RAFAEL AUGUSTO BURIM

**Avaliação da reparação de defeitos ósseos críticos na calvária de ratos Wistar
sob ação sistêmica de Icarin: estudo radiográfico,
histomorfológico e histomorfométrico**

São Paulo

2013

RAFAEL AUGUSTO BURIM

**Avaliação da reparação de defeitos ósseos críticos na calvária de ratos Wistar
sob ação sistêmica de Icariin: estudo radiográfico,
histomorfológico e histomorfométrico**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientador: Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni.

São Paulo

2013

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

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Burim, Rafael Augusto.

Avaliação da reparação de defeitos ósseos críticos na calvária de ratos Wistar sob ação sistêmica de Icariin: estudo radiográfico, histomorfológico e histomorfométrico / Rafael Augusto Burim; orientador Maria Cristina Zindel Deboni. -- São Paulo, 2013.

69 p.: fig., tab., 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco - Maxilofaciais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Reparo ósseo. 2. Mandíbula - Reconstrução. 3. Cirurgia Bucomaxilofacial. 4. Formação óssea de animal. 5. Osso e ossos. I. Deboni, Maria Cristina Zindel. II. Título.

Burim RA. Avaliação da reparação de defeitos ósseos críticos na calvária de ratos Wistar sob ação sistêmica de Icarin: estudo radiográfico, histomorfológico e histomorfométrico. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: ____/____/2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____ Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____ Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____ Instituição: _____
Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À minha esposa Andréa Tieme Cabral de Mello Burim, por todo apoio, carinho, companheirismo e compreensão dedicados a mim e à minha carreira desde os tempos de residência no HCFMUSP, e por proporcionar momentos inesquecíveis em nossas vidas, todos os dias.

À minha mãe Rachel Maria Vesco Burim, exemplo de garra, determinação e amor à família e ao meu pai Ayrton Aparecido Burim, homem de caráter, sempre muito dedicado a mim, em todos os momentos.

Aos meus avós maternos Therezinha Cagnacci Vesco e José Mario Vesco por todo apoio durante a minha formação profissional e por me ensinar o verdadeiro sentido da palavra “família”.

Aos meus avós paternos Yolanda Sivieri Burim e Ângelo Burim (*in memoriam*) por todos os momentos vividos juntos e pelo amor e carinho sempre demonstrados a mim e à minha família.

À sra. Zelinda Satsiko Cabral de Mello e ao sr. Oscar Cabral de Mello Júnior por todo apoio e confiança em mim depositados e por me receberem em sua família.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni pela orientação na realização desta pesquisa, pela amizade e pela dedicação exemplar na formação dos alunos de graduação e pós-graduação da Faculdade de Odontologia da USP.

À Profa. Dra. Maria da Graça Naclério-Homem pela constante presença e liderança junto aos alunos de pós-graduação.

À Profa. Dra. Luciana Corrêa do departamento de Patologia da FOU SP pelo auxílio na leitura e interpretação das lâminas histológicas.

Ao departamento de Radiologia Odontológica da FOU SP por permitir a obtenção das radiografias desta pesquisa.

Aos colegas de pós-graduação Daniel Falbo Martins de Souza e Daniel Sendyk pela confiança, amizade, pelos bons momentos vividos ao longo do curso e, pelo auxílio na realização de diversas etapas deste trabalho, fossem elas fáceis ou difíceis.

À Sra. Neide Mascarenhas pela ajuda e comprometimento com a manipulação dos animais durante os procedimentos experimentais.

Aos demais colegas de pós-graduação: Julio, Cris, Gabriel, Ana Carolina e Alexandre pela amizade e companheirismo ao longo do curso e por proporcionarem ao curso de pós-graduação uma oportunidade única de troca de conhecimentos e experiência profissional.

A todos os docentes da disciplina de Cirurgia e traumatologia Bucomaxilofacial da FOUSP pelo convívio e pelos ensinamentos transmitidos ao longo do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado e, dessa forma, contribuir com a realização desta pesquisa.

À bibliotecária Glauce pela revisão e auxílio na estruturação do texto.

À instituição Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo por proporcionar um curso de excelência em pós-graduação.

“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta.”

Chico Xavier

RESUMO

Burim RA. Avaliação da reparação de defeitos ósseos críticos na calvária de ratos Wistar sob ação sistêmica de Icariin: estudo radiográfico, histomorfológico e histomorfométrico [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão original.

A reconstrução de defeitos ósseos críticos é alvo de inúmeras pesquisas em cirurgia bucomaxilofacial. Tais pesquisas visam, de maneira geral, a otimização da neoformação óssea e a eliminação dos procedimentos de remoção de osso autógeno para reconstrução. Os modelos animais têm sido a metodologia mais utilizada para avaliar a eficácia de novas substâncias e biomateriais na reparação óssea. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência de um flavonóide, o icariin, na reparação óssea de defeitos críticos confeccionados na calvária de ratos Wistar. Um defeito ósseo crítico circular foi confeccionado em 40 calvarias de ratos por meio de uma broca trefina de 8 mm de diâmetro sob irrigação salina constante. Ao final dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram divididos, aleatoriamente, em grupo teste (n=20), que recebeu o icariin, na dose de 125 mg/kg de peso e grupo controle (n=20), que recebeu soro fisiológico. Ambas as substâncias foram administradas por meio de gavagem até o dia da eutanásia. Ao final de cada período observacional de 7, 14, 21 e 42 dias, 5 animais de cada grupo foram eutanasiados e as amostras da calvária foram removidas e mantidas em formol 10% por 48 horas. As calvárias foram radiografadas e, após descalcificação, foram submetidas à avaliação histológica com coloração hematoxilina-eosina sob microscópio de luz. Os defeitos foram analisados considerando a diminuição da área do defeito na imagem radiográfica, as características de reparo ósseo e a osteogênese na região da ferida. Os resultados da análise radiográfica mostraram que a área do defeito ósseo no grupo teste foi significativamente menor que no grupo controle em todos os períodos observacionais. A avaliação histológica mostrou um aumento na neoformação óssea do grupo teste ($p=0,02$). A histomorfometria demonstrou osteogênese significativa no grupo teste com 7 dias ($p=0,021$), 14 dias ($p=0,014$), 21 dias ($p=0,021$) e 42 dias ($p=0,009$). Foi possível concluir que o icariin sistêmico induziu uma maior neoformação óssea em defeitos críticos.

Palavras-chave: Cicatrização. Regeneração óssea. Ratos Wistar. Calvaria. *Epimedium*.

ABSTRACT

Burim RA. Evaluation of calvaria critical size defects healing in Wistar rats induced by systemic Icariin: a radiographic, histomorphologic and histomorphometric study [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão original.

Bone critical defect reconstruction is an important target in current oral surgery research. Contemporary research has been searching for osteogenesis optimization to minimize the necessity of using autogenous bone grafts procedures. Animal models have been the widespread methodology to evaluate the effect of different new substances and biomaterials in bone healing. The aim of this study was to assess the influence of systemic daily flavonoid, icariin, in the repair of calvaria critical size defects induced in Wistar rats. A round critical size defect was performed centrally in 40 rat's calvaria using an 8mm trephine under sterile saline solution irrigation. After surgery, half the animals, randomly, received by gavage daily doses of 125mg/Kg-icariin (Test Group) till the euthanasia. The other half (Control Group) received the same volume of saline solution. Five animals of each group were euthanized after 7, 14, 21 and 42 days postoperatively. The rats' calvaria were removed, fixed in 10% formalin for 48 hours. Calvarias were X-rayed and after decalcification they underwent histological examination with hematoxylin eosin stain under a light microscope. Defects were analyzed considering area diminishing in X-ray image, bone healing characteristics and osteogenesis in the defect region. Results showed that bone defect area in Test Group was significant smaller in all observational periods. Histological evaluation showed an increased expression in bone trabeculae neoformation in Test Group ($p=0,02$). Histomorphometry demonstrated significant osteogenesis in Test Group at 7 days ($p=0,021$), 14 days ($p=0,014$), 21 days ($p=0,021$) and 42 days ($p=0,009$). It was concluded that systemic icariin induced a more expressive bone healing in critical size defects in rats.

Keywords: Wound healing. Bone regeneration. Wistar rat. Calvaria. *Epimedium*

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Cirurgia Experimental: acesso à calvária do animal e osteotomia com broca trefina de 8 mm de diâmetro (A). Remoção do fragmento ósseo e obtenção do defeito ósseo crítico (B).....	36
Figura 4.2 – Frascos contendo o Icariin, preparados pela Farmácia de Manipulação Unipharmus®.....	37
Figura 4.3 – Sonda de gavagem utilizada para medicar os animais com icariin em seu conteúdo.....	38
Figura 4.4 – Administração do icariin ao rato com auxílio da sonda de gavagem.....	39
Figura 4.5 – Padronização da posição do aparelho radiográfico para realização das radiografias.....	40
Figura 4.6 – Amostra posicionada para realização da radiografia.....	40
Figura 4.7 – Esquema ilustrativo da demarcação do osso neoformado para mensuração da área no software ImageLab2000®.....	43
Figura 5.1 – Radiografia das amostras do grupo Controle (acima) e do grupo Teste (abaixo), com os respectivos períodos de observação.....	45
Figura 5.2 – Radiografia das amostras do grupo Controle (acima) e do grupo Teste (abaixo), com os respectivos períodos de observação.....	45
Figura 5.3 – Aspectos histológicos do reparo do defeito ósseo.....	50
Figura 5.4 – Gráfico das médias das áreas de neoformação óssea.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Distribuição da amostra final nos grupos e períodos experimentais.....	44
Tabela 5.2 – Distribuição dos valores médios $\pm$ desvio-padrão da área radiográfica dos defeitos ósseos comparativamente entre grupos e períodos.....	46
Tabela 5.3 – Distribuição dos valores médios $\pm$ desvio-padrão da área radiográfica dos defeitos ósseos no grupo comparativamente entre os períodos....	46
Tabela 5.4 – Descrição dos aspectos da histomorfologia considerando as variáveis do reparo segundo os grupos e períodos.....	49
Tabela 5.5 – Dados descritivos em média $\pm$ desvio padrão quanto a área de neoformação óssea e comparativamente entre os grupos teste e controle (intergrupos) para cada período de observação.....	51
Tabela 5.6 – Dados descritivos em média $\pm$ desvio padrão da mensuração da área de neoformação óssea (mm^2), comparativamente entre os períodos (intragrupos) para cada grupo experimental.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Micrômetro
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
Cbfa1	<i>Core binding factor A1</i>
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DFDBA	Enxerto ósseo alógeno desmineralizado congelado
g	grama
ICB-USP	Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
MAPKs	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
Mg	Miligrama
mm	milímetro
NF-κB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
Kg	Kilograma
OPG	Osteoprotegerina
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE	Prostaglandina E
PGF2α	Fator prostaglandina α2
RANKL	<i>receptor activator of NF-κB ligand</i>
rhBMP-2	Proteína morfogenética óssea recombinante humana
Runx2	<i>runt-related transcription factor 2</i>
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório
TGF-β	Fator de Crescimento Beta Transformante.

