuíram. Em contrapartida, houve um aumento nas concentrações das citocinas anti-inflamatórias e OPG. O estudioso destaca que no início da pesquisa RANKL estava aumentada em relação à OPG, já, no final, a taxa de perda de massa óssea diminuiu, ou seja, a concentração de RANKL reduziu drasticamente e a de OPG se elevou.

Conforme explanado pelos estudiosos, as citocinas selecionadas no presente estudo como alvos para a análise por RT-PCR estão intimamente envolvidas no processo inflamatório da Doença Periodontal com perda óssea.

6.3 CARACTERÍSTICAS E PRESSUPOSTOS TEÓRICOS DOS MEDICAMENTOS UTILIZADOS NESTE ESTUDO

Conforme já explanado nos tópicos 4.1 e 6.1, a Doença Periodontal foi induzida nos ratos e os mesmos foram divididos em grupos de acordo com as medicações administradas: Grupo nimesulida, Grupo tintura-mãe de Arnica montana (Arnica TM) e Grupo Arnica montana 6CH (Arnica 6CH). O Grupo Água (H₂O) serviu como controle.

A Doença Periodontal compreende um quadro inflamatório e usualmente com perda óssea. Preconiza-se, então, a utilização de fármacos anti-inflamatórios e analgésicos para o alívio desses sintomas, sendo indispensável a remoção dos agentes causais para o tratamento efetivo da doença. Na sequência estão destacados os medicamentos utilizados neste estudo.

6.3.1 NIMESULIDA

Conforme descrito no tópico 2.2, o nimesulida é um AINE (Anti-inflamatório Não Esteroidal), e, de acordo com Rang et al. (2012) o mecanismo primário de ação dos AINEs está relacionado com a inibição da enzima ciclo-oxigenase (COX), bloqueando a produção de prostaglandinas e tromboxanos.

Os AINEs, de acordo com Burke, Smyth e FitzGerald (in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006), incluindo os inibidores seletivos da COX-2, têm ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética. Os autores explicam que houve várias evidências de que as prostaglandinas atuam na patogênese da febre e inflamação e que são liberadas quando há dano celular. Eles acrescentam que os AINEs inibem a biossíntese das prostaglandinas em todos os tipos de células.

Rang et al. (2012) descrevem que existem duas isoformas comuns da enzima COX: a COX-1 e COX-2. A COX-1 é uma enzima expressa na maioria dos tecidos e está envolvida na homeostase dos tecidos, e é responsável pela síntese de prostaglandinas com características, por exemplo, de citoproteção gástrica.

Esses autores destacam que a COX-2 é estimulada em células inflamatórias quando os tecidos estão lesionados ou infectados, por exemplo, após

ação das citocinas inflamatórias, interleucina (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α). Portanto, a isoforma COX-2 é responsável pela produção dos prostanoídes da inflamação.

A ação anti-inflamatória conferida aos AINEs, de acordo com os estudiosos, é feita pela redução da produção de prostaglandina E2 e prostaciclina (PGI₂), derivadas principalmente da COX-2, o que implica na limitação da vasodilatação e do aumento de permeabilidade vascular, restringindo dessa forma o edema local.

Burke, Smyth e FitzGerald (in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006) apontam que alguns AINEs bloqueiam a COX-2 com relativa seletividade, como o diclofenaco, o meloxicam e o nimesulida.

O nimesulida tem destaque pela sua frequência nos receituários dos consultórios odontológicos. Segundo Burke, Smyth e FitzGerald (in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006), o nimesulida é um composto da classe das sulfonilidas e tem seletividade para a COX-2 semelhante ao celecoxib. Dentre suas propriedades, são enfatizadas a inibição da ativação de neutrófilos, diminuição na produção de citocinas e redução na produção de enzimas de degradação.

O trabalho de Bjarnason (2007) explana que o nimesulida é um AINE com ação preferencial sobre a COX-2. Assim, ele tem uma confiabilidade gastrointestinal superior aos outros AINEs. O estudo de Kerola et al. (2009) demonstrou que o nimesulida suprimiu quase totalmente a atividade da COX-2 e uma diminuição parcial da ação da COX-1, comprovando a relativa seletividade do nimesulida sobre a COX-2.

De acordo com as pesquisas de Avelar et al. (2012), De Menezes e Cury (2010) e Levrini et al. (2008), o nimesulida é utilizado na odontologia, particularmente na cirurgia de remoção dos terceiros molares, com ações anti-inflamatórias e analgésicas combatendo a dor e o edema. É o fármaco de referência para este tipo de procedimento com raros efeitos indesejáveis.

Os estudos de Rainsford (2006), Binning (2007), e Rainsford et al. (2006) apontam que o nimesulida é bem distribuído pelo mundo como um poderoso

analgésico, antipirético e anti-inflamatório. Tem um ótimo perfil de tolerância pelo organismo e possui atividade rápida sendo uma alternativa de tratamento segura.

Queiroz Junior et al. (2009, p. 154) descrevem em seu trabalho que modelos de doença periodontal induzida por ligadura em ratos evidenciaram que a administração sistêmica de drogas seletivas para COX-2 e AINEs tradicionais pode prevenir a perda óssea alveolar. Estes dados sugerem a implicação de COX-1 e / ou COX-2 na patofisiologia da doença periodontal.

Os autores acrescentam que a indução da produção de COX-2 na inflamação leva à síntese de PGE 2, responsável pela maior parte dos efeitos observados na doença periodontal, compreendendo a vasodilatação, o recrutamento de células inflamatórias, a perda óssea e destruição do colágeno. Dessa forma, os inibidores seletivos da COX-2 são uma boa abordagem para restringir a progressão da doença periodontal.

Os pesquisadores também apontam que estudos recentes demonstraram um benefício suplementar do nimesulida. Esse fármaco diminui os níveis gengivais de PGF 2 α além da PGE 2. Em contrapartida, demonstrou-se que PGF 2 α eleva os níveis de IL-6 nas áreas periodontais. Destaca-se, assim, que os efeitos benéficos dos inibidores seletivos da COX-2 na doença periodontal podem não ser apenas atribuído aos baixos níveis de prostaglandina E 2.

O estudo de Garcia et al. (2010, p. 294) descreve que a expressão da COX-2 é significativamente aumentada em tecidos periodontais inflamados. Eles também elucidam que a COX-2 restringe o processo da osteoblastogênese e modifica as atividades dos genes responsáveis pela diferenciação dos osteoblastos.

Segundo os mesmos autores, a função dos fármacos anti-inflamatórios na patogênese da doença periodontal destrutiva está ligada com a inibição da metaloproteinase da matriz e com a diminuição na expressão da prostaglandina, pois essas drogas agem na via da COX.

Ainda, de acordo com Garcia et al. (2010, p. 299), a redução da perda óssea no grupo de animais induzidos à doença periodontal e tratados com Lumiracoxib (inibidor seletivo da COX-2) possivelmente está relacionada com o bloqueio da produção de PG, e restrição de todos os processos inflamatórios

associados com a periodontite experimental, tais como os metabolitos do ácido araquidônico e citocinas inflamatórias (IL-1 e IL -6) que podem ter atividade de reabsorção óssea.

O trabalho de Oliveira et al. (2008) relata que o meloxicam (AINE com relativa seletividade para a COX-2) pode interferir com a progressão da doença periodontal e seu uso sistêmico diminui a expressão do VEGF e a perda óssea alveolar.

Já o estudo de Nassar et al. (2005), com periodontite induzida experimentalmente em ratos, demonstra que o meloxicam provoca o bloqueio de COX-2 e como consequência há uma diminuição do processo inflamatório na fase aguda. A inibição da COX-2 pode provocar a diminuição na progressão da perda óssea nessa fase.

Porém, em períodos mais longos da doença, os autores descrevem que há uma redução da eficácia do meloxicam no combate à inflamação, pois o acúmulo bacteriano (biofilme) induz a um aumento do estímulo imunitário-inflamatório com a ativação de outros mediadores inflamatórios. Dessa forma, isso pode explicar a falta de inibição da reabsorção óssea encontrada nos grupos tratados com meloxicam nos períodos mais tardios.

A pesquisa de Karakawa et al. (2010) com o diclofenaco elucida sua ação contra a inflamação e também na infra-regulação da remodelação óssea. O mecanismo desse fármaco sobre a remodelação óssea está associado com a diminuição do fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB) fosforilado, que rege a diferenciação e ativação dos osteoclastos.

Face ao exposto, o nimesulida, um AINE com relativa seletividade para a COX-2, possui propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas semelhantes aos demais AINEs mencionados anteriormente. Assim, s.m.j., pode ser indicado para a patologia periodontal, doença com características inflamatórias que evolui até à lesão óssea.

6.3.2 ARNICA MONTANA 6CH

De acordo com a descrição no tópico 2.3 dos trabalhos de Allen (1995) e Cairo (1994), a Arnica montana homeopática é indicada para as sequelas de traumatismos mecânicos, para impedir a supuração, a septicemia, as equimoses consequentes das cirurgias e também para dor odontológica resultante das intervenções dentárias.

Alguns estudos demonstram que a Arnica montana homeopática proporciona redução da dor, conforme relatado por Jeffrey e Belcher (2002) e Robertson, Suryanarayanan e Banerjee (2007). Uma outra pesquisa, desenvolvida por Brinkhaus et al. (2006) apontou menor tendência de inchaço pós-operatório enquanto Karow et al. (2008) identificou melhor tolerabilidade e cicatrização de feridas em comparação com o diclofenaco.

O trabalho de Macêdo et al. (2004, p. 86) explana que a permeabilidade vascular induzida por injeções de histamina em ratos foi significativamente reduzida pelo pré-tratamento com Arnica 6CH, comparada com o placebo e com o controle.

Na cirurgia buco-maxilo-facial, de acordo com a revisão da literatura de Bevilaqua (2003), o medicamento homeopático Arnica montana mostra-se eficaz contra a dor e o edema pós-operatórios. Já para Fernandez et al. (2002), nesse tipo de cirurgia caracterizada por edema facial traumático, a Arnica montana homeopática teve resultado superior ao piroxicam.

Também na cirurgia de terceiros molares inclusos, segundo a pesquisa de Souza et al. (2011), a Arnica montana 6 CH foi eficiente no controle do edema e apresentou correspondência em relação ao diclofenaco de sódio 50mg.

De acordo com Sreemanti et al. (2012), a Arnica montana 30CH, em bactérias *E. coli* submetidas a raios UV, auxiliou no reparo ao dano do DNA através do aumento da regulação de genes de reparação e também melhorou o estresse oxidativo pela redução da geração de ROS (espécies reativas de oxigênio) e modulação adequada de enzimas anti-estresse oxidativo, ou seja, aumento de SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase) e de GSH (glutathiona reduzida).

A pesquisa de Kawakami et al. (2011) aponta os efeitos da Arnica montana 6CH reduzindo o edema nas patas de ratos inoculados com 1% de carragenina. Os autores também citam outros estudos em que *Arnica montana* 6CH é capaz de modular o processo inflamatório agudo em ratos, pois pode aumentar a absorção de edema linfático e do fluxo sanguíneo local, bem como promover a migração de células polimorfonucleares.

Em relação ao trabalho desses estudiosos, observou-se que o tempo é importante para o efeito da Arnica montana 6CH: animais que apresentaram pico tardio de edema (após 30 minutos da injeção de carragenina) foram mais sensíveis à Arnica do que os animais que apresentaram um pico precoce de edema (antes de 30 minutos). Isso coincidiu com a redução da degranulação de mastócitos e aumento do diâmetro dos vasos linfáticos. A explicação mais plausível para esse fato é que a histamina e as prostaglandinas estão envolvidas no processo de edema mais tardio e a Arnica atuaria sobre esses mediadores.

Os autores concluem com esse experimento que o tratamento com Arnica montana 6CH não modula a migração de leucócitos, mas a regulação vascular, a absorção linfática, a expressão de moléculas de adesão CD54 e a degranulação de histamina. Eles acrescentam que há uma nítida influência da variação individual na cinética dos eventos vasculares após o tratamento com Arnica montana 6CH.

O estudo de Shubhamoy et al. (2014), feito em um ambulatório odontológico de um Hospital Homeopático do Governo na Bengala Ocidental (Índia), aponta que as condições dentárias mais diagnosticadas foram periodontite crônica (n = 113, 27,5%), dor de dente com cárie (n = 65, 15,8%), pulpite reversível (n = 49, 11,9%), sensibilidade do cimento (n = 48, 11,7%), gengivite (n = 32, 7,8%), e abscesso periodontal agudo (n = 31, 7,5%).

Esse estudo destaca que a Arnica montana foi um dos medicamentos mais utilizados na forma de tintura e na 30CH, sendo aplicado especialmente para extração dentária. Os autores sugerem que resultados muito positivos foram evidenciados tanto em condições agudas quanto crônicas com essa terapêutica e indicando que a intervenção homeopática pode influenciar na progressão da doença, porém, mais estudos são necessários.

Os trabalhos apresentados no tópico 2.3.1 exibiram primeiramente que a terapêutica homeopática, de acordo com Mourão, Moutinho e Canabarro (2013), pode auxiliar o tratamento periodontal convencional, e contribuir com benefícios adicionais ao mesmo. Já um outro estudo realizado por Farina (2010) destaca que o medicamento homeopático pode impulsionar a formação óssea.

As pesquisas supra citadas foram desenvolvidas com medicamentos diferentes da Arnica montana homeopática. Porém, de acordo com as descrições dos estudos com a homeopatia Arnica montana, é possível considerar que esse fármaco também pode ser utilizado em casos agudos e crônicos e, assim, s.m.j., sugere-se seu emprego no tratamento da Doença Periodontal com perda óssea.

6.3.3 TINTURA-MÃE DE ARNICA MONTANA

O tópico 2.4 discorreu sobre alguns trabalhos envolvendo o fitoterápico Arnica montana.

Os pesquisadores Verma et al. (2010) descrevem o papel anti-inflamatório da Arnica montana através da inibição do NO, da COX-2 e do TNF- α . Enquanto que Quinelato, Balduino e Guimarães (2011) elucidam a ação principal da Arnica montana na inibição da ativação do fator de transcrição celular NF- κ B reduzindo a inflamação e a dor causadas por entorse, contusões e ferimentos.

