

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Jimmy Cavalcanti Calixto

**INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DE
SINVASTATINA NA REPARAÇÃO ÓSSEA EM CALVÁRIA
DE RATOS**

Taubaté - SP
2008

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Jimmy Cavalcanti Calixto

**INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DE
SINVASTATINA NA REPARAÇÃO ÓSSEA EM CALVÁRIA
DE RATOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté.

Área de concentração: Prótese dentária

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lia Anbinder

Taubaté - SP
2008

Ficha catalográfica elaborada pelo

SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas / UNITAU

C154i Calixto, Jimmy Cavalcanti

Influência da administração local de sinvastatina na reparação óssea em calvária de ratos / Jimmy Cavalcanti Calixto. - 2008.

75f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Taubaté, Programa de Pós-graduação em Odontologia, 2008.

Orientação: Profa. Dra. Ana Lia Anbinder, Departamento de Odontologia.

JIMMY CAVALCANTI CALIXTO

**INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL DE SINVASTATINA NA
REPARAÇÃO ÓSSEA EM CALVÁRIA DE RATOS**

Dissertação apresentada para obtenção do Título de Mestre pelo Programa de Pós-graduação do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté.
Área de concentração: Prótese Dentária

Data: 16/07/2008

Resultado: APROVADO

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Lia Anbinder, Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Prof. Dra. Ana Christina Claro Neves, Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Prof. Dr. Maximiliano Piero Neisser, UNESP – São José dos Campos

Assinatura: _____

À minha mãe Ianeze e aos meus filhos Thiago e Beatriz

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Taubaté pela disponibilidade de seus laboratórios, biotério e animais para realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Lia Anbinder, pela orientação, dedicação e desprendimento em compartilhar os seus conhecimentos durante todo o trabalho, sem os quais este trabalho não poderia ser realizado.

À Profa. Dra. Ana Christina Claro Neves, pela coordenação e confiança passada durante todo o curso.

Ao Prof. Dr. José Roberto Cortelli, pró-reitor de Pesquisa e Pós-Graduação, pelo apoio durante todo o curso.

À Profa. Dra. Ana Julia Urias Santos, Diretora do Instituto Básico de Biociências, pelo apoio para a realização da parte prática do experimento.

À Profa. Dra. Maria Cristina Cangussu, pela ajuda imprescindível para realização da análise estatística dos dados.

Ao meu colega de turma, Carlos Eugênio Villaboim de Castro Lima, pelo companheirismo, paciência, desprendimento e alegria durante todos esses meses, sem os quais não conseguiria concluir este trabalho.

À Técnica em laboratório Maria de Fátima Pacheco e a Profa. Dra Andréia Milharezzi Abud, responsável pelo Laboratório de Histologia, pela ajuda decisiva para a confecção das lâminas histológicas deste trabalho.

Aos graduandos em Odontologia: João Gabriel Azarias, João Guilherme Arantes e Flávio Monteiro pela ajuda incansável durante os procedimentos cirúrgicos.

À graduanda em Odontologia Lilian Frederico, pela ajuda imprescindível durante as fases cirúrgica e de leitura de resultados desse trabalho.

À Faculdade de Odontologia de São José de Campos - UNESP, na pessoa da Profa. Adjunta Yasmin Rodarte Carvalho, responsável pelo laboratório de Patologia, que cedeu o laboratório para a realização das fotografias histológicas.

Aos Funcionários do biotério da UNITAU: Eliane Lopes de Carvalho, Cleusa Moreira Santos, Pedro Cardoso Júnior, Marcos Antônio Rodrigues Pinto e à veterinária Luciana Cauduro Ximenes pelos cuidados indispensáveis realizados aos animais durante todo o experimento.

À Graduada em Odontologia Rafaela Pio dos Santos de Castro Lima, pela ajuda decisiva em todas as etapas do trabalho.

À FAPESP (processo 07/55508-8) e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

À administradora Suely Louvores pela ajuda decisiva para a finalização deste trabalho.

Aos animais experimentais, sacrificados em nome da ciência.

RESUMO

Diversas alternativas terapêuticas têm sido propostas para a reparação de defeitos ósseos, associadas à cirurgia, como enxertos autógenos, alógenos e aloplásticos, plasma rico em plaquetas e alguns medicamentos. Recentemente foram publicados diversos trabalhos relatando correlação entre o uso de estatinas, medicamentos usados como redutores do nível de colesterol sanguíneo e neoformação óssea. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento local com sinvastatina na reparação de defeitos em calota craniana de ratos. Foram utilizados 48 ratos, nos quais foram confeccionados dois defeitos ósseos de 5mm de diâmetro, um em cada parietal. Os animais foram divididos em três grupos de acordo com o material utilizado no defeito: controle, em que o defeito não foi tratado; sinvastatina, esponja de colágeno embebida com sinvastatina; e carreador, esponja de colágeno e água destilada. O sacrifício ocorreu após trinta ou sessenta dias; as calotas foram removidas, submetidas a exames radiográficos e à preparação histológica de rotina, sendo então realizada análise densitométrica da área do defeito ósseo e histométrica da área de neoformação óssea, com auxílio de um programa computacional para análise de imagens. Os dados foram submetidos à ANOVA e teste t de Student. Tanto na análise densitométrica, como na histométrica, verificou-se ausência de diferença estatística entre os três grupos, em cada período experimental. Aos sessenta dias, os animais do grupo controle apresentaram formação óssea superior que aos trinta dias, o que não aconteceu com aqueles que receberam sinvastatina ou apenas o carreador. Clinicamente, verificou-se formação de crosta necrótica nos animais do grupo sinvastatina. Concluiu-se, de acordo com a metodologia utilizada, que a sinvastatina administrada localmente prejudicou a reparação de defeitos experimentais em calvária de ratos.

Palavras-chave: Sinvastatina. Reparo ósseo. Densitometria. Histomorfometria.

ABSTRACT

Several therapeutic alternatives have been proposed for the healing of bone defects, associated to the surgery, like autogenous, allogeneous and aloplastic grafts, plasma rich in plaques and some drugs. Recently several works were published reporting correlation between the use of statins, drugs used to reduce the level of blood cholesterol, and bone neoformation. The aim of this work was to evaluate the effect of the treatment with simvastatin, locally administered, in the healing of rat calvarial bone defects. There were used 48 rats, in which there were made two bone defects of 5 mm of diameter, one in each parietal bone. The animals were divided in three groups according to the material used in the defect: control, in which the defect was not treated; simvastatin, sponge of collagen soaked with simvastatin; and carrier, sponge of collagen and distilled water. The sacrifice took place after thirty or sixty days; the skulls were removed, subjected to radiographic examinations and to the routine histological preparation, then histometric analysis of the area of the bone defect was carried out, with support of a software for analysis of images. The data were subjected to the ANOVA and test t of Student. Both in the densitometric and in histometric analysis, it was verified the absence of statistical difference between the three groups, in each experimental period. At sixty days, the control animals presented more bone formation than in thirty days, which did not happen with those who received simvastatin or just the carrier. Clinically, it was verified formation of necrotic crust in the animals of the simvastatin group. One concluded, according to the methodology used, that the simvastatin administered locally harmed the repair of experimental defects in calvaria of rats.

Key words: Simvastatin. Bone repair. Densitometry. Histomorfometry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1 ESTUDOS EM ANIMAIS	11
2.2 ESTUDOS EM HUMANOS	28
3 PROPOSIÇÃO	36
4 MATERIAL E MÉTODO	37
4.1 ANIMAIS	37
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	37
4.3 PREPARAÇÃO DO MEDICAMENTO E CARREADOR	38
4.4 REALIZAÇÃO DOS DEFEITOS ÓSSEOS	40
4.5 SACRIFÍCIO	42
4.6 DENSITOMETRIA RADIOGRÁFICA	42
4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMÉTRICA	45
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5 RESULTADOS	48
5.1 ANÁLISE RADIOGRÁFICA	49
5.1.2 Tempo trinta dias	49
5.1.3 Tempo sessenta dias	50
5.1.4 Comparação entre os tempos trinta e sessenta dias	51
5.2 ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS	52
5.2.1 Análise histométrica	52
5.2.1.1 Tempo trinta dias	53
5.2.1.2 Tempo sessenta dias	54
5.2.1.3 Comparação entre os tempos trinta e sessenta dias	55
5.2.2 Análise histológica descritiva	56
5.2.2.1 Grupo controle aos trinta e sessenta dias	56
5.2.2.2 Grupo carreador aos trinta e sessenta dias	57
5.2.2.3 Grupo sinvastatina aos trinta e sessenta dias	58
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXO	75

1 INTRODUÇÃO

Defeitos ósseos podem ser decorrentes de inúmeras causas, tais como patologias, traumas ou reabsorções ósseas. Quase sempre são identificados através de exames de imagens, e podem ter dimensões variadas. Esses defeitos constituem lesões de grande interesse no campo da Odontologia e têm sido um desafio nas áreas de cirurgia bucomaxilofacial, implantodontia, ortodontia, periodontia e prótese. O tecido ósseo tem notável capacidade de reparação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; MOURAD, 1997), entretanto, em casos de defeitos extensos em humanos isto nem sempre ocorre.

Atualmente, o enxerto autógeno tem sido o material de escolha para o reparo de grandes defeitos ósseos, entretanto, existem alguns problemas associados ao uso desta técnica, tais como: necrose do sítio doador e difícil controle da reabsorção do enxerto. Quanto ao uso de enxertos alógenos, existe a possibilidade de respostas imunológicas e/ou contaminação, enquanto que, os enxertos aloplásticos não promovem reparo ósseo adequado (SWEENEY et al., 1995).

Outras alternativas para o reparo de defeitos ósseos têm sido testadas, como as substâncias indutoras de neoformação óssea, tais como proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) associadas com biomateriais (AABOE et al., 1998) usadas localmente, ou ainda medicação sistêmica como a calcitonina (ARISAWA et al., 2000).

As estatinas são medicamentos que têm sido utilizados nos últimos dez anos como redutores de colesterol na corrente sangüínea. Entretanto, recentemente, estudos vêm relatando a ação dessas substâncias na formação óssea (MUNDY et

al., 1999), por meio da estimulação da BMP-2 (JADHAV; JAIN, 2006; MUNDY et al., 1999; SUGIYAMA et al., 2000).

A sinvastatina é uma estatina semi-sintética que vem sendo amplamente estudada e se destaca por promover menos efeitos adversos que as demais, apresentar efeito redutor do colesterol e ter ação indutora de neoformação óssea (WONG; RABIE, 2005a), sozinha ou associada com outras substâncias tais como plasma de O₂ (YOSHINARI et al., 2006).

Desta maneira, o presente trabalho teve como objetivo estudar a influência da sinvastatina administrada localmente na reparação de defeitos ósseos em calotas cranianas de ratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTUDOS EM ANIMAIS

A primeira estatina relatada foi a mevastatina por Endo et al.(1976). Foi isolada em culturas de fungos e atua especificamente sobre uma enzima a HGM-COA redutase, limitando o metabolismo do colesterol. Esta descoberta provocou uma revolução no tratamento da hipercolesterolemia, um dos principais fatores de doença coronariana. Desde esta descoberta outras estatinas foram formuladas tais como: sinvastatina, lovastatina, pravastatina, cerivastatina, atorvastatina e outras.

Osteoporose e outras doenças caracterizadas por perda óssea são importantes problemas de saúde pública. Apesar do recente sucesso das substâncias que inibem a reabsorção óssea, existe necessidade da descoberta de um medicamento não tóxico que promova aumento de formação óssea em indivíduos que já apresentam perda substancial deste tecido. Desta maneira, Mundy et al. (1999) estudaram o aumento da neoformação óssea decorrente do uso de estatinas *in vitro* e *in vivo* em roedores. Foram examinados mais de trinta mil compostos naturais em cultura de células ósseas e identificada a lovastatina como o único produto natural capaz de aumentar a produção de BMP-2, que estimula o crescimento ósseo. Para investigar os efeitos biológicos das estatinas no osso, foram adicionadas à cultura de células de calvária murina neonatal, lovastatina, sinvastatina, fluvastatina e mevastatina. A quantidade de osso neoformado pelas estatinas foi aumentada, aproximadamente, duas a três vezes. Os autores testaram também a influência desses medicamentos no tecido ósseo *in vivo*. Para isso, foram injetadas lovastatina e sinvastatina, via subcutânea, em calvária de camundongos

machos, na dose de 5 ou 10mg/kg/dia, três vezes ao dia, durante cinco dias. Foi observado um aumento de 50% de osso neoformado em relação ao grupo controle. Os autores testaram também as estatinas em ratas com e sem ovariectomia, para simular os efeitos da menopausa nas mulheres, situação em que a osteoporose ocorre freqüentemente. Os animais receberam doses, via oral, de 5 a 50mg/kg/dia, durante 35 dias. Após análise histomorfométrica, foi verificado aumento de 39 a 94% no volume do osso trabecular pós-tratamento. Os autores não excluíram a possibilidade das estatinas, além de promoverem o aumento do crescimento ósseo, inibirem a reabsorção óssea, embora tenham observado que o efeito na reabsorção foi menor que o efeito no aumento da nova formação óssea. Os autores relataram que as estatinas devem ser mais investigadas como agentes anabólicos para o osso.

Maeda et al. (2001) avaliaram o efeito da sinvastatina na diferenciação osteoblástica, em cultura de células semelhantes aos osteoblastos e células da medula óssea de rato. A sinvastatina aumentou a atividade da fosfatase alcalina e mineralização em uma relação dose e tempo dependente. Este efeito estimulador foi observado com baixas doses. Na análise de *Northern Blot* foi mostrado que a estatina aumenta a produção de BMP-2 em células parecidas com osteoblastos, como também aumentam mRNA para colágeno tipo-I. Esses resultados indicam que a sinvastatina tem efeito anabólico no osso através da promoção de diferenciação osteoblástica, sugerindo que pode ser usada para tratamento de doenças metabólicas do osso, como a osteoporose.

Maritz et al. (2001) observaram os efeitos das estatinas no tecido ósseo em ratos. Utilizaram animais com e sem ovariectomia e diversas dosagens de sinvastatina (1, 5, 10 e 20mg/kg); atorvastatina (2,5mg/kg) e pravastatina (10mg/kg)

por via oral. Foram realizados exames histomorfométricos e de densitometria óssea dos fêmures dos animais. Os autores concluíram que: 1 - as estatinas diminuem a densidade mineral óssea em ratos; 2 - altas doses de sinvastatina aumentam a formação e reabsorção óssea; 3 - baixas doses de sinvastatina diminuem a formação óssea e aumentam a reabsorção óssea; 4 - os efeitos da sinvastatina observados nos exames histomorfométricos diferem nas diferentes dosagens; 5 - os efeitos da sinvastatina observados em ratas ovariectomizadas não são observados em ratas sem ovariectomia; 6 - a sinvastatina é incapaz de prevenir perda óssea causada por ovariectomia em ratas.

Junqueira et al. (2002) avaliaram o efeito da sinvastatina em regeneração óssea guiada em mandíbulas de ratas ovariectomizadas e nos níveis de colesterol no sangue. Para isso usaram setenta ratas que foram divididas em dois grupos: controle e tratado, sendo que em ambos existiam ratas ovariectomizadas ou não. Um mês depois da ovariectomia, foi confeccionado um defeito ósseo mandibular que foi coberto com membrana politetrafluoretileno. O grupo tratado recebeu sinvastatina (20mg/kg) via oral, por 15 ou trinta dias. Os ratos foram sacrificados em 15, trinta ou sessenta dias depois da cirurgia. A mandíbula foi utilizada para análise densitométrica e histomorfométrica. Os animais ovariectomizados apresentaram maior nível de colesterol que os demais, sem diferença entre os períodos de tratamento e tempo do sacrifício. Nos animais ovariectomizados tratados com sinvastatina houve maior neoformação óssea que nos animais do grupo controle ovariectomizado. Concluiu-se que a deficiência de estrógeno aumenta o nível de colesterol no sangue e que a sinvastatina estimula a formação de novo osso apenas nos animais ovariectomizados.

Anbinder et al. (2002) avaliaram a influência da sinvastatina na densidade óssea em tíbias de ratos. Foram utilizados vinte ratos machos, divididos em grupos tratado e controle. Os dez animais do grupo tratado receberam 20mg/kg de sinvastatina macerada em água filtrada, via oral, diariamente, enquanto os animais do grupo controle receberam apenas água filtrada. O sacrifício ocorreu após períodos de 15 ou trinta dias, quando a densidade óptica no centro da região de maior extensão látero-medial do terço médio da tíbia foi avaliada, usando-se um fotodensitômetro digital. Maiores valores de densidade óssea foram encontrados nos animais do grupo tratado.

