UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Curso de Graduação em Medicina Veterinária

Victoria Arrifano Moraes

O USO DA HOMEOPATIA NA SENESCÊNCIA/SENILIDADE: MODELO EXPERIMENTAL.

São Paulo

2017

Victoria Arrifano Moraes

O USO DA HOMEOPATIA NA SENESCÊNCIA/SENILIDADE: MODELO EXPERIMENTAL.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para a obtenção do título Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador (a): Prof.ª Dr.ª Cidéli de Paula Coelho

São Paulo

2017

ARRIFANO MORAES, VICTORIA
O Uso da Homeopatia na Senescência/Senilidade: Modelo Experimental / VICTORIA ARRIFANO MORAES. -- São Paulo , 2017
51 f.

TCC Graduação (Medicina Veterinária) - Universidade de Santo Amaro, 2017

Orientador(a): Cidéli de Paula Coelho

1.Homeopatia. 2.Senilidade. 3.Calcárea carbônica. 4.Baryta muriática. 5.Densidade Óssea. I.Cidéli de Paula Coelho, orient. II.Universidade de Santo Amaro III.Titulo

Universidade de Santo Amaro

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais

PARECER N.º 07 /2015

REGISTRO CEP UNISA N.º 78/2015 – PROJETO DE PESQUISA

Projeto de Pesquisa: "A Homepatia como ferramenta para melhorar a cognição na senescência/senilidade: modelo experimental."

Pesquisadores Responsáveis: Cideli de Paula Coelho
Victoria Arrifano Moraes

Curso: Medicina Veterinária

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação:

O Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais **(CEUA-UNISA),** esta de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei federal nº 11.794 (Lei Arouca) que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais no país e a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, manifestando-se pela **APROVAÇÃO** do Projeto **"A Homepatia como ferramenta para melhorar a cognição na senescência/senilidade: modelo experimental."**

*** Prezados Pesquisadores o CEUA solicita:**

- Relatório da pesquisa ao término do prazo estipulado no cronograma do projeto.
- Ser informado sobre qualquer alteração na metodologia informada no Projeto de Pesquisa.

São Paulo, 21 de agosto de 2015.

Valeria Castilho Onofrio
Coord do Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA
Universidade Santo Amaro - UNISA

PROFA. DRA. VALÉRIA CASTILHO ONOFRIO
Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA
UNISA - Universidade de Santo Amaro

Victoria Arrifano Moraes

O USO DA HOMEOPATIA NA SENESCÊNCIA/SENILIDADE: MODELO EXPERIMENTAL.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para a obtenção do título Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador(a): Profa. Dra. Cidéli de Paula Coelho

São Paulo,_____ de _____ de 2017.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Prof. Dr._____

Conceito Final

Lembro que um dia, após descobrir que havia passado no vestibular, eu falei que a minha Dachshund Tutu iria estar presente na minha formatura e muitas pessoas duvidaram e é por isso que dedico este trabalho a ela. Minha pequena, que venceu grandes obstáculos e hoje, graças à Homeopatia, ela está com a saúde melhor do que há 5 anos atrás.

Agradecimentos

Minha lista de agradecimentos é enorme, mas não há nada mais justo do que começar agradecendo aos meus queridos pais Vera e Reinaldo, por terem incentivado todas as minhas escolhas profissionais, me ajudando a decidir o que era melhor, mas sempre dentro daquilo que eu realmente almejava, sem nunca terem imposto qualquer obstáculo para que eu pudesse alcançar minhas metas.

Agradeço também aos meus avós Palmira e Francisco, que são meus segundos pais em todos os aspectos, agradeço por sempre apoiarem minhas decisões, mesmo quando não concordavam; por terem ajudado a pagar pela minha formação e pelo meu carro que foi o melhor e mais maravilhoso presente de formatura (que chegou antes da hora, rs).

Agradeço à minha querida tia, madrinha e terceira mãe Miriam, que me orientou em todas as minhas apresentações desde o ensino médio, me mostrou grandes ensinamentos da vida e também participou financeiramente na minha formação.

Agradeço à dona Mira Falchi, que também ajudou financeiramente para a conclusão dos meus estudos.

Agradeço a minha melhor amiga Beatriz por ter sido presente em todos os momentos, me apoiando e incentivando durante toda a graduação.

E não poderia deixar de agradecer à minha “mãe da veterinária”, professora e orientadora Cidéli, que me acompanhou desde o primeiro ano da graduação, me proporcionando muito, aprendizado, dedicação e carinho e por ter me apresentado à minha nova grande paixão que é a Homeopatia.

Existem diversas outras pessoas pelas quais sou muito grata, mas não caberiam todas em uma folha de papel. Tento mostrar a elas minha gratidão todos os dias e agora mais do que nunca, pois estando formada, poderei tratar com todo respeito e dedicação os animais daqueles que assim o quiserem.

“Se der medo, finge que tem coragem e vai com medo mesmo”.

Palavras de uma sábia Coruja.

Resumo

O processo de envelhecimento é extremamente complexo e multifatorial, devido a sua natureza multidisciplinar. Sendo assim, é de extrema importância o estudo de medicamentos que possam melhorar o envelhecer de homens e animais. O objetivo do presente estudo é avaliar a ação de medicamentos homeopáticos na melhora de tarefas cognitivas, prejudicadas pela senilidade e possíveis alterações positivas em parâmetros orgânicos que são afetados pelo passar do tempo, juntamente com a avaliação da densidade mineral óssea que também pode se apresentar alterada durante o processo de envelhecimento. Foram utilizados 32 ratos Wistar, machos, com 22 a 23 meses de idade provenientes do Biotério da Universidade Santo Amaro (UNISA) (autorizado pelo CEUA n 07/2015). Todos os machos foram alojados em gaiolas com acesso *ad libitum* ao alimento e água, com ciclo de luz controlado 12:12 horas (7h/19h) e distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (4/gaiola), sendo 8 animais por grupo, e os medicamentos ministrados na água de bebida *ad libitum*: *Baryta carbônica* 30 cH; *Baryta muriática* 30 cH; Solução hidroalcoólica 10%; Controle Branco (não tomará medicamento nenhum). Em cada bebedouro foram colocadas 5 gotas da medicação e agitado (trocados 2x na semana). Os animais passaram pelo Campo Aberto (CA) no dia 1 do experimento, após 40 dias de medicação os animais passaram por testes comportamentais como o Campo Aberto (CA), Labirinto em “T” e reconhecimento de objetos. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA, seguido pelo Teste de Bartlett e Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni, sendo $p \leq 0,05$. Na necropsia foi retirado o fêmur de cada animal. O experimento foi realizado em cego. Após a retirada do fêmur, as amostras coletadas foram expostas a uma máquina de raios-X portátil (Nomad® Aribex, EUA). A densidade óptica foi determinada por números em uma escala de cinza 8 bits (0-255) e foi medida pelo programa Digora para Windows® (Soredex, Finlândia) em 13 pontos normalizados em 3 áreas do fêmur por dois observadores independentes. Os dados foram analisados por ANOVA, seguido de testes de comparação múltipla, para identificar diferenças entre os grupos e tratamentos e também em relação à região óssea analisada (3 regiões distintas do osso). Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. No inicio do experimento não houve diferença estatística entre os grupos no CA, demonstrando uniformidade entre os animais. Após a medicação ao passar pelo CA, foi observado um aumento dos quadrantes andados ($p \leq 0.05$) na locomoção total e uma diminuição do Freezing dos grupos que tomaram *Calcarea carbônica* e *Baryta muriática* ($p \leq 0.05$) em comparação com os grupos

Controle branco e Solução hidroalcoólica, demonstrando uma melhor disposição dos idosos medicados. No Teste do Labirinto em T demonstrou-se um maior número de acertos no grupo *Baryta muriatica* 30 cH, portanto auxiliou na melhora da memória dos idosos. No presente estudo, não foram observados efeitos significativos do tratamento sobre a densidade mineral óssea na região proximal, distal e média. Os medicamentos foram capazes de aumentar a locomoção dos animais mesmo sem alteração na densidade óssea e a *Baryta muriática* agiu na melhora cognitiva dos animais em comparação aos outros grupos.

Palavras-chave: Homeopatia, Senilidade, Modelo experimental, *Calcárea Carbônica*, *Baryta muriática*, densidade óssea.

Abstract

The aging process is extremely complex and multifactorial due to its multidisciplinary nature. Therefore, it is extremely important to study medicines that improve the aging of men and animals. The objective of the present study is to evaluate the action of homeopathic medicines in the improvement of cognitive tasks, impaired by senility and possible positive changes in organic parameters that are affected by the passage of time, together with an evaluation of the bone mineral density that can also be altered during the aging process. Thirty-two male Wistar rats aged 22 to 23 months from the Santo Amaro University Laboratory (UNISA) (authorized by CEUA n ° 07/2015) were used. All males were housed in cages with *ad libitum* access to food and water, with light cycle controlled at 12:12 hours (7:00 am / 7:00 pm) and randomly distributed in 4 experimental groups (4 / cage), being 8 animals per group, and the medicines given in drinking water *ad libitum*: *Calcarea carbonic* 30 cH; *Baryta muriatic* 30 cH; Hydroalcoholic solution 10%; White Control (will not take any medication). Five drops of the medication were placed in each drinking fountain and shaken (changed 2x a week). The animals went through the Open Field (OF) on day 1 of the experiment, after 40 days of medication the animals underwent behavioral tests such as Open Field (OF), T-maze and object recognition. Data were analyzed statistically by ANOVA, followed by the Bartlett test and Bonferroni Multiple Comparison Test, where $p \leq 0.05$. At necropsy the femur was removed from each animal. The experiment was performed in the blind. After removal of the femur, the collected samples were exposed to a portable X-ray machine (Nomad® Aribex, USA). Optical density was determined by numbers on an 8-bit gray scale (0-255) and was measured by the Digora for Windows® program (Soredex, Finland) at 13 normalized points in 3 areas of the femur by two independent observers. The data were analyzed by ANOVA, followed by multiple comparison tests, to identify differences between groups and treatments and also in relation to the analyzed bone region (3 distinct regions of the bone). Value of $p < 0.05$ was considered significant. At the beginning of the experiment there was no statistical difference between the groups in the OF, demonstrating uniformity between the animals. After medication when passing through the OF, an increase of the quadrants walked ($p \leq 0.05$) in the total locomotion and a decrease in the Freezing of the groups that *took Calcarea carbonic* and *Baryta muriatic* ($p \leq 0.05$) were observed in comparison with the White and Hydroalcoholic solution, demonstrating a better disposition of medicated elderly. In the t-maze test, a greater number of hits was found in the *Baryta muriatic* 30 cH

group therefore, it helped to improve the memory of the elderly. In the present study, no significant effects of treatment on bone mineral density were observed in the proximal, distal and middle region. The drugs were able to increase the locomotion of the animals even without alteration in the bone density and the *Baryta muriatic* acted on the cognitive improvement of the animals in comparison to the other groups.