Também Jäger et al. (2009) apontam as propriedades anti-inflamatórias da Arnica montana que age na inibição da ligação ao DNA dos fatores de transcrição AP-1 e NF- κ B. Eles acrescentam que a tintura de Arnica reduz a produção de TNF- α e IL-1 β , que são mediadores pró-inflamatórios.

De acordo com Beg et al. (2011), o extrato etanólico de flores de Arnica montana contem princípios anti-inflamatórios, como o 1,5-trans-guaianolide com ação em NF- κ B e em IL-8 *in vitro* e *in vivo*. Já Klaas et al. (2002) enfatizam a presença no extrato de Arnica montana de lactonas de sesquiterpeno, principalmente a 11 α ,13-dihydrohelenalina com atividade anti-inflamatória que atua na inibição dos fatores de transcrição NF- κ B e de NF-AT e consequentemente no controle sobre a liberação das citocinas IL-1 e TNF- α .

Os autores Macêdo et al. (2004, p. 84) apontam a atividade imunológica *in vitro / in vivo* da Arnica montana, observando-se o aumento da fagocitose pelos granulócitos e macrófagos. Os estudiosos acrescentam a ação imunológica de dois polissacarídeos da Arnica montana em cultura de células, são eles: Fucogalactoxiloglicano e proteína ácida arabino-3,6-galactano resultando no aumento da fagocitose *in vivo* e estímulo à produção do fator de necrose tumoral (TNF) pelos macrófagos respectivamente.

Os pesquisadores também descrevem que na inflamação aguda induzida pela carragenina, o grupo tratado com Arnica montana manifestou um efeito inibidor significativo sobre o edema em comparação com o controle.

O trabalho de Jäggi et al. (2004) *in vitro* demonstra que a tintura-mãe de Arnica montana inibe a síntese de Leucotrieno B₄ (LTB₄) por 5-lipoxigenase (5-LOX) e também tem efeito inibitório na produção de prostaglandinas (PGE₂) por bloqueio maior sobre a COX-1 e menor sobre a COX-2.

Os estudiosos Sharma et al. (2015) relatam o mecanismo de ação do extrato metanólico da flor de Arnica montana (AMME) contra a inflamação e estresse oxidativo na artrite induzida por colágeno Tipo II (CIA) em ratos. A administração de AMME produziu uma significativa redução na severidade da doença.

Esse estudo também exhibe que no começo da CIA ocorre um aumento expressivo nos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL1- β , IL-6 e IL -12 e também do óxido nítrico em comparação com os ratos controle normais. A administração de AMME inibiu a expressão de todos esses mediadores inflamatórios e os autores sugerem que a eficácia dessa terapêutica pode ser devido à presença de compostos fenólicos e flavonoides no extrato.

Os estudos relatados no tópico 2.4.1 destacaram a utilização de fitoterápicos com atividades sobre a osteogênese, na cicatrização óssea, na destruição articular, na osteoporose, na Doença Periodontal experimental, enfim, nas patologias ósseas causadas por reabsorção óssea excessiva.

É importante salientar que os trabalhos descritos no tópico citado acima foram realizados com fitoterápicos distintos da Arnica montana. Em contrapartida, de

acordo com os resultados dos trabalhos aqui mencionados com o fitoterápico Arnica montana, é admissível ponderar que esse medicamento pode representar uma opção viável, s.m.j., para a patologia periodontal com dano ósseo.

6.4 RESULTADOS

Com relação à análise da perda óssea, a figura 6 do tópico 5.1 indica que nenhum dos tratamentos foi capaz de conter a perda óssea. Em contrapartida, essa figura mostra uma tendência do fármaco nimesulida para diminuir a perda óssea no período de 14 dias de tratamento. Já a figura 7 do mesmo tópico, além de sugerir que os tratamentos não controlam a perda óssea, também aponta que o grupo nimesulida exibe uma perda óssea significativamente maior aos 28 dias em relação aos 14 dias de tratamento, provavelmente pela tendência citada anteriormente.

O resultado acima está de acordo com o estudo de Nassar et al. (2005) com o fármaco meloxicam (medicamento com relativa seletividade para a COX-2) administrado em ratos Wistar após a indução da Doença Periodontal por ligadura. Esse trabalho relata que os grupos tratados com meloxicam após 5 dias de administração apresentaram perda óssea alveolar expressivamente diminuída ($p < 0,05$), quando comparados com grupos controle. Porém, após 15 dias de tratamento com meloxicam, não houve diferenças significativas na reabsorção óssea. Assim, esses resultados contribuem com evidências de que o tratamento com meloxicam pode modificar a progressão da Doença Periodontal induzida experimentalmente em ratos durante o período inicial. Nossos estudos utilizaram animais com no mínimo 14 dias da indução da doença periodontal. Apesar da tendência exibida pelo nimesulida de diminuir a perda óssea, também não encontramos diferenças significativas, nem aos 14, 21 ou 28 dias.

Segundo os estudiosos Nassar et al. (2005), a redução da eficácia do meloxicam para resistir à inflamação após longos períodos pode ser explicada pelo acúmulo de biofilme e pela ativação de outros mediadores inflamatórios.

Também, na pesquisa de Ghalayani et al. (2014) com diclofenaco (medicamento com relativa seletividade para a COX-2) e celecoxib (fármaco seletivo

para a COX-2) em 45 ratos Wistar machos após a extração do primeiro molar superior direito, foi descrita a imunomarcção TRAP (Fosfatase ácida resistente ao tartarato, enzima expressa em osteoclastos e que está relacionada com a reabsorção óssea).

Segundo os estudiosos, a imunomarcção TRAP no dia 7 foi menor nos grupos diclofenaco e celecoxib em relação ao grupo controle. No dia 14, o número de osteoclastos foi menor no grupo diclofenac em relação ao controle, sem diferença estatisticamente significativa; porém, no grupo celecoxib, o número de osteoclastos foi significativamente menor. No dia 21, o número de osteoclastos foi menor nos dois grupos tratados com AINEs em comparação ao grupo controle.

Ainda, de acordo com o estudo, a expressão do gene de RANKL foi expressivamente diminuída nos grupos teste em comparação com o grupo controle. As drogas avaliadas provocaram uma diminuição significativa na expressão TRAP durante três semanas após a extração, especialmente nos primeiros 14 dias. Os autores concluíram que esses dois tipos diferentes de AINEs (diclofenaco e celecoxib) podem influenciar a perda óssea após a extração dentária.

A partir do que foi explanado pelos autores, pode-se deduzir que a administração de AINEs em ratos para processos inflamatórios interrompe a perda óssea em períodos mais precoces.

No entanto, o trabalho de Oliveira et al. (2008) com 120 ratos Wistar submetidos à indução da Doença Periodontal por ligadura e tratados com meloxicam aponta que o tratamento com esse medicamento reduziu a reabsorção óssea em todos os períodos estudados (3, 7, 14 e 30 dias). Nossos estudos utilizaram nimesulida, AINE semelhante ao meloxicam no que diz respeito à inibição preferencial de COX-2 e nenhuma redução da perda óssea foi verificada, em nenhum período estudado. É importante recordar que a inibição da COX, com consequente redução da produção de prostanoídes, não é o único mecanismo conhecido destes anti-inflamatórios, o que poderia explicar a diferença de resultados.

De acordo com os autores Oliveira et al. (2008), o meloxicam reduziu significativamente a expressão do RNAm para VEGF (Fator de crescimento

endotelial vascular) em tecidos doentes após 14 dias de tratamento. Eles sugerem um papel importante para o VEGF na progressão da doença periodontal e na perda óssea alveolar. O VEGF tem papel central na vasculogênese, está aumentado em tecidos inflamados e intimamente relacionado com a COX-2. A análise por RT-PCR revela uma correspondência positiva entre RNAm da COX-2 e do VEGF. Estudos futuros de nosso grupo poderiam verificar o efeito do nimesulida e de outros medicamentos fitoterápicos e homeopáticos sobre a expressão do RNAm para o VEGF, procurando elucidar a evolução da perda óssea na doença periodontal.

Quanto à análise microscópica dos cortes histológicos, a figura 9 do tópico 5.2 aponta que no grupo H₂O ocorre alteração significativa do infiltrado inflamatório, quando são comparados os três períodos de estudo. Houve redução significativa aos 21 dias, quando comparado aos 28 dias de tratamento (* $p < 0,05$). No grupo nimesulida há redução significativa do infiltrado inflamatório aos 28 dias de tratamento comparando-se com 21 dias (* $p < 0,05$), sugerindo uma diminuição do infiltrado inflamatório no momento mais tardio do experimento para esse tratamento.

É importante salientar que no presente estudo, pela análise microscópica, no escore para o infiltrado inflamatório houve predomínio de células mononucleares, conforme consta no Apêndice C que relaciona a porcentagem de PMN de acordo com a leitura das lâminas. Isso provavelmente foi devido aos períodos utilizados neste estudo (14, 21 e 28 dias), em que o processo inflamatório já está na fase crônica.

Essa informação vem ao encontro do trabalho desenvolvido por Rodini (2005), com a indução da Doença Periodontal por ligadura em ratos, que destaca que os PMNs estão presentes desde as fases mais precoces da doença. Já as células mononucleares são escassas nos períodos iniciais e são mais observadas a partir de 14 dias de indução experimental.

Também em relação ao infiltrado inflamatório, Rodini et al. (2008), em seu estudo com a indução da Doença Periodontal por ligadura em ratos, apresentam resultados ligeiramente diferentes, pois, em todos os períodos analisados (1, 3, 7, 14 e 30 dias) foram encontrados inúmeros PMNs e poucas células mononucleares, inclusive nos períodos mais tardios, havendo predominância de PMNs nos períodos

iniciais. Estes dois trabalhos que procuraram caracterizar o infiltrado inflamatório ao longo da evolução da doença periodontal, revelam certa dificuldade em estabelecer um padrão bem definido para cada uma das fases. Nossos resultados mostraram maior correspondência com o trabalho de Rodini (2005).

Ainda, na pesquisa de Rodini (2005) observou-se no período de 14 dias de indução, um infiltrado inflamatório de moderado a intenso com predomínio de células mononucleares e eventuais PMNs. Já no período de 30 dias, de acordo com o estudo, foi encontrado infiltrado inflamatório discreto com predomínio de células mononucleares.

Essa característica tardia do processo inflamatório também foi relatada por Aquino et al. (2009) com dois modelos experimentais para a indução da Doença Periodontal em ratos: um por ligadura e o outro por injeções de LPS no palato. O resultado desse experimento indicou uma significativa diminuição na densidade do infiltrado celular aos 30 dias no grupo com ligadura.

Nossos resultados, entretanto, mostraram que o infiltrado inflamatório aos 28 dias no grupo H₂O foi de moderado a intenso, com predominância de células mononucleares. Ao que tudo indica, a predominância de células mononucleares nesta fase mais tardia parece ser uma constante, havendo, contudo, discordância com relação à intensidade do infiltrado inflamatório.

Igualmente, o trabalho de Oliveira (2007) com a indução da Doença Periodontal por colocação da ligadura em ratos teve resultados semelhantes àqueles obtidos no presente estudo com o grupo nimesulida: os ratos tratados com meloxicam (medicamento com relativa seletividade para a COX-2) apresentaram inúmeras células inflamatórias no período de 14 dias e, aos 30 dias, células inflamatórias em quantidade moderada, evidenciando efeito deste medicamento.

Ao correlacionarmos a perda óssea com o infiltrado inflamatório, conforme apresentado na figura 12 do tópico 5.2, nota-se que nos animais do grupo H₂O (parte A da figura), houve redução expressiva do infiltrado aos 21 dias de tratamento sem modificação da perda óssea. Ao que parece, a intensidade do infiltrado não mostrou correlação com a perda óssea ocorrida no período. Entretanto, no grupo de animais tratados com nimesulida (parte D da figura), o aumento da perda óssea

prossegue significativamente ($*p<0,05$) com o decorrer do tempo, mesmo havendo diminuição significativa do infiltrado ($*p<0,05$) aos 28 dias. Mais uma vez, a intensidade do infiltrado não mostrou correlação com o nível de perda óssea, indicando que outros fatores estão envolvidos neste processo.

Bezerra et al. (2000), estudando ratos submetidos à colocação de ligadura para a indução da Doença Periodontal e com administração de indometacina (AINE tradicional) ou meloxicam (AINE com relativa seletividade para a COX-2), após a eutanásia dos animais aos 7 dias, observaram que ambos os tratamentos reduziram a perda óssea alveolar e as alterações histopatológicas (com redução da contagem de leucócitos) comparados com o grupo controle.

Em contrapartida, já nos períodos mais tardios do nosso estudo, em especial no grupo nimesulida, mesmo com a diminuição do infiltrado inflamatório (28 dias), o aumento da reabsorção óssea prossegue aparentemente sem alteração. Esse resultado da perda óssea está parcialmente de acordo com a pesquisa de Nassar et al. (2005), onde os grupos tratados agudamente com meloxicam, após 5 dias de administração, apresentaram perda óssea alveolar significativamente diminuída ($p < 0,05$), quando comparados com grupos controle; contudo, após 15 dias de tratamento com este AINE, não houve diferenças na perda óssea em relação ao grupo não tratado, da mesma forma que no nosso estudo. Conforme relatam os estudiosos, há redução no efeito do meloxicam para combater o processo inflamatório após períodos mais extensos, o que pode ser explicado pela ativação de outros mediadores inflamatórios.

É importante nesse sentido, destacar um outro estudo realizado por Holzhausen et. al. (2002) com indução da Doença Periodontal em ratos que reforça o exposto acima. Nesse trabalho, os animais foram tratados agudamente com celecoxib (medicamento seletivo para a COX-2) por até 30 dias. Os resultados evidenciaram que houve uma redução significativa da perda óssea e do infiltrado inflamatório nos grupos tratados em relação ao controle, salientando que os dados apresentados nesse estudo são referentes apenas ao terceiro dia de tratamento.

Ainda, de acordo com os autores, a perda óssea continuou a progredir de maneira mais lenta nos dentes com ligadura tanto nos animais tratados quanto nos

não tratados. Eles acrescentam que a inibição da COX pode resultar na acumulação do ácido araquidônico nos tecidos e pode ser metabolizado pela via alternativa das lipoxigenases. Um dos metabólitos dessa via é o LTB₄ que parece ter um importante papel na reabsorção óssea associada ao processo inflamatório.

Dessa forma, pelo relato dos trabalhos de Nassar et al. (2005) e Holzhausen et. al. (2002) pode-se inferir que o tratamento com AINEs na Doença Periodontal induzida por ligadura é eficaz na fase mais precoce do processo com inibição da perda óssea alveolar.