Thylin et al. (2002) avaliaram os efeitos da sinvastatina em gel no tecido ósseo de calvária de ratos. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: G1, com somente injeção subcutânea de gel de metilcelulose sobre a calvária (INJ-GEL, n=8), G2, injeção de gel com sinvastatina (INJ- SIN, 2,2mg, n=16), G3, membrana sozinha com gel implantada sobre a calvária (MEM-GEL, n= 10), G4, membrana contendo gel e sinvastatina (MEM-SIN, n=10) e G5, ratos não tratados (n=12). Os animais foram sacrificados depois de 22 ou 44 dias, a calvária foi descalcificada e submetida à análise histomorfométrica. No grupo G2 (INJ-SIN) houve aumento de 53% a 83% na espessura do osso comparado ao G1, enquanto que no G4 (MEM-SIN) verificou-s aumento de 159% a 172% da área óssea comparada ao G3 (MEM-GEL). Neste estudo uma única alta dose de sinvastatina em gel pôde estimular a formação de osso de calvária murina, particularmente quando colocada embaixo de uma membrana oclusiva. Tais procedimentos devem ser mais investigados para um possível desenvolvimento de terapia periodontal.

Wong e Rabie (2003) compararam a quantidade de osso formado após enxerto de esponja de colágeno com sinvastatina e somente com a esponja de

colágeno em defeitos ósseos em coelhos. Foram utilizados nove animais adultos, nos quais foram criados, ao todo, 15 defeitos no osso parietal. Os animais foram divididos em três grupos: cinco defeitos foram preenchidos com 0,2ml de sinvastatina dissolvida em água (2,5mg/ml) e misturada à esponja absorvível de colágeno; outros cinco defeitos foram enxertados com esponja absorvível de colágeno misturada à água (controle positivo) e, os cinco defeitos restantes foram deixados vazios (controle negativo). Os animais foram sacrificados no décimo quarto dia e os defeitos foram preparados para a avaliação histológica. O resultado foi de um aumento de 308% de novo osso em defeitos com enxertos de colágeno com sinvastatina comparados àqueles enxertos somente com colágeno. Nenhum osso foi formado no grupo controle negativo. Os enxertos de colágeno com estatina foram osteoindutores e podem ser usados como material para enxertos em defeitos ósseos.

Pytlik et al. (2003) estudaram o efeito da sinvastatina no desenvolvimento da osteopenia causada por ovariectomia em ratas. Utilizaram para isso quarenta ratas divididas em seis grupos: grupo 1 – ovariectomia simulada; grupo 2 – ovariectomia simulada em que foram administrados 3mg/Kg de sinvastatina por via oral diariamente; grupo 3 - ovariectomia simulada em que foram administrados por via oral 6mg/kg de sinvastatina diariamente; grupo 4 – ovariectomia; grupo 5 – ovariectomia e administrados por via oral 3mg/Kg de sinvastatina diariamente; grupo 6 – ovariectomia e administrados por via oral 6mg/Kg de sinvastatina diariamente. Em todos os grupos foram examinados os seguintes parâmetros: ganho de peso, comprimento e diâmetro da tíbia e fêmur, resistência do colo do fêmur e largura da secção transversa da tíbia. Os animais foram sacrificados após 28 dias. A sinvastatina administrada (3 e 6mg/Kg) nos grupos em que foi simulada a

ovariectomia pouco influenciou na remodelação óssea, contudo nos grupos ovariectomizados tratados, houve aumento significativo de neoformação óssea e diminuição da reabsorção induzida pela ovariectomia, principalmente com a dose de 6mg/Kg.

Song et al. (2003) investigaram o efeito da sinvastatina na diferenciação osteoblástica e adiposa em cultura de células da medula óssea de camundongos, *in vitro*. As células foram cultivadas com e sem sinvastatina e realizaram-se exames para quantificar diversos marcadores bioquímicos ósseos. Houve um aumento significativo de osteocalcina, osteopontina e da fosfatase alcalina. Por outro lado, houve uma significativa inibição da diferenciação adiposa nas células tratadas com sinvastatina. Também foi observado que a sinvastatina aumentou significativamente a expressão da BMP-2. Concluiu-se que a sinvastatina aumentou a diferenciação osteoblástica e inibiu a diferenciação adiposa em células do estroma de medula óssea de camundongos.

Para examinar o potencial efeito anabólico das estatinas na formação de osso Von Stechow et al. (2003) compararam a atividade da sinvastatina com o conhecido efeito anabólico de paratormônio (PTH). Para isso foram utilizados camundongos ovariectomizados, que permaneceram sem tratamento durante cinco semanas para permitir o desenvolvimento de osteopenia. Logo em seguida, foram tratados por oito semanas, e o fêmur foi analisado por microtomografia computadorizada. Depois de 13 semanas de estudo, os animais foram sacrificados e os animais tratados com PTH (80µg/kg/dia) apresentaram maior quantidade de osso trabecular que o grupo controle. Contudo, a mesma comparação para o grupo tratado com sinvastatina (10mg/kg/dia) não mostrou diferença significativa. Na análise de osteocalcina do soro, demonstrou-se que nenhuma formação de osso ou atividade osteoblástica foi

significativamente aumentada pela sinvastatina neste estudo *in vivo*. Os autores relataram que, enquanto o PTH demonstrou o esperado efeito anabólico, a sinvastatina falhou no estímulo à formação de osso, apesar de ter sido verificada a presença do seu metabólito ativo no soro. Enquanto que as estatinas têm claro efeito na formação de osso *in vitro*, alterações são necessárias na formulação das estatinas existentes para uma melhor eficácia *in vivo*.

Ayukawa et al. (2004) examinaram o efeito da sinvastatina na osteogênese em volta de implantes de titânio. Utilizaram para isso dez ratos que receberam implantes de titânio puro em ambas as tíbias, e foram divididos em dois grupos. No grupo experimental, foi administrada sinvastatina intraperitonealmente na dose 10mg/Kg, diariamente durante trinta dias; no grupo controle foi administrada solução salina isotônica intraperitonealmente durante o mesmo período. Os animais foram sacrificados depois de trinta dias e foi realizada histomorfometria óssea e a análise da área de contato ósseo com o implante. No grupo controle foi observado osso, mas também tecido conjuntivo interposto entre o osso e o implante. Em contraste, no grupo experimental foi observado osso em maior quantidade. A densidade óssea e a taxa de contato ósseo com os implantes no grupo experimental eram significativamente maiores do que no grupo controle. Os autores concluíram que a sinvastatina pode ter o potencial para melhorar a osteointegração dos implantes.

Oxlund e Andreassen (2004) avaliaram o efeito da sinvastatina no aumento da formação de osso cortical em ratas ovariectomizadas. Para isso usaram sessenta ratas, que foram divididas em quatro grupos de 15 animais: grupo 1, controle com sacrifício no dia zero; grupo 2, em que foi realizada ovariectomia simulada e os animais receberam placebo; grupo 3, com ratas ovariectomizadas tratadas com placebo; grupo 4, com ratas ovariectomizadas que receberam sinvastatina 20mg/kg

diariamente, duas vezes ao dia, por um tubo gástrico, durante três meses. A resistência da diáfise da tíbia aumentou em 8% e a taxa de formação do osso no meio da diáfise aumentou em duas vezes no grupo 4, comparado com o grupo 3. O volume de osso na proximal da tíbia e corpo vertebral foram reduzidos nos grupos 3 e 4, mas, a redução foi menor no grupo 4. Esta redução na perda do osso esponjoso epifisário está em concordância com a diminuição em 36% da atividade da fosfatase ácida, indicando uma diminuição da atividade osteoclástica no grupo 4 comparado com o grupo 3. Concluíram que a sinvastatina induziu a um moderado aumento na formação de osso cortical e reduziu a perda de osso esponjoso induzida pela ovariectomia.

Wong e Rabie (2005a) estudaram a osteogênese induzida pelas estatinas. Para isso examinaram a expressão histológica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), da proteína morfogenética do osso e o fator de ligação (CBFa-1) no reparo ósseo com e sem sinvastatina. Foram confeccionados, ao todo, trinta defeitos ósseos no osso parietal de quinze coelhos, que foram divididos em dois grupos. No grupo tratado, os defeitos foram preenchidos com esponja colágeno embebida em 0,2ml de solução de sinvastatina (2,5mg/ml) e no outro grupo, os defeitos foram preenchidos com esponja de colágeno embebida com água. Os animais foram sacrificados após um à seis dias da cirurgia. Após estudos de imunohistoquímica, verificou-se que nos defeitos com sinvastatina, o VEGF foi expresso no terceiro dia pós-cirurgia; BMP-2, no quarto dia, e CBFa no quinto dia, quando também se iniciou a formação de novo osso. Todos esses eventos ocorreram um dia antes no grupo tratado, quando comparado àquele que recebeu a esponja de colágeno sozinha. As estatinas induziram e aceleraram a formação de

osso no local, provocando o início da expressão dos fatores de crescimento que regulam a angiogênese, diferenciação das células ósseas e osteogênese.

Wong e Rabie (2005b) realizaram um outro estudo em que foi analisado o padrão histológico da cicatrização de defeitos ósseos tratados com e sem sinvastatina. Examinaram para isso 14 coelhos em que foram realizados 28 defeitos ósseos de 10x5mm nos ossos parietais. Os animais foram divididos em dois grupos: experimental, em que os defeitos ósseos foram preenchidos com matriz de colágeno e 0,2ml de sinvastatina na concentração de 2,5mg/ml; controle, em que foi colocada apenas matriz de colágeno e 0,2ml de água destilada. Os animais foram sacrificados um, dois, três, quatro, cinco, seis ou 14 dias após as cirurgias. Após avaliações histomorfométricas, observou-se que o osso novo foi formado nos defeitos desde o quinto dia após as cirurgias no grupo experimental, um dia mais cedo que no grupo controle. Os animais que foram sacrificados no décimo quarto dia apresentaram abundante formação óssea nos defeitos. Estes resultados dão suporte para que se afirme que as estatinas induzem e aceleram a formação óssea localmente.

Stein et al. (2005) avaliaram os efeitos do uso local da sinvastatina no crescimento ósseo mandibular e na inflamação. Neste estudo foram avaliados os efeitos de baixas doses de sinvastatina e dos inibidores da síntese de cicloxigenase (COX) na inflamação dos tecidos e no crescimento ósseo. Para isso foram utilizadas ratas adultas que não foram tratadas, ou tratadas com doses únicas de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 ou 2,2mg de sinvastatina em gel de metilcelulose implantado na parte lateral das mandíbulas. No lado oposto da mandíbula, foi implantado somente gel de metilcelulose em uma membrana ácida. O tecido ósseo sob os implantes de cada lado foi avaliado histomorfometricamente depois de três, sete e 24 dias da cirurgia. Os ratos tratados com 0,5mg de sinvastatina, receberam também diariamente uma

injeção intraperitoneal de inibidor de COX-2 (NS-398; 1mg/kg por sete dias, n=16), inibidor geral de COX (indometacina; 1 mg/kg por sete dias; n=16), ou nenhum inibidor da inflamação. As mandíbulas também foram avaliadas histomorfometricamente. Existiu um aumento de 45% na área óssea no grupo tratado com 0,5mg de sinvastatina em comparação ao grupo controle e a inflamação clínica observada foi diminuída em comparação com alta dose de sinvastatina (2,2mg). Para a dose 0,1mg de sinvastatina observou-se que não houve um significativo aumento do crescimento ósseo. Os inibidores de COX (NS-398 e a indometacina) reduziram a inflamação e o crescimento ósseo. Reduzindo a dose de 2,2 para 0,5mg de sinvastatina, reduziu-se a inflamação para um nível mais aceitável clinicamente, sem sacrificar o potencial de crescimento ósseo. A COX associada à inflamação parece ser necessária para o crescimento ósseo *in vivo*.

Von Knoch et al. (2005) investigaram o efeito da sinvastatina na formação óssea em casos de osteólise induzida por partículas de alto peso molecular (polietileno), em calvária de camundongos. Para isso foram utilizados 21 animais divididos em três grupos: grupo I (controle), em que foi simulada a cirurgia na calvária, o que consistia na incisão de 10mm na calvária dos camundongos mantendo o perióstio intacto e confeccionada a sutura; grupo II, em que foi realizada a cirurgia e inseridas partículas de polietileno na calvária; e grupo III, que recebeu os mesmos procedimentos do grupo II e sinvastatina diariamente na dose 120mg/Kg na dieta. Após 14 dias, os animais foram sacrificados e as calvárias removidas para exame histomorfométrico. Os autores concluíram que a sinvastatina promoveu notadamente formação de osso sob partículas de polietileno, podendo ter um efeito anabólico favorável posterior à osteólise local.

Sato et al. (2005) observaram o efeito da aplicação local da sinvastatina com sulfato de cálcio ou com colágeno bovino no alvéolo dentário após exodontia. Para isto utilizaram 36 ratos divididos em seis grupos, de acordo com o material enxertado nos alvéolos dos incisivos direitos das mandíbulas após a extração. No grupo controle não foi colocado nada; o grupo sinvastatina recebeu apenas 2mg de sinvastatina; o grupo colágeno recebeu apenas colágeno bovino; no grupo colágeno-sinvastatina foi aplicado 2mg de sinvastatina e colágeno bovino; no grupo sulfato de cálcio foi colocado apenas sulfato de cálcio; e finalmente, o grupo sinvastatina-sulfato de cálcio recebeu 2mg de sinvastatina com sulfato de cálcio. Os animais foram sacrificados depois de quatro semanas, as mandíbulas foram dissecadas, removidas e submetidas a exames histomorfométricos e radiológicos. Quando a sinvastatina foi aplicada sozinha ou com colágeno bovino, não houve aumento de formação óssea nos alvéolos após extração. Contudo, houve um aumento significativo de formação de osso naqueles alvéolos pós-extração que receberam sulfato de cálcio e sinvastatina. Embora mais estudos sejam necessários, os resultados indicam que a sinvastatina aumenta a formação de osso nos alvéolos após extrações dependendo do carreador usado.

Na busca da melhor forma de administração das estatinas que possa influenciar o tecido ósseo, Gutierrez et al. (2006) avaliaram o efeito da aplicação transdérmica da lovastatina na formação de osso. Para isso, administraram lovastatina por via transdérmica ou oral a ratas ovariectomizadas ou não. A concentração plasmática do medicamento era mais alta e se mantinha por mais tempo quando administrado por aplicação transdérmica. Somente após cinco dias de administração transdérmica de lovastatina houve um aumento de 30 a 60% no volume do osso trabecular e, depois de quatro semanas, foi observado um aumento

de 150% nas taxas de formação de osso. Foi observado também um significativo aumento da osteocalcina no soro. A lovastatina administrada por via transdérmica produz esses efeitos profundos em doses de 1% da dose oral, sem qualquer evidência de hepatotoxicidade ou miotoxicidade.

Galus et al. (2006) examinaram a influência da fluvastatina na indução da formação de osso heteroectópica em camundongos. Foram utilizados cinquenta camundongos nos quais se implantou matriz óssea desmineralizada (DBM) de ratos no músculo da coxa para induzir a ossificação heteroectópica. Após a cirurgia, os animais foram divididos em dois grupos: experimental, em que foram administrados 0,2ml de fluvastatina por via subcutânea durante 25 dias; placebo – em que foram administrados 0,2ml de água fosfatada com pH 7,3, também por via subcutânea, durante 25 dias consecutivos. Após 25 dias de implantação, foram realizadas as análises dos níveis de colesterol total (TC), triglicerídeos, colesterol de baixa densidade e a atividade da fosfatase alcalina. Os animais foram sacrificados após trinta dias. Realizou-se também a medição da massa mineral depositada em torno das áreas implantadas com DBM, por meio de pesagem em balança analítica. No grupo experimental, foi observado aumento significativo na massa mineral nas áreas implantadas e nos níveis da fosfatase alcalina, enquanto que houve diminuição dos níveis de TC e TG, quando comparados com o grupo placebo. Estes resultados mostraram que a administração de estatinas pode afetar a ossificação heteroectópica em camundongos.