Key words: Homeopathy, Senility, Experimental model, *Calcarea carbonic*, *Baryta muriatic*, bone density.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Animal submetido ao teste de Atividade Geral em Campo Aberto.....31

Figura 2. Animal submetido à primeira parte do teste de reconhecimento de objetos.....32

Figura 3. Animal submetido à segunda parte do teste de reconhecimento de objetos.....32

Figura 4. Animal submetido ao Teste de Labirinto em "T".....33

Figura 5. Nomad – Exposição ao Raios-X 34

Figua 6. Digora Optime 35

Figura 7. Os dados estão apresentados como médias ± SEM. Em relação ao teste de aprendizagem Labirinto em "T“ . Uma maneira ANOVA seguido por teste de comparação múltipla de Bonferroni, * p <0,05- em relação ao grupo HS e controle Branco.....36

Figura 8. Os dados estão apresentados como médias ± erro padrão. ANOVA seguido por teste de comparação múltipla de Bonferroni, * p <0,05- em relação ao grupo Solução hidroalcoólica e controle Branco. 37

Figura 9. Os dados estão apresentados como médias ± SEM. Em relação ao teste de aprendizagem Labirinto em "T“ . Uma maneira ANOVA seguido por teste de comparação múltipla de Bonferroni, * p <0,05- em relação ao grupo HS e controle Branco.....38

Figura 10. Comparação dos registros de densidade mineral óssea entre dois observadores independentes. 39

Figura.11. Avaliação do efeito do tratamento sobre a densidade mineral óssea.....41

Figura.12. Avaliação do efeito do tratamento e da região sobre a densidade mineral óssea Grupos: SH – Solução hidroalcoólica; CC – Calcária carbônica; BM – Baryta muriática; CB – Controle.....42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise descritiva da densidademineral óssea por tratamento e região..... 40

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de Variância

BM - Barita Muriática

CA - Campo Aberto

Ca^{2}+- Cálcio

CB - Controle Branco

CC - Calcárea Carbônica

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DMO - Densidade Mineral Óssea

DP - Desvio Padrão

EUA - Estados Unidos da América

IP - Intraperitoneal

Mg^{2}+- Magnésio

OMS - Organização Mundial da Saúde

Pi - Fosfato

PSP - fósforo foto estimuláveis

SNC - Sistema Nervoso Central

UHDs - Uso de Ultradiluições

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20

1.1.Análise Comportamental 21

1.1.1. Avaliação da atividade geral em Campo Aberto.....22

1.1.2. Reconhecimento de Objetos em Campo Aberto 23

1.1.3. Teste de Labirinto em "T" 23

1.2. Tecido Ósseo 23

1.2.1. Problemas Ósseos no Envelhecimento.....25

1.2.2. Densitometria Óssea.....27

1.3. Ultradiluições / Homeopatia.....27

2. OBJETIVO GERAL 29

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 29

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....29

4.1. Modelos Animais 29

4.1.1 Animais.....29

4.2. Avaliação da Atividade Geral em Campo Aberto 30

4.3. Teste de Reconhecimento de Objetos em Campo Aberto 31

4.4. Teste de Labirinto em "T" 33

4.5. Preparação do Fêmur.....34

4.6. Densitometria Óssea.....34

5. RESULTADOS 35

5.1. Campo Aberto 35

5.2. Reconhecimento de Objetos em Campo Aberto 37

5.3. Labirinto em "T" 37

5.4. Densidade Mineral Óssea 38

5.5 Avaliação de Possível Efeito de Interação Entre Tratamento e Região 42

6. DISCUSSÃO 43

7. CONCLUSÃO.....45

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 46

ANEXO 1.....52

1. INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento é extremamente complexo e multifatorial, devido a sua natureza multidisciplinar. Sobre este assunto, podem-se destacar as teorias estocásticas, baseadas no acúmulo aleatório de moléculas com alterações estruturais ou funcionais, e as teorias não-estocásticas relacionadas a mecanismos programados no genoma de cada organismo (LUKIW, 2007; LEE e COLS. 2006). Dentre as teorias estocásticas incluem-se as seguintes: radicais livres, lesão mitocondrial, alteração do colágeno, lesão de membrana, mutação genética e “erro catastrófico” na síntese de proteínas, e as teorias neuroendócrina e imunológica (LETIEMBRE e COLS. 2007).

Atualmente, entende-se que o envelhecimento não é uma alteração patológica e sim um processo natural e fisiológico (MUNIZ et al., 2007). Com o passar do tempo, o indivíduo idoso começa a apresentar aspectos próprios que caracterizam a diminuição da capacidade funcional de seu organismo. Essas alterações podem ser expressas como tendências a inúmeras patogenias, recuperação lenta, cronificação de determinadas doenças. A pré disposição a determinadas alterações pode estar relacionada à senescência, ou seja, ao envelhecimento fisiológico. Contudo, o envelhecimento que se associa a patologias e redução da função dos órgãos de um indivíduo é definido como senilidade, ou seja, envelhecimento patológico (MUNIZ et al., 2007).

O organismo que sofre o impacto do envelhecimento está sujeito a alterações no nível das células, dos órgãos e dos sistemas, tendo uma variabilidade grande, de acordo com a nutrição, presença de traumas ou ainda infecções.

A medicina convencional reage com ceticismo e muitas vezes recusa-se a aceitar evidências de pesquisas com a homeopatia, argumentando que a ciência homeopática contém dois pontos incógnitos: o mecanismo de ação e o uso de ultradiluições (UHDs). Isto leva a uma pressão considerável sobre a homeopatia para apresentar provas, a fim de ser aceita pela ciência e pela medicina convencional. Nas últimas décadas, um número considerável de estudos clínicos e experimentais foi conduzido com a utilização da homeopatia, com base em métodos convencionais. A pesquisa básica e estudos experimentais podem ser úteis para

esclarecer os mecanismos de ação, afirmando qualidade dos remédios e dando provas da ação dos medicamentos ultradiluídos (RIGUETTI et al., 2015).

1.1 Análise Comportamental

O comportamento exploratório possibilita que o animal obtenha informações do ambiente e permite que ele explore o desconhecido, tornando-o fundamental para sua sobrevivência. Diante desse princípio, tal comportamento torna-se um fator importante de aprendizado (GERLAI, 1998) visto que permite que o animal aprenda a buscar recursos ambientais tais como alimentos, água e companheiros. Assim como possíveis rotas de fuga e reconhecimento da proximidade de predadores (HENRY, 2004). Com o passar do tempo, os indivíduos idosos podem apresentar déficits comportamentais que podem incluir processamentos cognitivos e motores cujos mecanismos envolvidos estão relacionados a funções executivas e aos sistemas sensorial e músculo esquelético (SPARROW, 2005), o que dificulta na manutenção do comportamento exploratório e, consequentemente, na vida desses animais.

Um estudo realizado por Oliani et al. (2007) que buscava comparar as funções cognitivas de idosos que caminham de forma independente com as de idosos dependentes de cadeira de rodas concluiu que indivíduos que se locomovem de forma independente apresentam melhor desempenho cognitivo quando comparados com idosos cadeirantes. Partindo dessa premissa é importante buscar métodos que melhorem as atividades locomotoras em indivíduos idosos, para proporcionar melhor qualidade de vida e tentar reduzir o declínio cognitivo desses indivíduos.

Diversos estudos vêm demonstrando que o estímulo de funções motoras no idoso pode diminuir morbidades, risco de diabetes e hipertensão, aumentar massa muscular e densidade óssea, melhorando a realização das atividades da vida diária com consequente diminuição do risco de quedas (ZAGO, 2003). Outros fatores como benefícios na oxigenação e fluxo sanguíneo cerebral, plasticidade neural, transmissão sináptica e produção de alguns neurotransmissores, como serotonina, acetilcolina, noradrenalina e dopamina também são observados (SUTOO, 2003).

Mediante tantos fatores envolvidos com a senescência/senilidade, análises comportamentais foram realizadas no presente estudo, por meio de: avaliação da atividade geral em Campo Aberto (CA): empregado como índice para medir emocionalidade ou alterações motoras; Teste de Reconhecimento de Objetos no CA e Teste de Labirinto em “T”.

1.1.1 Avaliação da atividade geral em Campo Aberto

O teste de atividade geral em campo aberto foi desenvolvido por Hall (1934; 1936) e desde então pode ser considerado um dos principais instrumentos de avaliação comportamental em animais de experimentação. Sua importância, provavelmente, decorre da simplicidade do aparelho (WALSH, et. al 1976), a facilidade de registro, ao ser comparado com uma avaliação em ambiente natural (NEVES, 2010) e por se tratar de um teste sensório-motor que quantifica atividade locomotora (WALSH, et. al 1976) e hábitos exploratórios dos animais (NEVES, 2010).