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento (porcentagem)
>	Maior que
<	Menor que
=	Igual a
≤	menor ou igual a

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISTA DA LITERATURA	17
2.1 O osso e a reparação tecidual óssea.....	17
2.2 Defeitos críticos em tecido ósseo.....	20
2.3 A reconstrução nas grandes perdas ósseas.....	20
2.4 Defeito crítico e os estudos experimentais em animais.....	24
2.5 O papel do flavonol icariin no metabolismo ósseo.....	27
3 PROPOSIÇÃO	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Material.....	33
4.2 Métodos.....	34
4.2.1 Procedimento cirúrgico experimental.....	34
4.2.1.1 Descrição da técnica cirúrgica.....	34
4.2.2 Preparo do Icariin, cálculo da dose e administração aos animais.....	37
4.2.3 Pós-operatório.....	39
4.2.4 Radiografia das amostras.....	39
4.2.5 Preparo das amostras histológicas.....	41
4.2.5.1 Análise histomorfológica.....	41
4.2.5.2 Análise histomorfométrica.....	42
4.2.6 Análise estatística.....	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Análise das Imagens Radiográficas.....	44
5.2 Análise Histomorfológica.....	47
5.3 Análise Histomorfométrica.....	51
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

A Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial é a especialidade odontológica que atua no o tratamento das doenças, traumatismos, lesões e anomalias congênitas e adquiridas do aparelho mastigatório e anexos e estruturas crânio-faciais associadas. A consequência dessa terapêutica envolve, em muitos casos, a perda de grandes extensões das estruturas do complexo maxilomandibular. Esta perda se configura em defeitos que não possuem a capacidade espontânea de regeneração, constituindo o que é denominado de defeito ósseo crítico.

Os defeitos ósseos críticos são rotineiramente tratados por meio de transplantes de osso autógeno removido, preferencialmente, da crista ilíaca ou da fíbula. Apesar do comprovado sucesso dessa forma de tratamento, a enxertia autógena está associada com algumas desvantagens relacionadas à área doadora, como dor, dificuldade de deambulação e possibilidade de infecção. Além disso, pode haver a não integração do osso autógeno à área receptora, sendo necessário novo procedimento cirúrgico para correção do defeito ósseo.

Tendo em vista as principais desvantagens apresentadas, inúmeros pesquisadores voltaram suas atenções na busca de um material que fosse substituto ao enxerto ósseo. Nesse contexto, surgiram os biomateriais e os fatores de crescimento.

Os fatores de crescimento tem se tornado o principal alvo de pesquisas relacionadas à reparação tecidual em decorrência das células tronco mesenquimais humanas apresentarem a capacidade de se diferenciar em osteoblastos, por meio da indução de fatores de crescimento. A associação destes a uma matriz carreadora é, atualmente, uma alternativa ao enxerto ósseo autógeno no tratamento dos defeitos ósseos críticos.

No entanto, o alto custo e a rápida degradação dos fatores de crescimento limitam seu uso clínico. Recentemente, a literatura tem proposto muitos estudos utilizando extratos fitoquímicos, como os flavonoides, com o objetivo de sintetizar e desenvolver substâncias ou drogas alternativas que tenham um custo mais acessível e que sejam igualmente eficazes que os fatores de crescimento teciduais.

Assim, propusemos-nos a desenvolver um estudo *in vivo* para avaliar o efeito de um flavonol, o icariin, no reparo de defeitos ósseos críticos.

2 REVISTA DA LITERATURA

2.1 O osso e a reparação tecidual óssea

O osso é uma forma altamente especializada de tecido conjuntivo em que a matriz extracelular é mineralizada, conferindo-lhe rigidez, mas mantendo algum grau de elasticidade. Sua função está relacionada com a constituição do esqueleto, sustentação e fixação dos músculos e depósito para íons cálcio, objetivando a manutenção da calcemia (Junqueira; Carneiro, 1990). O osso apresenta grande capacidade de remodelação, pois se renova constantemente com o objetivo de manter a estabilidade da calcemia e de responder às necessidades metabólicas do corpo humano (Marx; Garg, 1998; Dempster, 1999).

O tecido ósseo é constituído, basicamente, de colágeno tipo I, composto por proteoglicanas e proteínas não colágenas (25%), uma parte mineral, principalmente a hidroxiapatita (65%) e água (10%). Macroscopicamente, o osso é dividido em cortical ou compacto e esponjoso ou medular. O osso cortical é caracterizado pela matriz de colágeno organizada sob a forma de lamelas concêntricas, ao redor de um canal vascular, denominado canal de Harvers. Os canais de Harvers contêm nervos e vasos sanguíneos que se comunicam entre si e com a cavidade medular por meio dos canais de Volkman. O osso medular é caracterizado pela presença de trabéculas ósseas e espaços intertrabeculares que são preenchidos por medula óssea vermelha, onde ocorre a produção ativa de células do sangue pelas células mesenquimais. Tal diferença estrutural faz com que a parte medular esteja mais relacionada com as funções metabólicas do osso e, a parte cortical responsável por oferecer resistência e proteção (Junqueira; Carneiro, 1990; Marx; Garg, 1998; Dempster, 1999). Completam a estrutura óssea o perióstio e o endóstio. O perióstio é uma fina camada de tecido conjuntivo com grande potencial osteogênico (Marx; Garg, 1998) composto por osteoblastos e fibras colágenas (Klein et al., 2003). Ele recobre o osso externamente, fornecendo a inervação e a irrigação que nutrem os ossos. O endóstio, um tecido equivalente, é formado por células pavimentosas e abriga a medula óssea recobrindo o osso internamente por todo o tecido ósseo medular (Marx; Garg, 1998; Klein et al., 2003).

Histologicamente, o osso é dividido em quatro tipos: o trabeculado, o composto, o lamelar e o fasciculado. O osso trabeculado apresenta uma matriz de colágeno desorganizada, sem a estrutura lamelar dos sistemas harversianos. Possui baixa resistência biomecânica e exibe uma velocidade de formação muito rápida, de cerca de 30 a 50 μm ao dia, sendo o primeiro tecido a se formar durante o processo de reparação óssea. Com a evolução da reparação, o osso trabeculado é reabsorvido e substituído pelo osso lamelar, mais maduro, com alta resistência biomecânica. Este se caracteriza pela formação lenta, aproximadamente de 0,6 μm ao dia e por apresentar uma estrutura altamente organizada de fibras colágenas e cristas de minerais. A fase de transição entre o tecido trabeculado e o osso lamelar é denominada de tecido ósseo composto. O tecido ósseo fasciculado é aquele encontrado na zona de inserção de ligamentos nas articulações (Melcher et al., 1970; Roberts et al., 1987).

O desenvolvimento dos ossos ocorre por meio dos fenômenos de reabsorção e aposição óssea resultantes da atividade dos osteoclastos e osteoblastos, respectivamente. Assim como na osteogênese, os osteoblastos e osteoclastos também regem os princípios da reparação dos tecidos ósseos (Shindeler et al., 2008).

Os osteoblastos são células comprometidas com a deposição e a calcificação da matriz colágena extracelular. Os osteoblastos sintetizam o colágeno tipo I, que corresponde a 90% da matriz orgânica e produzem outras proteínas não colagênicas como, por exemplo, a sialoproteína óssea, a osteopontina, a osteonectina, a osteocalcina, as proteínas morfogenéticas ósseas (bone morphogenetic proteins – BMPs), as proteoglicanas, dentre outras. Elas são células ricas em fosfatase alcalina, uma enzima essencial para o processo de mineralização da matriz (Marx; Garg, 1998). Os osteoblastos têm origem a partir de células-tronco osteoprogenitoras mesenquimais que estimuladas por fatores de crescimento e de transcrição, diferenciam-se em osteoblastos (Klein et al., 2003). Vários fatores locais e sistêmicos regulam o seu número, a sua diferenciação e sua atividade. Dessa forma, os osteoblastos possuem receptores para hormônios sistêmicos (paratormônio, estrógenos, insulina, glicocorticóides, hormônios tireoideanos), vitamina D3 e fatores locais como prostanóides (PGE, PGF2 α), citocinas (TGF- β , BMPs, PDGF) e interleucinas (Raisz; Rodan, 1998).

Com o término do processo de diferenciação, os osteoblastos diminuem sua atividade metabólica, ficam envoltos pela matriz óssea e, a partir de então, passam a ser denominados de osteócitos. Os osteoclastos são células derivadas dos monócitos, multinucleadas, que chegam ao tecido ósseo por diapedese e fundem-se para formar um microambiente ácido capaz de reabsorver o tecido mineral (Klein et al., 2003). Os osteoclastos reabsorvem osso em resposta a fatores liberados por osteoblastos estimulados como, por exemplo, a osteoprotegerina (OPG) (Mcsheehy; Chambers, 1986).

A reparação do osso segue a mesma sequência de eventos moleculares observada nos tecidos não ósseos e, didaticamente, a regeneração óssea pode ser dividida em três fases (Schindeler et al., 2008). A primeira fase é caracterizada por um intenso processo inflamatório, pela formação de coágulo sanguíneo, pela remoção dos restos celulares e da matriz colágena por macrófagos e pela formação do tecido de granulação (Tsiridis et al., 2007; Schindeler et al., 2008).

O segundo estágio consiste na deposição de matriz mineral pelos osteoblastos e pode ocorrer com ou sem a deposição de uma matriz fibrocartilaginosa prévia. Quando não existe contato direto dos fragmentos ósseos ocorre a osteogênese endocondral, ou seja, quando a deposição de colágeno e matriz mineral é precedida pela formação de uma matriz fibrocartilaginosa. Quando há contato entre os segmentos da ferida, a formação de tecido ósseo ocorre sem a formação de tecido cartilaginoso, sendo este processo denominado de osteogênese intramembranosa (Shapiro, 2008). Em ambos os casos, a estabilidade da ferida óssea é fundamental para a reparação óssea adequada (Klein et al., 2003; Epari et al., 2007).

A fase final do reparo ósseo é protagonizada pelos osteoclastos e corresponde à remodelação do tecido ósseo em sua configuração original (Schindeler et al., 2008; Ragatt; Patridge, 2010). Dessa forma, a reparação óssea constitui-se de uma complexa sequência de eventos moleculares e celulares que atuam de forma coordenada para restaurar as estruturas danificadas por traumatismos e doenças e é essencial para a manutenção da homeostasia dos organismos vivos. (Balbino et al., 2005; Sen; Roy, 2008).

2.2 Defeitos críticos em tecido ósseo

Um defeito ósseo crítico é conceituado como uma ferida, de menor tamanho possível, confeccionada dentro de uma estrutura óssea, que não possui capacidade espontânea de reparo durante o tempo de vida de um animal (Schmitz; Hollinger, 1986). O defeito ósseo crítico não é capaz de se regenerar sem algum tipo de intervenção clínica, como por exemplo, a aplicação de um enxerto ósseo autógeno (Spicer et al., 2012).

A reparação de um defeito ósseo crítico tem início nas bordas da ferida, que se tornam mais espessas com a formação de osso lamelar. No entanto, em decorrência do tamanho do defeito, o processo de reparo ósseo não evolui para o centro da ferida e, assim, ocorre a formação de tecido conjuntivo fibroso ao invés de osso (Schmitz; Hollinger, 1986).

Além do tamanho do defeito ósseo, outros fatores podem interferir com a quantidade e qualidade da reparação. Dentre esses fatores, citam-se a localização anatômica do defeito e sua estabilidade uma vez que pequenas movimentações dos fragmentos ósseos ou do biomaterial, quando submetidos a cargas biomecânicas, podem levar ao insucesso da reparação (Carter et al., 1998; Gomes; Fernandes, 2011). Além disso, a estrutura interna do tecido ósseo, o suprimento sanguíneo, o envolvimento do osso cortical e a presença ou ausência do periósteo também podem interferir com a reparação tecidual óssea (Schmitz; Hollinger, 1986).