Negrão et al. (2006) estudaram o possível efeito das estatinas na mineralização dos tecidos e o provável envolvimento da fosfatase alcalina. Os autores tomaram como base os diversos estudos clínicos e laboratoriais publicados que mostravam uma associação entre as estatinas e o aumento da densidade e/ou

formação óssea, mas sem nenhuma explicação clara sobre como este efeito foi encontrado. Então, frente a essa revisão de estudos, os autores levantaram a hipótese do efeito das estatinas estar relacionado à atividade da fosfatase alcalina, uma enzima com papel importante na mineralização, que pode também contribuir para uma mineralização patológica em outros tecidos, como a calcificação vascular. A experiência dos autores com os efeitos das estatinas sobre a fosfatase alcalina os levou a admitir a possibilidade de se desenvolver uma estatina com efeito crescente em osso, mas não em tecido vascular, sendo necessários mais estudos clínicos para confirmar a conveniência de uma estatina específica para cada condição clínica.

Sugiyama et al. (2007) avaliaram os efeitos de várias estatinas, administradas por via oral ou subcutânea, na osteoindução ectópica causada pela proteína morfogenética óssea recombinante humana 2 (rhBMP-2). Para isso implantaram discos de 5µg de rhBMP-2 no músculo da panturrilha de ratos. A forma de lactona da sinvastatina, a forma de ácido-hidróxido da sinvastatina, cerivastatina ou somente uma solução de carboximetilcelulose de sódio como veículo foram administrados por via oral ou subcutânea por vinte dias. Os discos foram removidos no vigésimo primeiro dia depois da implantação, e a indução da formação de osso ectópico foi avaliada por exames radiográficos, histológicos e bioquímicos. Os resultados mostraram que as áreas radiopacas nas radiografias e o conteúdo de cálcio nos grupos com sinvastatina subcutânea eram significativamente maiores do que nos outros grupos. A atividade da fosfatase alcalina e a atividade da fosfatase ácida tartarato resistente no grupo com sinvastatina subcutânea foram significativamente menores que nos outros grupos. Histologicamente, os exames revelaram um aumento do volume do osso ectópico no grupo com sinvastatina subcutânea. Os autores concluíram que, a administração de sinvastatina subcutânea estimula a

osteoidução ectópica causada pela rhBMP-2 por meio da diminuição da reabsorção óssea.

Özeç et al. (2007) avaliaram o efeito da aplicação local da sinvastatina na reparação de defeitos ósseos em mandíbulas de ratos. Para isso, fizeram defeitos ósseos de 3mm de diâmetro na região do ângulo da mandíbula de 23 animais, que foram divididos em três grupos: no grupo experimental, os defeitos foram preenchidos com sinvastatina dissolvida em água e misturada em uma esponja gelatinosa, no segundo grupo, os defeitos ósseos foram preenchidos com água misturada em uma esponja gelatinosa (controle ativo) e, no último grupo, os defeitos foram deixados vazios (controle passivo). Os animais foram mortos no décimo quarto dia e os defeitos foram preparados para avaliação radiográfica e histológica. A densidade da área de reparação óssea foi avaliada por tomografia computadorizada periférica quantitativa. Os resultados obtidos neste exame mostraram que a densidade na região de reparação óssea do grupo experimental foi maior em 240% em relação ao grupo controle passivo e 190% maior que o grupo controle ativo. Os exames histológicos também mostraram que no grupo experimental houve maior formação de novo osso do que nos grupos controles. Os autores concluíram que a esponja gelatinosa com sinvastatina estimulou a reparação dos defeitos ósseos em mandíbulas de ratos.

Kiliçoglu e Erdemli (2007) investigaram os efeitos da sinvastatina na cicatrização de fraturas em ratos. Utilizaram 54 animais em que foram realizadas fraturas manualmente no terço distal das pernas direitas, e que foram agrupados de acordo com a dose de sinvastatina administrada e o tempo de sacrifício. Utilizaram-se doses de 1mg ou 2mg de sinvastatina, ou apenas solução salina (grupo controle), por via subcutânea, em torno do local fraturado durante cinco dias a partir do dia das

fraturas Os animais foram sacrificados após sete, 14 ou 21 dias, e as tíbias foram dissecadas, removidas e submetidas à análise histomorfométrica. Concluiu-se que o tratamento com sinvastatina das fraturas mostrou um significativo efeito positivo na cicatrização.

Ma et al. (2007) realizaram um estudo para comparar os efeitos da sinvastatina na formação óssea e reabsorção de partículas de cerâmica, em defeitos ósseos realizados em volta de implantes. Para isso utilizaram 162 ratos que receberam nas tíbias implantes de aço inoxidável recobertos com hidroxiapatita e com um colar de Gelfoam e de fosfato tricálcico, onde foram colocados os medicamentos. Os ratos foram divididos em quatro grupos: sinvastatina local (0,1, 0,9 ou 1,7 mg) ; sinvastatina por via oral durante vinte dias (10 ou 50 mg/ kg/ dia); BMP-2 recombinante localmente; e controle. Os animais foram sacrificados após seis ou 26 semanas, então foram realizadas análises histológicas e testes mecânicos. A sinvastatina por via oral não teve nenhum efeito quando comparado com o grupo controle, e localmente, prejudicou o reparo, ao contrário da BMP-2. O efeito das estatinas no reparo dos defeitos ósseos é influenciado pela biodisponibilidade e são necessários mais estudos para que se descubra um sistema de distribuição do medicamento para uso em defeitos ósseos.

Na tentativa de elucidar o mecanismo pelo qual as estatinas estimulam a formação óssea localmente, Bradley et al. (2007) verificaram a associação entre os inibidores de COX-2, BMP-2 e óxido nítrico e a formação de osso *in vivo*. Para isso utilizaram ratas, que receberam 0,5mg de sinvastatina em gel de metilcelulose em um lado da mandíbula e apenas o gel no outro. Foram realizados exames da atividade enzimática para quantificar óxido nítrico, BMP-2, e COX-2, além de análise histomorfométrica para analisar a taxa de formação óssea. Foram administrados

também, intraperitonealmente inibidores de óxido nítrico e de ciclooxigenase-2. Os resultados encontrados pelos autores sugerem que a sinvastatina estimula a formação de BMP-2, óxido nítrico e a taxa de formação óssea regional, ao passo que os inibidores de ciclooxigenase-2 inibem a formação de BMP-2 e reduzem a taxa de formação óssea.

Skoglund e Aspenberg (2007) investigaram os efeitos da sinvastatina na cicatrização de fraturas em camundongos. Utilizaram setenta animais em que foram realizadas fraturas nos fêmures, e que foram agrupados de acordo com a via de administração do medicamento: G1 - vinte animais receberam injeções por via subcutânea, dez receberam veículo e dez veículo e sinvastatina (20mg/kg de peso); G2- trinta animais divididos em três grupos de dez, que receberam continuamente por meio de um dispositivo subcutâneo o veículo, o veículo com 5mg/kg ou 10mg/kg de sinvastatina diariamente; G3 - vinte animais que receberam por meio de uma mini-bomba osmótica colocada no local da fratura; dez receberam veículo e dez veículo e sinvastatina (0,1mg/kg diariamente). Os animais foram sacrificados após 14 dias, os fêmures foram dissecados e submetidos ao teste mecânico de flexão em três pontos. Nenhum efeito foi observado no grupo G1, que recebeu injeções subcutâneas diariamente, contudo no grupo G2 que recebeu continuamente sinvastatina houve um aumento de 160% na força para fratura nos testes de flexão e um aumento de 170% na força para fratura no grupo G3, que recebeu localmente a sinvastatina. Os autores concluíram que houve um efeito positivo nos parâmetros biomecânicos na cicatrização de fraturas quando foi administrada localmente a sinvastatina.

Lee et al. (2008) realizaram um estudo em que foi comparado o efeito local da implantação cirúrgica e de um protocolo de injeções de sinvastatina na formação de

osso em ratos. Foram utilizadas fêmeas em que doses de 0,1; 0,5 ou 1,0mg de sinvastatina em 30 μ l de gel em metilcelulose foram inseridas sob uma membrana ácida em um lado da mandíbula, e no outro lado somente gel de metilcelulose. Esses animais foram comparados com outro grupo de ratas em que 0,5mg de sinvastatina em 50 μ l de gel em metilcelulose foram injetados sobre o periósteo em um lado da mandíbula e o outro lado recebeu somente injeções de gel em metilcelulose. Foram realizadas avaliações na mandíbula em três, sete, 24 e noventa dias por meio de exames histomorfométricos e testes mecânicos (flexão em três pontos). Injeções de 0,5mg de sinvastatina efetivamente reduziram o tecido inflamatório enquanto que preservaram o crescimento ósseo quando comparados com a implantação cirúrgica após 24 dias. Quando foram comparados aos lados controle das mandíbulas, a taxa de formação óssea foi significativamente alta, principalmente nos lados da mandíbula com sinvastatina, especialmente sob membrana. Os resultados dos testes de flexão em três pontos revelaram um grande aumento na força para fratura nos grupos com injeções sinvastatina após 24 dias. Os autores concluíram que injeções de 0,5mg de sinvastatina em gel de metilcelulose podem induzir a um efeito acumulativo na neoformação óssea com pouca inflamação tecidual e sem perder as propriedades mecânicas quando comparado com a implantação cirúrgica do medicamento.

2.2 ESTUDOS EM HUMANOS

Chung et al. (2000) investigaram, em um trabalho retrospectivo, o efeito das estatinas no aumento da densidade mineral óssea em pacientes com diabetes mellitus tipo 2. Revisaram dados de arquivos médicos, e selecionaram 69 pacientes com diabetes tipo 2 divididos em dois grupos: controle (n=33) que não receberam nenhuma estatina; e tratamento (n=36) que receberam lovastatina, pravastatina ou sinvastatina. Foi analisada a densidade mineral óssea da coluna vertebral, fêmur e quadril, após 18 meses. Houve um aumento significativo da densidade mineral óssea dos pacientes que receberam alguma estatina, quando comparados com grupo controle depois de ajustados por idade, sexo e índice de massa corporal. Os autores sugeriram que as estatinas podem aumentar a densidade mineral óssea do fêmur de pacientes com diabetes mellitus tipo 2.

Chan et al. (2001) fizeram um estudo prospectivo para determinar a relação entre o uso de sinvastatina e os diversos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. Foram realizados exames de sangue e urina de 17 pacientes com hipercolesterolemia, antes e depois do tratamento com 20mg de sinvastatina diariamente durante quatro semanas, quando foram medidos a atividade específica da fosfatase alcalina e a concentração de osteocalcina como marcadores de formação óssea. Houve um aumento significante da concentração de osteocalcina no soro depois do tratamento com sinvastatina, ao passo que com relação à atividade de fosfatase alcalina, não foram verificadas mudanças significantes. Com estes dados, concluíram que a sinvastatina causa um efeito benéfico no metabolismo ósseo, refletido pelo aumento da osteocalcina no soro e que esta

potencialidade pode permitir que as estatinas se tornem o primeiro efetivo agente anabólico para tratamento de osteoporose.

Renjmark et al. (2002) observaram os efeitos das estatinas no processo de reabsorção e aposição óssea em mulheres após a menopausa. Foram avaliadas 280 mulheres divididas em dois grupos: experimental – 140 mulheres tratadas com estatinas por mais de dois anos; controle – 140 mulheres não tratadas com estatinas nos últimos dois anos. Foram realizados exames para medir os níveis de paratormônio (PTH), marcadores ósseos (osteocalcina, fosfatase alcalina, colágeno tipo1) e densidade mineral óssea. Os níveis dos marcadores ósseos foram mais baixos no grupo tratado que no grupo controle. Por outro lado o nível de PTH foi 16% mais alto no grupo tratado com sinvastatina, contudo a BMD não foi diferente entre os dois grupos. Os dados obtidos mostraram que as estatinas afetaram a função das células ósseas, principalmente os efeitos de anti-reabsorção óssea.

Montagnani et al. (2003) avaliaram o efeito do tratamento com 40mg/dia de sinvastatina na densidade e no volume ósseo em trinta mulheres pós-menopáusicas. Em todas as mulheres, a cada três meses, foram feitos exames de sangue para quantificar cálcio, fosfato, colesterol de baixa densidade, colesterol de alta densidade, triglicérides, colesterol total, fosfatase alcalina e colágeno tipo I. Depois de seis e 12 meses de tratamento, foram feitas densitometria da coluna lombar e fêmur. O grupo tratado com sinvastatina mostrou significativo aumento da fosfatase alcalina em seis meses, ao passo que o colágeno tipo I teve um aumento insignificante, além da melhoria da densidade óssea, após seis e doze meses, enquanto no grupo controle houve uma diminuição da densidade no fim do período estudado. Os resultados sugerem o provável efeito positivo da sinvastatina na formação e densidade óssea.

Kuzuya et al. (2003) realizaram um estudo prospectivo para avaliar os efeitos da atorvastatina no metabolismo ósseo através da mensuração dos níveis da atividade da fosfatase alcalina no soro (como um marcador para formação óssea), dos níveis de colágeno tipo N-telopeptídeo de colágeno tipo I e creatinina na urina (como marcadores de reabsorção óssea) e da densidade óssea através de exames radiométricos. Participaram do estudo 16 pacientes idosos com hipercolesterolemia e 27 pacientes sem hipercolesterolemia. Foram solicitados exames de sangue e urina antes do tratamento com atorvastatina e três e seis meses depois. Os exames radiográficos foram realizados antes do tratamento, seis e 12 meses depois. Não houve diferença significativa na densidade mineral óssea (DMO) ou na concentração de fosfatase alcalina após o uso de atorvastatina. No entanto, houve significativa diminuição de colágeno tipo N-telopeptídeo de colágeno tipo I e creatina na urina. Os autores concluíram que atorvastatina pode inibir a reabsorção óssea, mas outros estudos por períodos mais longos, são necessários.

Lupattelli et al. (2004) analisaram se o tratamento com sinvastatina pode modificar a densidade mineral óssea em mulheres. Participaram do estudo quarenta mulheres com hipercolesterolemia em idade pós-menopausa e com pelo menos dois fatores de risco para arteriosclerose, que receberam 40mg diárias de sinvastatina durante dois anos de tratamento (grupo experimental), ou foram tratadas apenas com a dieta (grupo controle). Todas as pacientes foram ajustadas quanto à idade, índice de massa corporal e uso de medicamentos. Foram realizados as medições de DMO, da coluna lombar e quadril. No grupo experimental foi observado um aumento significativo da DMO na coluna lombar depois de oito meses de tratamento, e depois de 24 meses no quadril. No grupo controle, depois de oito e 24 meses, foi observada

uma pequena diminuição da DMO tanto na coluna lombar quanto no quadril. Este estudo indica que o tratamento com sinvastatina traz efeitos benéficos à DMO.

Tikiz et al. (2004) avaliaram o efeito da sinvastatina no metabolismo ósseo e os níveis de citocina no soro. Trinta e oito pacientes em idade pós-menopausa com hipercolesterolemia, que não tinham sido tratados previamente e que não estavam em tratamento para osteoporose, receberam 20mg de sinvastatina diariamente por via oral durante três meses. Foram medidos os níveis de fosfatase alcalina e osteocalcina (marcadores de formação óssea); colágeno tipo I (marcador de reabsorção óssea); e os níveis de citocina e colesterol no soro antes e depois do tratamento. O colesterol total diminuiu depois do tratamento com sinvastatina, todavia não houve uma mudança significativa dos níveis de colágeno tipo I no soro, mas os níveis de fosfatase e osteocalcina foram significativamente aumentados. Os níveis de citocina foram significativamente diminuídos. Estes achados dão suporte à idéia de que a sinvastatina tem um efeito anabólico na formação óssea e que a diminuição de citocina pode também estar envolvida no processo de remodelação óssea.

Baek et al. (2005) analisaram o efeito da sinvastatina na proliferação e diferenciação em células do estroma de medula óssea humana. Para isso utilizaram medula óssea de doadores saudáveis. As células mononucleares foram isoladas em cultura de linhagem osteoblástica e divididas em dois grupos: com e sem tratamento com sinvastatina. Foram medidas a atividade da fosfatase alcalina, a calcificação de matriz de cada grupo e a proliferação celular. A sinvastatina aumentou a atividade da fosfatase alcalina de maneira dose-dependente, diminuiu a proliferação celular e aumentou o nível expressão de osteocalcina. Os autores concluíram que a

sinvastatina estimula a formação óssea por diferenciação osteoblástica e inibe a proliferação de células do estroma de medula óssea humana.