Com relação ainda à correspondência entre perda óssea e infiltrado inflamatório, o que foi notado no presente trabalho no grupo H₂O, com diminuição do infiltrado inflamatório aos 21 dias sem alteração da perda óssea, e no grupo nimesulida, com diminuição significativa do infiltrado inflamatório com progressão da reabsorção óssea aos 28 dias pode ser ratificado pelo estudo de Kayal (2013).

De acordo com essa pesquisa, além dos leucócitos do infiltrado inflamatório, as células que residem no periodonto normal, como fibroblastos, células do epitélio juncional e do endotélio vascular, podem ser desvirtuadas por exposição a agentes bacterianos e citocinas, tornando-se grandes participantes da destruição dos tecidos.

O autor acrescenta que existem no periodonto as quimiocinas que são produzidas por vários tipos de células, tais como fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, osteoclastos, células epiteliais, polimorfonucleares, monócitos, linfócitos e mastócitos. Algumas quimiocinas podem estimular uma ou mais etapas da reabsorção óssea, incluindo o recrutamento, a diferenciação, ou fusão de células precursoras para formar osteoclastos ou aumentar a sobrevivência dos mesmos.

Isto posto, é possível admitir que a evolução da perda óssea não está apenas relacionada com a expressão do infiltrado inflamatório, e, assim, pode-se explicar os dados observados com o grupo H₂O e nimesulida anteriormente mencionados no presente trabalho.

Quanto à avaliação da expressão de mediadores inflamatórios na doença periodontal por RT-PCR, os alvos escolhidos foram TNF- α , COX-2, IL-6, OPG e

RANKL conforme já elucidado no tópico 6.2. E, de acordo com o descrito anteriormente, na análise microscópica houve predomínio no escore para o infiltrado inflamatório de células mononucleares que expressam essas citocinas.

Essa informação está de acordo com estudo desenvolvido por Kayal (2013) que aponta os linfócitos como células imunes importantes que podem produzir IL-1, IL-6, IL-17, RANKL e TNF- α . São os mais relevantes leucócitos no infiltrado inflamatório associado à degradação periodontal. Os autores acrescentam que os linfócitos também produzem uma série de moléculas inibidoras que bloqueiam diretamente a formação de osteoclastos, incluindo a osteoprotegerina (OPG), IL-4, IL-10, IL-13 e interferon- γ (IFN- γ).

Antes de discorrermos sobre os resultados das expressões do RNAm para as citocinas escolhidas no estudo, é importante reiterar as informações relativas aos mecanismos de ação relacionados com os medicamentos envolvidos neste trabalho.

Em se tratando do medicamento homeopático, é necessário inicialmente salientar algumas características da Homeopatia descritas no tópico 2.3 deste trabalho.

A Homeopatia baseia-se no modelo vitalista, que atribui ao princípio vital a gestão das sensações e funções fisiológicas. A doença é caracterizada pelo desequilíbrio da força vital e a saúde seria restabelecida com o reequilíbrio vital (TEIXEIRA, 2006). No medicamento homeopático são utilizadas doses mínimas e dinamizadas e, com sua ação, é possível ter a potência da contra-doença sem prejudicar o organismo (MÚRIAS, 2009).

De acordo com Sousa (2012), a Homeopatia auxilia o organismo a curar-se a si mesmo, não bloqueia os sintomas. Os medicamentos homeopáticos estimulam a autodefesa e fortalecem o sistema imunológico.

A pesquisa desenvolvida por Kawakami et al. (2011), comentada anteriormente no tópico 6.3.2, aponta que a Arnica montana 6CH é capaz de modular o processo inflamatório agudo em ratos. Os autores acrescentam que é possível que a Arnica montana 6CH atue sobre a histamina e as prostaglandinas,

mediadores envolvidos no processo de edema. Conclui-se nesse estudo que a Arnica montana 6CH modula a regulação vascular, a absorção linfática, a expressão de moléculas de adesão CD54 e a degranulação de histamina.

Com relação ao nimesulida, de acordo com Burke, Smyth, e FitzGerald (in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006), é um AINE com relativa seletividade para COX-2 e tem como propriedades a inibição da ativação de neutrófilos, diminuição na produção de citocinas e redução na produção de enzimas de degradação.

Modelos de doença periodontal induzida por ligadura em ratos destacaram que a administração sistêmica de drogas seletivas para COX-2 e AINEs tradicionais pode prevenir a perda óssea alveolar nas fases iniciais da doença, e os inibidores seletivos da COX-2 podem restringir a progressão da doença periodontal (QUEIROZ JUNIOR et al., 2009). O nimesulida suprime quase totalmente a atividade da COX-2 e provoca uma diminuição parcial da ação da COX-1 (BJARNASON, 2007).

A redução da perda óssea no grupo de animais induzidos à doença periodontal e tratados com inibidor seletivo da COX-2 possivelmente está relacionada com o bloqueio da produção de PG, e diminuição de todos os processos inflamatórios associados, bem como diminuição dos metabolitos do ácido araquidônico e citocinas inflamatórias (IL-1 e IL -6) que podem ter atividade na reabsorção óssea (GARCIA et al., 2010).

É importante salientar o estudo realizado por De Menezes e Cury (2010) que descreve características adicionais do nimesulida na supressão dos processos inflamatórios. Esse medicamento pode suprimir a liberação ou a produção de histamina, leucotrienos, citocinas pró-inflamatórias, de enzimas dos leucócitos e a produção de metaloproteinases.

O fitoterápico Arnica montana é descrito com propriedades anti-inflamatórias através da inibição do NO, da COX-2, do TNF- α e da IL-1 β . Esse medicamento também atua na inibição da ativação do fator de transcrição celular NF- κ B e AP-1 reduzindo a inflamação e a dor consequentes de entorse, contusões e ferimentos (JÄGER et al., 2009; VERMA et al., 2010; QUINELATO, BALDUINO E GUIMARÃES, 2011). Em um trabalho *in vitro* desenvolvido por Jäggi et al. (2004) foi

demonstrado que a tintura-mãe de Arnica montana inibe a síntese de LTB₄ pela via da 5-lipoxigenase (5-LOX) e exerce um bloqueio maior sobre a COX-1 e menor sobre a COX-2.

O extrato etanólico de flores de Arnica montana contém princípios anti-inflamatórios como o 1,5-trans-guaianolide, as lactonas de sesquiterpeno, principalmente a 11 α ,13-dihydrohelenalina com ação em IL-8, na inibição dos fatores de transcrição NF- κ B e de NF-AT e, conseqüentemente, no controle sobre a liberação das citocinas IL-1 e TNF- α (BEG et al., 2011; KLAAS et al., 2002). Sharma et al. (2015) acrescentam em seu estudo com extrato metanólico da flor de Arnica montana (AMME) que os compostos fenólicos e flavonóides do extrato inibem os mediadores inflamatórios.

De acordo com Macêdo et al. (2004, p. 84), a atividade imunológica *in vitro* / *in vivo* da Arnica montana ocorre pela presença de dois polissacarídeos em cultura de células, o Fucogalactoxiloglicano e a proteína ácida arabino-3,6-galactano, relacionados com a indução ao aumento da fagocitose *in vivo* e à síntese de TNF pelos macrófagos, respectivamente.

Os resultados de nosso estudo em relação à expressão do RNAm para o TNF- α foram apresentados nas figuras 17 e 18 do tópico 5.3. Não há diferença significativa quanto à expressão dessa citocina entre os grupos, quando se analisam isoladamente os períodos de 14 e 28 dias. No entanto, no período de 21 dias, há uma diferença significativa entre o grupo nimesulida e o grupo Arnica 6CH (* $p < 0,05$), com grande aumento da expressão desta citocina após tratamento com Arnica 6CH e redução significativa da mesma com o tratamento com nimesulida.

Já a figura 18 exhibe os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias. Não há diferença significativa em relação à expressão do RNAm para TNF- α nos grupos H₂O, Arnica TM e nimesulida. Contudo, para o medicamento Arnica 6CH, há diferença significativa entre os períodos de 21 e 14 dias (* $p < 0,05$). Também, percebe-se aos 14 dias de tratamento, fase mais precoce de nosso estudo, tendência para redução da expressão do RNAm para TNF- α com o tratamento de Arnica TM (também mostrado na figura 17).

Ainda, na figura 18, em relação ao grupo H₂O, percebe-se tendência para aumento da expressão do TNF- α aos 21 dias, parecendo ser esta alteração tendência natural da evolução da doença. Neste mesmo período, o tratamento com Arnica 6CH parece seguir padrão semelhante, observando-se inclusive aumento significativo da expressão do RNAm desta citocina inflamatória, ao contrário do que se verificou nos outros grupos de tratamento.

Com relação ao tratamento com nimesulida, também na figura 18, observa-se a tendência para redução progressiva da expressão do RNAm para esta citocina, ao longo dos três períodos. O tratamento com este AINE parece ter sido o único capaz de reduzir progressivamente a expressão do RNAm para TNF- α , sendo a menor expressão na fase mais tardia da doença. Ao contrário, nos animais tratados com Arnica TM, é interessante a redução inicial, aos 14 dias, em período mais precoce da doença periodontal

Na análise destas duas figuras (17 e 18) percebe-se certa diferença com relação aos efeitos da Arnica TM e da Arnica 6CH, no que diz respeito à expressão do RNAm para TNF- α .

Quanto ao TNF- α , é relevante destacar o trabalho de Dosseva-Panova, Popova e Panov (2014) que relata que em indivíduos com periodontite crônica são encontradas grandes quantidades de fatores pró-inflamatórios, entre eles o TNF- α , quimiocinas, e outros mediadores inflamatórios em comparação com indivíduos saudáveis. Os autores acrescentam que dentre outras citocinas, o TNF- α está implicado na reabsorção óssea, pela ativação e diferenciação dos osteoclastos. As citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, TNF- α e IL-6 são as primeiras na sinalização e são predominantes na lesão periodontal.

O estudo de Papadopoulos et al. (2013) demonstrou que a infecção por *P. gingivalis* em camundongos deficientes em TNF não conseguiu impulsionar a perda óssea em comparação com seus respectivos controles. Os autores acrescentam que TNF funciona em sinergia com RANKL para estimular a ativação e a diferenciação de osteoclastos. Estes dados indicam que o TNF é uma citocina chave para conduzir a perda óssea oral *in vivo*.

Isto posto, pode-se presumir que o perfil de expressão do RNAm para o TNF- α após tratamento com cada medicamento estudado, segue os mecanismos de ação relacionados respectivamente à Arnica 6CH, Arnica TM e nimesulida, já descritos anteriormente. Dessa forma, seria esperado para os medicamentos em que a expressão do RNAm para TNF- α foi reduzida, uma menor perda óssea. Porém, nenhum dos medicamentos foi capaz de impedir a perda óssea, caso específico do nimesulida nos nossos estudos.

Assim, pode-se imaginar que a permanência da ligadura, bem como a participação de outros mediadores inflamatórios, tenha conduzido a perda óssea posterior, independentemente da redução da expressão do RNAm para TNF- α . Importante é lembrar da permanência do agente agressor.

No que se refere a expressão do RNAm para o TNF- α no grupo nimesulida, há uma diferença significativa aos 21 dias em relação ao grupo Arnica 6CH (figura 17). Também, a expressão do RNAm para o TNF- α com o tratamento por esse fármaco diminui progressivamente no decorrer dos três períodos, quando se observa os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias (figura 18).

Esses dados corroboram com o descrito por Burke, Smyth e FitzGerald (in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006) sobre os efeitos do nimesulida. Segundo os autores destaca-se a inibição da ativação de neutrófilos, a diminuição na produção de citocinas, redução na síntese de enzimas de degradação e a possibilidade também de ativação de receptores de glicocorticóides.

O estudo de Werner, Souza e Zampronio (2006) com ratos Wistar, que verificou a atividade antipirética do nimesulida, sustenta a informação acima. Nesse experimento, houve a indução de mediadores inflamatórios por injeção de LPS nos animais. O nimesulida reduziu a febre induzida por MIP-1 α , PGF2 α , entre outros mediadores. Destacou-se nesse trabalho que a administração do nimesulida reduziu os níveis plasmáticos de TNF- α nos ratos tratados com LPS.

No que diz respeito ao grupo Arnica TM, a análise dos resultados apontou tendência à diminuição da expressão do RNAm para TNF- α aos 14 dias na figura que apresenta os tratamentos agrupados (figura 17). Essa observação vem ao encontro do trabalho realizado por Sharma et al. (2015) com o extrato metanólico de

Arnica montana (AMME) administrado por 20 dias em ratos com artrite induzida por colágeno Tipo II (CIA). É importante ressaltar que o desenvolvimento da artrite deu-se em 20 dias, e no 21º dia o AMME começou a ser administrado por mais 20 dias. O AMME causou supressão significativa dos níveis dos mediadores inflamatórios no plasma, entre eles, do TNF- α .

Ainda neste grupo Arnica TM, nota-se ligeiro aumento da expressão de RNAm para TNF- α aos 21 dias e com manutenção do nível aos 28 dias, mostrando um aparente estado de equilíbrio. Com base no exposto, pode-se também presumir que essa ocorrência deu-se pela permanência da ligadura.

Quanto à expressão de RNAm para TNF- α para os grupos Arnica TM e Arnica 6CH, nota-se diferença entre os efeitos dessas medicações. Em relação à Arnica TM, conforme o exposto, ela tem atividade na redução do RNAm para TNF- α , embora com ligeiro aumento e estabilização dos nível de expressão aos 21 dias. No entanto, com a Arnica 6CH, há um grande aumento da expressão do RNAm para TNF- α aos 21 dias, semelhante ao que ocorre no grupo tratado com H₂O. De acordo com Kayal (2013), na doença periodontal, os linfócitos são predominantes e produzem algumas citocinas, entre elas, o TNF- α .