Durante o período em que o animal é mantido na arena do Campo Aberto, tais unidades de avaliação são computadas: unidade de locomoção, o ato de o animal penetrar com os quatro membros em uma das divisões do chão da arena, que pode ser avaliada pela movimentação no centro da arena, estando esta mais relacionada à ansiedade e locomoção na periferia do campo aberto que é indicador da atividade locomotora; unidade de levantar corresponde à postura de o animal permanecer apoiado nos membros posteriores, com o tronco perpendicular ao chão, tendo a cabeça dirigida para cima, podendo ou não tocar com os membros anteriores as paredes do campo aberto, tal resposta tem sido utilizada como medida do nível de excitabilidade, haja vista que esse comportamento tem correlação com outras atividades como a auto-limpeza corporal (grooming), defesa e reações sexuais (NEVES, 2010); cada bolo de fezes produzido pelo animal durante o período de teste foi registrado como unidade de defecação, sendo este indicador de estado emocional do animal (CRUZ, 2012). O registro da frequência dos parâmetros foi feito por intermédio de um contador manual. O tempo de imobilidade (freezing) também foi medido, sendo este definido quando o animal não apresenta locomoção e movimentos de farejar. Este parâmetro foi medido com o auxílio de um cronômetro.

1.1.2 Reconhecimento de Objetos em Campo Aberto

O teste de reconhecimento de objetos visa avaliar condições cognitivas, mais especificamente a memória de curto prazo em roedores (ENGELKE, 2007), ou seja, a capacidade do animal em discriminar objetos já conhecidos anteriormente, daqueles que não são conhecidos (CRUZ, 2009). Essa tendência, no roedor, é vista pelo maior tempo explorando novos objetos em relação aos que já são familiares a ele, por isso essa predileção ao novo pode ser aplicada ao método de avaliação de memória de aprendizagem e reconhecimento.

Para minimizar as interferências ambientais durante a análise, foi incorporado um sistema de vídeo no campo aberto, com a presença de um avaliador a fim de identificar os animais no início dos testes e manter a limpeza do campo imediatamente após a retirada de um animal para então iniciar a próxima sessão de avaliação, retirando assim possíveis influências olfativas.

1.1.3 Teste de Labirinto em “T”

A avaliação em Labirinto em “T” tem a finalidade semelhante ao teste de reconhecimento de objetos, haja vista que ambos apontam comportamento exploratório e memória dos animais em questão, especialmente modelos de roedores para distúrbios do SNC (GERLAI, 1998). Este teste é baseado no interesse dos animais em explorar um novo ambiente, ou seja, eles geralmente optam por visitar um novo braço do labirinto, ao invés de um braço familiar. Tal comportamento reflete a cognição, mais especificamente a memória desses indivíduos, tendo em vista que animais com a cognição preservada optariam pelo espaço nunca visitado no momento do teste de escolha livre, pois este se lembraria que já havia visitado o outro braço previamente.

1.2 Tecido Ósseo

Os ossos, em conjunto com a cartilagem, formam a estrutura que promove sustentação e proteção ao organismo. Estes protegem a maioria dos órgãos de tecidos moles, como o sistema nervoso central, órgãos da cavidade torácica e

pélvica (KONIG & LIEBICH, 2011; SIQUEIRA, 2014). São eles que alojam e protegem a medula óssea, sendo esta a formadora de células sanguíneas; participam da locomoção promovendo apoio aos músculos esqueléticos, e também constituem um sistema de alavanca que aumenta as forças geradas no momento da contração muscular (VALENTE, 2011). Os ossos também têm a função de armazenar cálcio, fosfato e outros íons, que são liberados de maneira controlada para que a concentração destes nos líquidos corporais seja constante (VALENTE, 2011).

Os ossos passam por processos contínuos de formação e danos, que podem ser caracterizados como um remodelamento. Este processo, tem os propósitos de reparação tecidual e preservação das concentrações séricas de íons como cálcio (Ca^{2+}), fosfato (Pi) e magnésio (Mg^{2+}), essenciais para diferentes funções do organismo (TORTORA, 2010; SIQUEIRA, 2014). Além de ser essencial para a homeostasia mineral do corpo, o tecido ósseo fornece em conjunto com a cartilagem, a estrutura que promove sustentação e proteção ao corpo.

A estrutura orgânica de tecido fibroso e células dos ossos permite que estes se tornem mais delgados e fracos com o desuso e para suportar maiores pesos, podem hipertrofiar. Os sais inorgânicos são os que conferem rigidez aos ossos e os tornam opacos às radiografias. (GETTY et al., 1975)

A principal divisão macroscópica dos ossos se dá por meio de duas classificações: osso compacto, sendo este mais denso e o osso esponjoso, mais frouxamente disposto (SIQUEIRA, 2014). O osso compacto ocupa a maior parte da massa esquelética, é mais espesso na porção média de ossos longos e mais adelgaçados nas extremidades (SIQUEIRA, 2014). A matriz óssea, apresentada em camadas, denominada lamelas e a substância intersticial calcificada são a principal composição do osso compacto e entre as lamelas, existem cavidades denominadas lacunas, sendo estas ocupadas pelas células ósseas ou osteócitos (GETTY et al., 1975).

O osso esponjoso ocupa a massa de ossos curtos e as extremidades de ossos longos, estendendo-se ao longo da diáfise, de formas variáveis. Estes são compostos por pequenas lâminas ósseas e espículas dispostas em diversas

direções e em determinados pontos podem até se cruzar. Esta disposição ocorre de acordo com as características mecânicas do osso em questão (SIQUEIRA, 2014).

A combinação do tecido ósseo compacto ou cortical e osso esponjoso ou trabecular faz com que este órgão seja leve , rígido, de alta força tênsil e não quebradiço (NG et al., 1997).

1.2.1 Problemas Ósseos no Envelhecimento

A perda da densidade mineral óssea (DMO) pode ser entendida como uma deterioração do tecido ósseo, este evento comum no envelhecimento causa patologias como a osteopenia (densidade óssea anormal) e a osteoporose. Há uma variedade de agentes farmacêuticos que têm sido recomendados para o tratamento da osteopenia e da osteoporose, incluindo a terapia de substituição hormonal (HOOLICK, et al., 2010), entretanto ainda é de extrema importância estudos que procurem efetividade na manutenção da densidade óssea, como o presente estudo, com a utilização da homeopatia.

A osteoporose e a osteopenia são doenças similares, a definição densitométrica que serviu para diferenciá-las foi instituída pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1994, que utilizou como critério o nível de lombar ou fêmur proximal de DMO-1,0 a 2,5 DP para osteopenia e para valores inferiores a 2,5 DP para osteoporose (AFONSO & PINHAL, 2015). Outra definição estabelecida pela OMS foi que osteoporose corresponde a uma doença metabólica sistêmica, onde há perda da massa óssea e da microarquitetura do tecido ósseo, na osteopenia por outro lado, há perda de massa óssea, porém não há perda da microarquitetura do tecido ósseo (AFONSO & PINHAL, 2015).

A osteoporose é a doença mais comum em se tratando do metabolismo ósseo (SIQUEIRA, 2014), é caracterizada por baixa densidade e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo que resulta em um osso com sua estrutura aparentemente normal, mas menos resistente a forças mecânicas (VALENTE, 2011) e a principal consequência da fragilidade óssea que esta doença desencadeia é a fratura patológica (SIQUEIRA, 2014), que ocorre principalmente no punho, vértebras e colo femoral (VALENTE, 2011).

Acredita-se que a perda óssea reflete um desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea, que estão relacionados a condições sistêmicas e locais associados a fatores raciais e genéticos, influência hormonal (ALONSO, 2015) e déficit de cálcio e vitamina D devido a dietas pobres em nutrientes, sedentarismo, pouca exposição ao sol, alcoolismo e tabagismo (SIQUEIRA, 2014).

A osteoporose se classifica em dois diferentes tipos: osteoporose primária do tipo I ou osteoporose pós-menopausa, associada à deficiência de estrógeno e acomete mulheres nos primeiros 10 anos após a menopausa. Já a osteoporose primária tipo II ou osteoporose senil acomete pessoas de idade avançada, afeta ossos compactos como o fêmur e quadril (SIQUEIRA, 2014) e nesta fase ocorre deficiência crônica de cálcio e aumento da atividade do paratormônio (PTH). A osteoporose secundária também pode acometer jovens, por ser consequência de processos inflamatórios, alterações endócrinas (VALENTE, 2011) e uso de medicamentos como corticóides e nesses casos a perda é mais lenta (SIQUEIRA, 2014).

A osteoporose reflete o processo de rarefação que caminha do osso normal até o osso mais poroso. Isto ocorre quando os osteoclastos criam uma cavidade tão profunda que não pode ser suficientemente preenchida pelos osteoblastos ou quando estes não conseguem preencher uma cavidade de reabsorção normal, o que caracteriza a osteoporose senil, que pode se agravar dependendo da presença e severidade das condições sistêmicas, locais e nutricionais (ALONSO, 2015).

A prevalência dessa doença aumentou em decorrência do crescimento da população idosa (SIQUEIRA, 2014). Calcula-se que cerca de 200 milhões de pessoas idosas em todo o mundo possuem osteoporose. Por esse motivo, a osteoporose tem sido considerada um problema de saúde pública. No Brasil, por outro lado, é pequeno o número de estudos sobre a prevalência desta doença (SIQUEIRA, 2014).

A prevenção e o tratamento da osteoporose têm como principal objetivo prevenir as fraturas patológicas. Todavia, complicações secundárias como dores crônicas e dificuldades para locomoção podem surgir, deixando os pacientes debilitados e em casos graves, levar a óbito (SIQUEIRA, 2014). Por isso, a prevenção da osteoporose e das fraturas relacionadas a ela é essencial para a qualidade de vida e bem estar, o que promove ao paciente independência durante o processo de envelhecimento (SIQUEIRA, 2014).