Yazawa et al. (2005) analisaram o efeito da sinvastatina na proliferação celular e na diferenciação osteoblástica em células de ligamento periodontal. Células do ligamento periodontal de pacientes com tecidos periodontais saudáveis foram cultivadas por sete, 14 e 21 dias e tratadas com sinvastatina ou mevalonato. Foram medidas a atividade da fosfatase alcalina, BMP-2, osteocalcina e cálcio. A sinvastatina aumentou a proliferação e metabolismo celular dependendo da dose depois de 24 horas e também estimulou a atividade da fosfatase alcalina com o efeito máximo em concentrações de 10^{-8} M. Dependendo também do tempo, a concentração de 10^{-8} M de sinvastatina aumentou o conteúdo de osteofósforo depois de sete dias e o conteúdo de cálcio depois de 21 dias. Os conteúdos de BMP-2 e osteocalcina não foram detectados. Contudo, o aumento da atividade da fosfatase alcalina causado pela estatina foi anulado pelo mevalonato. Os resultados sugerem que em baixas concentrações a sinvastatina mostra um efeito positivo na proliferação e diferenciação osteoblástica de células humanas do ligamento periodontal e que estes efeitos podem ser causados pela inibição da síntese do mevalonato.

Tikiz et al. (2005) investigaram o efeito da sinvastatina no metabolismo e na DMO em pacientes com hipercolesterolemia. Participaram do estudo 32 pacientes com osteopenia pós-menopáusia, as quais foram tratadas com 20mg de sinvastatina diariamente. Durante um ano, as pacientes foram acompanhadas clinicamente e foi observada uma diminuição do nível de colesterol total. Por volta do terceiro mês, níveis de fosfatase alcalina óssea e osteocalcina estavam significativamente aumentados. No entanto, não foi observada mudança significativa

nos níveis de N-telopeptídeo do colágeno tipo I. No período entre seis a doze meses, os níveis de fosfatase alcalina óssea e osteocalcina diminuíram quando comparados com os valores do pré-tratamento. Um gradual e profundo aumento do PTH durante o período de tratamento foi observado, porém, não se observou uma significativa mudança nos níveis de DMO na coluna vertebral, na cabeça do fêmur e no triângulo de Ward. O tratamento com sinvastatina mostrou um curto efeito anabólico ósseo, que foi perdido quando se prolongou o tratamento. A diminuição dos marcadores anabólicos e de reabsorção em seis e 12 meses sugerem que os efeitos da sinvastatina no metabolismo ósseo é principalmente em favor da inibição da reabsorção óssea em um longo período de observação, embora este efeito inibitório não tenha sido refletido na DMO.

Embora números limitados de estudos controlados sugiram que as estatinas possam ter o potencial para reduzir o risco de fraturas pelo aumento da formação óssea, outros estudos têm falhado para mostrar algum benefício nas diminuições das fraturas. Para resolver este conflito é necessário um maior número de experimentos clínicos randomizados. Desta maneira Jadhav e Jain (2006) colocaram em discussão uma possível razão para a discrepância nos resultados dos estudos clínicos e pré-clínicos, considerando a alta hepatoseletividade, a baixa disponibilidade oral, e a distribuição das estatinas para o microambiente ósseo em ótima concentração. A otimização da dose, aliada com o sistema controlado da distribuição do medicamento, pode aumentar a disponibilidade e distribuição das estatinas no osso. A descoberta de uma estatina ósseo-específica ou um sistema de distribuição do medicamento no osso abrirá um grande campo para o tratamento da osteoporose.

Benoit et al. (2006) realizaram um estudo com objetivo de encontrar um carreador efetivo para as estatinas, para aplicações terapêuticas em ortopedia. Para tanto, a fluvastatina foi incorporada a uma solução de dimetacrilato polietilenoglicol. Esta solução foi colocada em contato com cultura de células mesenquimais humanas e posteriormente foram avaliadas a mineralização, produção de BMP-2 e a quantidade de cálcio depositada. Os autores concluíram que a fluvastatina em dimetacrilato polietilenoglicol pode ser útil em aplicações terapêuticas sobre tecido ósseo, não somente por ativar a diferenciação osteogênica de células mesenquimais humanas mas também modulando a função destas células.

Hu et al. (2006) observaram a ação da sinvastatina no aumento da expressão do receptor da BMP-2 em cultura de células. Para isto utilizaram cultura de células renais embrionárias de células de músculos lisos de artéria pulmonar e de células endoteliais de microvasos de pulmão, todas humanas, adicionadas ou não de sinvastatina, de acordo com o grupo. Observou-se uma indução ao aumento da BMP-2 em todas as culturas com sinvastatina, sinalizando deste modo um aumento na diferenciação e função endotelial.

Safaei et al. (2007) examinaram os efeitos da lovastatina na densidade mineral óssea em mulheres em idade pós-menopausa com diabetes mellitus tipo 2. Participaram deste estudo 55 mulheres que foram divididas em dois grupos: o grupo tratado com 20mg de lovastatina (n=28) via oral diariamente durante 18 meses e o grupo controle (n=27), que recebeu somente a dieta para diabetes, sem nenhum medicamento. Após 18 meses foram realizados exames de densitometria da coluna lombar, do fêmur e do quadril. Nas mulheres tratadas com lovastatina houve aumento da DMO na coluna lombar e fêmur, enquanto que as que receberam somente a dieta não apresentaram mudanças significativas na DMO. Os autores

concluíram que o tratamento com lovastatina pode prevenir a perda óssea em mulheres em idade pós-menopausa com diabetes mellitus tipo 2.

3 PROPOSIÇÃO

O propósito deste trabalho foi estudar o efeito do tratamento com sinvastatina administrada localmente no reparo de defeitos ósseos cirúrgicos em calota craniana de ratos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 ANIMAIS

Para este trabalho foram utilizados 48 ratos adultos, machos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Wistar*) com aproximadamente noventa dias de idade. Os animais foram mantidos em gaiolas em temperatura ambiente e alimentados com ração e água *ad libitum*, fornecidas pelo Biotério do Instituto Básico de Biociências da Universidade de Taubaté – UNITAU. O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Taubaté, CEEA/UNITAU n° 0023/06, (ANEXO A).

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em três grupos: grupo sinvastatina (SIN), grupo carreador (CAR) e grupo controle, conforme o tratamento do defeito ósseo. No grupo sinvastatina (SIN), os defeitos ósseos foram preenchidos com esponja de colágeno liofilizado reabsorvível e embebidas em solução de sinvastatina (2,2mg/0,05ml); no grupo carreador (CAR), os defeitos foram preenchidos com esponja de colágeno

embebida em água destilada; e nos espécimes do grupo controle o defeito não foi preenchido.

Cada um dos grupos foi posteriormente, subdividido em dois, de acordo com o período de observação anterior ao sacrifício (trinta ou sessenta dias). A Figura 1 ilustra a divisão dos grupos experimentais.

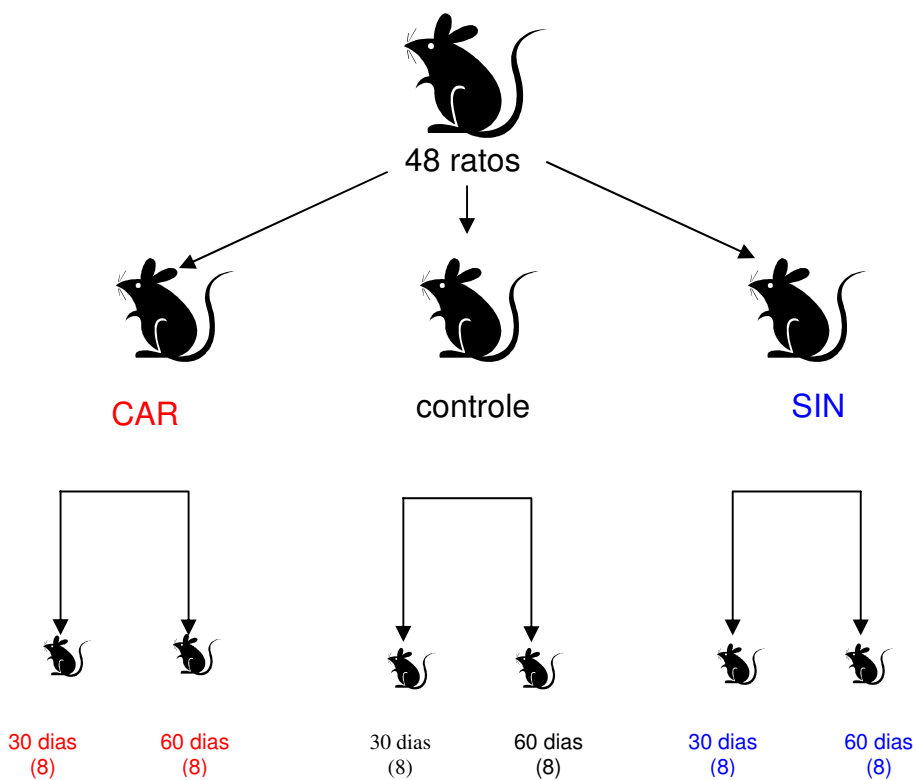


Figura 1 - Divisão dos grupos experimentais

4.3 PREPARAÇÃO DO MEDICAMENTO E CARREADOR

A solução de sinvastatina foi preparada no Manipulário Farmácia de Manipulação (Taubaté - SP) um dia antes dos procedimentos cirúrgicos. A sinvastatina (lote n° 0707071512 – Galena, China) foi diluída em água destilada por meio de agitação durante uma hora, na proporção de 2,2mg/0,05ml e mantida em refrigeração à 13°C até o momento do uso (Figura 2a).

O carreador utilizado para manter o medicamento em contato com o defeito ósseo foi o colágeno liofilizado reabsorvível (Hemospon esponja – Technew, Rio de Janeiro, RJ), (Figura 2b e 2c), em forma de esponjas previamente recortadas e pesadas em balança analítica, com peso médio de 2,5mg. As esponjas foram embebidas na solução de sinvastatina ou em água destilada por dez minutos e prensadas entre duas placas de vidro, para que o volume absorvido fosse 0,056ml. Toda a manipulação do medicamento e carreador ocorreu em condições assépticas.



Figura 2 – Medicamentos utilizados: a) sinvastatina em solução; b) embalagem da esponja de colágeno; c) esponja de colágeno recortada

4.4 REALIZAÇÃO DOS DEFEITOS ÓSSEOS

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala de técnicas cirúrgicas do Instituto Básico de Biociências da UNITAU. Para a realização dos defeitos ósseos nas calvárias, todos os animais receberam anestesia geral. Os animais foram pesados antes do procedimento cirúrgico, para quantificar a dosagem correta de anestésico. Utilizou-se solução de 13mg/Kg de cloridrato de xilasina (Anasedan-Vetbrands-Sespo, Jacareí, SP), substância com propriedade sedativa, analgésica e relaxante muscular, associada a 33mg/Kg do anestésico geral cetamina base (Dopalen. Vetbrands - Sespo, Jacareí, SP), por via intramuscular. Depois da anestesia, foi realizada a depilação da área sobre a calota craniana e antissepsia com álcool iodado (Figura 3a). Em seguida, foi realizada uma incisão em linha reta no plano sagital mediano, com lâmina de bisturi nº15, na pele sobre a calota, até que se atingiu o periósteo (Figura 3b). O tecido mole e o periósteo foram afastados (Figura 3c) e realizados dois defeitos ósseos bicorticais (Figura 3d), um em cada parietal, com auxílio de brocas trefinas de 5mm de diâmetro, montadas em motor elétrico (Smart Surgical - VK Driller Equipamentos Elétricos, Jaguaré, SP), na velocidade de 1814rpm com 16N, sob irrigação abundante com soro fisiológico (cloreto de sódio 0,9%). Posteriormente foi colocado ou não o preenchimento (Figura 3e), de acordo com o grupo e realizada sutura da pele com fio de seda nº4 (Ethicon - Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP) e nova antissepsia com álcool iodado da área operada (Figura 3f).

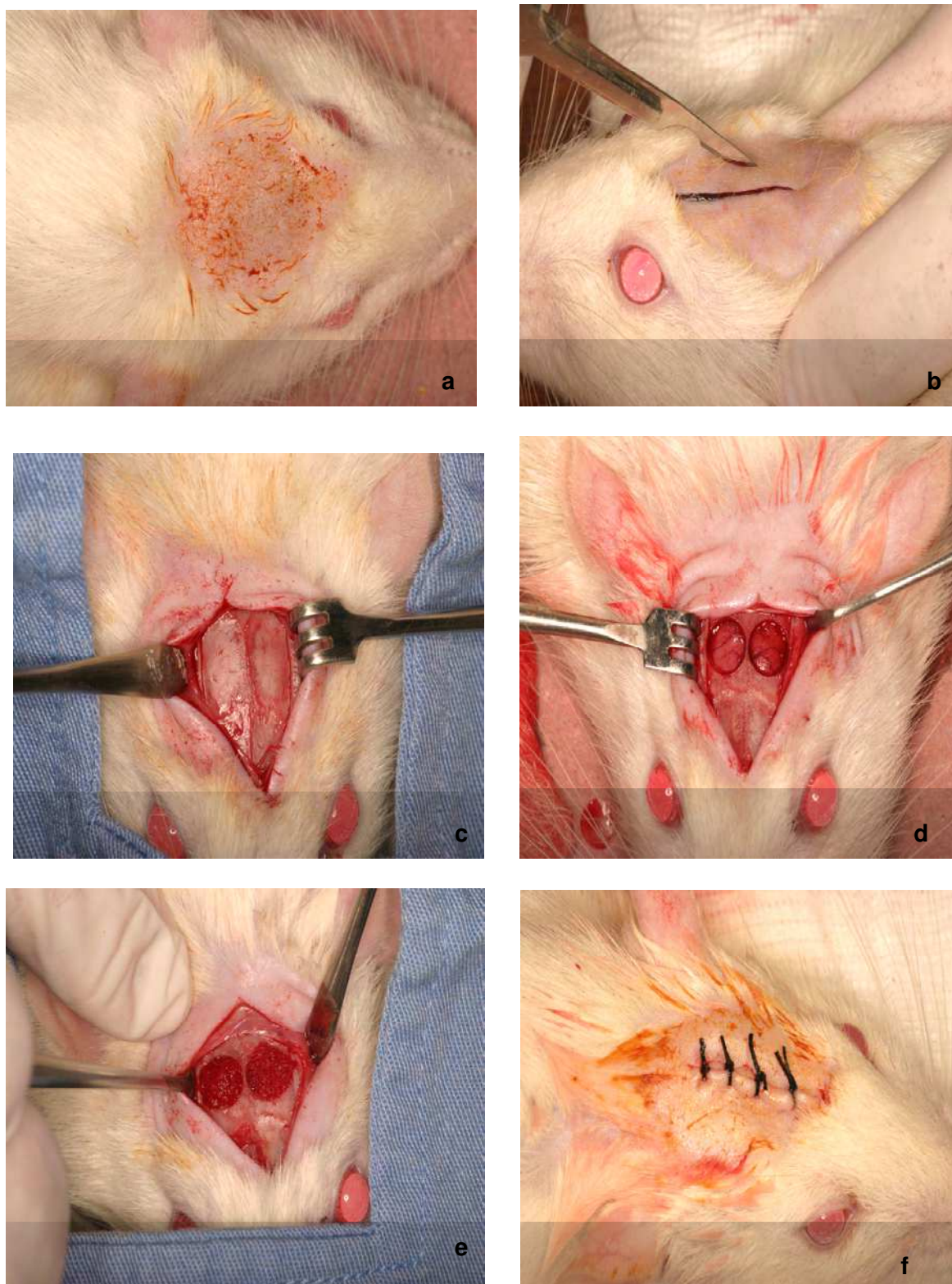


Figura 3 - Procedimento cirúrgico: a) antissepsia; b) incisão; c) exposição do tecido ósseo; d) confecção dos defeitos ósseos; e) preenchimento dos defeitos ósseos; f) sutura da pele

4.5 SACRIFÍCIO

Para o sacrifício, os animais foram novamente anestesiados e então decapitados em guilhotina. As calvárias foram dissecadas, o tecido mole excedente removido.

4.6 DENSITOMETRIA RADIOGRÁFICA

As peças foram radiografadas em aparelho de raios X (RX) odontológico (DabiAtlante Spectro 70X – Dabi Atlante- São Paulo – SP), com sensor digital (Trophy RVG) sob os parâmetros de 8mA e 70KVp, com distância foco-objeto de 30cm, tempo de exposição de 0,1s e incidência do feixe pela superfície externa. Algumas radiografias podem ser observadas na Figura 4.