Isto posto, pode-se sugerir, segundo os princípios da Homeopatia em relação ao estímulo da autodefesa e fortalecimento do sistema imunológico, descrito anteriormente por Sousa (2012), que houve um maior infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear no grupo Arnica 6CH aos 21 dias, comparado ao grupo H₂O, embora não significativo (figura 9 do tópico 5.2). O mesmo se observa para o grupo tratado com nimesulida, nesta mesma figura. Curiosamente, o tratamento com Arnica 6CH, de algum modo estimulou intensamente a expressão do RNAm para esta citocina, ao contrário do nimesulida, que diminuiu significativamente. Partindo-se do princípio que estas células mononucleares sejam as responsáveis pela produção desta citocina inflamatória (TNF- α), nossos dados sugerem que distintos mecanismos moleculares estão envolvidos neste processo. Quando se comparam os resultados dos animais tratados com H₂O e com Arnica 6CH, verifica-se grande semelhança na expressão do RNAm para TNF- α nas três fases do estudo, o que poderia sugerir ser efeito apenas da água. No entanto, como discutiremos a seguir, a expressão do RNAm para outras citocinas, quando

comparada com o grupo H₂O, fornece forte evidência de que a preparação homeopática apresenta notável efeito biológico.

A figura 19 do tópico 5.3, apresenta todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias em relação à expressão do RNAm para COX-2. Não há diferença significativa quanto à expressão dessa citocina entre os grupos, quando se analisam isoladamente cada período de estudo. Entretanto, no período de 14 dias, percebe-se que os três medicamentos apresentaram tendência para reduzir a expressão do RNAm desta citocina, quando comparado com o grupo H₂O, especialmente a Arnica 6CH. Ainda nesta figura, no período de 21 dias, comparando-se com o grupo H₂O, a Arnica 6CH também parece exibir tendência para reduzir a expressão do RNAm para a COX-2.

A figura 20 do tópico 5.3, apresenta os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias. Não há diferença significativa em relação à expressão do RNAm para COX-2 nos grupos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias. No entanto fica nítido a expressiva redução da expressão do RNAm para esta citocina com o tratamento por Arnica 6CH em todos os períodos estudados. Se analisarmos o grupo H₂O, veremos que a expressão do RNAm para a COX -2 parece estar aumentada aos 14 dias da doença periodontal, havendo depois redução, com tendência de estabilidade já aos 21 dias.

Nesta mesma figura é interessante observar que a Arnica TM e o nimesulida, respectivamente um fitoterápico e um conhecido anti-inflamatório não esteroideal, parecem apresentar perfil semelhante, com ligeira tendência de aumento da expressão do RNAm aos 21 dias da doença inflamatória.

No presente estudo, quando se analisa o grupo nimesulida, observou-se redução não significativa da expressão do RNAm para a COX-2 aos 14 dias, comparado com o grupo H₂O. Esse resultado se assemelha ao descrito por Oliveira (2007) com ratos induzidos à Doença Periodontal por ligadura e tratados com meloxicam, primeiro inibidor seletivo de COX-2 lançado no mercado. Nesse estudo, no grupo tratado com meloxicam, a expressão do RNAm para VEGF aos 14 dias foi estatisticamente menor do que a do grupo que não recebeu tratamento.

A expressão do RNAm para VEGF, de acordo com o estudo de Oliveira et al. (2008), está intimamente relacionada com a COX-2 em tecidos inflamados e a análise por RT-PCR manifesta uma correlação positiva entre o RNAm dessas duas citocinas.

O estudo realizado por Lohinai et al. (2001) vem de encontro com os resultados obtidos no nosso estudo, especialmente aos 14 dias no grupo H₂O. O experimento desses autores consistiu na indução da Doença Periodontal por ligadura em ratos, tratando os animais com um inibidor seletivo da COX-2 (NS-398) por 7 dias. Demonstrou-se que os níveis aumentados de RNAm para COX-2 e / ou os níveis da proteína foram seguidas pela formação de PGE₂ no grupo de animais controle (tratados com H₂O) e, estes eventos, foram completamente reduzidos pela administração do NS-398. Desta forma, percebe-se que na evolução natural da doença periodontal, aqui simulada pelos animais tratados com H₂O, ocorre grande aumento da expressão do RNAm para COX-2, exatamente como visto em nossos resultados.

Também, Oliveira (2007) e Oliveira et al. (2008) relatam que em períodos mais tardios (30 dias) a expressão do RNAm para VEGF e COX-2 estão reduzidos, em relação aos períodos mais precoces da doença.

Os dados dos experimentos de Lohinai et al. (2001), Oliveira (2007) e Oliveira et al. (2008) estão de acordo com a análise do grupo H₂O apresentada: a expressão do RNAm para COX-2 parece estar elevada aos 14 dias da doença periodontal, ocorrendo após uma diminuição, com propensão de estabilidade aos 21 dias. Interessante observar que os dados destes autores apontam que inibidores mais seletivos para a COX-2 (meloxicam e NS-398), inibidores estes da atividade desta enzima, também são capazes de reduzir a expressão do RNAm para esta mesma enzima.

No que se refere ao grupo Arnica TM, há uma tendência para a redução da expressão do RNAm para COX-2 aos 14 dias, com ligeiro aumento não significativo aos 21 dias e nova redução aos 28 dias, perfil bastante parecido ao exibido pelo tratamento com nimesulida (figura 20).

Jäggi et al. (2004), mostraram que a tintura-mãe de Arnica utilizada em cultura de células humanas, de placenta e vesícula seminal de ovelha, foi capaz de inibir a atividade da COX-1 e da COX-2, reduzindo a síntese de PGE-2. Os estudiosos acrescentam que esse fitoterápico bloqueia também a síntese de LTB4 pela inibição da 5-LOX. Este trabalho mencionado deixa claro que a tintura-mãe de Arnica apresenta notável atividade anti-inflamatória, inibidora da ação da COX-1 e da COX-2, de maneira semelhante ao nimesulida. Isto poderia explicar os resultados semelhantes para os dois tratamentos descritos em nosso estudo, no que diz respeito à expressão do RNAm para COX-2.

No que concerne à nítida redução da expressão do RNAm para a COX-2 em todos os períodos para o grupo Arnica 6CH, sabe-se que são escassas as publicações relacionadas ao mecanismo de ação do medicamento homeopático. No entanto, este fato por si revela que este medicamento está atuando, de forma ainda não compreendida, no mecanismo de leitura e transcrição do material genético.

Já relatamos anteriormente uma série de artigos que mostram evidências de ação clínica anti-inflamatória e analgésica com o uso de medicamentos homeopáticos, incluindo a Arnica 6CH (JEFFREY e BELCHER, 2002; BEVILAQUA, 2003; ROBERTSON, SURYANARAYANAN e BANERJEE, 2007; KAWAKAMI et al., 2011; SOUZA et al., 2011)

Dessa forma, através da correlação do exposto pelos autores acima citados, pode-se justificar, salvo melhor interpretação, a nítida diminuição nos níveis do RNAm para a COX-2 em todos os períodos estudados para o grupo Arnica 6CH.

A figura 21 do tópico 5.3, exhibe todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias em relação à expressão do RNAm para IL-6. Não há diferença significativa quanto à expressão dessa citocina entre os grupos nos períodos estudados.

A figura 22 do tópico 5.3, representa os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias. Ainda que não exista diferença significativa em relação à expressão do RNAm para IL-6 nos grupos separados nos períodos de 14, 21 e 28 dias, chama a atenção certa tendência para aumento progressivo da expressão do RNAm ao longo dos períodos estudados, em todos os tratamentos, exceto com a

Arnica 6CH, que mostra expressão ligeiramente aumentada no período de 14 dias, diminuindo ao longo da evolução da doença.

Em relação ao perfil da expressão do RNAm para IL-6, primeiramente, é importante lembrar a característica do medicamento homeopático com atividade contra-doença, de estímulo à autodefesa e de fortalecimento do sistema imunológico (MÚRIAS, 2009; SOUSA, 2012).

Complementando o relatado acima, no estudo de Madeira et al. (2012) com camundongos é descrito o papel da IL-10 (anti-inflamatória). Essa citocina é expressa em tecidos periodontais inflamados e está associada com menor gravidade da doença. Dessa forma, a IL-10 inibe a liberação de citocinas osteoclastogênicas, como IL-6 e estimula a produção de osteoprotegerina (OPG) bloqueando a reabsorção óssea.

Também, o trabalho de Puliti et al. (2002) com camundongos, sustenta a função da IL-10. Nesse experimento foi feita a administração de anticorpos anti-IL-10 no momento da infecção por *Streptococcus* tipo IV, grupo B (GBS), que causa a artrite séptica difusa. Como resultado, houve agravamento de lesões articulares e mortalidade de 60% associada com produção precoce e sustentada de IL-6, IL-1- β e o TNF- α . O efeito de IL-10 foi avaliado pela administração de IL-10 uma vez ao dia durante 5 dias, começando 1 hora após a infecção. O tratamento com IL-10 causou benefícios na artrite GBS. A atenuação da patologia estava associada com uma redução significativa nos níveis de IL-6, IL-1- β , e a produção de TNF- α .

Isto posto, de acordo com os princípios da Homeopatia, pode-se considerar, s.m.j., que o medicamento Arnica 6CH pode impulsionar reações anti-inflamatórias e, assim, por exemplo, aumentaria as citocinas anti-inflamatórias, entre elas, possivelmente a IL-10. Dessa forma, com a administração da Arnica 6CH percebe-se uma ligeira tendência de diminuição da expressão de RNAm para IL-6 ao longo do tempo. Tal hipótese poderia ser comprovada em futuros estudos.

No entanto, em nosso estudo, observa-se não haver diferença significativa entre todos os grupos quanto à expressão do RNAm para IL-6 nos períodos estudados. E, na figura 22 que apresenta os tratamentos isolados, nos

grupos H₂O, Arnica TM e nimesulida a expressão do RNAm para a IL-6 tem uma ligeira tendência ao aumento, como já comentamos anteriormente.

Kayal (2013) descreve em seu estudo que a IL-6 é primariamente produzida por células mononucleares. Em nosso estudo, estas foram as células predominantes no infiltrado inflamatório, fato já bem observado desde os 14 dias (figuras 8 e 9). Este autor comenta inclusive que a IL-6 é bastante frequente no fluido crevicular de pacientes com periodontite refratária, sofrendo extensa perda óssea. Também afirma que a associação entre a IL-6 e a perda óssea está bem estabelecida em modelos animais. Desta forma os dados de nosso estudo vêm de encontro a estas observações, visto que o tratamento com H₂O, mostrou progressivo aumento da expressão do RNAm para esta citocina. Da mesma forma, o tratamento com Arnica TM e nimesulida, também mostraram aumento progressivo da expressão, visto que não conseguiram reduzir a perda óssea induzida pela doença periodontal. Interessante novamente observar a tendência verificada com o tratamento por Arnica 6CH, que mostra aumento inicial da expressão do RNAm para IL-6, tendendo para ligeira redução aos 21 dias, mantendo tal expressão estável nestes níveis aos 28 dias, ao contrário dos demais tratamentos.

Também, o trabalho realizado por Sharma et al. (2015) com o extrato metanólico de Arnica montana (AMME) administrado em ratos com artrite induzida por colágeno Tipo II (CIA) descreveu que o AMME causou supressão significativa de IL-6 no plasma.

Pode-se inferir, salvo melhor interpretação, que a tendência para o aumento da expressão do RNAm para IL-6 com todos os tratamentos utilizados em nosso estudo, provavelmente ocorre devido à permanência da ligadura nos dentes dos animais. A remoção desta ligadura e a continuidade da medicação poderia elucidar melhor o papel das drogas anti-inflamatórias tradicionais, fitoterápicas e homeopáticas.

A figura 23 do tópico 5.3, apresenta todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias em relação à expressão do RNAm para OPG. Não há diferença significativa quanto à expressão dessa citocina entre os grupos nos períodos estudados. Parece evidente, embora não exista diferença significativa, a

marcante redução da expressão do RNAm aos 14 dias, com o tratamento de Arnica 6CH. Chama a atenção a grande expressão do RNAm para esta citocina produzida pelo tratamento com Arnica TM, também aos 14 dias, embora o desvio padrão seja elevado. Isto pode sugerir que o mecanismo de ação do mesmo princípio ativo, administrado de forma homeopática ou fitoterápica, são diferentes.

A figura 24 do tópico 5.3, exibe os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias. Não há diferença significativa em relação à expressão do RNAm para OPG nos grupos separados nestes períodos. Entretanto, os resultados do grupo H₂O mostram certa redução da expressão ao longo da evolução da doença e o mesmo perfil de expressão é verificado com o tratamento de Arnica TM. Quando se analisam os resultados do tratamento com Arnica 6CH, o padrão de expressão é completamente diferente, mostrando tendência nítida para o aumento da expressão do RNAm para esta citocina, ao longo do tempo. Padrão diferente também é visto com o tratamento de nimesulida, havendo aumento da expressão aos 21 dias, comparado com os outros dois períodos, não havendo praticamente diferença entre os valores aos 14 e 28 dias. Interessante que este padrão de expressão também foi verificado com o RNAm para COX-2, sendo uma delas pró-inflamatória (COX-2), favorecendo a reabsorção óssea, e outra nitidamente protetora da reabsorção (OPG).

Quanto à expressão de RNAm para a OPG no grupo Arnica 6CH (marcante redução aos 14 dias e com clara tendência para aumento ao longo do tempo), é importante reiterar que o medicamento homeopático, conforme descrito anteriormente, pode estimular as reações anti-inflamatórias e de defesa do organismo (MÚRIAS, 2009; SOUSA, 2012). Dessa forma, a homeopatia, hipoteticamente, pode estimular a produção das citocinas anti-inflamatórias, entre elas, por exemplo, a IL-10. E, de acordo com o estudo de Madeira et. al. (2012), a IL-10 bloqueia a liberação de citocinas osteoclastogênicas, como IL-6 e estimula a produção de osteoprotegerina (OPG) bloqueando a reabsorção óssea.

Assim, pode-se considerar neste estudo, uma correlação entre a diminuição da expressão do RNAm para a IL-6 e o aumento da expressão do RNAm para OPG com a administração da Arnica 6CH ao longo do tempo.

No caso da Arnica TM, medicamento fitoterápico, parece evidente de acordo com a figura 23, que os produtos ativos presentes nesta tintura, foram rapidamente eficazes em aumentar a produção de osteoprotegerina (14 dias), inclusive de forma mais rápida e efetiva do que o próprio nimesulida. Nenhuma diferença significativa foi encontrada nestes resultados, mas níveis semelhantes de OPG, após o tratamento com nimesulida, só foram verificados aos 21 dias. Este fato sugere rápida ação anti-inflamatória e osteoprotetora da Arnica TM. Estudos em fases mais precoces da doença poderiam responder melhor a esta questão.