2.3 A reconstrução nas grandes perdas ósseas

A Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofaciais é a especialidade da Odontologia que tem como objetivo o diagnóstico e o tratamento cirúrgico e coadjuvante das doenças, traumatismos, lesões e anomalias congênitas e adquiridas do aparelho mastigatório e anexos e estruturas crânio-faciais associadas. Dentre as importantes áreas de atuação do cirurgião bucomaxilofacial, destacam-se as reconstruções dos defeitos ósseos críticos mandibulares (Resolução CFO-63/2005).

A mandíbula é o local mais frequente da região maxilofacial que necessita de reconstruções ósseas para o restabelecimento da sua continuidade e

função. O tratamento do defeito ósseo crítico da mandíbula representa um grande desafio em decorrência do constante movimento funcional mandibular durante a fala, mastigação e deglutição e também por se tratar de uma região fundamental na estética humana, e autoestima do indivíduo (Manson et al., 1986; Schmitz; Hollinger, 1986; Kubler et al., 1985; Keskin et al., 2008).

Os defeitos ósseos críticos da mandíbula são provenientes de ferimentos faciais graves, como os traumatismos por arma de fogo ou por ressecções cirúrgicas inerentes ao tratamento de algumas neoplasias benignas e malignas do complexo maxilomandibular (Zemman et al., 2007; Guerrier et al., 2012; Trivellato et al., 2008). Tais defeitos levam a uma solução de continuidade da mandíbula e, se não forem adequadamente reconstruídos, resultam em assimetria facial importante com comprometimento grave da estética e da função mandibular (Trivellato et al., 2008).

Atualmente, a reconstrução dos defeitos mandibulares é realizada, de maneira mais frequente, por meio do enxerto ósseo autógeno removido da crista ilíaca ou pelo retalho microvascularizado proveniente da fíbula (Foster et al., 1999; Trivellato et al., 2008; Mücke et al., 2009; López-Arcas et al., 2010; Guerrier et al., 2012; Okoje et al., 2012).

O osso autógeno representa o que é considerado padrão ouro nas cirurgias reconstrutivas porque apresenta três características fundamentais para o reparo ósseo: condutividade óssea, fatores endógenos de osteoindução e células osteogênicas capazes de responder aos fatores sinalizadores (Carson; Bostrom, 2007).

A escolha pelo tipo de reconstrução a ser empregada depende, principalmente, da extensão do defeito ósseo e da vascularização do sítio receptor do osso transplantado (Foster et al., 1999).

A perda de tecido mole adjacente, a presença de infecções prévias (Guerrier et al., 2012) e a radioterapia (Mücke et al., 2009) são exemplos de situações que levam a uma diminuição da vascularização do sítio receptor. Nesses casos, seria preferível o uso de retalho microvascularizado, capaz de sobreviver em um ambiente desfavorável e hipovascularizado, graças ao seu pedículo vascular que garante o suprimento sanguíneo imediato ao osso transplantado.

Em teoria, os retalhos microvascularizados poderiam reconstruir defeitos ósseos de qualquer extensão ao passo que os enxertos autógenos

deveriam ter seu uso restrito a defeitos menores do que 5 cm de comprimento. Os segmentos mandibulares maiores que 5 cm tratados por meio de enxertos ósseos tendem a um maior índice de complicações pós-operatórias e, portanto, a opção para reconstrução destes defeitos deveria ser pelo retalho microvascularizado (Foster et al., 1999) . A escolha também deve levar em consideração os custos do tratamento e a disponibilidade de equipes multidisciplinares com capacitação técnica suficiente para a realização desses procedimentos, em especial os retalhos microvascularizados (Trivellato et al., 2008).

Apesar de o enxerto autógeno estar indicado para defeitos de até 5 cm de extensão, um estudo clínico publicado recentemente mostrou que segmentos maiores que 5 cm podem ser reconstruídos, com sucesso, por meio do enxerto ósseo em bloco removido de crista ilíaca e fixado com placa de reconstrução. Os defeitos ósseos eram provenientes de ferimentos por arma de fogo e foram reconstruídos em um segundo tempo cirúrgico, ou seja, após completa reparação dos ferimentos. Os autores verificaram que houve integração do enxerto em 80% dos pacientes operados e que o osso resultante foi considerado adequado, para receber implantes dentários, em 66% dos indivíduos (Guerrier et al., 2012).

Outros pesquisadores mostraram que as ressecções segmentares mandibulares realizadas para o tratamento dos ameloblastomas sólidos podem ser reconstruídas no mesmo ato operatório por meio de enxerto autógeno de crista ilíaca. Apesar de ser um tratamento controverso na literatura, os autores evidenciam que esta modalidade promove a remoção completa da lesão e a reabilitação estética e funcional do paciente no mesmo ato cirúrgico. A reconstrução com enxerto autógeno ainda permite a reabilitação oral por meio de implantes dentários osseointegrados após um período de tempo relativamente curto, proporcionando retorno rápido à função mastigatória normal (Trivellato et al., 2008).

Os enxertos autógenos ainda podem ser utilizados de forma particulada, acondicionados em uma malha de titânio fixada à mandíbula (Tideman et al., 1998). O osso autógeno particulado tem sido considerado um dos melhores materiais de enxertia óssea para reconstrução mandibular em decorrência da alta capacidade das células ósseas transplantadas em promover neoformação de osso (Tideman et al., 1998; Iino et al., 2009). Um estudo reportou o sucesso da reconstrução mandibular realizada por meio de enxerto autógeno particulado em pacientes submetidos à ressecção mandibular devido à neoplasias. Além disso, os

autores verificaram que a extensão do defeito foi mais determinante para a ocorrência de complicações pós-operatórias em relação à reconstrução mandibular do que a malignidade do tumor ou a radioterapia (Iino et al., 2009).

Para o êxito da terapia com enxerto ósseo autógeno particulado ou em bloco, o cirurgião deve estar atento a algumas características que interferem diretamente no sucesso do tratamento tais como a extensão do defeito ósseo, o correto ajuste do enxerto ao sítio receptor, a vascularização das margens receptoras, o recobrimento pela mucosa oral, a imobilidade do enxerto e uma oclusão estável (Foster et al., 1999; Trivellato et al., 2008).

Os retalhos microvascularizados são descritos com sucesso na literatura mundial e devem ser considerados como opção no planejamento da reconstrução mandibular. Estes fornecem quantidade óssea suficiente, permitem instalação de implantes dentários no mesmo ato operatório da reconstrução e auxiliam na reconstrução dos tecidos moles (Bianchi et al., 2013). Defeitos ósseos que variaram de 3,5 cm a 12,5 cm provenientes da ressecção parcial da mandíbula para tratamento de ameloblastomas sólidos foram tratados por meio de retalhos microvascularizados de ílio e fíbula. Os resultados deste estudo mostrou que todos os retalhos integraram e permitiram reabilitação imediata com implantes dentários ou em um segundo tempo cirúrgico (Bianchi et al., 2013).

Os retalhos microvascularizados também estão indicados para pacientes com comprometimento vascular avançado, como nos casos de osteonecrose dos maxilares secundária ao uso de bisfosfonatos. A vantagem destes em relação ao enxerto autógeno livre do pedículo vascular é que a anastomose dos vasos do osso transplantado ao sítio receptor permite um suprimento sanguíneo imediato para o osso transplantado, o que previne o risco de não integração do retalho, aumentando as chances de sucesso do tratamento (Mücke et al., 2009).

Apesar dos excelentes resultados obtidos com os enxertos autógenos e com os retalhos microvascularizados de fíbula, estas opções de reconstrução apresentam algumas complicações e desvantagens que envolvem, principalmente, morbidade significativa da área doadora do material, aumento do tempo de tratamento e dos custos, necessidade de equipes multidisciplinares capacitadas, risco de contaminação e não integração do enxerto e, frequentemente, por resultar em quantidade e qualidade óssea insuficiente para reabilitação oral (Herford; Boyne, 2008; Block et al., 2009).

Frente a essas desvantagens, as pesquisas voltaram suas atenções para o desenvolvimento de biomateriais que fossem capazes de restaurar a continuidade óssea, eliminando a necessidade de cirurgia na área doadora (Stella; Warner, 2000; Herford; Boyne, 2008). A realização de procedimentos efetivos de reconstrução por meio de fatores de osteoindução ou de crescimento sem a necessidade da enxertia óssea convencional é de grande importância para as cirurgias de reconstrução óssea da região da cabeça e pescoço (Herford; Boyne, 2008; Luvizuto et al., 2011).

Dentre os biomateriais, o que mais tem ganhado atenção nas pesquisas é a proteína morfogenética óssea recombinante humana (rhBMP-2), descrita primeiramente por Urist (Urist, 1965). As BMPs são conceituadas como substâncias capazes de estimular células tronco mesenquimais adultas a se diferenciarem em osteoblastos e consequentemente formar osso (Herford; Boyne, 2008).

A rhBMP-2 embebida em um carreador de colágeno foi utilizada para tratamento de defeitos ósseos críticos na mandíbula de humanos resultantes de osteomielite ou de ressecções por neoplasias. A pesquisa mostrou que a rhBMP-2 promoveu uma regeneração excelente da região, estabelecendo uma base óssea adequada para reabilitação com implantes. Este estudo embasa o uso de rhBMP-2 na reparação óssea dos defeitos ósseos críticos da face. As proteínas morfogenéticas ósseas mostraram-se como alternativa aos diversos tipos de enxertos autógenos e retalhos microvascularizados para o tratamento de defeitos ósseos críticos na mandíbula (Herford; Boyne, 2008).

2.4 Defeito crítico e os estudos experimentais em animais

Os estudos *in vivo* com modelos animais são uma forma de experimentação muito utilizada entre os pesquisadores em decorrência da capacidade destes em fornecer dados importantes das condições de reparo de um determinado tecido em investigação. Além disso, testes em animais tem papel fundamental na inserção de novos medicamentos, dispositivos e estratégias de tratamento na prática clínica (Spicer et al., 2012).

As pesquisas com animais estabelecem uma ligação entre os estudos *in vitro* e os ensaios clínicos e, conseqüentemente, podem ser úteis no estabelecimento de intervenções clínicas mais efetivas. Rotineiramente, diversos modelos *in vivo* são usados para avaliar o processo de regeneração óssea, a interação entre o osso e o biomaterial e as evidências de ossificação fisiológica ou patológica (Gomes; Fernandes, 2011).

Muitas espécies são úteis para representar modelos de defeitos ósseos em animais, dentre eles os camundongos, ratos, coelhos, cachorros, porcos, ovelhas e cabras. Os animais roedores, especificamente, são os que mais têm sido utilizados nas pesquisas sobre reparação tecidual óssea por apresentar fácil reprodutibilidade e custo acessível (Spicer et al., 2012).

A calvária do rato, em especial, mostra-se como um modelo adequado para a avaliação da regeneração óssea orientada por biomateriais ou substâncias provenientes da engenharia de tecidos, principalmente aqueles que se referem à reparação dos defeitos craniofaciais (Schmitz; Hollinger, 1986; Gomes; Fernandes, 2011). A calvária do rato é, anatomicamente, similar à mandíbula humana por consistir de uma camada de osso medular envolto por duas corticais ósseas. Dessa forma, os defeitos ósseos mandibulares podem ser representados, para fins de pesquisa, por meio das feridas ósseas produzidas na calvária dos ratos (Schmitz; Hollinger, 1986).