Utilizando o programa computacional Image J 1.31p (National Institute of Health – USA – http://rsb.info.nih.gov/ij/java1.31_03), foi calculada a densidade radiográfica em tons de cinza da região correspondente a um círculo de área de 15.380 pixels, sobre cada defeito ósseo (Figura 5). As medidas foram tomadas por um único examinador que desconhecia o grupo de radiografias, ao qual os espécimes pertenciam. Na análise estatística foi utilizada a média dos valores obtidos nos dois defeitos, para cada animal.

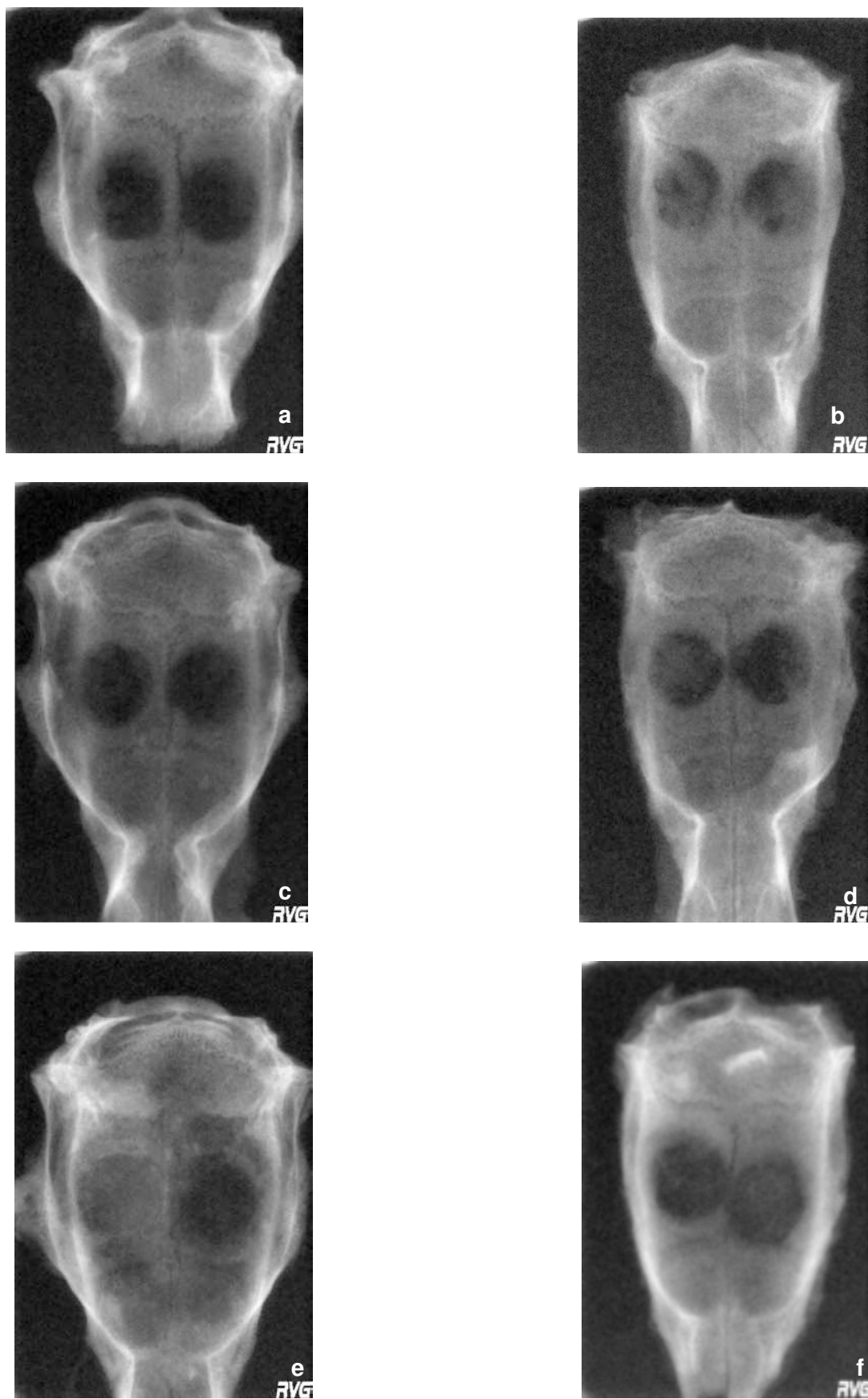


Figura 4 – Radiografias dos grupos: a) grupo C30; b) grupo C60; c) grupo CAR30; d) grupo CAR60; e) grupo SIN30; f) grupo SIN60

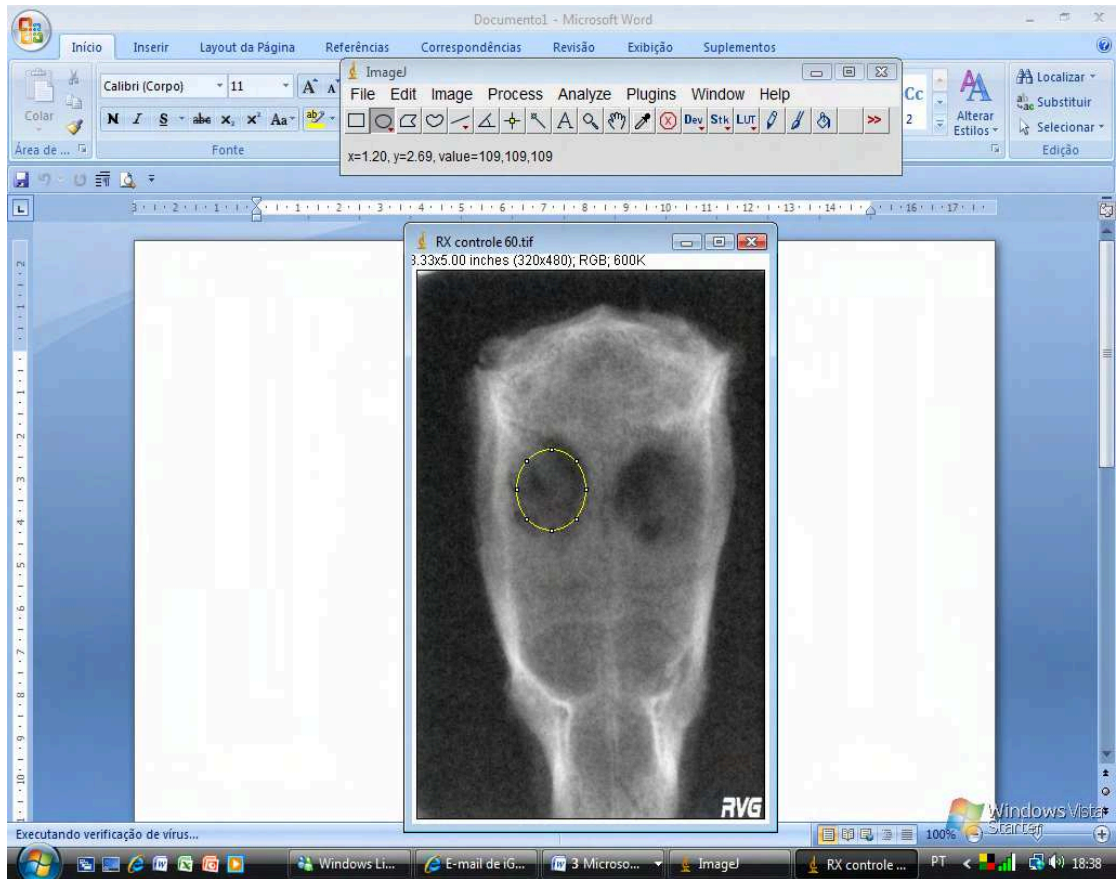


Figura 4 - Área para cálculo da densidade radiográfica, na tela do programa Image J

4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMÉTRICA

Após fixação com solução de formol a 10%, as peças foram seccionadas com o auxílio de disco diamantado, na região da sutura mediana. A porção direita das peças foi estocada, e a esquerda, descalcificadas em ácido tricloroacético a 5% (FITZMAURICE; PITALIA; FREEMONT, 1992), durante aproximadamente vinte dias. Posteriormente, foram hemisseccionadas no sentido ântero-posterior na região central do defeito ósseo. Cada fragmento foi incluído, no sentido da superfície de corte, em um bloco de parafina e submetido à técnica histológica de rotina. Foram confeccionados quatro cortes semi-seriados de cada bloco, com 5 a 7 μ m de espessura e aproximadamente 20 μ m entre cada nível, corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Realizou-se a análise histológica descritiva, em microscopia de luz, das lâminas de cada grupo. Para análise histométrica da neoformação óssea, a imagem de quatro cortes histológicos de cada bloco foi digitalizada (AXIOPHOT 2; Carl Zeiss do Brasil - São Paulo- SP), em aumento de 25 vezes. Foi digitalizada também a imagem de uma escala micrométrica para calibração do programa Image J 1.31p (National Institute of Health – USA) que calculou a área de osso neoformado em mm². Com auxílio do programa Adobe Photoshop for Windows 1997 (Microsoft – USA), a área de matriz óssea neoformada, incluindo as lacunas de osteócitos, foi selecionada, utilizando-se a ferramenta “varinha mágica”, com tolerância 25 (Figura 6a). A imagem foi então recortada e transferida para o programa Image J 1.31p (National Institute of Health – USA) sendo selecionado o processo de imagem *Type 8-Bit*. A imagem foi binarizada (*Make Binary*) e confeccionada a análise de partículas (*Analyze Particles*), que teve sua área avaliada em mm² (Figura 6b). A análise foi

feita por um único examinador calibrado, que desconhecia o grupo ao qual as amostras pertenciam.

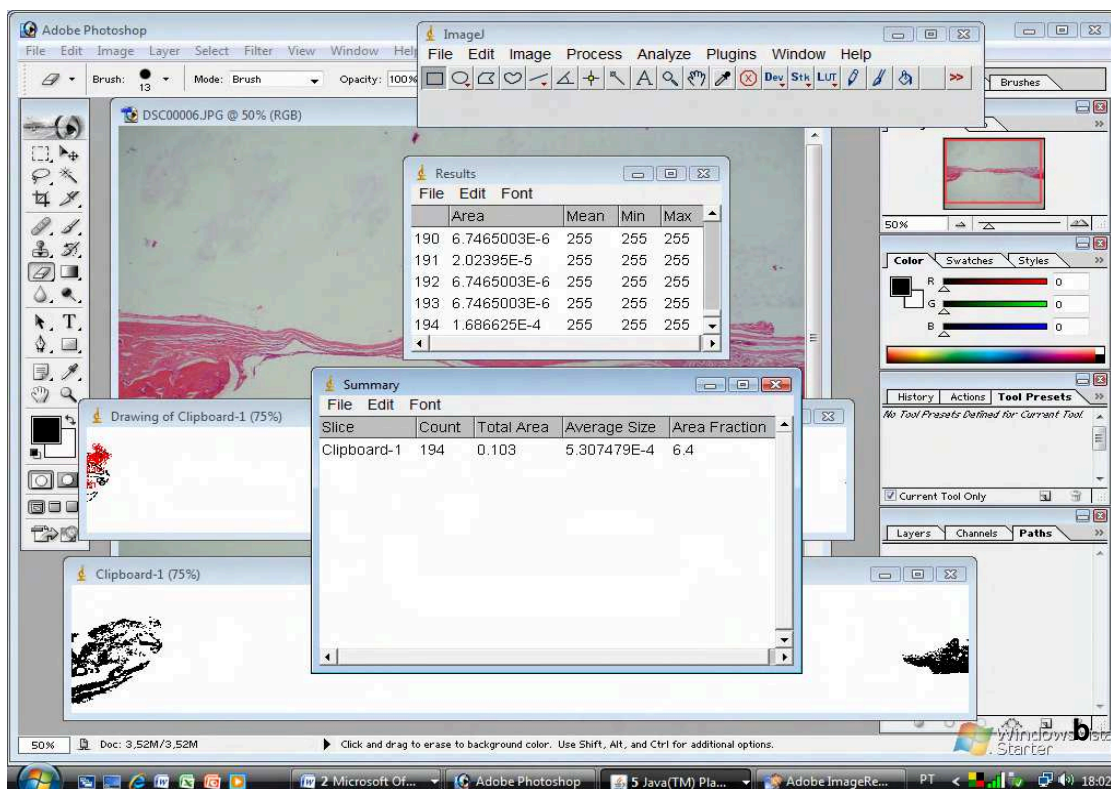
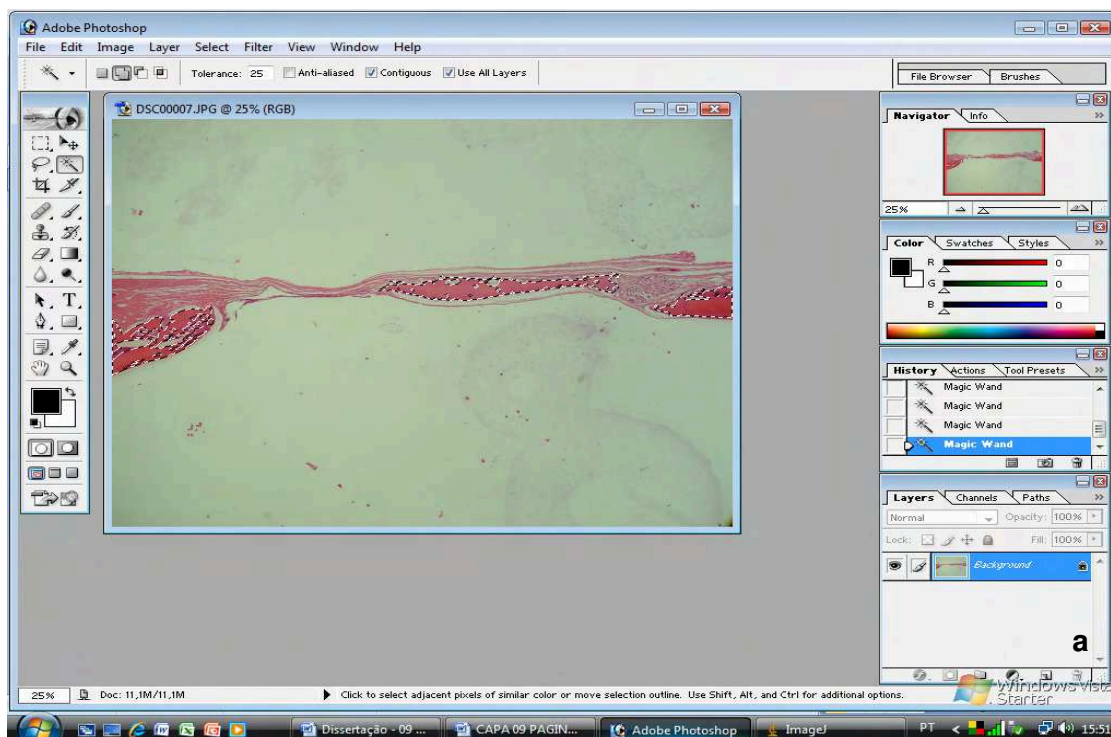


Figura 6 – Telas dos programas computacionais utilizados: a) área selecionada do defeito ósseo no programa Adobe Photoshop; b) área calculada do defeito ósseo no programa ImageJ

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos após densitometria radiográfica e análise histomorfométrica foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov - Smirnov (K-S), que identificou distribuição normal. Quando se testou a influência do medicamento aos trinta e sessenta dias, foi utilizado a ANOVA. Após o teste ANOVA, aplicou-se o teste t de Student para comparar os grupos nos diferentes períodos de observação. Para a realização das análises foram utilizados programas específicos (Minitab *for Windows*, versão 14, Microsoft Office Excel 1997-2003 e GraphPad Prism 4.0 *for Windows*).

5 RESULTADOS

Com relação à evolução clínica dos animais, foi observado que após as cirurgias houve recuperação normal, exceto em quatro animais do grupo sinvastatina, que morreram e em dois outros do mesmo grupo que ficaram com seqüelas neurológicas. Também foi observado nos animais do grupo sinvastatina necrose com formação de crosta de aproximadamente 15mm de diâmetro e aspecto enegrecido. A referida crosta apareceu por volta do décimo quarto dia permanecendo até o quadragésimo quinto dia após a cirurgia, na área da sutura realizada (Figura 7).