1.2.2 Densitometria Óssea

Os tecidos calcificados podem ser avaliados pelas imagens radiográficas utilizando a densidade radiográfica (densitometria). A determinação da mineralização óssea é de grande importância para se alcançar um diagnóstico efetivo e em alguns casos, chegar a um diagnóstico precoce, como, por exemplo, em indivíduos com osteoporose, que se descoberta de forma prévia, os riscos de fragilidade óssea e consequente fraturas patológicas são bem reduzidos (ALVES, STERMAN, 2010). O exame radiográfico possui funções variadas, sendo uma das principais, a análise do estado do tecido ósseo, a qual avalia a consistência óssea, ou sua arquitetura (normal ou com fratura) (FONZAR, 2010). Este também é importante para acompanhar a evolução do remodelamento e/ou reconstituição óssea, ao longo do tempo, entretanto, radiografias convencionais não analisam o reparo ósseo quantitativamente (FONZAR, 2010), pois em exames radiográficos simples, só se consegue visualizar lesões quando a perda mineral óssea foi superior a 30% e sua interpretação pode ser subjetiva (ALVES, STERMAN, 2010). Com a finalidade de adquirir novas informações qualitativas e quantitativas do tecido ósseo, pesquisadores e profissionais da saúde vêm buscando cada vez mais a densitometria óptica radiográfica (FONZAR, 2010), também conhecida como fotodensitometria, esta tem boa precisão e acurácia e seu custo é inferior às demais (LOUZADA, 2002).

Uma das razões que promoveu o ressurgimento dessa técnica foi o emprego de equipamentos digitalizados como o “scanner” e programas computacionais, que permitem o armazenamento, a recuperação e a obtenção rápida das imagens radiográficas (LOUZADA, 2002).

1.3 Ultradiluições / Homeopatia

A maioria dos tratamentos homeopáticos utiliza medicamentos altamente diluídos, o que gera controvérsias e críticas em muitos aspectos da ciência moderna. Porém, os efeitos biológicos obtidos em modelos experimentais são evidentes. Apesar disso, a simples demonstração dos efeitos biológicos da homeopatia representa apenas um primeiro passo para elucidação desses mecanismos

(WASSENHOVEN, 2007; BONAMIN, 2007; KOMISSARENKO, 2012; SANTANA, et al., 2014 a; SANTANA, et al., 2014b).

O tratamento homeopático desenvolvido por Samuel Hahnemann é baseado na premissa de que, se um produto em dose ponderal pode causar sintomas físicos e comportamentais em um indivíduo saudável, em doses ultradiluídas e sucucionadas, pode curar os mesmos sintomas em um indivíduo doente. Esse produto pode ser oriundo dos reinos mineral, vegetal ou animal, bem como de laboratórios biológicos, indústria químico-farmacêutica (VANDERLEI, 2010; SANTANA, et al., 2014 a; SANTANA, et al., 2014b).

Muitos medicamentos já têm seu efeito biológico comprovado através de estudos sérios, que geraram artigos publicados em revistas indexadas, como por exemplo, o efeito do *Rhus toxicodendron* na modulação inflamatória no caso de Artrite (FISHER e SCOTT, 2001; PATIL, et al., 2011). Tupe, et al. (2015) utilizou O *Syzygium jambolanum* (utilizado na clínica para Diabetes mellitus) in vitro, e constatou o poder do medicamento na proteção celular e na glicação, fato este muito importante no envelhecimento, teor do presente estudo. Nas intoxicações por aflatoxina, em modelo experimental com ratos, o medicamento homeopático *Tarentula cubensis* 6D, diminuiu os efeitos deletérios em parâmetros bioquímicos (KARABACAK, et al., 2015). Mutlu, et al. (2015) em pesquisa básica, em camundongos, alcançou resultados com o medicamento *Anaxim perator*que sugerem efeito anti-depressivo, ansiolítico e analgésico nos animais.

Mathie e Clausen (2015) realizaram uma meta-análise (estudo bibliométrico) dos artigos publicados na “Homeopathy” sobre tratamentos veterinários e concluiu a presença de 38 ensaios clínicos ou profiláticos, em 07 espécies e 27 condições médicas diferentes.

Na literatura a *Calcarea carbônica* é um medicamento indicado para patologias da infância e da senilidade, com prevenção do envelhecimento precoce (Demarque, et al., 2003). E a *Baryta muriática* também é utilizada na clinica para o mesmo fim, no caso dos idosos.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é avaliar a possibilidade de medicamentos homeopáticos melhorarem tarefas cognitivas e a densidade mineral óssea, prejudicadas no animal/humano idoso.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o quanto o medicamento homeopático pode ou não alterar o comportamento e a densidade óssea dos animais em questão.

Analisar se a *Calcarea carbônica* e a *Baryta muriática* são os medicamentos mais indicados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelos Animais

Modelos animais vêm sendo desenvolvidos na tentativa de reproduzir experimentalmente, fenômenos com características comparáveis às observadas em contexto humanos (SENGUPTA, 2013). Estes modelos, embora com limitações, são ferramentas que oferecem vantagens em relação às pesquisas com seres humanos. Experimento com roedores facilitam a observação no desenvolvimento do estudo , permitem manipulações específicas e controladas do ambiente (KREMER, 2007).

4.1.1 Animais

Foram utilizados 32 animais Wistar com 22 a 23 meses de idade provenientes do Biotério da Universidade de Santo Amaro (UNISA).

Todos os animais foram alojados em gaiolas com acesso *ad libitum* ao alimento e água, com ciclo de luz controlado 12:12 horas (7h/19h). Temperatura de 23 a 24° C.

Os medicamentos foram feitos segundo a Pharmacopéia Homeopática Brasileira. Os animais tomaram o medicamento ultradiluído na água de bebida *ad libitum*. Em cada bebedouro foram colocadas 5 gotas da medicação e agitado, os bebedouros foram trocados 2x na semana e o procedimento foi o mesmo.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (4/gaiola), sendo 8 animais por grupo:

1. *Grupo Calcarea carbônica* 30 cH;

2. Grupo *Baryta muriática* 30 cH;

3. Grupo Solução hidroalcoólica 10%;

4. Grupo Controle.

O experimento foi realizado em cego, e os medicamentos utilizados em código, somente revelados após a realização da estatística. Os animais foram pesados semanalmente e passaram pelo Campo Aberto (CA) no dia 1 do experimento, após 40 dias de medicação os animais passaram por testes comportamentais como o Campo Aberto (CA), Labirinto em “T” e reconhecimento de objetos. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA, seguido pelo Teste de Bartlett e Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni, sendo $p \leq 0,05$. (ZAR, 2010).

Os animais foram submetidos à eutanásia de forma recomendada pelo CONCEA (2013), por anestesia geral com Xilazina + Ketamina (IP) Na necropsia foi retirado o fêmur de cada animal.

Cálculo da anestesia para a Eutanásia: Misturar 1 mL de Ketamina 5% (50 mg/mL) + 1 mL de Xilazina 2% (20 mg/mL) (5 mg para cada 100 g ou 0,05 mg/g de peso de Ketamina e 2 mg para cada 100 g ou 0,02 mg/g de peso de Xilazina). Desta mistura considerar a dose 0,3 mL para cada 100 g de peso do rato, por via IP (Massone, 2008).

4.2 Avaliação da Atividade Geral em Campo Aberto (CA)

A atividade geral dos ratos foi observada em campo aberto. Neste teste os animais foram colocados em uma arena, sempre durante um mesmo período do dia.

Cada animal foi colocado individualmente no centro do aparelho de campo aberto, tendo sido observado por 3 minutos. O fundo deste aparelho é dividido em vinte e cinco partes aproximadamente iguais. Entre um animal e outro, o aparelho foi limpo com solução de álcool a 5% para evitar-se a interferência do odor do animal anterior. Foram observados frequência de locomoção, de levantar e o número de bolos fecais (defecação) (Figura 1).

Figura 1. Animal submetido ao Teste de Atividade Geral em Campo Aberto.

Fonte: o autor (2017).

4.3 Teste de Reconhecimento de Objetos

Foram submetidos à sessão de treino por 10 minutos na arena de campo aberto com dois objetos de tamanho e forma iguais. É cronometrado o tempo gasto explorando os objetos (Figura 2).

Figura 2. Animal submetido à primeira parte do teste de reconhecimento de objetos.

Fonte: o autor (2017).

Na sessão de teste, feita 90 minutos após, um dos objetos é trocado por outro diferente em forma, mas do mesmo tamanho (Figura 3). Os resultados dos tempos de exploração dos objetos são comparados e analisados por Teste estatístico ANOVA, seguido de Teste de Bonferroni.

Figura. 3. Animal submetido à segunda parte do teste de reconhecimento de objetos.

Fonte: o autor (2017).

4.4 Teste de Labirinto em “T”

O labirinto em T foi construído em madeira pintada de preto (tinta acrílica impermeável) com três braços formando um “T” (90° de inclinação). O labirinto em T foi elevado 65 cm do chão. Os braços com 10 cm de largura e as paredes com 30 cm de altura. Um dos braços contendo uma área de partida de 20 cm de comprimento, separado por uma parede removível da continuação do braço. O restante desse braço possuiu 45 cm de comprimento. Os outros dois braços (esquerdo e direito) foram os braços de escolha tendo 40 cm de comprimento cada (Figura 4). Os ratos foram colocados na área de partida do aparato e lá mantidos por 10 segundos. Nesse momento, a barreira foi erguida, permitindo que o animal explore o labirinto por mais 90 segundos. Inicialmente, cada rato passou por uma sessão de escolha forçada no labirinto, na qual o braço direito ficou bloqueado. Após 20–30 minutos, o rato passou por uma sessão de escolha livre, onde ambos os braços são abertos para a exploração. Após 4–5 h, o rato passou por outra sessão de escolha forçada, na qual o braço esquerdo estava bloqueado. Finalmente, após 20–30 min., o rato passou por outra sessão de escolha livre. As sessões de escolha forçada (com um dos braços obstruídos) objetivaram levar o animal para um determinado braço do aparato; nas sessões seguintes de livre escolha (com os dois braços livres), o animal tinha acesso aos dois braços do aparato, sendo as sessões de livre escolha o teste propriamente dito. Tanto as sessões de escolha forçada como livre tinham duração máxima de 90 segundos. Antes de cada sessão, o aparato foi lavado com uma solução de 5% álcool/água para eliminar possíveis interferências devido a pistas olfativas deixadas anteriormente por outros ratos.