A estrutura óssea da calvária permite a realização de um defeito padronizado, que é facilmente avaliado por meio de radiografias e análises histológicas. Sua localização anatômica oferece um campo visual satisfatório para realização do acesso cirúrgico e do manejo intra-operatório. A dura-máter e a camada subcutânea fornecem suporte adequado para os materiais ali implantados, dispensando a necessidade de fixações. A calvária do rato permite a comparação entre as diversas substâncias que podem ser enxertadas em um modelo de defeito ósseo crítico, com o objetivo de testar a capacidade destas substâncias em promover o reparo de lesões extensas. No entanto, neste modelo de experimentação não é possível analisar a resposta dos biomateriais frente a cargas biomecânicas (Gomes; Fernandes, 2011).

As pesquisas que simulam a reparação tecidual de defeitos ósseos divergem quanto ao diâmetro ideal para ser considerado um defeito ósseo crítico. Deste modo, foi observado que defeitos de 8 mm de diâmetro confeccionados na

calvária de ratos Sprague-Dawley diminuíram para 5 mm de diâmetro após 4 semanas e, após esse período, não houve neoformação óssea adicional até a 12ª semana de observação (Schmitz; Hollinger, 1986). Apesar disso, os defeitos de 8 mm de diâmetro produzidos na calvária de ratos têm sido considerados como um modelo animal adequado de defeito ósseo crítico para a maioria dos autores (Schmitz; Hollinger, 1986; Efeoglu et al., 2009; Gomes; Fernandes, 2011; Spicer et al., 2012).

Dessa forma, Mokbel et al., 2008 utilizaram o modelo de defeito crítico de 8 mm de diâmetro para comparar o reparo ósseo da calvária em ratos Sprague Dawley na presença do osso mineral bovino inorgânico acondicionado em rhBMP-2, do enxerto com osso alógeno desmineralizado e congelado (DFDBA) acondicionado em rhBMP-2, do osso autógeno e do coágulo sanguíneo. Verificaram, por meio de histomorfologia e histomorfometria que a reparação óssea da calvária desses animais foi melhor na presença de osso mineral bovino inorgânico acondicionado em rhBMP-2 e concluíram que a adição de rhBMP-2 aos substitutos ósseos se mostrou eficaz na regeneração óssea de defeitos críticos na calvária de ratos.

Outro estudo avaliou a influência do alendronato na reparação tecidual de defeitos ósseos críticos em ratos Wistar, tratados por meio de enxerto autógeno, utilizando o mesmo modelo de 8 mm de diâmetro na calvária do animal. Verificaram que tanto o uso local como o uso sistêmico do alendronato aumentou significativamente a neoformação óssea quando comparados ao grupo que recebeu apenas o enxerto autógeno (Toker et al., 2012).

Depois da confecção do defeito ósseo, seguida da implantação do biomaterial ou da administração da substância auxiliar na reparação e, após o período de observação da reparação tecidual, o tecido neoformado deve ser analisado por meio de métodos que se complementam. A análise histológica associada a exames de imagem, como radiografias convencionais e microtomografia, são os métodos mais comumente utilizados (Gomes; Fernandes, 2011).

A histomorfologia e a histomorfometria são as principais análises histológicas realizadas (Spicer et al., 2012). A histomorfologia é utilizada para fornecer uma visão geral do tecido de interesse, referente aos dados da morfologia celular, estrutura e disposição das células na interface com a matriz extracelular ou com o material implantado. Uma análise semi-quantitativa pode ser realizada

utilizando um sistema de pontuação nos quais os dados podem ser avaliados por meio de análises não paramétricas de variância. A histomorfometria, por sua vez, permite a análise quantitativa dos dados histológicos, no que diz respeito à área de tecido neoformado e número de componentes da região de interesse (Vignery; Baron, 1980; Parfitt et al., 1987).

As radiografias, e mais recentemente a microtomografia, têm sido empregadas na avaliação dos processos de reparo ósseo e regeneração. Os exames por imagens são básicos para avaliar o reparo de fraturas e de defeitos ósseos e complementam as análises histológicas da neoformação óssea (Schortinghuis et al., 2003).

2.5 O papel do flavonol icariin no metabolismo ósseo

Flavonóide é a designação dada a um grupo de metabólitos da classe dos polifenóis encontrados, principalmente, em vegetais, flores, frutas, no chá verde e no vinho (Simões, et al., 2007). Um tipo de flavonóide, o icariin, mais apropriadamente classificado como um flavonol, vem ganhando atenção nas pesquisas sobre reparação tecidual por atuar no metabolismo ósseo por meio de mecanismos ainda não completamente comprovados.

O icariin é o principal componente ativo isolado da planta asiática *Epimedium brevicornum maxim*, que tem sido utilizada no tratamento adjunto de fraturas ósseas, doenças articulares e disfunção gonadal na tradicional medicina chinesa durante milhares de anos. A literatura tem reportado que este flavonol possui uma ampla gama de efeitos farmacológicos e biológicos. Artigos publicados recentemente mostraram que as drogas que contêm o icariin podem exercer efeitos benéficos no tratamento da osteoporose e na prevenção da osteonecrose, por meio da estimulação da formação de osso e diminuição da atividade de reabsorção óssea (Simões et al., 2007; Yin et al., 2007; Nian et al., 2009; Wei et al., 2010).

Assim, um estudo clínico randomizado duplo cego desenvolvido por Zhang et al. (2007), mostrou que os flavonoides da erva *epimedium*, dentre eles o icariin que corresponde a 77% da composição, inibiram a reabsorção óssea e regularam o *turn-over* ósseo em favor da neoformação óssea. Os autores

concluíram que os flavonoides exerceram efeitos benéficos na prevenção da perda óssea em mulheres na pós-menopausa.

Nian et al. (2009), em um estudo sobre a osteoporose induzida em ratas após ooforectomia, verificaram que a administração sistêmica do icariin na dose de 25 ou 125 mg/kg de peso por dia foi capaz de recuperar significativamente a densidade mineral óssea perdida nos fêmures. Houve melhora das propriedades biomecânicas da estrutura óssea, evidenciada pelo aumento da energia requerida para produzir fratura na tíbia dos animais. Por meio da avaliação histomorfométrica os autores observaram que o icariin aumentou a espessura e a coalescência de trabéculas ósseas. A avaliação histológica do grupo teste evidenciou algumas características, como mineralização, ossificação e depósitos cartilagosos calcificados, que indicam ação regenerativa marcante e sugerem que a ação protetora do icariin é decorrente de ganho na formação de osso.

Outros autores (Wei et al., 2010) avaliaram os efeitos do icariin no reparo ósseo durante o período de consolidação da distração osteogênica realizada na mandíbula de coelhos. O flavonóide foi administrado por meio de gavagem na dose de 2,5 mg/kg de peso por dia, até o dia da eutanásia, com a finalidade de promover uma consolidação óssea mais precoce e, dessa maneira, reduzir as possibilidades das complicações inerentes a esse procedimento, como dor, refratura, infecção ou não união óssea. A avaliação histológica mostrou que o osso neoformado, no grupo experimental, apresentou-se com trabéculas mais maduras e melhor organizadas no momento final de observação. Além disso, as trabéculas neoformadas apresentaram-se alinhadas paralelamente ao eixo da distração. A histomorfometria óssea revelou que o novo volume de osso e o número de trabéculas no grupo experimental foram estatisticamente maiores. A avaliação radiográfica exibiu maior radiopacidade, assim como a densidade óssea, que também se mostrou superior em relação ao grupo controle. Os autores ressaltaram que o melhor efeito na neoformação óssea ocorreu quando o icariin foi administrado até o dia da eutanásia.

Diversos estudos *in vitro* estudaram a eficácia osteogênica do icariin e seus mecanismos de ação em osteoblastos em cultura. Neste contexto, Yin et al. (2007), mostraram que o icariin exerceu efeito estimulatório direto na proliferação e diferenciação de osteoblastos humanos e que os efeitos osteogênicos do icariin podem ocorrer pela super-regulação da proteína morfogenética-2.

Zhao et al. (2008), evidenciaram o efeito osteogênico do flavonol em células osteoblásticas, MC3T3-E1, derivadas da calvária de camundongos, e em células pré-osteoblásticas por meio da super-regulação de marcadores de atividade osteogênica como Runx2, Osteocalcina e Sialoproteína Óssea. No entanto, os autores observaram que o icariin não foi capaz de induzir a diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais humanas ou de células indiferenciadas pluripotentes C3H10T1/2, sugerindo que o princípio ativo droga exerce seus efeitos osteogênicos apenas em células submetidas à linhagem osteoblástica. Os autores concluíram que o icariin foi um excelente agente anabólico ósseo cujo mecanismo de ação pode ser explicado pela indução da expressão de Runx2, produção de proteínas morfogenéticas-4 (BMP-4) e ativação da sinalização de proteínas morfogenéticas

Em 2010, Hsieh et al., verificaram, *in vitro*, aumento da proliferação e mineralização de osteoblastos pelo emprego do icariin. Esses dados permitiram aos autores concluir que esse fitoterápico é um potente agente anabólico ósseo e que, provavelmente, exerce seus efeitos osteogênicos por meio do aumento da síntese de óxido nítrico e pelo estímulo à indução de proteína morfogenética-2. O óxido nítrico é tido como um modulador do metabolismo ósseo cuja ação se manifesta, principalmente, sobre osteoclastos. O aumento da produção de óxido nítrico pode ser capaz de diminuir a atividade de osteoclastos e, conseqüentemente reabsorver menos osso. As proteínas morfogenéticas ósseas têm papel fundamental na regulação da indução de osso, manutenção e reparo. Os autores ainda salientaram que, subsequentemente, o icariin, por meio da indução de BMP e síntese de óxido nítrico, pode ser capaz de regular a expressão gênica de Cbfa1/Runx2, de Osteoprotegerina (OPG) e de RANKL.

De maneira semelhante ao trabalho de Hsieh et al. (2010), Qian et al. (2006), sugeriram que os efeitos anabólicos do icariin são decorrentes do aumento da expressão do gene Cbfa1, por este ser o responsável pela regulação da diferenciação dos precursores osteoblásticos e da atividade de osteoblastos maduros.

Com o objetivo de melhorar o comportamento biológico dos materiais à base de trifosfato de cálcio, Zhang et al. (2010), adicionaram icariin a discos de cerâmica de β -trifosfato de cálcio. Mostraram que a adição de icariin na concentração de 0,01 mg/ml ao biomaterial aumentou o potencial osteoindutor da

cerâmica de β -trifosfato de cálcio e, assim, concluíram que o flavonol combinado àquele biomaterial pode ser uma boa opção como substituto ao enxerto ósseo (Zhang et al., 2010).

Fan et al. (2011), mostraram que o icariin apresentou um efeito dose dependente na proliferação de células tronco mesenquimais humanas, evidenciado pelo aumento da viabilidade celular simultaneamente ao aumento da concentração do flavonóide. Além disso, observaram que o icariin foi capaz de aumentar a diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais humanas em concentrações que variaram de 10^{-9} a 10^{-6} M. No entanto, mostraram que em concentrações mais altas, como 10^{-5} M de icariin, houve diminuição da viabilidade celular em decorrência da toxicidade da substância sobre as células.