Figura 7 – Formação da crosta em animais do grupo SIN: a) após 14 dias; b) após 45 dias

Após os períodos de observação, trinta e sessenta dias, os animais foram sacrificados, as calotas cranianas removidas e realizada as análises radiográficas e histomorfométricas de cada grupo.

5.1 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

Após análise da densidade radiográfica dos dois defeitos realizados em cada animal, os dados resultantes foram submetidos à análise estatística. Para cada animal, utilizou-se a densidade radiográfica média do defeito direito e esquerdo. Os dados da estatística descritiva podem ser observados na Tabela 1. Para a análise inferencial, abordaremos os tempos de trinta e sessenta dias separadamente.

Tabela 1 - Medidas de tendência central e dispersão de densidade radiográfica em cada grupo no tempo trinta e sessenta dias

Grupo	n	Média	Erro padrão	Desvio-padrão	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
CAR30	8	46,06	3,44	9,72	42,87	36,54	61,79
C30	8	43,11	3,25	9,19	40,85	33,55	64,86
SIN30	6	53,27	2,91	7,12	60,87	44,97	61,06
CAR60	8	56,24	2,90	8,21	54,89	48,68	72,64
C60	8	63,48	3,37	9,53	65,56	49,75	78,45
SIN60	6	59,20	0,87	2,14	58,79	56,54	62,95

5.1.2 Tempo trinta dias

Para definir o melhor parâmetro de testagem procedeu-se ao teste de normalidade Kolmogorov - Smirnov (K-S), que identificou distribuição normal dos dados como pode ser observado na Tabela 2 e por isso assumiu-se a média e o desvio-padrão como estimadores para a comparação entre os grupos.

Tabela 2 – Resultados do teste de de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para os dados de densidade radiográfica (tempo de trinta dias)

	n	Média	Desvio-Padrão	K-S	p
Valores	22	46,95	9,439	0,195	0,037

Testou-se então a diferença entre os grupos utilizando ANOVA, que não identificou diferença estatística significativa na comparação entre eles ($p=0,13$), como destacado na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados da ANOVA na comparação entre os dados da densidade radiográfica dos grupos, no tempo trinta dias

Origem	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Mínimos quadrados	F	p-valor
Grupos	2	364,30	182,10	2,03	0,13
Erro padrão	19	1506,90	79,30		
Total	21	1871,20			

5.1.3 Tempo sessenta dias

Para os dados deste tempo, a Tabela 4 apresenta o diagnóstico de uma distribuição normal ($p>0,15$), sendo também utilizadas à média e desvio-padrão como estimadores na testagem estatística.

Tabela 4 – Resultados do teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para os dados de densidade radiográfica (tempo de sessenta dias)

	n	Média	Desvio-padrão	K-S	p
Valores	22	59,68	7,994	0,098	> 0,15

Procedeu-se então a identificação da diferença entre os grupos através da ANOVA. Observou-se ausência de diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,20$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados da ANOVA na comparação entre os grupos, no tempo sessenta dias

Origem	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Mínimos quadrados	F	p-valor
Grupos	2	212,00	106,00	1,78	0,20
Erro padrão	19	1113,10	59,50		
Total	21	1342,10			

5.1.4 Comparação entre os tempos trinta e sessenta dias

Ao se analisar os resultados do teste t de Student, inferido através da média e o desvio-padrão, observou-se que só existiu diferença significativa nos grupos controle e carreador, entre os tempos de trinta e sessenta dias ($p<0,05$) (Figura 8).

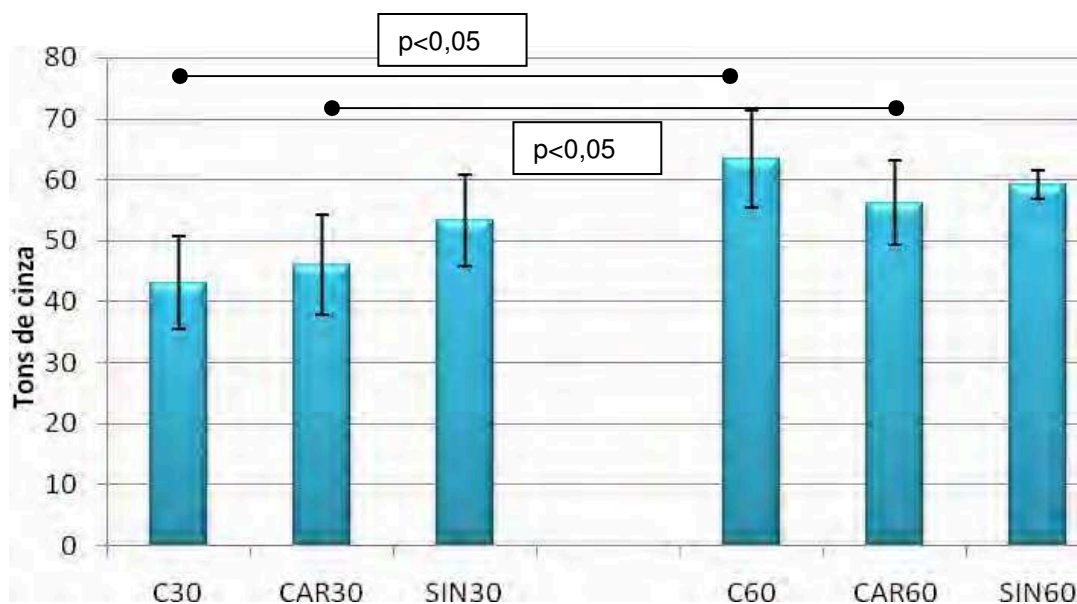


Figura 8 - Média e desvio-padrão dos valores de densidade radiográfica em cada grupo nos tempos trinta e sessenta dias. Após o teste t de Student, verificou-se diferença significativa entre: C30 e C60; CAR30 e CAR60

5.2 ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS

5.2.1 Análise histométrica

Após análise das imagens microscópicas e medição das áreas de neoformação óssea, os dados foram submetidos à análise estatística. É importante ressaltar que os grupos sinvastatina, trinta e sessenta dias, têm menor número de amostras em virtude da morte dos animais, assim como os grupos controle e carreador, nos quais, devido a dificuldades técnicas, as lâminas não puderam ser lidas, (Tabela 6). Para a análise inferencial, abordaremos os tempos de trinta e sessenta dias separadamente.

Tabela 6 - Medidas de tendência central e dispersão dos dados de área de formação óssea em cada grupo nos tempos trinta e sessenta dias

Grupo	n	Média	Erro padrão	Desvio-padrão	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
CAR30	7	0,4249	0,093	0,2461	0,356	0,199	0,899
C30	6	0,456	0,0548	0,1343	0,4845	0,292	0,648
SIN30	6	0,4832	0,198	0,485	0,32	0	1,304
C60	7	0,970	0,079	0,210	0,94	0,73	1,21
CAR60	8	0,540	0,150	0,430	0,42	0,31	1,59
SIN60	6	0,730	0,160	0,390	0,62	0,26	1,38

5.2.1.1 Tempo trinta dias

Para definir o melhor parâmetro de testagem procedeu-se ao teste de normalidade Kolmogorov - Smirnov (K-S) (Tabela 7), que identificou distribuição normal dos dados, e por isso assumiu-se a média e o desvio-padrão como estimadores para a comparação entre os grupos.

Tabela 7 – Resultados do teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para os dados de neoformação óssea do defeito (tempo de trinta dias)

	n	Média	Desvio-padrão	K-S	p
Valores	19	0,4531	0,3019	0,1556	>0,10

Testou-se então a diferença entre os grupos utilizando ANOVA, que não identificou diferença estatística significativa entre eles ($p= 0,9473$), conforme destacado na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados da ANOVA na comparação entre os grupos, no tempo trinta dias

Origem	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Mínimos quadrados	F	p-valor
Grupos	2	0,01106	0,005529	0,05428	0,9473
Erro padrão	16	1,63	0,10199		
Total	18	1,641			

5.2.1.2 Tempo sessenta dias

Para os dados deste tempo, a Tabela 9 apresenta o diagnóstico de uma distribuição normal ($p > 0,10$), sendo também utilizadas a média e desvio-padrão como estimadores na testagem estatística.

Tabela 9 – Resultados do teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para os dados de neoformação óssea do defeito (tempo de sessenta dias)

	n	Media	Desvio-padrão	K-S	p
Valores	21	0,7355	0,3937	0,1409	>0,10

Testou-se então em seguida a diferença entre os grupos a partir da ANOVA, que, igualmente, não identificou diferença estatística na comparação entre eles ($p = 0,0903$), conforme destacado na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados da ANOVA na comparação entre os dados da neoformação óssea dos grupos, no tempo sessenta dias

Origem	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Mínimos quadrados	F	p-valor
Grupos	2	0,727	0,3635	2,757	0,0903
Erro padrão	18	2,373	0,1319		
Total	20	3,1			

5.2.1.3 Comparação entre os tempos trinta e sessenta dias

Quando comparados os grupos nos diferentes tempos, observou-se diferença estatística por meio do teste t de Student, com um $p= 0,01$. Ao se analisar os resultados do teste t de Student, inferido através da média e o desvio-padrão, só foi constatada diferença no grupo controle, entre os tempos de trinta e sessenta dias ($p<0,05$) (Figura 9).

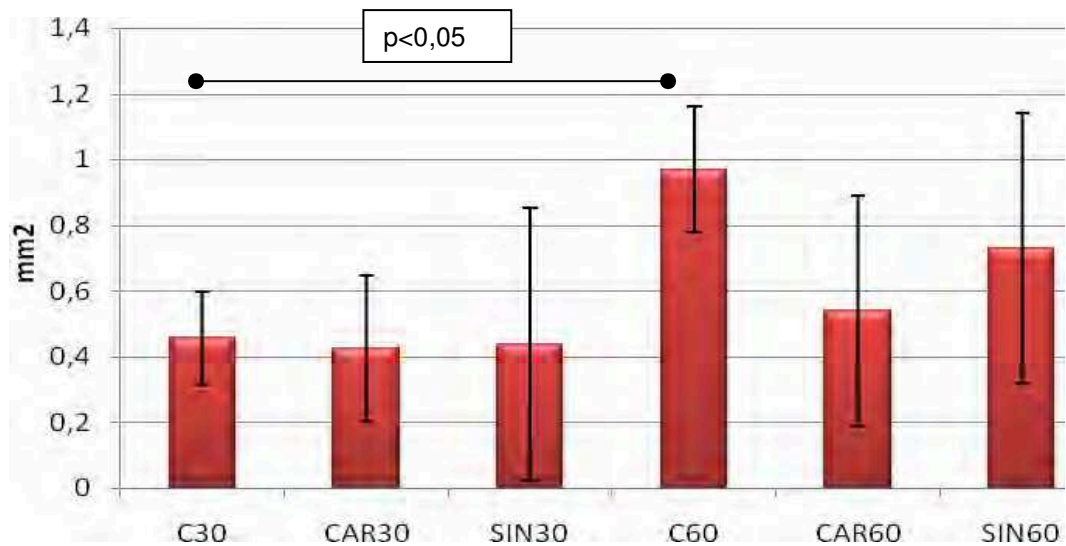


Figura 9 - Média e desvio-padrão dos valores em cada grupo nos tempos trinta e sessenta dias. Após o teste t de Student, verificou-se diferença significativa apenas entre C30 e C60

5.2.2 Análise histológica descritiva

5.2.2.1 Grupo controle aos trinta e sessenta dias

Aos trinta dias, nas bordas dos defeitos observou-se neoformação óssea, de formato aproximadamente triangular, com ápice em direção ao centro do defeito, com espaços medulares e contorno irregular, contendo osteócitos em osteoplastos volumosos, dispostos de maneira desorganizada e recoberta por osteoblastos achatados. Não se encontrou dificuldade em diferenciar o osso neoformado do osso antigo, que apresentava osteócitos menores, dispostos regularmente, na maioria das vezes de maneira paralela. Pequenas ilhas ósseas estavam presentes no centro do defeito (Figura 10a e b), contendo raros espaços medulares, menores em tamanho do que aqueles do osso das bordas, além de contorno mais regular e osteócitos volumosos. Notaram também osteoblastos achatados ao redor do osso neoformado. Havia ainda a presença de tecido conjuntivo frouxo nos defeitos, com fibroblastos e discreto infiltrado inflamatório crônico, composto por linfócitos e plasmócitos. No osso antigo adjacente puderam-se notar linhas reversas basófilas, indicadoras de remodelação óssea, além de áreas de neoformação óssea, provavelmente devido ao afastamento do perióstio. Algumas linhas reversas também puderam ser observadas no osso neoformado. No interior do defeito, em alguns espécimes, havia alguns pêlos em processo de reabsorção por células gigantes multinucleadas, por vezes formando pequenos granulomas.

Aos sessenta dias, na maioria das bordas dos defeitos houve maior formação de osso novo que em trinta dias, que se apresentava mais espesso e maduro, contendo osteócitos menores e dispostos mais regularmente, com menos espaços medulares e presença de linhas reversas basófilas. Em grande parte dos espécimes,

verificou-se presença de ilhas de osso novo no centro do defeito, delgadas, mais maduras, com poucos espaços medulares e com algumas linhas reversas. Em alguns casos, praticamente houve fechamento linear do defeito ósseo (Figura 10c e d), restando pequenas áreas de tecido conjuntivo interposto entre o osso neoformado. Áreas de inflamação discreta ainda estavam presentes. No osso antigo adjacente ao defeito puderam-se também notar linhas reversas basófilas, indicadoras de remodelação óssea, além de áreas de neoformação óssea.

5.2.2.2 Grupo carreador aos trinta e sessenta dias

Aos trinta dias, os animais que receberam a esponja de colágeno como material de preenchimento do defeito apresentaram formação de tecido ósseo mais imaturo que aqueles do grupo controle. Osteócitos e osteoblastos eram mais volumosos e a presença de osteoclastos tornou-se mais evidente. O tecido conjuntivo que preenchia o defeito era mais espesso (Figura 11a) que no grupo controle e possuía moderado infiltrado inflamatório crônico, além numerosos vasos sangüíneos congestos. Não se notaram restos de esponja de colágeno. Em quatro animais observou-se formação de ilhas de tecido ósseo no centro do defeito, mais irregulares que nos grupos anteriores. Linhas reversas basófilas puderam ser encontradas tanto no osso recém-formado, como no osso antigo (Figura 11b). Também foram observados alguns granulomas formados pela presença de pêlos. Em um espécime, verificou-se formação exuberante de tecido de granulação,

contendo alguns macrófagos espumosos, além de áreas de abscedação, com presença de polimorfonucleares.

Aos sessenta dias, o tecido conjuntivo que preenchia o defeito apresentava-se mais delgado, ora com menos, ora com igual inflamação que aos trinta dias, mas ainda com muitos vasos sangüíneos congestos. O osso neoformado continuou mais imaturo que no grupo controle do mesmo período, alguns mostrando uma ilha de formação óssea central (Figura 11c), sendo evidentes osteoblastos volumosos e osteócitos (Figura 11d) dispostos de maneira irregular. Em um único espécime houve fechamento quase completo do defeito. Linhas reversas de aposição óssea foram observadas tanto no osso novo, como no antigo.

5.2.2.3 Grupo sinvastatina aos trinta e sessenta dias

Os animais tratados com sinvastatina, aos trinta dias, apresentaram pouca formação de tecido ósseo (Figura 12a) bastante imaturo, com osteócitos e osteoblastos muito volumosos, além de espaços medulares, nas bordas do defeito. Não houve formação óssea central em nenhum animal, mas alguns centros de ossificação (Figura 12b), com células osteogênicas volumosas, puderam ser observados. O tecido conjuntivo que preenchia o defeito era espesso, com inflamação de moderada a intensa, predominantemente crônica, com vasos sangüíneos por vezes congestos e áreas de hemorragia. Em dois animais observou-se área de necrose de coagulação no centro do defeito. Áreas extensas de reabsorção do osso antigo foram encontradas também em dois animais, assim como

presença de tecido gorduroso. Intensa remodelação no osso preexistente foi comum. Em apenas um animal não se observou tecido nervoso cerebral com áreas de necrose sob a região do defeito.