É interessante notar que nos grupos Arnica TM e nimesulida, apesar dos perfis de expressão do RNAm para a OPG serem distintos aos 14 e 21 dias, eles apresentam redução bastante semelhante aos 28 dias, mostrando níveis muito parecidos nesta fase mais tardia da progressão da doença.

A figura 25 do tópico 5.3, aponta todos os tratamentos agrupados nos períodos de 14, 21 e 28 dias em relação à expressão do RNAm para RANKL. Não há diferença significativa quanto à expressão dessa citocina entre os grupos nos períodos estudados. Verifica-se também que todos os tratamentos mostraram tendência para redução da expressão do RNAm para esta citocina aos 14 e 21 dias, quando comparados ao grupo H₂O. Sendo o RANKL uma citocina cuja ação final estimula a reabsorção óssea, nossos resultados parecem mostrar que todos os tratamentos procuraram diminuir a perda óssea nas fases iniciais do estudo, notadamente aos 14 dias, visto que todos eles mostraram redução da expressão do RNAm para RANKL, especialmente a Arnica 6CH. Perfil semelhante se observa aos 21 dias e, aparentemente, aos 28 dias a expressão do RNAm já estava estabilizada e reduzida para todos os grupos. Isto pode indicar, na evolução natural da doença, que a perda óssea inicial é grande, em face da grande expressão do RNAm para esta citocina no grupo H₂O. Como a tendência da perda óssea é se estabilizar, seria natural a redução gradual da produção desta citocina.

A figura 26 do tópico 5.3, mostra os tratamentos isolados nos períodos de 14, 21 e 28 dias. Não há diferença significativa em relação à expressão do RNAm para RANKL nos grupos separados nestes períodos e a análise desta figura leva a conclusões semelhantes às obtidas com a figura anterior.

A pesquisa de Chen et al. (2014) evidenciou expressão do RNAm para RANKL em nível celular em células inflamatórias, principalmente macrófagos e linfócitos.

O estudo de Kayal (2013) acrescenta que em análise microscópica confocal menos de 20% das células B e T que expressam RANKL são encontradas em tecidos gengivais saudáveis. Porém, nos tecidos gengivais doentes, mais de 50 e 90% de células T e células B, respectivamente, expressam RANKL. Desta forma, as células T e B ativadas podem ser a fonte celular de RANKL para a reabsorção óssea no tecido gengival periodontal doente.

No entanto, de acordo com Chen et al. (2014) outras células podem também ser fonte importante neste processo, porque podem regular a expressão de RANKL indiretamente sintetizando citocinas pró-inflamatórias, as quais podem subsequentemente regular a função dos linfócitos.

RANK, conforme o estudo de Kayal (2013), é um receptor presente na superfície dos precursores dos osteoclastos. Quando RANK se liga a seu ligante RANKL, estimula a diferenciação destas células precursoras em osteoclastos maduros. Nesse trabalho foi observado que a infiltração de leucócitos no tecido conjuntivo periodontal e o aumento na contagem de leucócitos na área inflamada teve como consequência um rápido aumento na perda de osso alveolar.

O estudioso acrescenta que a COX-2 é uma enzima induzida principalmente por citocinas pró-inflamatórias e leva à formação de prostaglandinas envolvidas em processos patológicos, tais como a formação de edemas e febre. As prostaglandinas são produzidas por osteoblastos e células do ligamento periodontal e estimulam potencialmente a formação e reabsorção óssea. Bezerra et al. (2000) acrescentam que a PGE2 pode ativar os osteoclastos que estão relacionados com a reabsorção óssea.

Dessa forma, é admissível afirmar que a reabsorção óssea depende também da expressão da COX-2. Assim, quando se comparam as figuras 19 e 25, respectivamente relativas à expressão do RNAm para COX-2 e RANKL, percebe-se no grupo H₂O, aos 14 dias, um grande aumento da expressão do RNAm de ambas as citocinas, com tendência progressiva para redução da expressão ao longo da

evolução da doença periodontal. O mesmo tipo de correlação pode ser feito aos 28 dias de estudo, quando a expressão do RNAm para as duas citocinas já se encontra estabilizada e reduzida em todos os grupos no presente estudo. Aparentemente o perfil de respostas para todos os tratamentos é bastante semelhante quando se compara a expressão ao longo do tempo das duas citocinas.

Segundo Oliveira (2007), o organismo consegue frear a destruição do tecido e o processo inflamatório diminui. A informação dessa autora também ratifica a tendência à redução progressiva da expressão do RNAm para RANKL ao longo do tempo observada no tratamento isolado com o grupo H₂O.

A figura 27 do tópico 5.3, mostra os resultados da expressão do RNAm para as diferentes citocinas, no grupo que recebeu tratamento com Arnica 6CH, comparados com os resultados do grupo H₂O. Este último grupo foi agora considerado como padrão de referência da evolução da doença periodontal.

Nas figuras mais à direita, são observadas as curvas comparativas mostrando a tendência de evolução da expressão do RNAm para cada citocina estudada. Nota-se que no caso da COX-2 (parte B da figura) e do RANKL (E) existe diferença significativa entre os tratamentos, com redução da expressão, quando se compara o conjunto dos três períodos de estudo, 14, 21 e 28 dias (*p<0,05). Como já comentamos, parece existir nítida correlação entre estas duas citocinas, pois ambas estimulam a reabsorção óssea. O fato da Arnica 6CH ter demonstrado redução da expressão do RNAm para ambas, demonstra sua ação biológica protetora da perda óssea induzida pela doença. Embora não se tenha encontrado diferença significativa, o caso da OPG (parte D da figura) também é interessante, pois a curva de expressão após tratamento com Arnica 6CH mostra nítida tendência para aumento da expressão com o tempo de administração, o que pode ser perfeitamente correlacionado com os dados anteriores, uma vez que este tratamento diminui a expressão de RNAm para citocinas relacionadas à perda óssea e aumentou a expressão do RNAm para citocina relacionada com a diminuição da perda óssea. A expressão do RNAm para TNF- α e IL-6 parece seguir o mesmo padrão, independentemente do tratamento utilizado (H₂O ou Arnica 6CH).

Existe um consenso na população em geral, que o medicamento homeopático é inerte, sem nenhum efeito e considerado por muitos como placebo. Ao elaborarmos a figura 27, o objetivo primordial foi o de comparar o grupo tratado com Arnica 6CH (homeopática) com o grupo tratado com H₂O que é naturalmente inativo.

A partir desta comparação, fica evidente que a Arnica 6CH exerce seu efeito biológico, em especial na expressão do RNAm para a COX-2 (parte B da figura) e do RANKL (parte E da figura), com diferença significativa em relação ao grupo H₂O nos períodos estudados (* $p < 0,05$), salientando ainda a clara tendência para a elevação da expressão do RNAm para a OPG do grupo Arnica 6CH (parte D da figura) comparada com o grupo H₂O, reforçando a hipótese de que este medicamento homeopático procurou diminuir a perda óssea característica da doença.

A figura 28 do tópico 5.3, mostra os resultados da expressão do RNAm para as diferentes citocinas no grupo que recebeu tratamento com Arnica TM, comparados com os resultados do grupo H₂O. Não foram encontradas diferenças significativas quanto à expressão das citocinas estudadas. Contudo, nas figuras mais à direita, pode-se perceber grande redução da expressão do RNAm para a COX-2 no grupo tratado com Arnica TM aos 14 dias de experimentação (parte B da figura), embora não se tenha encontrado diferença significativa. Este fato pode indicar suas propriedades naturais anti-inflamatórias, visto ser um medicamento fitoterápico. Da mesma forma, na parte E da figura, quando se comparam as expressões do RNAm para RANKL nos dois grupos de tratamento, percebe-se grande redução, em todas as fases do estudo, naqueles animais que receberam tratamento com Arnica TM ($p = 0,06$). Provavelmente, estudos com maior número de animais poderiam elucidar melhor este aspecto. Da mesma forma que o medicamento homeopático, a Arnica TM, fitoterápica, também procurou reduzir a expressão do RNAm para COX-2, nas fases iniciais da doença, e para o RANKL, em todas as fases do estudo, duas citocinas nitidamente relacionadas com o aumento da perda óssea.

Nesta mesma figura percebe-se ainda que o padrão de expressão do RNAm para as demais citocinas (TNF- α , IL-6 e OPG) foi semelhante nos animais tratados com H₂O ou Arnica TM.

A figura 29 do tópico 5.3, mostra os resultados da expressão do RNAm para as diferentes citocinas no grupo que recebeu tratamento com nimesulida, comparados com os resultados do grupo H₂O. Foi encontrada diferença significativa apenas na comparação da expressão do RNAm para RANKL (* $p < 0,05$), o que evidencia que este agente anti-inflamatório seletivo para COX-2 diminui a expressão de RNAm para uma citocina nitidamente indutora da perda óssea. Ainda, analisando-se a parte A da figura, percebe-se a grande redução da expressão do RNAm para TNF- α aos 21 de tratamento, após a administração de nimesulida, o que também demonstra sua ação na tentativa de inibir a expressão de uma citocina caracterizada como grande estimuladora do processo de reabsorção óssea. Também na parte B da figura, houve importante redução da expressão do RNAm para COX-2, logo aos 14 dias, após tratamento com este AINE, novamente indicando sua ação anti-inflamatória, na tentativa de impedir a reabsorção óssea e a correlação já mencionada com a expressão do RNAm para RANKL, sempre na mesma direção. Fica também claro que o padrão de expressão do RNAm para IL-6 e OPG é bastante semelhante após os dois tratamentos.

Os dados acima vêm ao encontro do estudo de Ghalayani et al. (2014), com ratos tratados com diclofenaco e celecoxib após extração dentária.

Esse trabalho apontou que a razão RANKL / OPG > 1 tem uma influência estimulante nos osteoblastos para a osteoclastogênese. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de RNAm para OPG entre os grupos controle e os grupos que utilizaram os medicamentos diclofenaco e celecoxib. Em contrapartida, a expressão do RNAm para RANKL foi significativamente reduzida nos grupos dos medicamentos em comparação com o grupo controle. Como a expressão de RNAm para RANKL diminuiu, a razão RANKL / OPG também se reduziu. Portanto, o diclofenaco e o celecoxib podem inibir a diferenciação de osteoclastos, procurando diminuir a reabsorção óssea.

No que se refere à expressão de RNAm para TNF- α , a figura 29 mostra grande redução desta expressão no grupo nimesulida, em especial aos 21 dias (parte A da figura).

Os estudos de Burke, Smyth e FitzGerald (in: GOODMAN e GILMAN'S, 2006) e Werner, Souza e Zamprônio (2006) sobre o nimesulida ratificam os resultados acima. Segundo os autores, dentre os efeitos do nimesulida, há a diminuição na produção de citocinas, entre elas o TNF- α .

No que concerne à expressão do RNAm para a COX-2, a figura 29 mostra considerável redução desta expressão aos 14 dias para o grupo nimesulida (parte B da figura).

Esse resultado está de acordo com experimentos com inibidor seletivo da COX-2 (meloxicam) que provoca diminuição da expressão do RNAm para VEGF, correlacionada positivamente com a expressão do RNAm para a COX-2 aos 14 dias (OLIVEIRA, 2007; OLIVEIRA et al., 2008). Também, o estudo de Lohinai et al. (2001) apontou uma diminuição da expressão do RNAm para a COX-2 aos 7 dias pela administração de NS-398 (inibidor seletivo da COX-2).

Face ao exposto, no que se refere aos resultados encontrados no presente estudo, pode-se vislumbrar, salvo melhor interpretação, outras opções de tratamento para a Doença Periodontal induzida por ligadura em ratos.

Pode-se considerar que a utilização da terapêutica alopática tradicional é muito difundida. Os AINEs em especial, fazem parte da rotina do consultório odontológico, somado ao fato de que existe uma infinidade de experimentos e publicações com esses medicamentos.

No entanto, conforme foi explanado no presente trabalho, a Fitoterapia e a Homeopatia podem ser boas escolhas terapêuticas para o tratamento da Doença Periodontal.

Em relação ao fitoterápico Arnica TM, foi observado no presente trabalho que em todas as fases estudadas, as expressões dos RNAm para as citocinas avaliadas foram parecidas as do grupo nimesulida. No que diz respeito aos

parâmetros perda óssea, infiltrado inflamatório e escore geral, os grupos Arnica TM e nimesulida apresentaram semelhança durante o tempo de tratamento.

De acordo com Jäggi et al. (2004), a tintura-mãe de Arnica montana inibe a síntese de LTB₄ pela via 5-LOX e também tem efeito inibitório sobre a produção de PGE₂ pelo bloqueio da COX-1. Os autores acrescentam que os AINEs tradicionais têm um histórico de efeitos adversos (dor abdominal, diarreia, náuseas, insuficiência renal, broncoespasmo, úlcera e sangramentos gastrointestinal). Já os inibidores seletivos da COX-2 podem ter efeitos cardiovasculares e renais com o uso contínuo.

Ainda, de acordo com os estudiosos, a inibição da síntese de PG pelos AINEs está associada ao aumento de leucotrienos pela via 5-LOX, pois as enzimas COX e 5-LOX partilham do mesmo ácido araquidônico e, com a inibição da COX, há um aumento do substrato para a produção de leucotrienos. Os leucotrienos, conforme descrito pelos estudiosos, contribuem para os processos inflamatórios, estão envolvidos no desenvolvimento de úlceras gastrointestinais e são potentes broncoconstritores. Tais efeitos colaterais dos AINEs limitam seu uso, principalmente por longos períodos.

Isto posto, parece ser possível a escolha da Arnica TM para o tratamento da Doença Periodontal com vantagens sobre o nimesulida, sobretudo quanto aos efeitos colaterais observados com o uso desse AINE.

No que diz respeito ao medicamento homeopático Arnica 6CH, demonstrado por este estudo ter efeito biológico significativo, quando comparado ao grupo de animais tratados com H₂O, notadamente quanto à redução da expressão de RNAm para COX-2 e RANKL.

Quanto aos parâmetros perda óssea, infiltrado inflamatório e escore geral, o grupo Arnica 6CH apresentou conformidade com os outros grupos do estudo durante os períodos de tratamento. Embora o efeito biológico protetor não tenha se manifestado clinicamente, suas ações moleculares foram bem documentadas. O fato de não termos verificado diminuição da perda óssea ou alteração significativa do infiltrado pode ser consequência da manutenção da ligadura, fator causal da doença periodontal. Futuros experimentos serão realizados removendo a ligadura, em

determinados períodos e verificando o efeito dos medicamentos anti-inflamatórios, fitoterápicos e homeopáticos sobre o reparo da lesão.