No trabalho de Huang et al. (2007) verificou-se que o icaritin, o produto da metabolização *in vivo* do icariin, foi capaz de estimular, *in vitro*, a diferenciação e proliferação de osteoblastos e facilitar a calcificação da matriz óssea. Esses resultados corroboram com outros achados de outros autores (Hsieh et al., 2011) que verificaram, também *in vitro*, uma inibição da diferenciação de osteoclastos na presença do icariin, sem causar interferências na viabilidade celular. Essas características permitem aos autores sugerir que o icariin pode ser capaz de prevenir a perda óssea inflamatória. (Huang et al., 2007; Hsieh et al., 2011)

O uso de uma fórmula chinesa denominada Er-Xian Decoction (EXD), composta por icariin, berberine e curculigoside, aumentou significativamente a densidade mineral óssea e o conteúdo ósseo em ratas osteoporóticas (Xue et al., 2012). Em cultura celular, os autores demonstraram que o emprego sinérgico desses componentes ativos inibiu a formação e diferenciação de osteoclastos e, conseqüentemente, a reabsorção óssea por meio da modulação do sistema OPG/RANKL nos osteoblastos e pela via mitocondrial (MAPKs) nos osteoclastos. O icariin se mostrou como o principal ingrediente da fórmula chinesa, enquanto que a berberine e o curculigoside tiveram um papel auxiliar aos efeitos inibitórios do icariin sobre a formação e diferenciação de osteoclastos e na reabsorção óssea.

Zhang et al. (2012), concluíram que os flavonoides da erva epimedium, dentre eles o icariin, foram capazes de regular a formação e a atividade dos osteoclastos por meio da inibição da proliferação e diferenciação destes por apoptose celular e interrupção do ciclo celular e, conseqüentemente, inibindo a reabsorção óssea por osteoblastos. Os autores acreditam que as alterações na

atividade dos osteoclastos são mediadas, provavelmente, pela interação entre os receptores de estrógeno e a via mitocondrial (MAPKs). O estrógeno aumenta a apoptose dos osteoclastos pelo aumento da produção de TGF- β e por reduzir a expressão de genes ativados de NF- κ B. Associando seus achados com outros estudos, os pesquisadores citam que a erva epimedium é capaz de promover osteogênese e melhorar a qualidade óssea por aumentar a formação óssea pelos osteoblastos e prevenir a reabsorção óssea pelos osteoclastos.

3 PROPOSIÇÃO

Verificar o efeito do uso sistêmico de icariin, sob o ponto de vista radiográfico, histomorfológico e histomorfométrico, no processo de reparo de defeitos ósseos críticos confeccionados na calvária de ratos Wistar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa, foi aprovado em 25 de agosto de 2011 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) sob protocolo nº 88, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL).

Todos os procedimentos cirúrgicos experimentais foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Maxilofaciais da Faculdade de Odontologia de Universidade de São Paulo.

As radiografias das amostras foram realizadas no laboratório de Radiologia da disciplina de Radiologia da Faculdade de Odontologia de Universidade de São Paulo. O preparo e as análises histológicas foram processados junto ao Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal e junto ao Laboratório de Informática dedicado à Odontologia (LIDO) da Disciplina de Patologia Geral do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Universidade de São Paulo.

4.1 Material

Oitenta (80) ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com peso entre duzentos e duzentos e cinquenta gramas (200g – 250g), e idade aproximada de quarenta e cinco (45) dias provenientes do Biotério Central do Instituto de Pesquisas Nucleares (IPEN) foram selecionados para o estudo. Durante todo o período da pesquisa, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno ventiladas, forradas com maravalha de madeira esterilizada, com ciclo dia/noite de 12/12 horas e alimentados por meio de ração para roedores (Labina for Rodents - Purina®) e água *ad libitum*.

4.2 Métodos

Todos os animais foram pesados para o cálculo da dose referente aos medicamentos de sedação, anestesia, analgesia e antibioticoterapia. Os 80 animais foram divididos em dois grupos. O Grupo Icariin (n=40) recebeu por gavagem doses diárias de flavonoide até o dia da eutanásia e o Grupo Controle (n=40), que recebeu o mesmo volume de soro fisiológico.

4.2.1 Procedimento cirúrgico experimental

Após a pesagem de cada um dos animais, estes foram mantidos em gaiolas individuais e separados dos demais animais para realização da anestesia. Esse procedimento permitiu que cada rato fosse anestesiado isoladamente, visando à redução do estresse aos demais animais que seriam submetidos ao mesmo procedimento. Em seguida, a anestesia geral foi obtida pela injeção por via intramuscular, na pata traseira direita de cada animal, do anestésico cloridrato de ketamina (Dopalen® - Vetbrands) na dose de 0,8 mg/kg de peso do animal associado ao relaxante muscular cloridrato de xilazina (Rompum® -Bayer AS) na dose de 0,3mg/kg de peso. Depois de atingido o plano anestésico, foi realizado profilaxia antibiótica por via intramuscular com benzilpenicilina benzatina (Roche®) na dose de 150.000 UI/Kg.

O preparo do sítio cirúrgico consistiu da realização de tricotomia na região da calvária seguida de anti-sepsia da pele do mesmo local com digluconato de clorexidina a 2%. Os animais foram posicionados em uma bancada utilizada para cirurgias experimentais, isolada com campos cirúrgicos esterilizados.

4.2.1.1 Descrição da técnica cirúrgica

- a. O acesso à calvária deu-se por meio de uma incisão retilínea de cerca de dois centímetros na pele da região mediana do crânio, estendendo-se da região nasofrontal até a protuberância occipital.

- b. A pele, o tecido subcutâneo, o músculo temporal e o periósteo foram divulsionados lateralmente para completa exposição dos ossos parietais do animal.
- c. O defeito ósseo foi confeccionado por meio de uma broca trefina em aço de 8 mm de diâmetro (Sistemas de Implantes Nacionais - SIN®), adaptada a um contra-ângulo em motor de implante (Driller®) sob baixa rotação e irrigação constante com soro fisiológico a 0,9%.
- d. Após a confecção do defeito ósseo, foi realizada a irrigação constante da ferida cirúrgica por soro fisiológico a 0,9%.
- e. Por fim, realizou-se a síntese da pele com fio de sutura de seda 3-0. (Ethicon®)

Figura 4.1 - Cirurgia Experimental: acesso à calvária do animal e osteotomia com broca trefina de 8 mm de diâmetro (A). Remoção do fragmento ósseo e obtenção do defeito ósseo crítico (B)

Imediatamente após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais até o dia da eutanásia.

4.2.2 Preparo do Icariin, cálculo da dose e administração aos animais

O flavonoide foi preparado pela Farmácia de Manipulação Unipharmus[®]. O modo de preparação e o cálculo da dose diária do fitoterápico foram baseados nos estudos de Nian et al. (2009). A dose diária máxima a ser recebida por cada animal não deveria ultrapassar 125 mg/kg de peso. Assim, mantida a proporção quanto ao peso dos animais, foi obtida a dose diária máxima de 31,25 mg de icariin para um rato de 250 gramas de peso. Considerando eventuais perdas na administração oral do icariin e, de maneira a facilitar a manipulação do flavonol, a dose diária foi arredondada para 32 mg de icariin para um rato de 250 mg de peso.

Figura 4.2 - Frascos contendo o Icariin, preparados pela Farmácia de Manipulação Unipharmus[®]

Figura 4.3 - Sonda de gavagem utilizada para medicar os animais com icariin em seu conteúdo

A droga foi administrada, diariamente, aos animais (Grupo Teste) por via oral empregando técnica de gavagem por técnica bioterista experiente. Para tanto o flavonóide foi diluído em água destilada, resultando em uma solução na concentração de 32 mg de icariin em 0,3 ml de veículo (32 mg/0,3ml). Estima-se que o conteúdo gástrico do rato é capaz de suportar até cerca de 0,5 a 0,6 ml de solução e, portanto, optamos por diluir a concentração máxima pela metade do que o estômago é capaz de suportar. A concentração do flavonóide variou de acordo com o peso do animal que foi mensurado a cada 7 dias. Deste modo garantiu-se a dosagem fixa de 125 mg/kg de peso do animal.

Figura 4.4 - Administração do icariin ao rato com auxílio da sonda de gavagem

4.2.3 Pós-operatório

Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados em câmara de CO₂ nos períodos de 7, 14, 21 e 42 dias pós-operatórios. Após a eutanásia, os crânios foram dissecados e imediatamente fixados em formol a 10% para os procedimentos de preparo histológico.

4.2.4 Radiografia das amostras

Previamente ao processamento laboratorial para análise histológica, todas as peças cirúrgicas foram radiografadas. As imagens radiográficas foram obtidas em filme odontológico periapical (Kodak Insight – Eastman Kodak Company – EUA) empregando-se aparelho de raios X odontológico modelo Timex 70E –

Gnatus®. Para padronização das imagens radiográficas, as amostras de todos os grupos e períodos foram posicionadas da mesma maneira sobre o filme radiográfico periapical, com auxílio de um suporte confeccionado em cera utilidade, tipo cefalostato, em uma distância focal de 4,5 cm e tempo de exposição radiográfica de 3,2 segundos.

Figura 4.5 - Padronização da posição do aparelho radiográfico para realização das radiografias

Figura 4.6 - Amostra posicionada para realização da radiografia

A revelação de todas as películas radiográficas foi realizada em conjunto, na Câmara Escura da Disciplina de Radiologia da Faculdade de

Odontologia da Universidade de São Paulo, seguindo critérios padronizados de tempo e temperatura.

A análise radiográfica consistiu da mensuração da área e perímetro dos defeitos ósseos por meio de um software de computador específico para interpretação de imagens (ImageJ®). A análise das imagens foi realizada por um único observador.

4.2.5 Preparo das amostras histológicas

Após a fixação das peças cirúrgicas em solução de formol tamponado a 10% por quarenta e oito (48) horas, os crânios foram imersos em solução de EDTA 10% (pH 7.4) durante 6 semanas para descalcificação do tecido ósseo.

A região de ferida foi seccionada ao meio, exatamente no plano sagital mediano da calvária do rato, resultando em duas partes da ferida: o lado esquerdo e direito. Cada lado da ferida foi incluído em seu respectivo bloco de parafina e, posteriormente, quatro cortes parassagitais foram realizados com espessura de 4,5 µm e submetidos à coloração de Hematoxilina-Eosina (HE).

A amostra constituiu-se da análise de duas lâminas histológicas, (L1 e L2) de cada animal, com quatro cortes histológicos em cada uma delas.

4.2.5.1 *Análise histomorfológica*

Os cortes histológicos foram analisados por meio de um microscópio de luz convencional (Olimpus® CH2 – Olympus Optical Co. Ltd – Japan), sob foco fixo e clareza de campo, com aumento final de 400X.

A análise dos aspectos histomorfológicos do reparo ósseo foi realizada por um patologista de forma cega considerando a presença das seguintes características do reparo: presença de infiltrado inflamatório, tecido de granulação, necrose, osteoclastos, vasos neoformados, neoformação óssea e presença de coágulo. Os parâmetros descritos anteriormente foram ponderados por meio de uma escala arbitrária, classificada de zero a quatro (0 = ausente; 1 = pouco; 2 = moderado; 3 = intenso e 4 = muito intenso).

4.2.5.2 *Análise histomorfométrica*

A metodologia de estudo histomorfométrico foi padronizada pelo Laboratório de Informática Dedicado à Odontologia da Faculdade (LIDO-FOUSP).

Para a histomorfometria, cada corte histológico de cada lâmina foi dividido em três partes: região anterior da ferida (próximo ao osso nasal), centro da ferida e região posterior da ferida (próximo ao osso occipital).

Imagens de cada região do corte histológico (aumento de 400x) foram obtidas por meio de uma câmera tipo CCD (Sony®) acoplada a um microscópio (Jeol®) e a uma placa de digitalização de imagens (Captivator®). Em seguida, essas imagens foram transferidas para um software de morfometria digital (ImageLab 2000®).

Por meio das ferramentas disponíveis no software ImageLab 2000®, as regiões correspondentes às trabéculas ósseas neoformadas nas regiões anterior, posterior e central da ferida foram delimitadas em cada um dos quatro (4) cortes histológicos de cada lâmina, permitindo estimar a evolução da neoformação óssea.