Figura 4. Animal submetido ao Teste de Labirinto em “T”.

Fonte: o autor (2017)

4.5 Preparação do Fêmur

Após a retirada do fêmur, os mesmos foram armazenados, para que o presente estudo pudesse ser realizado.

4.6 Densitometria Óssea

Todas as amostras coletadas foram expostas a uma máquina de raio-x portátil (Nomad® Aribex, EUA) (Figura 5).

Figura.5: Nomad – Exposição ao Raio-X.

Fonte: Imagens fornecidas pela Dra. Maristela Dutra Corre Bonfim.

As imagens foram analisadas por um scanner digital indireto (SoredexDigora® Optime) (figura 6) com placas de fósforo foto estimuláveis (PSP). A densidade óptica foi determinada por números em uma escala de cinza 8 bits (0-255) e medida pelo programa Digora para Windows® (Soredex, Finlândia) em 13 pontos normalizados em 3 áreas do fêmur por dois observadores independente.

Figura. 6: Digora Optime.

Fonte: Imagens fornecidas pela Dra. Maristela Dutra Corre Bonfim.

Foi realizada análise estatística dos resultados, paramétricos (ANOVA, seguido de testes de comparação múltiplus) (ZAR, 2010). Sendo considerado significante $p \leq 0,05$. Para a locomoção foi realizado ANOVA, seguido do Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e para a densidade óssea, a normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene; a distribuição dos dados dentro de cada grupo foi normal ($p > 0,05$) a homogeneidade das variâncias foi respeitada ($p>0,05$).

5. RESULTADOS

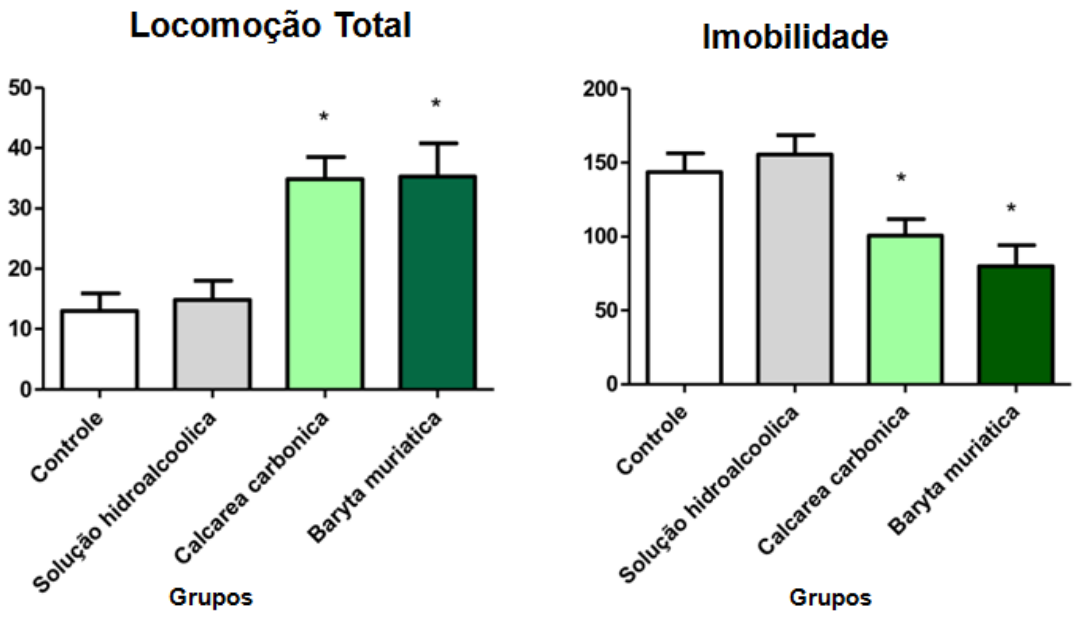
Quanto a análise comportamental em Campo Aberto e Teste de Aprendizado em Labirinto em T:

5.1 Campo Aberto

No Campo Aberto realizado no início do experimento antes dos animais serem medicados não houve diferença estatística, demonstrando que os grupos no inicio do experimento eram homogêneos. Após os 40 dias de medicação os animais voltaram a realizar o Campo aberto e obtivemos resultados diferentes entre os

grupos. A Locomoção total foi maior (p <0,05) no grupo Baryta muriática (35,3± 5,4 quadrantes) e no grupo *Calcarea carbônica* (34,8±3,6 quadrantes) em relação ao grupo controle (13,0±2,9) e grupo solução hidroalcoólica (14,8±3,1). Houve também diferença estatística na Imobilidade, onde os grupos *Calcarea carbônica* e *Baryta muriática* ficaram menos imóveis (100,5±11,3 e 79,8±14,22 segundos, respectivamente) em relação ao Controle e a Solução hidroalcoólica (143,6±12,5 e 155,4±13,1 segundos, respectivamente).

Figura 7. Os dados estão apresentados como médias ± erro padrão. Relativa à locomoção total e imobilidade. Uma maneira ANOVA seguido por teste de comparação múltipla de Bonferroni, * p <0,05- em relação ao grupo SH e Controle Branco.

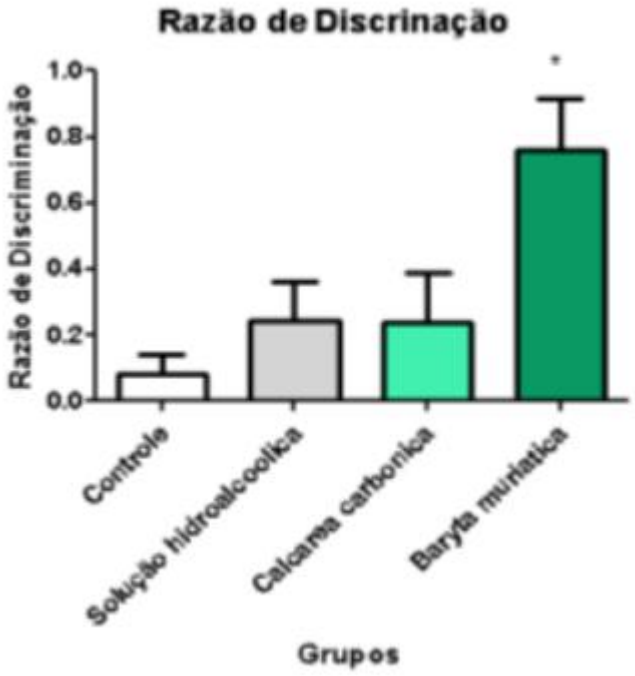


Fonte: o autor (2017).

5.2 Reconhecimento de Objetos

Em relação ao teste de Reconhecimento ou Discriminação de objetos, pode-se observar que o grupo dos animais que tomou *Baryta muriática* reconheceu mais um novo objeto do que o grupo controle e solução hidroalcoólica (p <0,05).

Figura 8. Os dados estão apresentados como médias ± erro padrão. ANOVA seguido por teste de comparação múltipla de Bonferroni, * p <0,05- em relação ao grupo Solução hidroalcoólica e controle Branco.

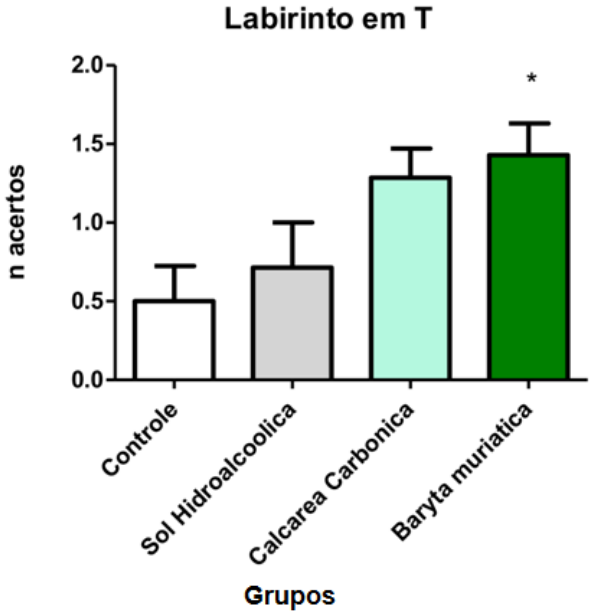


Fonte: o autor (2017).

5.3 Labirinto em “T”

Em relação ao teste de aprendizagem Labirinto em "T“, observamos um número maior (p <0,05) de acertos no grupo que tomou *Baryta muriática* (1,5±0,2 acertos) em relação ao Controle (0,5±0,2) e Solução hidroalcoólica.

Fig 9. Os dados estão apresentados como médias ± erro padrão. Em relação ao teste de aprendizagem Labirinto em "T“ . Uma maneira ANOVA seguido por teste de comparação múltipla de Bonferroni, * p <0,05- em relação ao grupo HS e controle Branco.