No entanto, existe a crença a respeito da homeopatia na população em geral de que a utilização do medicamento homeopático está arrolada com uma terapêutica inerte, ou seja, sem eficácia e rotulada por muitos como placebo.

As publicações relacionadas ao mecanismo de ação do medicamento homeopático são insuficientes, principalmente a respeito dos seus efeitos moleculares.

Bigagli et al. (2014) demonstram em seu estudo os efeitos de preparações *Apis mellifica*, relatada na literatura homeopática com propriedades anti-inflamatórias. O experimento consistiu em estudar os efeitos das preparações *Apis mellifica* TM e as diluições 3CH, 5CH, 7CH em cultura de células humanas para avaliar a expressão global de diferentes genes com a técnica de microarray, um método que pode detectar respostas integradas das células com concentrações extremamente diluídas.

Nesse trabalho, os resultados obtidos a partir da análise de microarray foram confirmados por RT-PCR semi-quantitativo. Destacou-se um resultado importante quanto à IL1 β , uma potente citocina pró-inflamatória: ela foi sobre regulada pela TM e sub-regulada por todas as diluições homeopáticas de *Apis*. Essa pesquisa apontou que preparações extremamente diluídas de *Apis* (até 10⁻¹⁶) ainda tem efeitos sobre a expressão do gene.

Também, a pesquisa desenvolvida por Oliosio et al. (2014) com o medicamento homeopático *Gelsemium sempervirens*, com indicações para dor de cabeça, nevralgias, estresse, ansiedade, excitação emocional, medo, entre outras, investigou por RT-PCR a expressão gênica de receptores e reguladores de neurotransmissores humanos envolvidos na sinalização excitatória neuronal. O experimento foi com células de neuroblastoma SH-SY5Y humanas, expostas durante 24 horas ao medicamento *Gelsemium sempervirens* nas diluições 2CH e 9CH.

De acordo com os pesquisadores, a exposição ao *Gelsemium sempervirens* 2CH, induziu a uma diminuição da regulação da maioria dos genes dessa natureza. As células tratadas mostraram uma diminuição estatisticamente significativa do receptor prokineticin 2. O ligante desse receptor é um neuropeptídeo envolvido na nocicepção e comportamentos como ansiedade e depressão.

Conforme o exposto, e somado aos resultados relevantes obtidos nesta pesquisa com o medicamento *Arnica* 6CH, infere-se que a Homeopatia pode ter efeitos biológicos. Dessa forma, parece ser possível a opção da *Arnica* 6CH como terapêutica para a Doença Periodontal.

No campo do conhecimento que este trabalho foi desenvolvido, pode-se dizer que se trata de uma pesquisa inovadora e que, s.m.j., pode suscitar estudos futuros.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A análise dos diferentes resultados obtidos neste estudo possibilita refletir a respeito dos aspectos abaixo descritos.

Diante dos efeitos adversos apresentados pelo nimesulida, e os resultados positivos das terapêuticas com Arnica TM ou com Arnica 6CH no desenvolvimento de todas as etapas do presente estudo, pode-se inferir que essas opções de tratamento parecem ser viáveis para o tratamento da Doença Periodontal induzida por ligadura em ratos.

Ficou destacada a evidência, tanto nos estudos que fundamentam esta pesquisa, quanto nos resultados aqui apresentados, que a Arnica 6CH pode ter efeitos biológicos, interferindo com a leitura e transcrição de material genético, em especial na Doença Periodontal experimental em ratos, como discutido neste trabalho.

Pelo exposto, pode-se dizer que se trata de uma pesquisa inovadora sugerindo uma possível aplicabilidade da Arnica 6CH na patologia periodontal.

Trabalhos futuros com as fases mais precoces da doença e a retirada da ligadura dos dentes dos ratos com prosseguimento dos tratamentos, talvez esclareçam a expressão do RNAm para outras citocinas, a expressão das proteínas envolvidas com o processo de perda óssea, bem como a eficácia dos tratamentos envolvidos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABIRAMASUNDARI G.; SUMALATHA K.R.; SREEPRIYA M. Effects of *Tinospora cordifolia* (Menispermaceae) on the proliferation, osteogenic differentiation and mineralization of osteoblast model systems in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 141, n. 1, p. 474-80, may, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874112001730>>. Acesso em: 9 fev. 2015.

ALLEN, H.C. **Sintomas-chave da Matéria Médica Homeopática**. 2.ed. São Paulo: Dynamis Editorial, 1995.

ARIZON M. et al. Langerhans cells down-regulate inflammation-driven alveolar bone loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 109, n. 18, p. 7043-8, may, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3344981/?tool=pubmed>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

AQUINO, S.G. et al. Differential regulation of MMP-13 expression in two models of experimentally induced periodontal disease in rats. **Archives of Oral biology**, London, v. 54, n. 2009, p. 609-17, mar. 2009.

AVELAR, R.L. et al. Effect of partially selective cyclooxygenase-2 inhibitor in there moval of third molars. **The Journal of Craniofacial Surgery**, Philadelphia, v. 23, n. 2, p. 108-12, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22446438>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

BAINBRIGGE B. et al. Role of *Porphyromonas gingivalis* phosphoserine phosphatase enzyme SerB in inflammation, imune response, and induction of alveolar bone resorption in rats. **Infection and Immunity**, Washington, v. 78, n. 11, p. 4560-9, nov. 2010. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/78/11/4560.full.pdf+html>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

BEG S. et al. Systematic review of herbals as potential anti-inflammatory agents: Recent advances, current clinical status and future perspectives. **Pharmacognosy Review**, New Delhi, v. 5, p. 120-37, dec. 2011. Disponível em: <<http://www.phcogrev.com/article.asp?issn=0973-7847;year=2011;volume=5;issue=10;spage=120;epage=137;auiast=Beg>>. Acesso em: 9 fev. 2015.

BEVILAQUA, C.H. **Avaliação do uso do medicamento homeopático Arnica montana no tratamento da dor e edema pós-operatórios em cirurgia buco-maxilo-facial**. 2003. 53p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23143/tde-02032005-143221/pt-br.php>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

BEZERRA B. de B. et al. *A.actinomycescomitans*-induced periodontal disease promotes systemic and local responses in rat periodontium. **Journal of Clinical Periodontology**, Malden, v. 39, n. 4, p. 333-41, apr. 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-051X.2011.01847.x/pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

BEZERRA M.M. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 71, n. 6, p. 1009-14, jun. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10914805>>. Acesso em: 13 ago. 2015.

BIGAGLI E. et al. Exploring the effects of homeopathic *Apis mellifica* preparations on human gene expression profiles. **Homeopathy**, London, v. 103, n. 2, p. 127-32, apr. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1475491614000228>>. Acesso em: 19 ago. 2015.

BINNING, A. Nimesulide in the treatment of post operative pain: a double-blind, comparative study in patients undergoing arthroscopic knee surgery. **The Clinical Journal of pain**, Seattle, v. 23, n. 7, p. 565-70, sep. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17710005>>. Acesso em: 30 jan. 2015.

BJARNASON, I. The Impact of Recent Data on our Understanding of the Roles of COX-1 and COX-2 in Gastrointestinal Pathophysiology. **Clinical Drug Investigation**, Basel, v. 27, n. 1, p. 7-13, dec. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23392785>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

BOTELHO M.A. et al. Effects of a herbal gel containing carvacrol and chalcones on alveolar bone resorption in rats on experimental periodontitis. **Phytotherapy Research**, Malden, v. 22, n. 4, p. 442-9, apr. 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.2325/pdf>>. Acesso em: 9 fev. 2015.

BRASIL. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS. **Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica**, Brasília, 2006. Disponível em: <<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnpic.pdf>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

BRINKHAUS, B. et al. Homeopathic arnica therapy in patients receiving knee surgery: results of three randomised double-blind trials.

Complementary Therapies in Medicine, Karlsruhe, v. 14, n.4, p. 237-46, dec. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965229906000410>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

BUFAINO, E.M. Phytotherapy in Brazil: recovering the concepts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 23, n. 1, p. 22-27, jan./ feb. 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v23n1/aop14812.pdf>>. Acesso em: 9 fev. 2015.

BURKE, A.; SMYTH, E.; FITZGERALD, G.A. Analgesic-Antipyretic agents; Pharmacotherapy of gout. In: BRUNTON, L.L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11.ed. New York: McGraw-Hill, 2006.

CAIRO, N. **Guia de Medicina Homeopática**. 21.ed. São Paulo: Livraria Teixeira, 1994.

CAMILOTTI, A.G. et al. Effect of ketoprofen and meloxicam on the bone loss rate in progression of periodontitis induced by lidatute. A radiographic evaluation in rats. **Periodontia**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 5-9, abr./jun. 2005. Disponível em <<http://www.revistasobrepe.com.br/arquivos/2005/PERIODONTIA%20-%20VOLUME%2015%20-%20N%C2%B0%2002%20-%20JUNHO%20-%202005%20ok.pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2015.

CAPOTE, E.P. et al. La terapia homeopática y su aplicación en la Estomatología. **Revista Archivo Médico de Camagüey**, Camaguey, v.13, n.1, p. 1-12, feb. 2009. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552009000100019&lng=es&nrm=iso&tlng=es>. Acesso em: 4 fev. 2015.

CENTURION, B.S. **Análise da perda óssea alveolar na doença periodontal induzida experimentalmente em ratos tratados com homeopatia e AINE**. 2007.

74p. Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo como pré-requisito para conclusão do programa de Educação Tutorial (PET), Bauru, 2007.

CHEN, B. et al. RANKL expression in periodontal disease: where does RANKL come from? **Biomed Research International**, New York, v. 2014, n. 2014, p. 1-7, feb. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3955606/#B7>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

CHEN, H. et al. Effects of traditional Chinese medicine on bone loss in SAMP6: a murine model for senile osteoporosis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 28, n. 5, p. 865-9, may, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15863895>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

CORREIA, A.D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L.E.M. Similia Similibus Curentur: notação histórica da medicina homeopática. **Rev. Ass. Med. Brasil**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 347-51, 1997. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ramb/v43n4/2026.pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2015.

CURTIS, K.M. et al. EF1 α and RPL13 represent normalization genes suitable for RT-qPCR analysis of bone marrow derived mesenchymal stem cells. **BMC Molecular Biology**, London, v. 11, n. 61, p. 1-15, aug. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2931506/>>. Acesso em: 9 jul. 2015.

DASTIS S.N. et al. Liver transplantation for nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced liver failure: nimesulide as the first implicated compound. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, London, v. 19, n. 11, p. 919-22, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18049158>>. Acesso em: 30 jan. 2015.

DE MENEZES, S.A.F.; CURY, P.R. Efficacy of nimesulide versus meloxicam in the control of pain, swelling and trismus following extraction of impacted lower third molar. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Kidlington, v. 39, n. 6, p. 580-84, june, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0901502710001062>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

DOSSEVA-PANOVA, V.T.; POPOVA, C.L.; PANOV, V.E. Subgingival microbial profile and production of proinflammatory cytokines in chronic periodontitis. **Folia**

Medica, Plovdiv, v. 53, n. 3, p. 152-160, 2014. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25434071>>. Acesso em: 15 dez. 2014.

ESCH, R.W.V.; KOOL, M.M.; AS, S.V. NSAIDs can have adverse effects on bone healing. **Medical Hypotheses**, Birmingham, v. 81, n. 2, p. 343-6, aug. 2013. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306987713001667>>. Acesso em: 2 fev. 2015.

FARINA, V.H. **Efeitos da Calcarea phosphorica 6CH e do Alendronato na reparação de lesão óssea em ratas ovariectomizadas**. 2010. 142p. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São José dos Campos, 2010. Disponível em:
<http://base.repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/104559/farina_vh_dr_sjc.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 5 fev. 2015.

FERNANDEZ, B.B. et al. Uso del árnica homeopática como antiinflamatorio en los edemas traumáticos faciales. **Rev Cubana Med Milit.**, Havana, v. 31, n. 3, p. 177-181, set./dez. 2002. Disponível em:
<http://bvs.sld.cu/revistas/mil/vol31_3_02/mil04302.pdf>. Acesso em: 4 fev. 2015.

GARCIA, V.G. et al. Treatment of experimental periodontal disease by a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 with scaling and root planing (SRP). **Inflammopharmacology**, Basel, v. 18, n. 6, p. 293-301, dec. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s10787-010-0059-z/fulltext.html>>. Acesso em: 17 jul. 2015.

GHALAYANI, P. et al. Effects of diclofenac and celecoxib on osteoclastogenesis during alveolar bone healing, *in vivo*. **Dental Research Journal**, Isfahan, v. 11, n. 3, p. 357-63, may/jun. 2014. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4119369/>>. Acesso em: 11 ago. 2015.

GHEDIRA, K.; GOETZ, P.; LE JEUNE, R. Arnica montana L. (Asteraceae) : Arnica. **Phytothérapie**, Paris, v. 10, p. 38-43, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs10298-012-0688-z.pdf>>. Acesso em: 9 fev. 2015.

GLOWACKI A.J. et al. Prevention of inflammation-mediated bone loss in murine and canine periodontal disease via recruitment of regulatory lymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, n. 46, nov. 2013. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/110/46/18525.long>> Acesso em: 10 fev. 2015.

GOMES FILHO, I.S. et al. Comparação de critérios que determinam o diagnóstico clínico da doença periodontal. **Revista Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 21, n. 51, p. 77-81, jan./mar. 2006. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fo/article/view/1085/861>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

GURGEL B.C. et al. Impact of an anti-inflammatory therapy and its withdrawal on the progression of experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 75, n. 12, p. 1613-18, dec. 2004. Disponível em: <http://www.institutokarinaleite.com.br/downloads/artigos_cientificos/dr_bruno/0001.pdf>. Acesso em 18 ago. 2015.

HA, H. et al. Water extract of *Spatholobus suberectus* inhibits osteoclast differentiation and bone resorption. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 13, p. 112, may, 2013. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/13/112>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

HAHNEMANN, S. **Organon da Arte de Curar**. 6.ed. Ribeirão Preto: Museu de Homeopatia Abrahão Brickmann, 1995.