A quantidade de neoformação óssea de cada lado da ferida foi obtida pela soma das médias de neoformação óssea dos quatro (4) cortes das regiões anterior, posterior e central de cada lâmina (L1 e L2), ou seja: a neoformação óssea do lado esquerdo da ferida óssea (L1) = média de neoformação da região anterior + média de neoformação da região central + média de neoformação da região posterior. O cálculo foi realizado da mesma forma para o lado direito (L2).

Assim, a neoformação óssea total, de cada animal, foi obtida por meio da soma da neoformação óssea da lâmina 1 com a lâmina 2 (L1 + L2)

Figura 4.7 – Esquema ilustrativo da utilização da ferramenta de demarcação para mensuração da área de osso neoformado em mm^2 (software ImageLab2000®).

4.2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos a estudo estatístico comparativo entre todos os grupos e períodos. Foram aplicados os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis utilizando o programa estatístico IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences), em sua versão 21.0, para a obtenção dos resultados. O valor da significância foi considerado quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

Do total inicial de 80 ratos, dez animais morreram no dia seguinte ao procedimento cirúrgico experimental, cinco no momento da anestesia, 12 no ato de gavagem com soro fisiológico e outros 13 no ato da gavagem com icariin. Assim, a amostra final foi constituída por 40 animais, distribuída em dois grupos (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Distribuição da amostra final nos grupos e períodos experimentais

Grupo	7 dias	14 dias	21 dias	42 dias
Controle (C)	5	5	5	5
Teste (T)	5	5	5	5

No período pré-operatório, o peso dos animais tanto do grupo C como do grupo T variou de 240 a 250g e, no dia do sacrifício, variou de 260 a 320g. Nenhum animal mostrou sinais de infecção na região da ferida cirúrgica. Todas encontravam-se limpas e a pele da região da incisão não apresentava deiscências.

5.1 Análise das Imagens Radiográficas

A figura 5.1 apresenta as imagens radiográficas das calvárias obtidas dos animais considerando os grupos e períodos de observação. A tabela 5.2 apresenta a comparação entre a área do defeito ósseo do grupo icariin com o grupo controle e, a tabela 5.3 mostra a comparação entre as áreas dos defeitos ósseos entre os períodos observacionais, dentro de cada um dos grupos. Para os valores da média do defeito ósseo e o correspondente desvio padrão, apresentados nas tabelas 5.2 e 5.3, foi utilizada a unidade de medida pixel/mm², disponível no software de análise.

Figura 5.1 – Imagem radiográfica das amostras do grupo Controle (acima) e do grupo Teste (abaixo), com os respectivos períodos de observação

Tabela 5.2 – Distribuição dos valores médios $\pm$ desvio-padrão das mensurações da área radiográfica dos defeitos ósseos comparativamente entre grupos e períodos. n=40 (unidade de medida: pixel/mm²)

Variável	Grupo e Período	n	Média $\pm$ DP	(p)
Área	Teste 7d	5	67712 $\pm$ 2189	0,028
	Controle 7d	5	75651 $\pm$ 4312	
	Teste 14d	5	56519 $\pm$ 3119	0,009
	Controle 14d	5	74042 $\pm$ 2572	
	Teste 21d	5	53936 $\pm$ 2314	0,009
	Controle 21d	5	71497 $\pm$ 5196	
	Teste 42d	5	48113 $\pm$ 1684	0,009
	Controle 42d	5	67640 $\pm$ 5407	

Teste de Mann-Whitney. Significância $p \leq 0,05$.

Tabela 5.3 - Distribuição dos valores médios $\pm$ desvio-padrão das mensurações da área radiográfica dos defeitos ósseos nos grupos comparativamente entre os períodos. n=40 (unidade de medida: pixel/mm²)

Variável	Momento de Observação	n	Média	Sig. (p)
Grupo Teste	7d	5	67712 $\pm$ 2189	0,001
	14d	5	56519 $\pm$ 3119	
	21d	5	53936 $\pm$ 2314	
	42d	5	48113 $\pm$ 1684	
Grupo Controle	7d	5	75651 $\pm$ 4312	0,105
	14d	5	74042 $\pm$ 2572	
	21d	5	71497 $\pm$ 5196	
	42d	5	67640 $\pm$ 5407	

Teste de Kruskal Wallis. Significância $p \leq 0,05$

Pela tabela 5.2, podemos observar que houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos em todos os períodos observacionais, ou seja, pela análise radiográfica, a área do defeito ósseo no grupo icariin foi menor que no grupo controle em todos os períodos de observação.

Como mostra a tabela 5.3, é possível identificar a diminuição dos valores da área do defeito ósseo ao longo do tempo em ambos os grupos, com exceção aos períodos de 7 e 14 dias do grupo controle que se mostraram

equivalentes. No entanto, apenas para o grupo teste houve diferença estatisticamente significativa entre os quatro momentos de observação.

5.2 Análise Histomorfológica

Período de 7 dias

O grupo teste apresentou infiltrado inflamatório pouco intenso comparativamente ao grupo controle. O tecido de granulação observado em ambos os grupos apresentou expressão semelhante. As áreas de necrose e a presença de osteoclastos foram mais intensas no grupo controle. Houve semelhança nos resultados para neoformação vascular e óssea neste período. A presença de exsudato fibrino hemorrágico foi maior no grupo teste. (Figura 5.3 A e B e tabela 5.4)

Período de 14 dias

A presença de infiltrado inflamatório, tecido de granulação e áreas de necrose foram semelhantes em ambos os grupos. A presença de osteoclastos nesse período foi mais intensa para o grupo teste. As neoformações vascular e óssea foram semelhantes em ambos os grupos. Foi possível observar trabéculas ósseas neoformadas caracterizadas pela proliferação de osteoblastos e osso imaturo no grupo teste. (Figura 5.3 C e D e tabela 5.4)

Período de 21 dias

O processo inflamatório no grupo controle manteve-se com moderada intensidade enquanto que, no grupo teste houve redução desse infiltrado. A presença de tecido de granulação foi semelhante para ambos os

grupos. Houve uma quantidade ligeiramente maior de osteoclastos no grupo controle. A neoformação vascular foi semelhante e a neoformação óssea foi mais expressiva no grupo teste. (Figura 5.3 E e F e tabela 5.4)

Período de 42 dias

Em 42 dias o infiltrado inflamatório ainda estava presente no grupo controle e ausente no grupo teste. A presença de tecido de granulação foi semelhante para ambos os grupos. O número de osteoclastos foi ligeiramente maior no grupo controle. A neoformação vascular foi similar em ambos os grupos. A neoformação óssea foi muito mais intensa para o grupo teste do que para o grupo controle. As trabéculas ósseas exibiam intensa atividade osteoblástica e presença de osteócitos com características de osso maduro. (Figura 5.3 G e H e tabela 5.4)

Tabela 5.4: Descrição dos aspectos da histomorfologia considerando as variáveis do reparo segundo os grupos e períodos

Variáveis	7 dias			14 dias			21 dias			42 dias		
	Controle	Teste	p	Controle	Teste	p	Controle	Teste	p	Controle	Teste	p
Inf. Inflamatório	1 [1 - 1]	2 [1 - 2]	0,083	1 [1 - 1]	1 [1 - 2]	0,563	1 [1 - 1]	0 [0 - 1]	0,083	1 [0 - 1]	0 [0 - 0]	0,083
Tec. Granulação	3,5 [3 - 4]	3 [3 - 3]	0,248	3 [3 - 3]	3 [3 - 3]	1	3 [3 - 3]	3 [3 - 3]	1	3 [3 - 3]	3 [3 - 3]	1
Necrose	1 [1 - 2]	0,5 [0 - 1]	0,386	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	-	0 [0 - 1]	0 [0 - 0]	0,564	0 [0 - 0]	0 [0 - 0]	-
Osteoclastos	3 [2 - 3]	2 [1 - 3]	0,194	1 [1 - 1]	3 [1 - 3]	0,083	3 [2 - 4]	3 [2 - 3]	0,665	2 [2 - 3]	1 [1 - 2]	0,06
Vasos Neoformados	3 [2 - 3]	2,5 [2 - 3]	0,564	3 [3 - 3]	3 [3 - 3]	1	3 [3 - 3]	3 [3 - 3]	1	3 [3 - 3]	3 [3 - 3]	1
Neoformação Óssea	2 [2 - 2]	2,5 [2 - 3]	0,248	2 [1 - 3]	3 [3 - 3]	0,083	3 [3 - 3]	3,5 [3 - 4]	0,248	3 [3 - 3]	4 [4 - 4]	0,02*
Coágulo	1 [0 - 2]	2 [0 - 3]	0,47	2,5 [1 - 3]	1 [0 - 1]	0,06	1 [1 - 1]	1 [0 - 1]	0,564	0 [0 - 1]	0 [0 - 0]	0,564

Resultado estatisticamente significante. $p \leq 0,05$.

Figura 5.3 – Aspectos histológicos do reparo do defeito ósseo: A) Controle 7 dias – ligeiro infiltrado inflamatório (asterisco) e tecido de granulação exuberante (seta); neoformação óssea na periferia da cortical óssea remanescente (setas). B) Icariin 7 dias – presença de tecido de granulação e neoformação óssea na periferia e para o centro do defeito (seta). C) Controle 14 dias – neoformação óssea localizada próximo ao defeito (seta). D) Icariin 14 dias – neoformação óssea com características de osso maduro na periferia e para a região central (seta); E) Controle 21 dias – neoformação óssea (seta); F) Icariin 21 dias – neoformação óssea mais exuberante para a região central (seta); G) Controle 42 dias – neoformação óssea e espaços vasculares (seta); H) Icariin 42 dias – neoformação óssea intensa (seta), trabéculas ósseas coalescentes, com características de osso maduro. 100x, 20µm, H&E

5.3 Análise Histomorfométrica

As médias das áreas de neoformação óssea mensurada nos cortes nas três regiões do defeito (caudal, central e frontal) em mm^2 estão apresentadas tabelas 5.5 e 5.6. Os dados foram comparados intergrupos e intragrupos. A figura 5.4 apresenta um gráfico para melhor ilustração das diferenças da neoformação óssea.

Tabela 5.5. Dados descritivos em média $\pm$ desvio padrão da mensuração da área de neoformação óssea (mm^2), comparativamente entre os grupos teste e controle (intergrupos) para cada período de observação. (n=35)

Grupo	Período	n	Média $\pm$ DP (mm^2)	Sig. (p)
Teste	7d	4	0,5745 $\pm$ 0,0787	0,021
Controle		4	0,2883 $\pm$ 0,0219	
Teste	14d	4	1,4044 $\pm$ 0,2063	0,014
Controle		5	0,6457 $\pm$ 0,0908	
Teste	21d	4	2,5256 $\pm$ 0,2127	0,021
Controle		4	1,2438 $\pm$ 0,1978	
Teste	42d	5	3,8447 $\pm$ 0,5787	0,009
Controle		5	1,5836 $\pm$ 0,5261	

Teste de Mann-Whitney- significância $p \leq 0,05$

Figura 5.4 – Gráfico das médias das áreas de neoformação óssea. Valores em mm^2 .

Em ambos os grupos houve diferença estatisticamente significativa na neoformação óssea entre os quatro momentos de observação, quando comparados concomitantemente e identificamos o crescimento dos valores de área de neoformação óssea ao longo do tempo (Tabela 5.6).

Tabela 5.6: Dados descritivos em média $\pm$ desvio padrão da mensuração da área de neoformação óssea (mm^2), comparativamente entre os períodos (intragrupos) para cada grupo experimental (n=30).