Aos sessenta dias, o tecido conjuntivo que preenchia o defeito era mais delgado e celular, e a inflamação na região diminuiu consideravelmente, apresentando-se discreta e sem focos de polimorfonucleares. Vasos sangüíneos congestos ainda eram evidentes. As áreas de necrose no defeito desapareceram, e o tecido neoformado tornou-se mais maduro, com osteoblastos e osteócitos menos volumosos que aos trinta dias (Figura 12c e d). Raras foram as áreas de tecido ósseo no centro do defeito. Em apenas dois animais não se observou tecido cerebral com áreas de necrose.

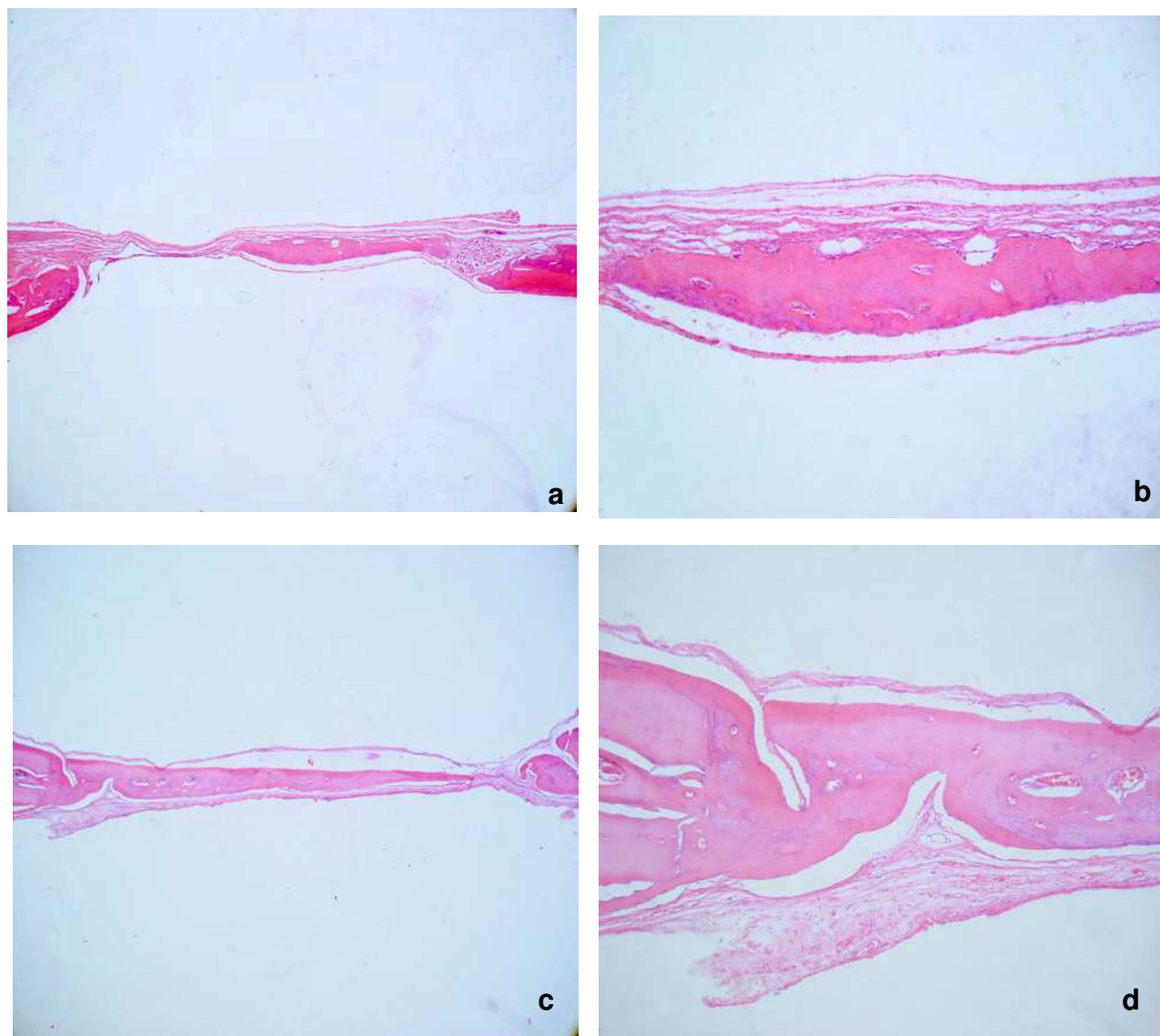


Figura 10 – Aspecto microscópico do grupo controle: a) grupo C30. Visão panorâmica da região do defeito evidenciando formação óssea nas bordas e no centro. Aumento original de 25x. HE; b) grupo C30. Detalhe da formação óssea no centro do defeito. Aumento original de 100x. HE; c) grupo C60. Visão panorâmica da região do defeito evidenciando formação óssea praticamente em toda sua extensão. Aumento original de 25x. HE; d) grupo C60. Detalhe da figura anterior. Aumento original de 100x. HE

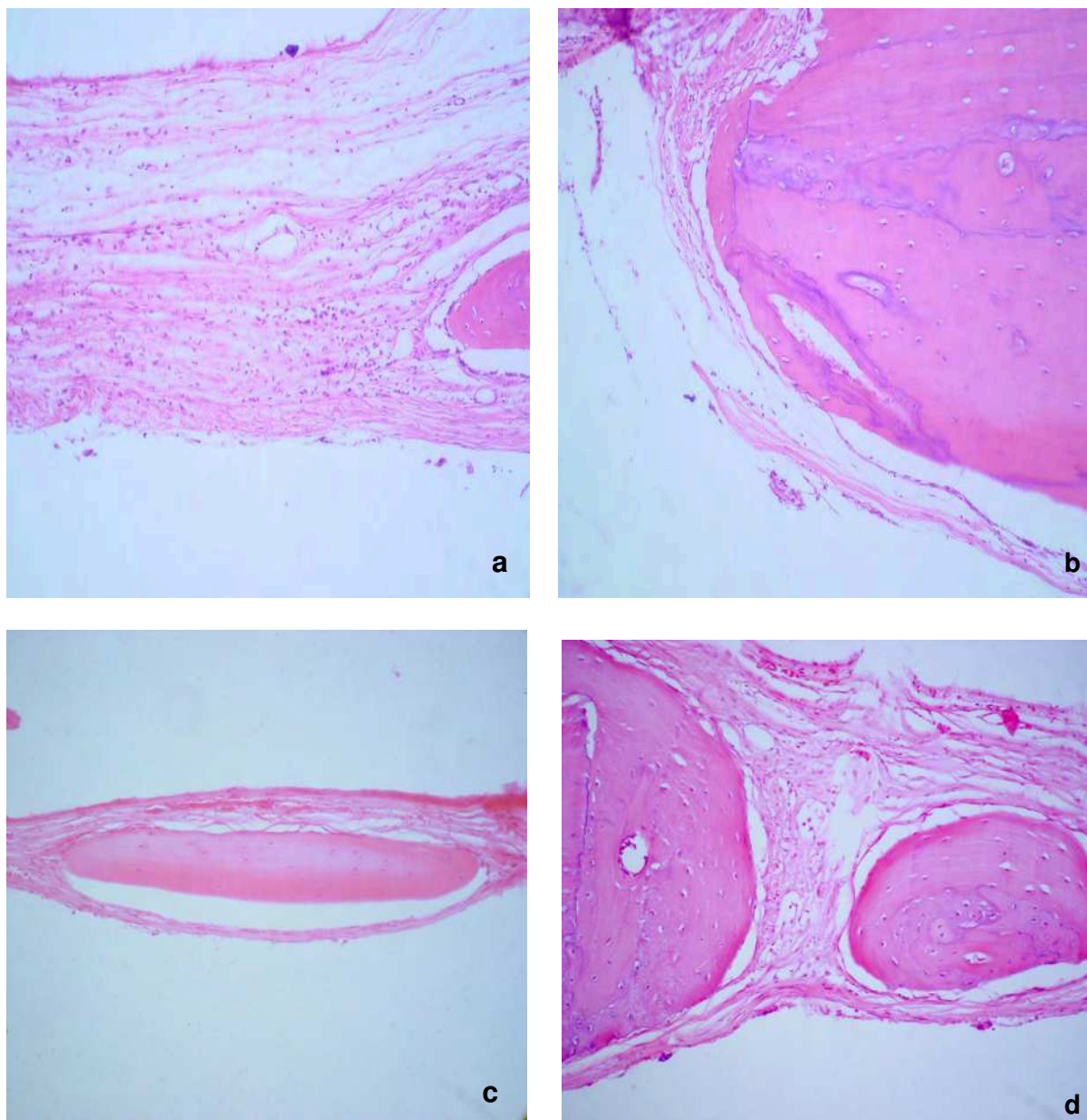


Figura 11 – Aspecto microscópico do grupo carreador: a) grupo CAR30. Tecido conjuntivo mais espesso que no grupo controle, com numerosos vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório crônico. Aumento original de 100x. HE; b) grupo CAR30. Linhas reversas basófilas (setas) indicativas de remodelação óssea. Aumento original de 200x. HE; c) grupo CAR60. Formação óssea central em forma de ilha. Aumento original de 200x. HE; d) grupo CAR60. Tecido ósseo neoformado nas bordas do defeito, contendo osteócitos em esteoplastos volumosos. Aumento original de 200x. HE

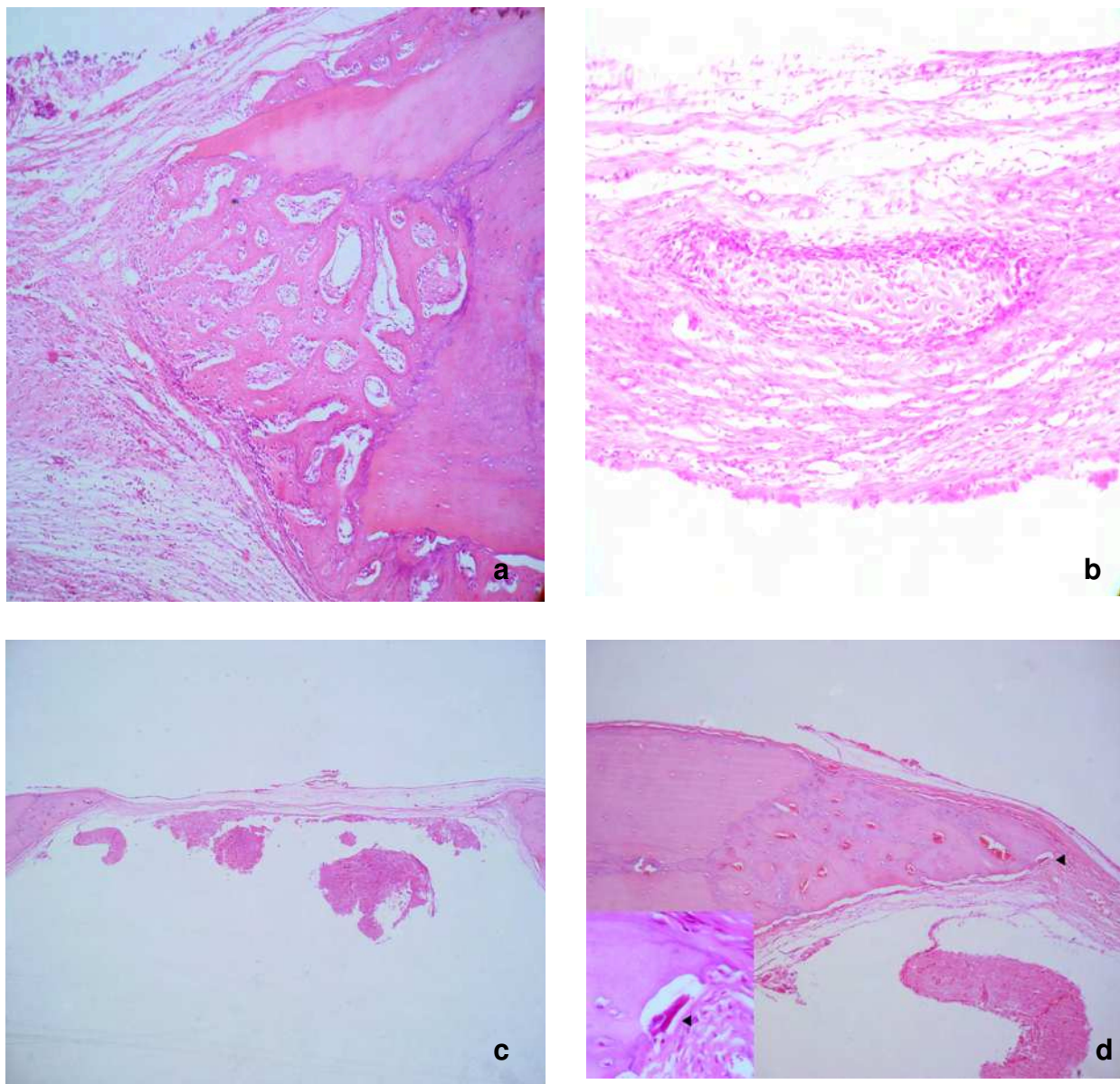


Figura 12 – Aspecto microscópico do grupo sinvastatina: a) grupo SIN30. Formação de tecido ósseo bastante imaturo nas bordas, onde, inclusive, houve reabsorção de osso antigo. Aumento original de 100x. HE; b) grupo SIN30. Centro de ossificação, envolto por células osteogênicas. Aumento original de 200x. HE; c) grupo SIN60. Visão panorâmica da região do defeito evidenciando tecido ósseo mais maduro que aos trinta dias na borda do defeito. Aumento original de 25x. HE; d) grupo SIN60. Detalhe da formação óssea na borda do defeito, com o osteoclasto em evidência. Aumento original de 100x. HE

6 DISCUSSÃO

O reparo de defeitos ósseos experimentais tem sido bastante utilizado para o estudo de regeneração óssea, pois se assemelha ao reparo direto de fraturas. Diversos modelos têm sido relatados, utilizando animais como ratos, coelhos, gatos, cachorros, porcos, macacos (HOLLINGER; KLEINSCHMIDT, 1990) e confeccionando os defeitos ósseos em calota craniana, mandíbula ou ossos longos (HOLLINGER; KLEINSCHMIDT, 1990; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Para a realização deste estudo os defeitos ósseos foram confeccionados na calota craniana de ratos, pois tem sido um dos locais de escolha para pesquisa, devido a capacidade regenerativa da calvária ser baixa, por ausência de forças externas (BRAZ et al., 2003).

Por definição, de acordo com o conceito de Schmitz e Hollinger (1986), tamanho crítico em um defeito intra-ósseo é o menor tamanho que não se regenera espontaneamente durante toda a vida do animal. Entretanto como a maioria dos estudos possui duração limitada, isto é, não acompanha toda a vida do animal, em estudos experimentais deve ser considerado como defeito de tamanho crítico aquele que não se regenera espontaneamente durante o período do estudo (GOSAIN et al., 2000). Deste modo deve-se realizar um defeito com o menor tamanho possível para que não ocorra reparo espontâneo durante o estudo e que, portanto o potencial osteogênico real de um implante, enxerto ou medicamento possa ser avaliado (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). De acordo com Schmitz e Hollinger (1986), o tamanho crítico de defeitos em calvária de ratos deve ser de 8mm de diâmetro. Entretanto, outros estudos realizados (BRAZ et al., 2003; DEVELIOGLU et al., 2006) consideraram o tamanho de 5mm de diâmetro em calvária de ratos maior que o

tamanho crítico durante o período do estudo, que variou entre trinta e sessenta dias e três e seis meses respectivamente. Desta maneira optou-se por realizar um defeito ósseo de 5mm em cada osso parietal, com o período de trinta e sessenta dias de observação, sendo uma amostra de cada animal usada para análise neste estudo e a outra amostra armazenada para análise de tecido não descalcificado, a ser realizada posteriormente.