HAN X. et al. *Porphyromonas gingivalis* Infection-Associated Periodontal Bone Resorption Is Dependent on Receptor Activator of NF- κ B Ligand. **Infection and Immunity**, Washington, v. 81, n. 5, p. 1502-9, may, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3648000/?tool=pubmed>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

HOLZHAUSEN et al. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 73, n. 9, p. 1030-6, sep. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12296588>>. Acesso em: 13 ago. 2015.

JÄGER, C. et al. Phytomedicines Prepared from *Arnica* Flowers Inhibit the Transcription Factors AP-1 and NF- κ B and Modulate the Activity of MMP1 and MMP13 in Human and Bovine Chondrocytes. **Planta Medica**, New York, v. 75, n. 12,

p. 1319-25, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19431101>>. Acesso em: 9 fev. 2015.

JÄGGI R. et al. Dual inhibition of 5-lipoxygenase/cyclooxygenase by a reconstituted homeopathic remedy; possible explanation for clinical efficacy and favourable gastrointestinal tolerability. **Inflammation Research**, Montreal, v. 53, n. 4, p. 150-7, mar. 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00011-003-1236-y>>. Acesso em: 16 jul. 2015.

JEFFREY, S.L.; BELCHER, H.J. Use of Arnica to relieve pain after carpal-tunnel release surgery. **Alternative Therapies In Health And Medicine**, West Sussex, v. 8, n. 2, p. 66-8, mar./apr. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11892685>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

JEONG, J.C. et al. Stimulative effects of *Drynariae Rhizoma* extracts on the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 96, n.3, p. 489-95, jan. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874104004787>>. Acesso em: 9 fev. 2015.

KARAKAWA, A. et al. Inhibitory Mechanism of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs on Osteoclast Differentiation and Activation. **Journal of Oral Biosciences**, Niigata, v. 52, n. 2, p. 119-24, feb. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1349007910800404#>>. Acesso em: 2 fev. 2015.

KAROW, J.H. et al. Efficacy of Arnica montana D4 for healing of wound safter Hallux valgus surgery compared to diclofenac.

The Journal of Alternative and Complementary Medicine, Frankfurt, v. 14, n. 1, p. 17-25, jan./feb. 2008. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/acm.2007.0560>>. Acesso em 04 fev. 2015.

KAWAKAMI, A.P. et al. Inflammatory Process Modulation by Homeopathic *Arnica montana* 6CH: The Role of Individual Variation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2011, n. 2011, p. 1-12, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3035003/>>. Acesso em: 21 jul. 2015.

KAYAL, R.A. The Role of Osteoimmunology in Periodontal Disease. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, n. 2013, p 1-12, aug. 2013. Disponível em: < <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/639368/>>. Acesso em: 08 ago. 2015.

KEROLA M. et al. Effects of Nimesulide, Acetyl salicylic Acid, Ibuprofen and Nabumetone on Cyclooxygenase-1- and Cyclooxygenase-2- Mediated Prostanoid Production in Healthy Volunteers ex vivo. **Basic Clinical Pharmacology & Toxicology**, Malden, v. 104, n. 1, p. 17-21, jan. 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-7843.2008.00332.x/pdf>>. Acesso em 11 fev. 2015.

KLAAS, C. A. et al. Studies on the Anti-Inflammatory Activity of Phytopharmaceuticals Prepared from *Arnica* Flowers. **Planta Medica**, New York, v. 68, n. 5, p. 385-91, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12058311>>. Acesso em: 9 fev. 2015.

KO Y.J. et al. Antiosteoporotic activity of *Davallia formosana*. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 139, n. 2, p. 558-65, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111008592>>. Acesso em: 9 fev. 2015.

LEE, C.H.; WANG, J.D.; CHEN, P.C. Increased risk of hospitalization for acute hepatitis in patients with previous exposure to NSAIDs. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, Malden, v. 19, n. 7, p. 708-14, jul. 2010. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pds.1966/pdf>>. Acesso em 11 fev. 2015.

LEE, J. W. et al. Alisol-B, a novel phyto-steroid, suppresses the RANKL-induced osteoclast formation and prevents bone loss in mice. **Biochemical Pharmacology**, Kansas City, v. 80, n. 3, p. 352-61, aug. 2010. Disponível em: <<http://www-sciencedirect-com.ez67.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0006295210002595?np=y>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

LEVRINI L. et al. Prescriptions of NSAIDs to patients undergoing third molar surgery : an observational, prospective, multicentre survey. **Clin Drug Investig.**, New York, v. 28, n. 10, p. 657-68, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18783304>>. Acesso em: 30 jan. 2015.

LICATA, A. et al. Clinical course and outcomes of drug-induced liver injury: nimesulide as the first implicated medication. **Digestive and Liver Disease**, Rome, v. 42, n. 2, p. 143-8, feb. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1590865809002564>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

LIMA, M.C. **O sistema renina-angiotensina na doença periodontal induzida experimentalmente em ratos**. 2011. 145p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, Bauru, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25132/tde-18012012-105831/pt-br.php>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

LIMA, V. et al. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **European Journal of Oral Sciences**, Malden, v. 108, n. 2, p. 123-9, apr. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10768725>>. Acesso em: 25 maio 2015.

LOHINAI Z. et al. Evidence for the expression of cyclooxygenase-2 enzyme in periodontitis. **Life Sciences**, Columbus, v. 70, n. 3, p. 279-90, dec. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12005261>>. Acesso em: 16 ago. 2015.

MACÊDO, S.B. et al. Anti-inflammatory activity of *Arnica montana* 6CH: preclinical study in animals. **Homeopathy**, London, v. 93, n. 2, p. 84-7, apr. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1475491604000098#>>. Acesso em 15 jul. 2015.

MADEIRA M.F.M. et al. MIF induces osteoclast differentiation and contributes to progression of periodontal disease in mice. **Microbes and Infection**, Merced, v. 14, n. 2, p. 198-206, feb. 2012. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1286457911002516/1-s2.0-S1286457911002516-main.pdf?_tid=c59def4c-5148-11e3-9857-00000aacb362&acdnat=1384886055_7b25489582889e4cf7c8d1c37f28fbba>. Acesso em: 10 fev. 2015.

MATTIA, C. et al. Nimesulide: 25 years later. **Minerva Medica**, Turin, v. 101, n. 4, p. 285-93, aug. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21030939>>. Acesso em: 30 jan. 2015.

MOURÃO, L.C.; MOUTINHO, H.; CANABARRO, A. Additional benefits of homeopathy in the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical Trial. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, Cheshire, v. 19, n.4, p. 246-50, nov. 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1744388113000388>. Acesso em: 6 fev. 2015.

MÚRIAS, I.A.S. **Homeopatia**: Um estudo sobre seus conceitos científicos, médicos e farmacêuticos. 2009. 81f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2009. Disponível em: http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/1105/2/lvo%20Murias_6287_Monografia.pdf. Acesso em: 4 fev. 2015.

NASSAR, C.A. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents bone resorption. **Braz Oral Res.**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 36-40, jan./mar. 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242005000100007. Acesso em: 20 jul. 2015.

O'CONNOR J.P.; LYSZ T. Celecoxib, NSAIDs and the skeleton. **Drugs Today**, Barcelona, v. 44, n. 9, p. 693-709, sep. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19137124>. Acesso em: 2 fev. 2015.

OLIOSO, D. et al. Effects of *Gelsemium sempervirens* L. on pathway-focused gene expression profiling in neuronal cells. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 153, n. 2, p. 535-39, apr. 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874114001743>. Acesso em: 20 ago. 2015.

OLIVEIRA, T.M. **Fator de crescimento endotelial vascular na doença periodontal inflamatória induzida experimentalmente em ratos**. 2007. 124p. Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, Bauru, 2007. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25133/tde-17102007-102930/pt-br.php>. Acesso em 29 jun. 2015.

OLIVEIRA T.M. et al. COX-2 Inhibition Decreases VEGF Expression and Alveolar Bone Loss During the Progression of Experimental Periodontitis in Rats. **Journal of Periodontology Online**, Waltham, v. 79, n. 6, p. 1062-9, jun. 2008. Disponível em: <http://www.joponline.org/doi/pdf/10.1902/jop.2008.070411>. Acesso em: 2 fev. 2015.

PAPADOPOULOS G. et al. Macrophage-Specific TLR2 Signaling Mediates Pathogen-Induced TNF-Dependent Inflammatory Oral Bone Loss. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 190, n. 3, p. 1148-57, feb. 2013. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/190/3/1148.full>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

PENOLAZZI L. et al. Induction of apoptosis of human primary osteoclasts treated with extracts from the medicinal plant *Embolica officinalis*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 8, n. 59, p. 1-11, oct. 2008. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1472-6882-8-59.pdf>>. Acesso em: 9 fev. 2015.

PULITI, M. et al. Regulatory role of interleukin-10 in experimental group B streptococcal arthritis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, n. 6, p. 2862-68, jun. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC128010/>>. Acesso em: 17 ago. 2015.

PUTNAM S.E. et al. Natural products as alternative treatments for metabolic bone disorders and for maintenance of bone health. **Phytotherapy Research**, Malden, v. 21, n. 2, p. 99-112, feb. 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.2030/pdf>>. Acesso em: 9 fev. 2015.

QIAGEN DISTRIBUTORS. **RNeasy Mini Handbook**. São Paulo, 2001.

QUEIROZ-JUNIOR C.M. et al. Endogenous opioids regulate alveolar bone loss in a periodontal disease model. **Life Sciences**, Columbus, v. 93, n. 12-14, p. 471-77, oct. 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320513004621>>. Acesso em: 30 jan. 2015.

QUEIROZ JUNIOR, C.M. et al. Role of systemic and local administration of selective inhibitors of cyclo-oxygenase 1 and 2 in an experimental model of periodontal disease in rats. **Journal of Periodontal Research**, Malden, v. 44, n. 2, p. 153-60, apr. 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0765.2007.01069.x/pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2015.

QUINELATO, V.; BALDUINO, A.; GUIMARÃES, J.P. Arnica montana e desordens musculares mastigatórias. **Rev Bras Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 68, n. 2, p. 225-8, jul./dez. 2011. Disponível em: <<http://revista.aborj.org.br/index.php/rbo/article/viewFile/308/261>>. Acesso em 9 fev. 2015.

RAINSFORD, K.D. Current status of the therapeutic uses and actions of the preferential cyclo-oxygenase-2 NSAID, nimesulide. **Inflammopharmacology**, Basel, v.14, n. 3-4, p. 120-37, aug. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16983492>>. Acesso em 30 jan. 2015.

RAINSFORD, K.D. et al. Nimesulide - a multifactorial approach to inflammation and pain: scientific and clinical consensus. **Current Medical Research and Opinion**, London, v. 22, n. 6, p. 1161-170, jun. 2006. Disponível em: <http://www.shu.ac.uk/_assets/pdf/bmrc-rainsford-NME-Review-CMRO.PDF>. Acesso em: 11 fev. 2015.

RANG H.P.et al. **Rang and Dale's Pharmacology**. 7.ed. Edinburgh: Elsevier, 2012.

REZENDE H.A.; COCCO M.I.M. A Utilização de Fitoterapia no Cotidiano de uma População Rural. **Rev Esc Enferm USP**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 282-8, jul. 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/reeusp/v36n3/v36n3a10.pdf>>. Acesso em: 6 fev. 2015.

ROBERTSON, A; SURYANARAYANAN, R; BANERJEE, A. Homeopathic Arnica montana for post-tonsillectomy analgesia: a randomised placebo control trial. **Homeopathy**, Wirral, v. 96, n.1, p. 17-21, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1475491606001470#>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

RODINI, C.O. **Doença periodontal inflamatória induzida por ligadura:** caracterização microscópica e estudo da presença de mastócitos e das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e metaloproteinases -2 e -9. 2005, 165p. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, Bauru, 2005.

RODINI C.O. et al. . Morphologic evaluation and expression of matrix metalloproteinases-2 and 9 and nitric oxide during experimental periodontal disease in rat. **Journal of Molecular Histology**, Brisbane, v. 39, n. 3, p. 275-82, jun. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10735-008-9163-4>>. Acesso em: 30 jan. 2015.

SANTOS, C.F. et al. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 12, n. 1, p. 1-11, jan./mar. 2004. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-77572004000100002>. Acesso em: 08 jul. 2015.

SHARAN K. et al. A novel quercetin analogue from a medicinal plant promotes peak bone mass achievement and bone healing after injury and exerts an anabolic effect on osteoporotic bone: the role of aryl hydrocarbon receptor as a mediator of osteogenic action. **Journal of Bone and Mineral Research**, Cambridge, v. 26, n. 9, p. 2096-111, sep. 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbmr.434/pdf>>. Acesso em: 9 fev. 2015.

SHARMA, S. et al. Cumulative therapeutic effects of phytochemicals in Arnica montana flower extract alleviated collagen-induced arthritis: inhibition of both pro-inflammatory mediators and oxidative stress. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Malden, p. 1-11, may, 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.7252/full>>. Acesso em: 21 jul. 2015.

SHUBHAMOY, G. et al. Dental Practice Scenario in a Government Homeopathic Hospital in West Bengal, India. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, Omaha, v. 19, n. 3, p. 200-4, jul. 2014. Disponível em: <<http://chp.sagepub.com/content/19/3/200.long>>. Acesso em: 20 jul. 2015.

SIMA, C.; GLOGAUER, M. Macrophage subsets and osteoimmunology: tuning of the immunological recognition and effector systems that maintain alveolar bone. **Periodontology 2000**, Malden, v. 63, n. 1, p. 80-101, oct. 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/prd.12032/pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

SOUSA, F.R.S. **A Homeopatia: uma visão histórica e de saúde pública**. 2012. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012. Disponível em: <<http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3740/1/Monografia%202012.pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2015.

SOUZA, L.M.A. et al. Ação Anti-Edematosa: Arnica montana 6CH X Diclofenaco de Sódio 50 mg . **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, João Pessoa, v.11, n.4, p. 491-96, out./dez. 2011. Disponível em: <<http://revista.uepb.edu.br/index.php/pboci/article/viewFile/886/727>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

SOUZA, G.P. **Efeitos do captopril sobre a doença periodontal induzida experimentalmente em ratos**. 2014. 127p. Dissertação (Mestrado em Ciências

Odontológicas Aplicadas) - Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, Bauru, 2014. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25149/tde-14042015-101126/pt-br.php>>. Acesso em: 29 jun. 2015.