Variável	Momento de Observação	n	Média±DP	Sig. (p)
Área de Neoformação Óssea Grupo Teste	7d	4	0,5745±0,0787	0,002
	14d	4	1,4044±0,2063	
	21d	4	2,5256±0,2127	
	42d	5	3,8447±0,5787	
Área de Neoformação Óssea Grupo Controle	7d	4	0,2883±0,0219	0,002
	14d	5	0,6457±0,0908	
	21d	4	1,2438±0,1978	
	42d	5	1,5836±0,5261	
Teste de Kruskal-Wallis				

6 DISCUSSÃO

A neoformação óssea foi significativamente maior nos defeitos ósseos dos animais que receberam o flavonóide, icariin.

Estudos anteriores já sugeriam que este flavonóide teria um potencial osteogênico. Alguns autores comentaram que o icariin está envolvido no aumento da capacidade de formação óssea e na diminuição da atividade de reabsorção óssea (Nian et al., 2009). Acredita-se que mecanismos moleculares estejam envolvidos, como a ativação da sinalização de proteínas morfogenéticas, a indução da expressão de Runx2 (Zhao et al., 2008), a estimulação de proteína morfogenética-2 (Yin et al., 2007; Hsieh et al., 2010) e a síntese de óxido nítrico, (Hsieh et al., 2010).

O flavonóide ainda não havia sido testado em modelos de defeitos ósseos críticos em que a proposta é verificar *in vivo* o potencial osteogênico da substância.

O modelo de defeitos ósseos confeccionados em calvária de ratos Wistar é muito utilizado na literatura em decorrência da sua fácil reprodutibilidade. A calvária destes permite uma padronização adequada dos procedimentos cirúrgicos. Apesar da controvérsia existente em relação ao tamanho do defeito ósseo a ser realizado na calvária, optamos pelo defeito de 8 mm de diâmetro por este ser o modelo de defeito crítico mais utilizado na literatura mundial e por não apresentar regeneração óssea significativa durante o período observacional de 42 dias (Schmitz; Hollinger, 1986; Gomes; Fernandes, 2011; Spicer et al., 2012). É relatado na literatura que mesmo os defeitos de 8 mm de diâmetro possuem certa capacidade de reparo porém, estes defeitos não possuem regeneração total (Schmitz; Hollinger, 1986).

A metodologia para manipulação do flavonóide sob a forma farmacêutica de solução seguiu de forma semelhante o que outros pesquisadores haviam realizado utilizando coelhos e modelos de reparo por distração osteogênica (Wei et al., 2010). A técnica de gavagem, ou alimentação forçada, foi considerada a maneira mais adequada de garantir que os animais recebessem de forma padronizada a dose diária de icariin. Apesar de a gavagem ter sido realizada por uma bioterista experiente, 25 animais morreram por aspiração do soro fisiológico ou

do icariin nessa etapa do trabalho. E isso deve ser considerado no planejamento de novas pesquisas que envolvam esta metodologia.

Os resultados inerentes à avaliação e interpretação radiográfica mostraram que o grupo teste apresentou uma redução mais acentuada nos valores de área do que o grupo controle, sendo estes valores estatisticamente significativos. A histomorfometria confirmou esse resultado por mostrar um maior volume de osso neoformado no grupo teste, em todos os períodos observacionais. Além disso, a análise histológica permitiu observar que o reparo ósseo ocorreu de maneira centrípeta, ou seja, das bordas para o centro da ferida. Alguns cortes mostraram uma projeção de osso no centro da ferida, que poderia sugerir uma neoformação distante da borda. No entanto, aprofundando o corte histológico, verificou-se que esse osso era proveniente da borda da ferida e, portanto foi caracterizado como uma projeção óssea da borda para o centro do defeito.

Complementando a análise histomorfométrica e a radiográfica, a avaliação histomorfológica mostrou que o osso neoformado do grupo teste se mostrou mais maduro, organizado e exibindo trabéculas ósseas coalescentes. Esses resultados estão de acordo com estudos prévios que também evidenciaram uma neoformação óssea mais acentuada e de melhor qualidade em grupos experimentais que receberam o icariin (Nian et al., 2009; Wei et al., 2010). Além disso, pela constante evolução da neoformação óssea observada no grupo teste ao longo de 42 dias, pode-se sugerir que o flavonóide exerce seus efeitos osteogênicos de maneira dependente da dose, conforme relatado anteriormente por outros pesquisadores (Fan et al., 2011). Foi possível observar que dentro do grupo teste a evolução do reparo da ferida cirúrgica mostrou padrões de neoformação óssea mais exuberantes entre cada um dos períodos observacionais do que no grupo controle. Isso pode levar a uma interpretação de que o defeito ósseo sob a influência do icariin reparou mais rápido e com melhor qualidade.

Outra especulação sobre o mecanismo de ação do icariin na neoformação óssea diz respeito à capacidade do flavonóide em diminuir a diferenciação osteoclástica e, conseqüentemente reduzir a quantidade de reabsorção de osso (Hsieh et al., 2011). A análise morfológica do reparo apresentou uma quantidade de osteoclastos menor que no grupo teste, com exceção do período de 14 dias. A amostra pode não ter permitido obter resultados que expliquem o motivo pelo qual isso ocorreu.

Os resultados da análise histomorfométrica corroboraram com aqueles encontrados na análise da área radiográfica do defeito. Houve reparo ósseo no grupo controle, mas ele foi muito menos expressivo do que no grupo teste. Este estudo mostrou resultados promissores em relação ao icariin. No entanto, cabe salientar que a avaliação radiográfica isolada é um método limitado para se identificar a neoformação de osso. A radiografia simples mostra uma imagem bidimensional, sujeita a distorção e que pode apresentar sobreposição de tecidos ósseos e não ósseos. Com o advento das microtomografias, provavelmente será possível identificar com mais precisão o padrão de neoformação óssea nos defeitos (Schortinghuis et al., 2003).

Apesar das limitações quanto aos resultados que podem ser obtidos pelas avaliações das radiografias, a complementação das análises utilizando-se a interpretação morfológica dos tecidos em reparo e a mensuração mais objetiva da quantidade de osso formado pela histomorfometria tornam os resultados mais confiáveis. Isso pode ser comprovado pelas imagens radiográficas que, no grupo controle não apresentavam áreas radiopacas que pudessem sugerir neoformação óssea. Entretanto a histomorfometria e a histomorfologia conseguiram evidenciar formação óssea mesmo que imatura.

Pelos resultados promissores que o icariin tem mostrado com as pesquisas recentes envolvendo o tecido ósseo e as células osteoblásticas, seria interessante testar o flavonóide em uma pesquisa envolvendo seres humanos. Por exemplo, empregar o flavonóide após exodontias com a finalidade de acelerar a reparação dos alvéolos como foi visto e até mesmo melhorar a qualidade do osso neoformado para posterior reabilitação por meio de implantes dentários. No entanto, é importante salientar que, para a realização de uma pesquisa clínica, o icariin deve ser submetido a testes toxicológicos que comprovem a não agressão do flavonol aos demais órgãos e tecidos. Na China, esta substância é utilizada, por alguns pesquisadores, no tratamento adjunto de fraturas ósseas e na osteoporose e, tais pesquisas não relataram reações adversas ao uso do icariin (Zhang et al., 2007). No entanto, alguns trabalhos em cultura de células mostram que determinadas doses do flavonóide podem apresentar características de citotoxicidade à célula em investigação (Hsieh et al., 2010; Fan et al., 2011; Hsieh et al., 2011).

O desenvolvimento de substâncias auxiliares na reparação tecidual óssea ou biomateriais que substituam, induzam ou melhorem a qualidade da

neoformação de osso são importantes para prevenir a necessidade de remoção de enxertos autógenos, diminuindo riscos, desvantagens e complicações inerentes a esse procedimento.

7 CONCLUSÃO

O estudo permitiu concluir que, do ponto de vista radiográfico, histomorfológico e histomorfométrico, os defeitos ósseos críticos apresentaram neoformação óssea mais expressiva quando influenciados pela administração sistêmica do icariin.

REFERÊNCIAS¹

Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev Bras Cienc Farm*. 2005 Mar; 41(1): 27-51.

Bianchi B, Ferri A, Ferrari S, Leporati M, Copelli C, Ferri T, Sesenna E. Mandibular resection and reconstruction in the management of extensive ameloblastoma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2013 Mar;71(3):528-37.

Block MS, Haggerty CJ, Fisher GR. Nongrafting implant options for restoration of the edentulous maxilla. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Apr;67(4):872-81.

Carson JS, Bostrom MP. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury*. 2007 Mar;38 Suppl 1:S33-7. Review.

Carter D, Beaupre´G, Giori N, Helms J. Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 1998;355(suppl):S41–55.

Dempster DW. New concepts in bone remodeling. In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP. *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. San Diego: Academic Press; 1999. Cap. 18, p.261-73.

Efeoglu C, Burke JL, Parsons AJ, Aitchison GA, Scotchford C, Rudd C, et al. Analysis of calvarial bone defects in rats using microcomputed tomography: potential for a novel composite material and a new quantitative measurement. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Dec;47(8):616-21.

Epari DR, Kassi JP, Schell H, Duda GN. Timely fracture-healing requires optimization of axial fixation stability. *J Bone Joint Surg Am*. 2007 Jul;89(7):1575-85.

¹De acordo com o Estilo Vancouver

Fan JJ, Cao LG, Wu T, Wang DX, Jin D, Jiang S, et al. The dose-effect of icariin on the proliferation and osteogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cells. *Molecules*. 2011 Dec 6;16(12):10123-33.

Foster RD, Anthony JP, Sharma A, Pogrel MA. Vascularized bone flaps versus nonvascularized bone grafts for mandibular reconstruction: an outcome analysis of primary bony union and endosseous implant success. *Head Neck*. 1999 Jan;21(1):66-71.

Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim*. 2011 Jan;45(1):14-24.

Guerrier G, Alaqeeli A, Al Jawadi A, Foote N, Baron E, Albustanji A. Reconstruction of residual mandibular defects by iliac crest bone graft in war-wounded Iraqi civilians, 2006-2011. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Jun 28.

Herford AS, Boyne PJ. Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Apr;66(4):616-24.

Hsieh TP, Sheu SY, Sun JS, Chen MH, Liu MH. Icariin isolated from *Epimedium pubescens* regulates osteoblasts anabolism through BMP-2, SMAD4, and Cbfa1 expression. *Phytomedicine*. 2010;17(6):414-23.

Hsieh TP, Sheu SY, Sun JS, Chen MH. Icariin inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by suppression of MAPKs/NF- κ B regulated HIF-1 α and PGE₂ synthesis. *Phytomedicine*. 2011;18(2-3):176-85.

Huang J, Yuan L, Wang X, Zhang TL, Wang K. Icaritin and its glycosides enhance osteoblastic, but suppress osteoclastic, differentiation and activity in vitro. *Life Sci*. 2007;81(10):832-40.

Iino M, Fukuda M, Nagai H, Hamada Y, Yamada H, Nakaoka K, et al. Evaluation of 15 mandibular reconstructions with Dumbach Titan Mesh-System and particulate cancellous bone and marrow harvested from bilateral posterior ilia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Apr;107(4):e1-8.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1990.

Keskin M, Kelly CP, Moreira-Gonzales A, Loboeki C, Yarim M, Kaplan S, et al. Repairing critical-sized rat calvarial defects with a periosteal cell-seeded small intestinal submucosal layer. *Plast Reconstr Surg*. 2008;122(2):400-9.