Para a escolha da dose de sinvastatina utilizada, foram observados outros estudos que também usaram o medicamento localmente. As doses utilizadas variavam bastante: 2,2mg (THYLIN et al., 2002); 0,5mg (ÖZEÇ et al., 2007; WONG; RABIE, 2003); 0,1mg, 0,5mg, 1,0mg, 1,5mg, 2,2mg (STEIN et al., 2005), assim como os carreadores utilizados: gel de metilcelulose (THYLIN et al., 2002); membrana com gel de metilcelulose (STEIN et al., 2005; THYLIN et al., 2002) e esponja de colágeno reabsorvível (ÖZEÇ et al., 2007; WONG; RABIE, 2003). Optou-se por utilizar a dose de 2,2mg de sinvastatina, que apresentou bons resultados no estudo de Thylin et al. (2002) diluída em 50µl de água destilada em esponja de colágeno (ÖZEÇ et al., 2007; WONG; RABIE, 2003). Em estudo piloto, observou-se que uma esponja de colágeno reabsorvível de cerca de 2,5mg, tamanho máximo para preencher um defeito ósseo de 5mm em calota, absorve apenas 0,056 ml de líquido, quantidade bastante inferior à utilizada em outros estudos. Wong e Rabie (2003) e Özeç et al. (2007) utilizaram 0,2ml de volume de solução 2,5mg/ml de sinvastatina. Stein et al. (2005) encontraram, como Thylin et al. (2002) bons resultados de estimulação de formação óssea com 2,2mg de sinvastatina em gel de metilcelulose. Thylin et al. (2002) e Stein et al. (2005) também relataram inflamação, edema e formação de crosta por volta do décimo dia, persistindo até 44 dias pós-cirurgia, mas com neoformação que variava de aumento de 45% em área óssea no local onde foi

colocado o medicamento (STEIN et al., 2005) até 180% (THYLIN et al., 2002). No entanto, a redução da quantidade utilizada para 0,5mg do medicamento manteve a estimulação do crescimento ósseo, diminuindo a intensidade de inflamação (STEIN et al., 2005). Em nosso trabalho, a associação de altas doses de sinvastatina, não em gel de metilcelulose (STEIN et al., 2005; THYLIN et al., 2002;), mas em esponja de colágeno, não conduziu a resultados satisfatórios. Outros estudos estão em andamento com o uso de dose menor do medicamento.

Com relação à avaliação de densidade radiográfica, diversos estudos (ANBINDER et al., 2002; JUNQUEIRA et al., 2002; LUPATELLI et al., 2004; MARITZ et al., 2001; MONTAGNANI et al., 2003; ÖZEÇ et al., 2007; SAFAEI et al., 2007; SATO et al., 2005; SIROLA et al., 2002; SUGIYAMA et al., 2007; TIKIZ et al., 2005) tomaram como base este tipo de avaliação, para detecção de formação óssea em uma área de reparação, porque o método tem menor custo e menor consumo de tempo quando comparado com os protocolos de análises histológicas. Além disso, na análise radiográfica avalia-se tecido calcificado, enquanto na análise histológica utilizada avaliou-se tecido ósseo descalcificado. Dessa maneira, as duas análises seriam complementares. Contudo o estudo de Pryor, Susin e Wikesjö (2006), contesta este tipo de avaliação, relatando que existe baixa acurácia e concordância entre o que foi observado na avaliação radiográfica e por meio de exames histológicos.

Observou-se que nos grupos em que foi administrada a sinvastatina, houve morte de quatro animais, e mais dois animais ficaram com seqüelas neurológicas, o que não ocorreu com os outros grupos em que não foi utilizada a sinvastatina. Pode-se conjecturar que estas ocorrências foram em consequência da dose do medicamento utilizado que funcionou como material irritante aos tecidos vizinhos

aos defeitos confeccionados, formando crosta, edema e provocando inclusive algumas áreas de necrose dos tecidos do cérebro, aderidas aos tecidos imediatamente abaixo desses defeitos.

O carreador utilizado também contribuiu para a inflamação local, que foi maior nos grupos em que o defeito recebeu algum preenchimento. A esponja de colágeno reabsorvível utilizada foi de origem porcina, usada na clínica odontológica rotineiramente pós-extrações, enquanto outros trabalhos omitem a origem ou usaram de origem bovina (ÖZEÇ et al., 2007; WONG; RABIE, 2003). A indústria passou a fabricar as esponjas de origem porcina, ao invés de bovina, em decorrência da disseminação da doença conhecida por vaca louca. A inflamação foi muito mais intensa nos grupos que receberam sinvastatina, indicando, portanto que a presença do medicamento foi muito mais deletéria do que somente a presença do carreador.

Estudo recente (MA et al., 2007) relatou que o uso de alta dose de sinvastatina usada localmente promoveu prejuízo ao reparo ósseo, sugerindo que este poderia ser em decorrência do aumento da estimulação na reabsorção óssea. Outro estudo mais antigo (MARITZ et al., 2001) também relatou que alta dose de sinvastatina poderia prejudicar a formação óssea e sugeriu que isto poderia ter ocorrido em função de um estímulo maior na atividade osteoclástica, prevalecendo a reabsorção sobre neoformação óssea.

Tikiz et al. (2005) relataram um curto período anabólico ósseo, que foi perdido quando se prolongou o tratamento com sinvastatina. Outros estudos (ÖZEÇ et al., 2007; WONG; RABIE, 2003). utilizaram períodos de avaliação mais curtos que os trinta e sessenta dias usados na presente pesquisa. Outros resultados poderiam ser encontrados se tivéssemos utilizado menores períodos de observação. Contudo,

Thylin et al. (2002) fizeram suas observações em períodos de 22 e 44 dias com resultados satisfatórios. Von Stechow et al. (2003) utilizaram período de 13 semanas de observação, após o que a sinvastatina falhou no estímulo à formação de osso.

Com estas observações, foi possível concluir que neste estudo, a administração local da sinvastatina prejudicou a reparação óssea de defeitos bicorticais em calota craniana de ratos. As hipóteses levantadas necessitam serem mais pesquisadas, para que se obtenha uma dose ótima e um sistema de entrega do medicamento mais efetivo.

7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações e análises dos resultados deste estudo, podemos concluir que a administração local da sinvastatina prejudicou a reparação óssea de defeitos bi-corticais em calota craniana de ratos.

REFERÊNCIAS

AABOE, M. et al. Incomplete bone regeneration of rabbit calvarial defects using different membranes. **Clinical Oral Implant Research**, Denmark, v. 9, p. 313-320, 1998.

ANBINDER, A. L. et al. Influência da sinvastatina na densidade óssea em tíbias de ratos. **Pós Graduação Revista Faculdade de Odontologia**, São José dos Campos, v. 9, n. 4, p. 331-336, out./dez. 2002.

ARISAWA E. A. L. et al. Influência da calcitonina na reparação óssea de tíbias de ratas ovariectomizadas. **Pós Graduação Revista Faculdade de Odontologia**, São José dos Campos, v. 3, n. 1, jan./jun. 2000.

AYUKAWA, Y. et al. Simvastatin promotes osteogenesis around titanium implants. A histological study in rats. **Clinical Oral Implant Research**, USA, v. 5, p. 346-350, 2004.

BAEK, K. H. et al. The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. **Journal Korean of Medical Sciences**, Korea, v. 20, p. 438-444, 2005.

BENOIT, D. S. W. et al. Synthesis and characterization of a fluvastatin-releasing hydrogel delivery system to modulate hMSC differentiation and function for bone regeneration. **Biomaterials**, v. 27, p. 6102-6110, 2006.

BRADLEY, J. D. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor reduces simvastatin-induced bone morphogenetic protein-2 and bone formation in vivo. **Journal of Periodontal Research**, USA, v. 42, p. 267-273, 2007.

BRAZ, F. et al. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, p. 19-24, 2003.

CHAN, H. M. et al. Simvastatin increases serum osteocalcin concentration in patients treated for hypercholesterlaemia. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, USA, v. 86, p. 4556-4559, Sept. 2001.

CHUNG, Y. et al. HMG-COA Reductase inhibitors increase BMD in type 2 diabetes Mellitus patients. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, USA, v. 85, p. 1137-1142, Dec. 2000.

DEVELIOGLU, M. et al. Assessment of the effect of a biphasic ceramic on bone response in a rat calvarial defect model. **Journal of Biomedical Material Research**, part A, p. 627-631, 2006.

ENDO, A. et al. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methy-glutaril coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B, fungal metabolites having hypocholesterolemic activity. **Febs Letters**, v. 72, n. 2, p. 232-236, 1976.

FITZMAURICE, R. J.; PITALIA, A.; FREEMONT, A. J. Effects of prolonged processing in standard and isotonic trichloroacetic acid (TCA) on cellular preservation in bone marrow trephines. **Journal of Clinical Pathology**, England, v. 45, p. 631-633, 1992.

GALUS, R. et al. Influence of fluvastatin on bone formation induced by demineralized bone matrix in mice. **Pharmacological Reports**, Poland, v. 58, p. 443-447, 2006.

GOSAIN, A. K. et al Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-(beta) isoforms. **Plastic and Reconstructive Surgery**, New York, v. 106, n. 2, p. 360-371, Aug. 2000.

GUTIERREZ, G. E. et al. Transdermal application of lovastatin to rats causes profound increases in bone formation and plasma concentrations. **Osteoporosis International**, USA, v. 17, p. 1033-1042, 2006.

HOLLINGER, J. O.; KLEINSHMIDT, J. C. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 1, n. 1, p. 60-68, Jan. 1990.

HU, H. et al. Simvastatin enhances bone morphogenetic protein receptor type II expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, p. 59-64, 2006.

JADHAV, S. B.; JAIN, G. K. Statin and osteoporosis: new role for old drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 1, p. 3-18, Jan. 2006.

JUNQUEIRA, J. C. et al. Effects of simvastatin on bone regeneration in the mandibles of ovariectomized rats and on blood cholesterol levels. **Journal of Oral Science**, v. 44, n. 3/4, p. 117-224, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO J. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 137-153.

KILIÇCOGLU, S. S.; ERDEMLI, E. New addition to the statin's effect. **Journal of Trauma Injury, Infection, and Critical Care**, v. 63, n. 1, p. 187-191, 2007.

KUZUYA, M. et al. Atorvastatin, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, reduces bone resorption in the elderly. **Journal of American Geriatrics Society**, USA, v. 51, n. 11, p. 1671-1678, Nov. 2003.

LEE, Y. et al. The effect of local simvastatin delivery strategies on mandibular bone formation in vivo. **Biomaterials**, USA, v. 29, p. 1940-1949, 2008.

LUPATTELLI, G. et al. Simvastatin bone mineral density in hypercholesterolemic postmenopausal women. **Metabolism**, v. 53, n. 6, p. 744-748, 2004.

MA, B. et al. The effect of simvastatin on bone formation and ceramic resorption in a peri-implant defect model. **Acta Biomaterialia**, v. 10, p. 149-155, 2007.

MAEDA, T. et al. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, p. 874-877, 2001.

MARITZ, F. J. et al. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, USA, v. 21, p. 1631-1641, 2001.

MONTAGNANI, A. et al. Effect of simvastatin treatment on bone mineral density and bone turnover in hypercholesterolemic postmenopausal women: a 1-year longitudinal study. **Bone**, USA, v. 32, p. 427-433, 2003.

MOURAD, L. A. Structure and function of the musculoskeletal system. In: McCANCE, K. L.; HUETER, S. E. **Pathophysiology**: the biologic basis for disease in adults and children. 3. ed. Sant Louis: Mosby, 1997. cap. 41, p. 1405-1485.

MUNDY, G. et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. **Science**, USA, v. 286, n. 5446, p. 1946-1949, Dec.1999.

NEGRÃO, M. R. et al. Statins and tissue mineralization: putative involvement of alkaline phosphatase. **Medical Hypotheses**, v. 67, p. 524-528, 2006.

OXLUND, H.; ANDREASSEN, T. T. Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone loss while increasing cortical bone formation. **Bone**, USA, v. 34, p. 609-618, 2004.

ÖZEÇ, I. et al. Effect of local simvastatin application on mandibular defects. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 18, n. 3, p. 546-549, May 2007.

PRYOR, M. E.; SUSIN, C.; WIKESJÖ, U. M. E. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. **Journal of Clinical Periodontology**, USA, v. 33, p. 455-460, 2006.

PYTLIK, M. et al. Effects of simvastatin on the development of osteopenia caused by ovariectomy in rats. **Polish Journal of Pharmacology**, Poland, v. 55, p. 63-71, 2003.

REJNMARK, L. et al. Statins decrease bone turnover in postmenopausal women: a cross-sectional study. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, p. 581-589, 2002.

SAFAEI, H. et al. Lovastatin effects on bone mineral density in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. **Acta Diabetol**, v. 44, p. 76-82, 2007.

SATO, D. et al. Local application of simvastatin to rat incisor socket: carrier-dependent effect on bone augmentation. **Journal of Oral Tissue Engineering**, v. 2, p. 81-85, 2005.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Washington, DC, n. 205, p. 298-307, 1986.

SIROLA, J. et al. Relation of statin use and bone loss: a prospective population-based cohort study in early postmenopausal women. **Osteoporosis International**, v. 13, p. 537-541, 2002.

SKOGLUND, B.; ASPENBERG, P. Locally applied simvastatin improves fracture healing in mice. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 8, p. 98-104, Sept. 2007.

SONG, C. et al. Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bone marrow stromal cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, USA, v. 308, p. 458-462, 2003.

STEIN, D. et al. Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 11, p. 1861-1870, Nov. 2005.

SUGIYAMA, M. et al. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Japan, v. 271, n. 3, p. 688-692, May 2000.

SUGIYAMA, T. et al. Subcutaneous administration of lactone form of simvastatin stimulates ectopic osteoinduction by rhBMP-2. **Oral Diseases**, v. 13, p. 228-233, 2007.

SWEENEY, T. M. et al. Repair of critical size rat calvarial defects using extracellular matrix protein gels. **Journal of Neurosurgery**, USA, v. 83, n. 4, p. 710-715, Oct. 1995.

THYLIN, M. R. et al. Effects of simvastatin gels on murine calvarial bone. **Journal of Periodontology**, USA, v. 73, n. 10, p. 1141-1148, Oct. 2002.

TIKIZ, C. et al. The effect of simvastatin on serum cytokine levels and bone metabolism in postmenopausal subjects: negative correlation between TNF- α and anabolic bone parameters. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 22, p. 365-371, 2004.

TIKIZ, C. et al. Effects of simvastatin on bone mineral density and remodeling parameters in postmenopausal osteopenic subjects: 1-year follow-up study. **Clinical Rheumatology**, USA, v. 24, n. 5, p. 447-452, Sept. 2005.

VON KNOCH, F. et al. The effect of simvastatin on polyethylene particle-induced osteolysis. **Biomaterials**, v. 26, p. 3549-3555, 2005.

VON STECHOW, D. et al. Does simvastatin stimulate bone formation in vivo? **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 4/8, Apr. 2003.

WONG, R. W. K.; RABIE, A. B. M. Statin collagen grafts used to repair defects in the parietal bone of rabbits. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, England, v. 41, p. 244-248, 2003.

WONG, R. W. K.; RABIE, A. B. M. Early healing pattern of statin-induced. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, England, v. 43, n. 1, p. 46-50, 2005.

WONG, R. W. K.; RABIE, A. B. M. Histologic and ultrastructural study on statin graft in rabbit skulls. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, USA, v. 63, p. 1515-1521, 2005.

YAZAWA, H. et al. Simvastatin promotes cell metabolism, proliferation, and osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 2, p. 295-302, Feb. 2005.

YOSHINARI, M. et al. Oxygen plasma surface modification enhances immobilization of simvastatin acid. **Biomedical Research**, v. 27, n. 1, p. 29-36, Feb. 2006.

ANEXO

ANEXO A – Declaração do Comitê de Ética para Experimentação Animal – Universidade de Taubaté



Instituto Básico de Biociências
Avenida Tiradentes, n° 500 – centro
Cep: 12030-180 - Taubaté/SP
Tel/Fax 3629-7909 - tel. 3629-2318
ibb@unitau.br e institutob@unitau.br

DECLARAÇÃO

Dec. n° 023/06

Registro CEEA/UNITAU n° 0023/06 (esse n° de registro deverá ser citado pelo pesquisador nas correspondências referentes a este projeto).

Projeto de Pesquisa: Influência da administração local de sinvastatina na reparação óssea em calvária de ratos.

Pesquisador(a) Responsável: Ana Lia Anbinder

Apresentar relatório final ao término da pesquisa: 02/08/2007

O Comitê de Ética para Experimentação Animal, em reunião de 16/02/2007 e no uso das competências definidas na Deliberação CONSEP N° 362/2003, considerou o Projeto acima aprovado.

Taubaté, 16 de fevereiro de 2006.

Profª Drª Naira Correa Cusma Pelogia
Coordenador do Comitê de Ética para Experimentação Animal
Universidade de Taubaté

Autorizo cópia total ou parcial desta obra, desde que citada a fonte, apenas para fins de estudo e pesquisa, sendo expressamente vedado qualquer tipo de reprodução para fins comerciais sem prévia autorização específica do autor.
Jimmy Cavalcanti Calixto

Taubaté, Julho de 2008.