SREEMANTI, D. et al. Potential of the homeopathic remedy, Arnica Montana 30C, to reduce DNA damage in Escherichia coli exposed to ultraviolet irradiation through up-regulation of nucleotide excision repair genes. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, Shanghai, v.10, n. 3, p. 337-346, mar. 2012. Disponível em: <<http://www.jcimjournal.com/jim/FullText2.aspx?articleID=jcim20120314>>. Acesso em: 16 jul. 2015.

TASSORELLI, C. et al. Central Components of the Analgesic/Antihyperalgesic Effect of Nimesulide: Studies in Animal Models of Pain and Hyperalgesia. **Drugs**, v. 63, n. 1, p. 9-22, jul. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14506907>>. Acesso em: 30 jan. 2015.

TEIXEIRA, M.Z. Homeopatia: ciência, filosofia e arte de curar. **Rev. Med.**, São Paulo, v. 85, n. 2, p. 30-43, abr./jun. 2006. Disponível em: <<http://www.bvshomeopatia.org.br/texto/artigoHo.rev.med.zulian06852.pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2015.

TOMAZZONI, M.I.; NEGRELLE, R.R.B.; CENTA, M.L. Fitoterapia Popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enferm.**, Florianópolis, v. 15, n. 1, p. 115-21, fev. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/tce/v15n1/a14v15n1.pdf>>. Acesso em: 6 fev. 2015.

VERMA N. et al. Evaluation of inhibitory activities of plant extracts on production of LPS – stimulated pro-inflammatory mediators in J774 murine macrophages.

Molecular and Cellular Biochemistry, Delhi, v. 336, n. 1-2, p. 127-35, mar. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11010-009-0263-6.pdf>>. Acesso em: 9 fev. 2015.

WALKER S.L. et al. Nimesulide associated fulminante hepatic failure. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, Malden, v. 17, n. 11, p. 1108-12, nov. 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pds.1665/pdf>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

WERNER, M.F.P.; SOUZA, G.E.P.; ZAMPRONIO, A.R. Nimesulide-induced antipyresis in rats involves both cyclooxygenase-dependent and independent mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, Utrecht, v. 543, n. 1-3, p. 181-89, aug. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001429990600570X>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

YANG, M. et al. Neutrophil- and myeloperoxidase-mediated metabolism of reduced nimesulide: evidence for bioactivation. **Chem. Res. Toxicol.**, Minneapolis, v. 23, n. 11, p. 1691-700, nov. 2010. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/tx1001496>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

ZHAO Y. et al. Gu Ling Pian, a traditional Chinese medicine, regulates function and OPG/RANKL synthesis of osteoblasts via the p38 MAPK pathway. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Malden, v. 59, n. 8, p. 1167-73, aug. 2007. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1211/jpp.59.8.0016/pdf>>. Acesso em: 9 fev. 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabela com os volumes administrados de T.M. de Arnica (diluída 20X) de acordo com os pesos dos ratos

Tintura mãe de arnica					
Peso do rato (g)	Volume (uL)	Peso do rato (g)	Volume (uL)	Peso do rato (g)	Volume (uL)
110	58,7	158	84,3	206	109,9
111	59,2	159	84,8	207	110,4
112	59,7	160	85,3	208	110,9
113	60,3	161	85,9	209	111,5
114	60,8	162	86,4	210	112,0
115	61,3	163	86,9	211	112,5
116	61,9	164	87,5	212	113,1
117	62,4	165	88,0	213	113,6
118	62,9	166	88,5	214	114,1
119	63,5	167	89,1	215	114,7
120	64,0	168	89,6	216	115,2
121	64,5	169	90,1	217	115,7
122	65,1	170	90,7	218	116,3
123	65,6	171	91,2	219	116,8
124	66,1	172	91,7	220	117,3
125	66,7	173	92,3	221	117,9
126	67,2	174	92,8	222	118,4
127	67,7	175	93,3	223	118,9
128	68,3	176	93,9	224	119,5
129	68,8	177	94,4	225	120,0
130	69,3	178	94,9	226	120,5
131	69,9	179	95,5	227	121,1
132	70,4	180	96,0	228	121,6
133	70,9	181	96,5	229	122,1
134	71,5	182	97,1	230	122,7
135	72,0	183	97,6	231	123,2
135	72,0	183	97,6	231	123,2
136	72,5	184	98,1	232	123,7
137	73,1	185	98,7	233	124,3
138	73,6	186	99,2	234	124,8
139	74,1	187	99,7	235	125,3
140	74,7	188	100,3	236	125,9
141	75,2	189	100,8	237	126,4
142	75,7	190	101,3	238	126,9
143	76,3	191	101,9	239	127,5
144	76,8	192	102,4	240	128,0
145	77,3	193	102,9	241	128,5
146	77,9	194	103,5	242	129,1
147	78,4	195	104,0	243	129,6
148	78,9	196	104,5	244	130,1
149	79,5	197	105,1	245	130,7
150	80,0	198	105,6	246	131,2
151	80,5	199	106,1	247	131,7
152	81,1	200	106,7	248	132,3
153	81,6	201	107,2	249	132,8
154	82,1	202	107,7	250	133,3
155	82,7	203	108,3	251	133,9
156	83,2	204	108,8	252	134,4
157	83,7	205	109,3	253	134,9

Peso do rato (g)	Volume (uL)	Peso do rato (g)	Volume (uL)	Peso do rato (g)	Volume (uL)
254	135,5	303	161,6	352	187,7
255	136,0	304	162,1	353	188,3
256	136,5	305	162,7	354	188,8
257	137,1	306	163,2	355	189,3
258	137,6	307	163,7	356	189,9
259	138,1	308	164,3	357	190,4
260	138,7	309	164,8	358	190,9
261	139,2	310	165,3	359	191,5
262	139,7	311	165,9	360	192,0
263	140,3	312	166,4	361	192,5
264	140,8	313	166,9	362	193,1
265	141,3	314	167,5	363	193,6
266	141,9	315	168,0	364	194,1
267	142,4	316	168,5	365	194,7
268	142,9	317	169,1	366	195,2
269	143,5	318	169,6	367	195,7
270	144,0	319	170,1	368	196,3
271	144,5	320	170,7	369	196,8
272	145,1	321	171,2	370	197,3
273	145,6	322	171,7	371	197,9
274	146,1	323	172,3	372	198,4
275	146,7	324	172,8	373	198,9
276	147,2	325	173,3	374	199,5
277	147,7	326	173,9	375	200,0
278	148,3	327	174,4	376	200,5
279	148,8	328	174,9	377	201,1
280	149,3	329	175,5	378	201,6
281	149,9	330	176,0	379	202,1
282	150,4	331	176,5	380	202,7
283	150,9	332	177,1	381	203,2
284	151,5	333	177,6	382	203,7
285	152,0	334	178,1	383	204,3
286	152,5	335	178,7	384	204,8
287	153,1	336	179,2	385	205,3
288	153,6	337	179,7	386	205,9
289	154,1	338	180,3	387	206,4
290	154,7	339	180,8	388	206,9
291	155,2	340	181,3	389	207,5
292	155,7	341	181,9	390	208,0
293	156,3	342	182,4	391	208,5
294	156,8	343	182,9	392	209,1
295	157,3	344	183,5	393	209,6
296	157,9	345	184,0	394	210,1
297	158,4	346	184,5	395	210,7
298	158,9	347	185,1	396	211,2
299	159,5	348	185,6	397	211,7
300	160,0	349	186,1	398	212,3
301	160,5	350	186,7	399	212,8
302	161,1	351	187,2	400	213,3

APÊNDICE B - Tabela com os volumes administrados de Arnica 6CH(diluída 100X) de acordo com os pesos dos ratos

Peso do rato (g)	Volume (uL)		Peso do rato (g)	Volume (uL)		Peso do rato (g)	Volume (uL)		Peso do rato (g)	Volume (uL)
110	117,7		158	169,1		206	220,4		401	429,1
111	118,8		159	170,1		207	221,5		402	430,2
112	119,8		160	171,2		208	222,6		403	431,2
113	120,9		161	172,3		209	223,6		404	432,2
114	122,0		162	173,3		210	224,7		405	433,3
115	123,1		163	174,4		211	225,8		406	434,4
116	124,1		164	175,5		212	226,8		407	435,5
117	125,2		165	176,6		213	227,9		408	436,6
118	126,3		166	177,6		214	229,0		409	437,7
119	127,3		167	178,7		215	230,1		410	438,8
120	128,4		168	179,8		216	231,1		411	439,8
121	129,5		169	180,8		217	232,2		412	440,8
122	130,5		170	181,9		218	233,3		413	441,9
123	131,6		171	183,0		219	234,3		414	443,0
124	132,7		172	184,0		220	235,4		415	444,1
125	133,8		173	185,1		221	236,5		416	445,2
126	134,8		174	186,2		222	237,5		417	446,2
127	135,9		175	187,3		223	238,6		418	447,2
128	137,0		176	188,3		224	239,7		419	448,3
129	138,0		177	189,4		225	240,8		420	449,4
130	139,1		178	190,5		226	241,8			
131	140,2		179	191,5		227	242,9			
132	141,2		180	192,6		228	244,0			
133	142,3		181	193,7		229	245,0			
134	143,4		182	194,7		230	246,1			
135	144,5		183	195,8		231	247,2			
136	145,5		184	196,9		232	248,2			
137	146,6		185	198,0		233	249,3			
138	147,7		186	199,0		234	250,4			
139	148,7		187	200,1		235	251,5			
140	149,8		188	201,2		236	252,5			
141	150,9		189	202,2		237	253,6			
142	151,9		190	203,3		238	254,7			
143	153,0		191	204,4		239	255,7			
144	154,1		192	205,4		240	256,8			
145	155,2		193	206,5		241	257,9			
146	156,2		194	207,6		242	258,9			
147	157,3		195	208,7		243	260,0			
148	158,4		196	209,7		244	261,1			
149	159,4		197	210,8		245	262,2			
150	160,5		198	211,9		246	263,2			
151	161,6		199	212,9		247	264,3			
152	162,6		200	214,0		248	265,4			
153	163,7		201	215,1		249	266,4			

154	164,8		202	216,1		250	267,5
155	165,9		203	217,2		251	268,6
156	166,9		204	218,3		252	269,6
157	168,0		205	219,4		253	270,7
Peso do	Volume		Peso do	Volume		Peso do	Volume
rato (g)	(uL)		rato (g)	(uL)		rato (g)	(uL)
254	271,8		303	324,2		352	376,6
255	272,9		304	325,3		353	377,7
256	273,9		305	326,4		354	378,8
257	275,0		306	327,4		355	379,9
258	276,1		307	328,5		356	380,9
259	277,1		308	329,6		357	382,0
260	278,2		309	330,6		358	383,1
261	279,3		310	331,7		359	384,1
262	280,3		311	332,8		360	385,2
263	281,4		312	333,8		361	386,3
264	282,5		313	334,9		362	387,3
265	283,6		314	336,0		363	388,4
266	284,6		315	337,1		364	389,5
267	285,7		316	338,1		365	390,6
268	286,8		317	339,2		366	391,6
269	287,8		318	340,3		367	392,7
270	288,9		319	341,3		368	393,8
271	290,0		320	342,4		369	394,8
272	291,0		321	343,5		370	395,9
273	292,1		322	344,5		371	397,0
274	293,2		323	345,6		372	398,0
275	294,3		324	346,7		373	399,1
276	295,3		325	347,8		374	400,2
277	296,4		326	348,8		375	401,3
278	297,5		327	349,9		376	402,3
279	298,5		328	351,0		377	403,4
280	299,6		329	352,0		378	404,5
281	300,7		330	353,1		379	405,5
282	301,7		331	354,2		380	406,6
283	302,8		332	355,2		381	407,7
284	303,9		333	356,3		382	408,7
285	305,0		334	357,4		383	409,8
286	306,0		335	358,5		384	410,9
287	307,1		336	359,5		385	412,0
288	308,2		337	360,6		386	413,0
289	309,2		338	361,7		387	414,1
290	310,3		339	362,7		388	415,2
291	311,4		340	363,8		389	416,2
292	312,4		341	364,9		390	417,3
293	313,5		342	365,9		391	418,4

294	314,6		343	367,0		392	419,4
295	315,7		344	368,1		393	420,5
296	316,7		345	369,2		394	421,6
297	317,8		346	370,2		395	422,7
298	318,9		347	371,3		396	423,7
299	319,9		348	372,4		397	424,8
300	321,0		349	373,4		398	425,9
301	322,1		350	374,5		399	426,9
302	323,1		351	375,6		400	428,0

APÊNDICE C - Tabela de porcentagem de PMN a partir da leitura das lâminas

H2O 14d	% PMN	Arn. 6CH 14d	% PMN	Tint. Arnica 14d	%PMN	Nimesulida 14d	%PMN
R1	50	R1	10	R1	30	R1	
R2	10	R2	5	R2	80	R2	90
R3		R3	50	R3	20	R3	50
R4	5	R4	80	R4	10	R4	10
R5	50	R5	10	R5	40	R5	50
Média	28,8	Média	31,0	Média	36,0	Média	50,0
Desv. Padr.	24,6	Desv. Padr.	29,4	Desv. Padr.	24,2	Desv. Padr.	32,7
H2O 21d	% PMN	Arn. 6CH 21d	%PMN	Tint. Arnica 21d	%PMN	Nimesulida 21d	%PMN
R1	10	R1	20	R1	30	R1	30
R2	10	R2	10	R2	10	R2	10
R3	5	R3	10	R3	50	R3	70
R4	20	R4	50	R4	5	R4	70
R5	5	R5	40	R5	30	R5	60
Média	10,0	Média	26,0	Média	25,0	Média	48,0
Desv. Padr.	6,1	Desv. Padr.	18,2	Desv. Padr.	18,0	Desv. Padr.	26,8
H2O 28d	% PMN	Arn. 6CH 28d	%PMN	Tint. Arnica 28d	%PMN	Nimesulida 28d	%PMN
R1	70	R1	50	R1	5	R1	40
R2	5	R2	20	R2	20	R2	50
R3		R3		R3	80	R3	50
R4	80	R4	30	R4	60	R4	0
R5	70	R5	70	R5	30	R5	60
Média	56,3	Média	42,5	Média	39,0	Média	40,0
Desv. Padr.	34,5	Desv. Padr.	22,2	Desv. Padr.	30,5	Desv. Padr.	23,5