Klein P, Schell H, Streitparth F, Heller M, Kassi JP, Kandziora F et al. The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. *J Orthop Res*. 2003 Jul;21(4):662-9.

Kubler N, Michel C, Zoller J, Bill J, Muhling J, Reuther J. Repair of human skull defects using osteoinductive bone alloimplants. *J Craniomaxillofac Surg*. 1995; 23(6):337-46.

López-Arcas JM, Arias J, Del Castillo JL, Burgueño M, Navarro I, Morán MJ, Chamorro M, Martorell V. The fibula osteomyocutaneous flap for mandible reconstruction: a 15-year experience. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Oct;68(10):2377-84.

Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R et al. The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials*. 2011 May;32(15):3855-61.

Manson PN, Crawley WA, Hoopes JE. Frontal cranioplasty: risk factors and choice of cranial vault reconstructive material. *Plast Reconstr Surg*. 1986;77(6):888-904.

Marx RE, Garg AK. Bone structure, metabolism and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent*. 1998; 7(4):267-76.

Mcsheehy PM, Chambers TJ. Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factors that stimulates osteoclastic bone resorption. *Endocrinology*. 1986;119:1654-9.

Melcher AH. Repair of wound in the periodontium of the rat. Influence of the periodontal ligament on osteogenesis. *Arch Oral Biol*, 1970; 15:1183-204.

Mokbel N, Bou Serhal C, Matni G, Naaman N. Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. *Oral Maxillofac Surg*. 2008. Jul;12(2):73-8.

Mücke T, Haarmann S, Wolff KD, Hölzle F. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaws treated by surgical resection and immediate osseous microvascular reconstruction. *J Craniomaxillofac Surg*. 2009 Jul;37(5):291-7.

Nian H, Ma MH, Nian SS, Xu LL. Antiosteoporotic activity of icariin in ovariectomized rats. *Phytomedicine*. 2009;16(4):320-6.

Okoje VN, Obimakinde OS, Arotiba JT, Fasola AO, Ogunlade SO, Obiechina AE. Mandibular defect reconstruction with nonvascularized iliac crest bone graft. *Niger J Clin Pract*. 2012 Apr-Jun;15(2):224-7.

Parfitt A, Drezner M, Glorieux F, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987;2:595–610.

Qian G, Zhang X, Lu L, Wu X, Li S, Meng J. Regulation of Cbfa1 expression by total flavonoids of *Herba epimedii*. *Endocr J*. 2006;53(1):87-94.

Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Biol Chem*. 2010 Aug 13;285(33):25103-8.

Raisz LG, Rodan GA. Embriology and cellular biology of bone. In: Avioli LV, Krane SM. Metabolic bone disease. 3^a ed, San Diego: Academic Press; 1998. Cap.1, p. 1-22.

Resolução CFO-63/2005. Conselho Federal de Odontologia. Diário Oficial da União. Seção I, de 19/04/2005. Pág. 104.

Roberts WE, Turley PK, Brezniak N, Fielder PJ. Implants: Bone physiology and metabolism. CDA J 1987;15(10):54-61.

Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop Relat Res. 1986 Apr;(205):299-308.

Schortinghuis J, Ruben J, Meijer H, Bronckers AL, Raghoobar G, Stegenga B. Microradiography to evaluate bone growth into a rat mandibular defect. Arch Oral Biol 2003;48:155–60.

Sen CK, Roy S. Redox signals in wound healing. Biochem Biophys Acta 2008 Nov;1780(1):1348-61.

Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. Eur Cell Mater. 2008 Apr 1;15:53-76.

Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: the cellular picture. Semin Cell Development Biol. 2008;108(1):5-13.

Simões, CMO Schenkel EP; Gosmann G; Mello JCP; Mentz LA; Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6^a ed. Porto Alegre: Ed. Universidade UFRGS;2007.

Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc.* 2012 Oct;7(10):1918-29.

Stella JP, Warner MR. Sinus slot technique for simplification and improved orientation of zygomaticus dental implants: a technical note. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2000. Nov-Dec;15(6):889-93.

Tideman H, Samman N, Cheung LK. Functional reconstruction of the mandible: a modified titanium mesh system. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1998 Oct;27(5):339-45.

Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K. Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. *Arch Oral Biol.* 2012 Nov;57(11):1545-50.

Trivellato AE, Montoro JR, Tavares MG, Melo DH, Franco Rde L, Mello-Filho FV, et al. Mandibular ameloblastoma treated by bone resection and immediate reconstruction. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2008 Jan-Feb;74(1):155-7.

Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: Which are the important molecules? *Injury.* 2007 Mar;38 Suppl 1:S11-25.

Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science.* 1965;150:893-899.

Vignery A, Baron R. Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. *Anat Rec.* 1980;196:191-200.

Xue L, Jiao L, Wang Y, Nie Y, Han T, Jiang Y, et al. Effects and interaction of icariin, curculigoside, and berberine in er-xian decoction, a traditional chinese medicinal formula, on osteoclastic bone resorption. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012; 2012:490843.

Wei H, Zili L, Yuanlu C, Biao Y, Cheng L, Xiaoxia W, et al. Effect of icariin on bone formation during distraction osteogenesis in the rabbit mandible. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010;40(4):413-8.

Yin XX, Chen ZQ, Liu ZJ, Ma QJ, Dang GT. Icariine stimulates proliferation and differentiation of human osteoblasts by increasing production of bone morphogenetic protein 2. *Chin Med J*. 2007;120(3):204-210.

Zemann W, Feichtinger M, Kowatsch E, Kärcher H. Extensive ameloblastoma of the jaws: surgical management and immediate reconstruction using microvascular flaps. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Feb;103(2):190-6.

Zhang D, Zhang J, Fong C, Yao X, Yang M. Herba epimedii flavonoids suppress osteoclastic differentiation and bone resorption by inducing G2/M arrest and apoptosis. *Biochimie*. 2012 Dec;94(12):2514-22.

Zhang G, Qin L, Shi Y. Epimedium-derived phytoestrogen flavonoids exert beneficial effect on preventing bone loss in late postmenopausal women: a 24-month randomized, double-blind and placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res*. 2007 Jul;22(7):1072-9.

Zhang X, Guo Y, Li XD, Wang R, Fan HS, Xiao YM, et al. The effect of loading icariin on biocompatibility and bioactivity of porous β -TCP ceramic. *J Mater Sci Mater Med*. 2011 Feb;22(2):371-9.

Zhao J, Ohba S, Shinkai M, Chung UI, Nagamune T. Icariin induces osteogenic differentiation in vitro in a BMP- and Runx2-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;369(2):444-8.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **88** nas fls. **106** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Maria Cristina Zindel Deboni**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*O uso do icariin sistêmico no reparo de defeitos ósseos-estudo em ratos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Rafael Augusto Burim, Daniel Falbo, Camilla Vieira Esteves dos Santos**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **25.08.2011**, com validade de **1** anos.

São Paulo, 30 de agosto de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

ANEXO B – Dados originais da histomorfometria.

Grupo Controle (n=18)

Animal	Área de neoformação L1	Área de neoformação L2	Área TOTAL de neoformação óssea POR ANIMAL (L1+L2)
d-1-7 dias	0,1818	0,1201	0,3019
d-2-7 dias	0,1406	0,1568	0,2974
d-3-7 dias	0,1151	0,1406	0,2557
d-4-7 dias	0,1320	0,1665	0,2985
d-6-14 dias	0,2025	0,3554	0,5579
d-7-14 dias	0,3631	0,3756	0,7387
d-8-14 dias	0,2838	0,2550	0,5388
d-9- 14 dias	0,3703	0,3269	0,6972
d-10-14 dias	0,2749	0,4212	0,6960
d-11-21 dias	0,7072	0,6769	1,3841
d-12-21 dias	0,6327	0,3217	0,9544
d-13-21 dias	0,7027	0,6532	1,3559
d-14-21 dias	0,5579	0,7229	1,2808
d-16-42 dias	1,0263	0,8869	1,9132
d-17-42 dias	0,6884	0,5681	1,2565
d-18-42 dias	0,3558	0,6785	1,0343
d-19-42 dias	1,2674	1,0587	2,3261
d-20-42 dias	0,5956	0,7922	1,3878

Grupo Teste (n=17)

Animal	Área de neoformação L1	Área de neoformação L2	Área TOTAL de neoformação óssea POR ANIMAL (L1+L2)
i-41-7 dias	0,3062	0,2910	0,5972
i-42-7 dias	0,3329	0,3213	0,6542
i-43-7 dias	0,2444	0,2221	0,4665
i-44-7 dias	0,2816	0,2987	0,5803
i-46-14 dias	0,6602	0,6609	1,3211
i-47-14 dias	0,7467	0,7028	1,4495
i-48-14 dias	0,5374	0,6433	1,1807
i-49-14 dias	0,8256	0,8409	1,6665
i-51-21 dias	1,2305	1,1321	2,3626
i-52-21 dias	1,5733	1,1218	2,6951
i-53-21 dias	1,4471	1,2759	2,7230
i-54-21 dias	1,0823	1,2396	2,3219
i-56-42 dias	2,0730	2,0422	4,1152
i-57-42 dias	2,2402	2,1622	4,4024
i-58-42 dias	1,1021	1,8369	2,9390
i-59-42 dias	1,6989	1,9274	3,6263
i-60-42 dias	1,8524	2,2881	4,1405

ANEXO C – Dados originais da histomorfologia – Grupo Controle n=18

Período	Animal	Infiltrado Inflam.	Tecido de Granulação	Necrose	Osteoclastos	Vasos Neoformados	Neoformação Óssea	Coágulo
7 dias	1	1	4	0	3	3	2	0
	2	1	3	1	3	3	2	1
	3	1	4	1	2	2	2	1
	4	1	3	2	3	3	2	2
	Média	1	3,5	1	3	3	2	1
14 dias	1	1	3	0	1	3	3	2
	2	1	3	0	1	3	2	1
	3	1	3	0	1	3	2	3
	4	1	3	0	1	3	1	3
	5	1	3	0	1	3	2	2
	Média	1	3	0	1	3	2	2,5
21 dias	1	1	3	1	4	3	3	1
	2	1	3	0	3	3	3	1
	3	1	3	0	2	3	3	1
	4	1	3	0	3	3	3	1
	Média	1	3	0	3	3	3	1
42 dias	1	1	3	0	2	3	3	0
	2	1	3	0	2	3	3	1
	3	1	3	0	3	3	3	0
	4	0	3	0	2	3	3	0
	5	0	3	0	3	3	3	1
	Média	1	3	0	2	3	3	0

Grupo Teste n=17

Período	Animal	Infiltrado Inflamatório	Tecido de Granulação	Necrose	Osteoclastos	Vasos Neoformados	Neoformação Óssea	Coágulo
7 dias	1	2	3	1	2	2	2	3
	2	2	3	1	1	2	2	3
	3	1	3	0	3	3	3	0
	4	2	3	0	2	3	3	1
	Média	2	3	0,5	2	2,5	2,5	2
14 dias	1	2	3	0	3	3	3	1
	2	1	3	0	3	3	3	1
	3	1	3	0	3	3	3	1
	4	1	3	0	1	3	3	0
	Média	1	3	0	3	3	3	1
21 dias	1	0	3	0	2	3	4	0
	2	0	3	0	3	3	3	1
	3	1	3	0	3	3	3	1
	4	0	3	0	3	3	4	1
	Média	0	3	0	3	3	3,5	1
42 dias	1	0	3	0	2	3	4	0
	2	0	3	0	1	3	4	0
	3	0	3	0	1	3	4	0
	5	0	3	0	2	3	4	0
	4	0	3	0	1	3	4	0
	Média	0	3	0	1	3	4	0