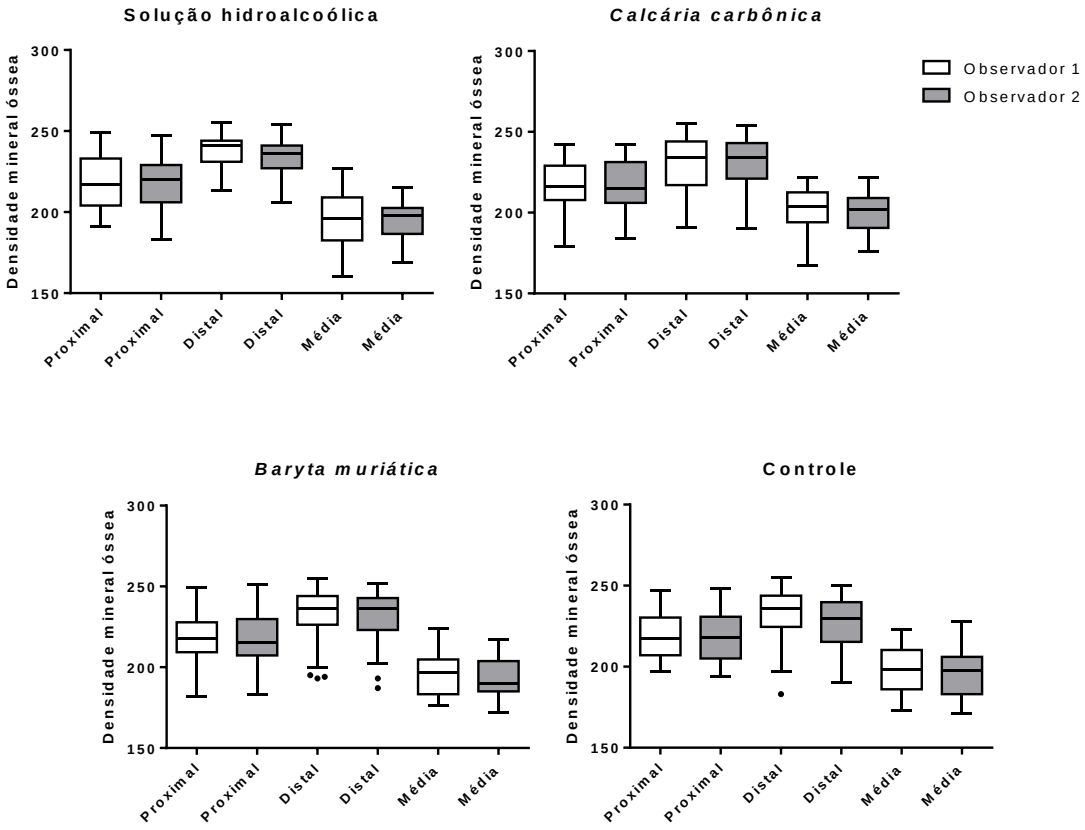


Fonte: o autor (2017).

5.4 Densidade Mineral Óssea

Testes t para amostras independentes foram conduzidos a fim de se avaliar se os registros de densidade mineral óssea variavam entre dois observadores independentes. Para todos os casos, não foram observadas diferenças entre os registros dos dois observadores (p > 0,05), conforme é possível evidenciar na Figura 11.

Figura. 10. Comparação dos registros de densidade mineral óssea entre dois observadores independentes.



Fonte: o autor (2017).

Uma ANOVA de uma via foi conduzida, de forma independente por região óssea, para se avaliar o efeito do tratamento sobre a densidade mineral óssea. Quanto aos pré-requisitos do teste, a existência de *outliers* foi avaliada pela análise gráfica de *box-plots*, a normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene. Os *outliers* identificados foram excluídos; a distribuição dos dados dentro de cada grupo foi normal ($p > 0,05$); a homogeneidade das variâncias foi respeitada ($p > 0,05$) (Tabela 1 e Figura 2). Uma vez que não houve diferenças entre os registros dos observadores, foram utilizados apenas os dados obtidos para o observador 1.

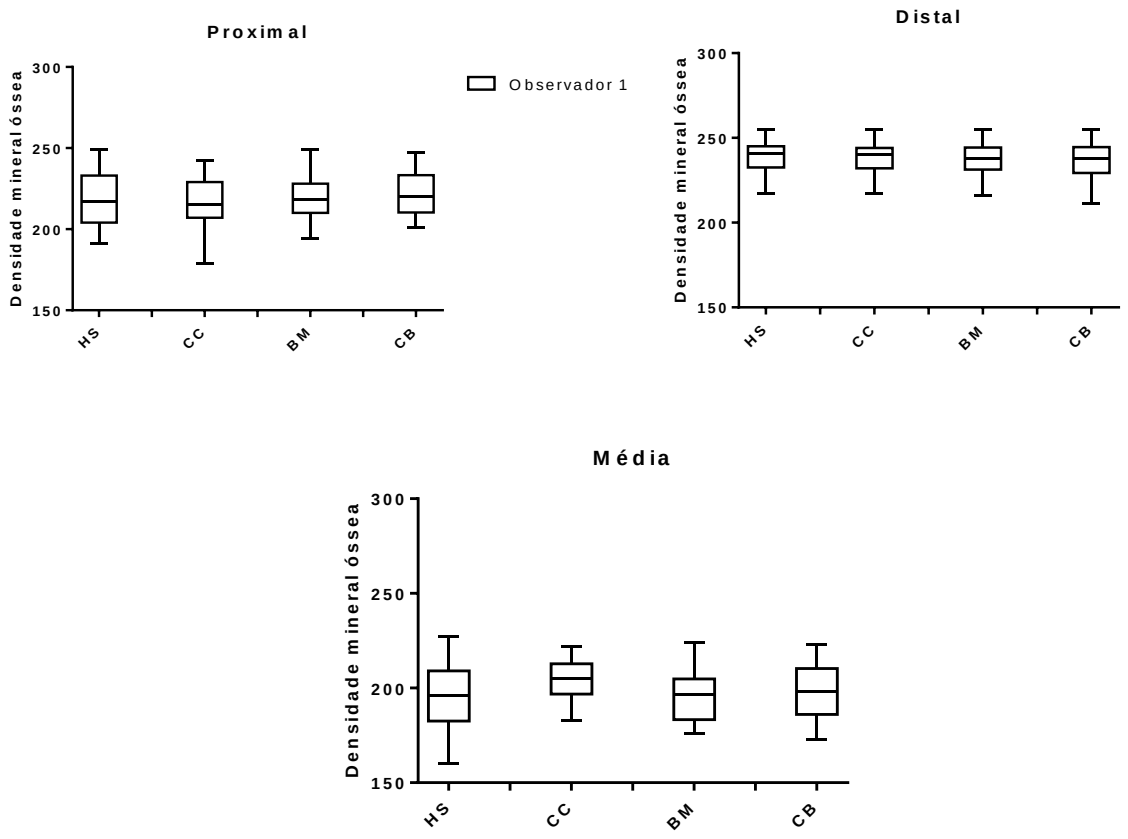
Tabela 1. Análise descritiva da densidade mineral óssea por tratamento e região.

				IC95%			
Grupo	**Região**	**Média**	**DP**	**Inferior**	**Superior**	**N**	**SW**
SH	**Proximal**	217,60	15,96	212,57	222,63	35	0,395
CC	**Proximal**	215,29	15,82	210,26	220,31	35	0,283
BM	**Proximal**	219,72	14,10	214,95	224,48	39	0,707
CB	**Proximal**	221,53	14,35	216,57	226,48	36	0,060
SH	**Distal**	238,70	9,06	235,38	242,01	33	0,242
CC	**Distal**	238,59	9,33	234,93	242,26	27	0,715
BM	**Distal**	238,32	9,19	235,06	241,59	34	0,740
CB	**Distal**	236,98	10,73	233,21	239,74	34	0,520
SH	**Média**	195,90	16,77	189,93	201,88	21	0,938
CC	**Média**	204,45	10,29	198,33	210,57	20	0,686
BM	**Média**	195,25	12,54	189,66	200,84	24	0,420
CB	**Média**	197,75	14,51	192,16	203,34	24	0,605

Fonte: o autor (2017).

DP: desvio padrão; *IC95%*: intervalo de confiança de 95% para a média; *SW*: os valores de p obtidos no teste de normalidade Shapiro-Wilk. Grupos: SH – Solução hidroalcoólica; CC – *Calcária carbônica*; BM – *Baryta muriática*; CB – Controle. Valores apresentados referem-se aos registros do Observador 1. Não foram evidenciadas diferenças entre os registros dos dois observadores.

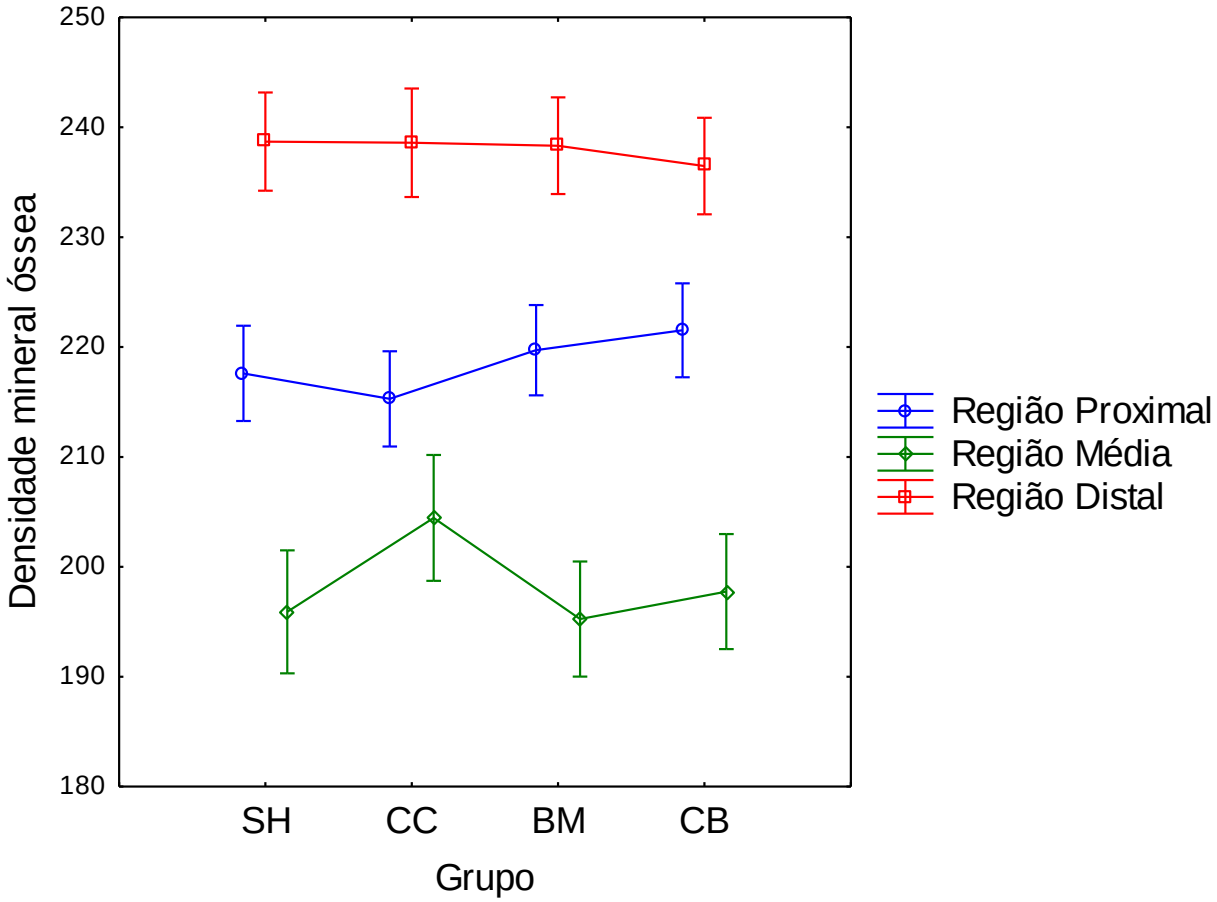
Figura 11. Avaliação do efeito do tratamento sobre a densidade mineral óssea.



Fonte: o autor (2017).

Não foram observadas diferenças significativas. Grupos: SH – Solução hidroalcoólica; CC – *Calcária carbônica*; BM – *Baryta muriática*; CB – Controle

Figura 12. Avaliação do efeito do tratamento e da região sobre a densidade mineral óssea. Grupos: SH – Solução hidroalcoólica; CC – Calcária carbônica; BM – Baryta muriática; CB – Controle.



Fonte: o autor (2017).

5.5 Avaliação de Possível Efeito de Interação Entre Tratamento e Região

Uma ANOVA de duas vias foi conduzida para se avaliar o efeito do tratamento e da região sobre a densidade mineral óssea. Quanto aos pré-requisitos do teste, a existência de outliers foi avaliada pela análise gráfica de box-plots, a normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene. Os outliers identificados foram excluídos; a distribuição dos dados dentro de cada grupo foi normal ($p > 0,05$); a homogeneidade das variâncias

foi respeitada ($p > 0,05$). Uma vez que não houve diferenças entre os registros dos observadores, foram utilizados apenas os dados obtidos para o observador 1.

Não foi observado efeito significativo da interação entre tratamento e região sobre a densidade mineral óssea ($F (6,350) = 1,883$, $p = 0,083$, $\eta 2$ parcial = 0,031). Entretanto, ao se avaliar o efeito principal do fator região, diferenças na densidade mineral óssea foram observadas ($F (2,350) = 243,86$, $p < 0,001$, $\eta 2$ parcial = 0,582). Em outras palavras, a densidade mineral óssea foi maior na região distal, independentemente do tratamento, seguida da região proximal; a região média foi a que apresentou os menores valores de densidade mineral óssea (Figura 13).

Ainda que não tenham sido observadas diferenças entre os tratamentos na região média ($p = 0,128$), tampouco um efeito de interação entre tratamento e região tenha sido observado ($p = 0,083$), nota-se que o tratamento com *Calcária carbônica* foi o que apresentou maior elevação da média da densidade mineral óssea nessa região (média = 204,45, IC 95% = 198,33; 210,57, N = 20 observações, 2 por osso) (linha verde da Figura 3, grupo CC). Não foram observados perfis semelhantes nas demais regiões ósseas (vide demais linhas da Figura 13). Talvez um estudo com maior número amostral de observações na região média do osso poderia detectar algum efeito sutil deste tratamento.

6. DISCUSSÃO

Modelos animais como ratos e camundongos são muito utilizados para estudar envelhecimento humano, trazendo como grande vantagem seu curto período de vida, fornecendo resultados mais rapidamente (MAGALHÃES, 2006). Os animais do presente estudo, com 22 a 23 meses já são considerados animais idosos, por viverem em condições de biotério, e ser a idade normalmente utilizada para experimentos de senilidade (VALENTE, 2011).

Com o passar do tempo, inúmeros modelos animais foram criados e padronizados para avaliar experimentalmente a ansiedade em humanos. Apesar de não ser possível afirmar que animais apresentem as mesmas sensações subjetivas

de ansiedade que os seres humanos, acredita-se que haja uma similaridade muito grande entre as espécies em relação aos mecanismos neurais e funções comportamentais subjacentes a essa emoção, desde a percepção de situações sinalizadoras de um perigo em potencial até a organização das reações de defesa (CRUZ, 2012).

Dentre as funções psicológicas humanas estudadas por meio de modelos experimentais, a ansiedade é a mais estudada atualmente (CRUZ, 2012). A partir destes modelos animais é possível desenvolver novas drogas ansiolíticas, promover avaliação fisiológica do mecanismo de ação dessas drogas, por meio do teste empírico de hipóteses comportamentais e fisiopatológicas (CRUZ, 2012).

No inicio do experimento não houve diferença estatística entre os grupos no CA, demonstrando uniformidade entre os animais, após a medicação ao passar pelo CA, foi observado um aumento dos quadrantes andados ($p \leq 0.05$) na locomoção total e uma diminuição da imobilização dos grupos que tomaram *Calcarea carbônica* e *Baryta muriática* ($p \leq 0.05$) em comparação com os grupos Controle branco e Solução Hidroalcoólica, demonstrando uma melhor disposição dos idosos medicados. Com o passar do tempo, o indivíduo idoso começa a apresentar aspectos próprios que caracterizam a diminuição da capacidade funcional de seu organismo, portanto encontrar medicamentos que possam auxiliar e reverter quadros na senilidade é muito importante, outros experimentos foram realizados neste sentido, como, por exemplo, o estudo de Cruz et al (2010) que utilizou o Extrato de Ginkgo biloba em ratos e conseguiu uma melhora da atividade motora e uma diminuição da imobilidade no Campo Aberto.

É sabido que o envelhecimento acelera processos neurodegenerativos (VALENTE, 2011), levando a disfunções cognitivas, porém no Teste do Labirinto em “T” demonstrou-se um maior número de acertos do braço correto no grupo que tomou *Baryta muriática* 30 cH, que portanto auxiliou na melhora da memória dos idosos.

Quando baseada nos parâmetros da Organização Mundial de Saúde, a densitometria óssea é a método diagnóstico padrão da osteoporose (VALENTE, 2011). Contudo, o resultado pode variar de acordo com a metodologia utilizada, com a parte do esqueleto analisada e com a composição corporal do paciente

(SAARELAINEN et al., 2007). Para a confirmação de osteoporose em um indivíduo, este deve apresentar DMO 2,5 desvios-padrão abaixo da média considerada normal (*T-score* < -2,5). *T-score* entre -1 e -2,5 caracteriza clinicamente a osteopenia (FERRETTI et al., 2003). A doença é classificada histomorfometricamente quando a perda óssea é maior que 11% (ALEXANDRE, 2005).

Não foram observados efeitos significativos do tratamento sobre a densidade mineral óssea na região proximal ($F(3,141) = 1,143$, $p = 0,334$, $\eta 2parcial = 0,024$), distal ($F(3,124) = 0,391$, $p = 0,760$, $\eta 2parcial = 0,009$), e média ($F(3,85) = 1,945$, $p = 0,128$, $\eta 2parcial = 0,064$) com os medicamentos *Calcarea carbônica* e *Baryta muriática*, resultado diferente do obtido por Canello et al. (2016) que verificou que preparações homeopáticas com tropismo do tecido ósseo podem melhorar significativamente a mineralização óssea, eles observaram frangos idosos, com um aumento de 30%, 36% e 63% da mineralização com os tratamentos com *S. officinalis* (9CH), *Tricalcarea* (4CH) (*P <0,05) e Calcarea *carbônica* (30CH) (***P <0,001), respectivamente, em um período de tratamento de 2 anos, e neste caso, levanta-se a hipótese de que 40 dias de tratamento dos ratos pode não ter sido o suficiente para uma diferença significativa.

7. CONCLUSÃO

Os medicamentos foram capazes de aumentar a locomoção dos animais mesmo sem alteração na densidade óssea e a *Baryta muriática* agiu na melhora cognitiva dos animais em comparação aos outros grupos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFONSO, A. A.; PINHAL, P. J. Densitometria Óssea e sua Relação Diagnóstica com a Osteopenia e a Osteoporose. IX Mostra de Trabalhos Acadêmicos, III Jornada de Iniciação Científica, Santos, São Paulo, Outubro, 2015.

2. ALEXANDRE, C. Androgens and bone metabolism. Joint Bone Spine, v.72, p.202-206, 2005.

3. ALONSO, M. B. C. Avaliação da Densidade Mineral Óssea, Conteúdo Mineral Ósseo e Níveis Séricos de Cálcio, Fósforo e Magnésio em Ratos Submetidos à Dieta Diária de Café e Refrigerantes à Base de Cola e Guaraná. Universidade Estadual de Campinas e Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, 2015

4. ALVES, J. D. S., STERMAN, F. A. Determinação da densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio de cães da raça Rottweiler, por meio da densitometria óptica radiográfica. Vet. e Zootec. .17(2): 229-237. Junho. 2010.

5. BONAMIN, L. V. Dados experimentais que fundamentam teorias interpretativas sobre ultradiluições. Tributo a Madeleine Bastide. Cultura homeopática, São Paulo, n. 21, p. 29-35, Out-Nov-Dez. 2007.

6. *CRUZ, A. P. M. FERNANDEZ, J. L.* Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotonérgicas, 2012.

7. CRUZ, J. G. P. et al. Efeitos da administração crônica de etanol sobre a aprendizagem no reconhecimento de objetos em camundongos nadadores. Dynamis Revista Tecno-científica. n 2. Vol. 15, 26-31. 2009.

8. DEMARQUE D, JOUANNY J, POITEVIN B, SAINT-JAINT Y. Farmacologia e Matéria Médica Homeopática. 3ª Edição. França: Organon, 2003.

9. ENGELKE, D. S. et al. Tarefa de Reconhecimento de Objetos: Uma Análise para Memória de Longa Duração. Salão de Iniciação Científica. UFRGS. Livro de resumos. Porto Alegre. 2007.

10. FISHER, P..; SCOTT, D.L. A randomized controlled trial of homeopathy in rheumatoid arthritis. Rheumatology; 40: 1052-1055. 2001.

11. FONZAR, J. F. Avaliação Qualitativa e Quantitativa do Reparo Ósseo por Imagens Procesadas pelos Programas “ImageJ” e “ODR”. Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”. Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária. Araçatuba. 2010.

12. GERLAI, R. A new continuous alternation task in T-maze detects hippocampal dysfunction in mice A strain comparison and lesion study. *Beha6ioural Brain Research.* Elsevier Science B.V. Vol. 95. Pg 91-101. September. 1998.

13. GETTY, Robert, SISSON, Septimus; GROSSMAN, James Daniels. Sisson/Grossman anatomia dos animaisdomésticos. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1 v. p. 19-22. 1975.

14. HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination asmeasures of individual differences in emotionality. J Comp Psychol.18:385-403. 1934.

15. HALL, C.S. Emotional behavior in the rat III. The relationship betweenemotionality and ambulatory activity. J Comp Psychol.22:345.1936.

16. HENRY, J.D., CRAWFORD, J. R., PHIILLIPS, L. H. Verbal fluency performance in dementia of the Alzheimer´s type: a meta-analysis. Neuropsychologia. 42:1212-22. 2004.

17. HOOLICK, M.F., KARAGUZEL, G. Diagnosis and treatment of osteopenia. Rev EndrocrMetabDisord, 11, pp 237-251, 2010.

18. KARABACAK, M.; ERASLAN, G.; KANBUR, M.; SARICA, Z.S. Effects of

Tarantula cubensis D6 on aflatoxin-induced injury in biochemical parameters in rats. Homeopathy, 104, 205-210, 2015.

19. KOMISSARENKO, A. A. New stage of scientific understanding of homeopathic phenomenon.InternationalJournalof High DilutionResearch, vol. 11, no. 40, p. 120-121, 2012.

20. KÖNIG, H.E., LIEBICH, H.G. Anatomia dos Animais Domésticos. Sistema Locomotor. Texto e Atlas Colorido. Porto Alegre. Artmed. p. 28-37. 2004.

21. KREMER, R. Efeitos da separação materna e do alcoolismo no testículo de ratos UChA e UChB (bebedores voluntários de etanol a 10%). 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada). Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP). Botucatu, SP, 2007.

22. LETIEMBRE, M. et al. Innate immune receptor expression in normal brain aging.Neuroscience, New York, v. 146, n. 1, p. 248-254, 2007.

23. LOUZADA, M. J. Q. Densitometria óptica radiográfica na mensuração da densidade mineral óssea de coelhos em crescimento. *Radiographicabsorptiometry for measuringbone mineral density in growingrabbits.* ArsVeterinaria, Jaboticabal, SP, Vol. 18, nº 2, 107-110, 2002.

24. LUKIW, W. J. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus.Neuroreport, Oxford, v. 18, p. 297-300, 2007.

25. MAGALHÃES, J. P. Species Selection in Comparative Studies of Aging and Antiaging Research. In: CONN, P. M. (Ed.). Handbook of Models for Human Aging. NewYork: Academic Press, p.9-20. 2006.

26. MATHIE, R.T.; CLAUSEN, J. Veterinary homeopathy: meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. Homeopathy, 104: 3-8, 2015.

27. MUNIZ, C. F., ARNAUT, A. C., YOSHIDA, M. et al. Caracterização dos Idosos com Fratura de Fêmur Proximal Atendidos em Hospital Escola Público. Revista Espaço para a Saúde, Londrina, v.8, n.2, p.33-38, jun. 2007.

28. MUTLU, O.; ULAK, G.; KOKTURK, S.; CELIKYURT, I.K.; AKAR, F.; ERDEN, F. Effects of homeopathic Anaximperatoronbehavioural and pain models in mice. Homeopathy, 104, 15-23, 2015.

29. NEVES, M. D. Avaliação da Memória em Camundongos Pré-condicionados com N-metil-d-aspartato e Submetidos ao Modelo de Traumatismo Crânio-encefálico. curso de Fisioterapia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC. Criúma, Junho, 2010.

30. NG, K. W.; ROMAS, E.; DONNAN, L.; FINDLAY, D. M. Bone Biology.Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism, v.11, p.1-22. 1997.

31. OLIANI, M. M. et al. *Locomotion and Cognitive Performance of Institutionalized Elderly People with Dementi.* Fisioterapia em Movimento, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 109-114, jan./mar. 2007.

32. PATIL CR, RAMBHADE AD, JADHAV RB.; PATIL, K.R.; DUBEY, V.K.; SONARA, B.M.; TOSHNIWAL, S.S. Modulation of arthritis in rats by Toxicodendronpubescens and its homeopathic dilutions. Homeopathy; 100: 131e137. 2011.

33. RIGUETTI, M. Aims of homeopathy research, 1994 and 2015.Homeopathy 104, 343-344, 2015.

34. SAARELAINEN, J.; RIKKONEN, T.; HONKANEN, R.; KRÖGER, H.; TUPPURAINEN, M. Is discordance in bone measurementes affected by body composition or anthopometry? A comparative study between peripheral and central devices. Journal of Clinical Densitometry, v.10, n.3, p.312-318, 2007.

35. SANTANA, F.R.; COELHO, C.P.; CARDOSO, T.N.; LAURENTI, M.D.; HURTADO, E.C.P.; BONAMIN, L.V. Modulation of inflammation response to murine cutaneous Leishmaniosis by homeopathic medicines: Thymulin 5cH.Homeopathy,Volume 103, Issue 4, p. 275–284. 2014a.

36. SANTANA, F.R.; COELHO, C.P.; CARDOSO, T.N.; LAURENTI, M.D.; HURTADO, E.C.P.; BONAMIN, L.V. Modulation of inflammation response to murine cutaneous Leishmaniasis by homeopathic medicines: *Antimoniumcrudum* 30cH. Homeopathy vol. 103, p.264- 274. 2014b.

37. SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. International Journal of Preventive Medicine, v. 4, n. 6, p. 624–630, June 2013.

38. SIQUEIRA, D. Osteoporose: uma Análise ultraestrutural do tecido ósseo em camundongos c57 e Apo EKO ovariotectomizados.– Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

39. SPARROW, WA, Tirosh O. Gait termination: a review of experimental methods and the effects of ageingand gait pathologies. Gait & Posture, 22:361-71. 2005.

40. SUTOO, D, AKIYAMA K. Regulation of brain function by exercise. Neurobiology of Disease. 13:1-14, 2003.

41. TORTORA, G.I. Princípios de Anatomia e Fisiologia, 12 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2010.

42. TUPE, R.S. et al. *Syzygium jambolanum* and *Cephalandra indica* homeopathic preparations inhibit albumin glycation and protect erythrocytes: an in vitro study. Homeopathy, 104, 197-204, 2015.

43. VALENTE, F. L. Estresse, Envelhecimento e Osteoporose. Estudo Experimental da Perda Óssea, da Expressão de Citocinas Pró-inflamatórias e

dos Marcadores Ósseos, Rank e OPG, em Ratos. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2011.

44. VANDERLEI, C. E. D. A homeopatia numa perspectiva sistêmica – contribuições da saúde para o desenvolvimento local sustentável. 2010. 175 p. Dissertação (Mestrado Gestão em Desenvolvimento Local Sustentável). Faculdade de Ciências da Administração de Pernambuco, Universidade de Pernambuco. Recife, PE, 2010.

45. WALSH, R. N., CUMMIM, R. K.The open-field test - A critical review. Psvcholoeical Bulletin'. 83: 482-504, 1976.

46. WASSENHOVEN, M. V. Evidence of effectiveness of homeopathy. Cultura Homeopática, São Paulo, v. 20, p. 27-31, 2007.

47. ZAGO, A. S., GOBBI, S. Valores normativos da aptidão funcional de mulheres de 60 a 70 anos. Revista Brasileira de Ciência e Movimento. 11:77-86, 2003.

48. ZAR, J. H. Biostatistical analysis. 5 ed. Upper Saddle River: Prentice Hall. P. 944. 2010.

ANEXO 1

Certificado de Apresentação Oral no 8º Congresso de Homeopatia Veterinária

Londrina - PR

8º Congresso Brasileiro de Homeopatia Veterinária

I Simpósio Brasileiro de Homeopatia na Agricultura

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS QUE O TRABALHO

A HOMEOPATIA COMO FERRAMENTA NA SENESCÊNCIA/SENILIDADE: MODELO EXPERIMENTAL.

foi apresentado na modalidade APRESENTAÇÃO ORAL durante o 8º CONGRESSO BRASILEIRO DE HOMEOPATIA VETERINÁRIA e 1º SIMPÓSIO BRASILEIRO DE HOMEOPATIA NA AGRICULTURA, realizado no período de 23 a 26 de novembro de 2017, em Londrina (PR), tendo como autores

Arrifano V., Motta L.C.A.S., Bernardi M.M., Bonfim M.D.C., Peres G.B.,Coelho C.P.

Londrina, 26 de novembro de 2017

REALIZAÇÃO

AMVHB

DRA. MONICA F. A. SOUZA
Presidente da AMVHB

DRA. PAULA ANDRESSA PENACCHI SALVI
Presidente 8º Congresso Brasileiro de Homeopatia Veterinária