

Dircilei Nascimento de Sousa

Estudo do efeito local da sinvastatina na neoformação óssea de defeitos na calvária  
de ratos.

Brasília-DF  
2013

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Aluna: Dircilei Nascimento de Sousa

Estudo do efeito local da sinvastatina na neoformação óssea de defeitos na calvária de ratos.

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. *Wagner Rodrigues Duarte*

Brasília-DF

2013

Aluna: Dircilei Nascimento de Sousa

Estudo do efeito local da sinvastatina na neoformação óssea de defeitos na calvária de ratos.

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. *Wagner Rodrigues Duarte*

Aprovado em 17 de dezembro de 2013.

Banca examinadora

---

Professor Doutor Wagner Rodrigues Duarte (Presidente)  
Universidade de Brasília

---

Professor Doutor Rivadávio Fernandes Batista de Amorim  
Universidade de Brasília

---

Professor Doutor Virgílio Moreira Roriz  
Centro Universitário Unievangélica

Brasília-DF

2013

*Dedico este estudo a minha mãe, pelo incentivo, pela dedicação e pelo investimento na minha formação profissional. Ao meu esposo Juliano, que esteve ao meu lado e ajudou em cada etapa para a realização deste estudo. Obrigada por acreditarem no meu esforço. Este estudo somente foi possível graças ao apoio de vocês.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade de Brasília, na pessoa do Reitor Professor Dr. Ivan Marques de Toledo Camargo.

À Faculdade de Ciências da Saúde da UnB, na pessoa da Diretora Professora Dra. Lílian Marly de Paula, pela oportunidade acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na pessoa do Coordenador Francisco de Assis Rocha Neves e aos funcionários.

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador, Wagner Duarte, pelo exemplo de caráter, educação e conhecimento, sempre esteve disposto a dividir seus conhecimentos, os quais me propiciaram enriquecer, observando o seu jeito único e paciente ao tratar as pessoas. Obrigada pela orientação.

À professora Vânia Ferreira, que muito contribuiu para a realização dessa pesquisa, ressaltando que este estudo foi concretizado graças ao seu apoio e dedicação, muito obrigada.

Ao aluno de iniciação científica (PIBIC), Leonardo Nogueira, por sua colaboração e dedicação na execução de fases deste estudo.

À professora Maria do Carmo, pela gentileza em realizar a revisão final desta pesquisa e pela prontidão em solucionar minhas dúvidas, além da amizade construída durante esses anos de convívio. Obrigada.

À professora Valéria Martins, por seu incentivo, pelo apoio, pela confiança e amizade. Ao professor Valter e à professora Cristiny pelo apoio e amizade.

À técnica do Laboratório de Histopatologia da Faculdade de Odontologia da UnB, Maria da Glória, pelo carinho, paciência e dedicação na confecção das lâminas histológicas.

Ao técnico do Laboratório de Histopatologia da Faculdade de Medicina da Unb, Bráulio, pelo apoio na confecção de lâminas histológicas.

Ao professor Sacha Braum pelos ensinamentos e supervisão técnica na execução da avaliação tomográfica com o *MicroCT*.

Ao professor Rivadávio Amorim pela atenção dada na elaboração da metodologia e avaliação dos resultados histológicos e leitura das lâminas.

À Susane Galli pela troca de conhecimentos, pela sintonia, pela amizade e companheirismo.

Aos professores Nilce, Soraya Leal, Jorge Faber e Érika Negrini, pelos ricos ensinamentos oferecidos em suas disciplinas.

Ao Washington Santana por sua colaboração.

Ao professor Virgílio Roriz por sua orientação e conselhos durante a elaboração e conclusão da pesquisa.

Obrigado a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse estudo.

Muito obrigada.

## RESUMO

**Objetivo:** O propósito deste estudo foi observar os efeitos da aplicação local da sinvastatina na estimulação da formação óssea em defeitos criados em calvária de ratos. Além disso, comparar os efeitos entre combinação da sinvastatina com o BoneCeramic® (carreador cerâmico) ou CollaTape® (carreador colágeno) na neoformação óssea, para identificar o melhor carreador para esta droga.

**Materiais e métodos:** Defeitos bilaterais foram obtidos nas calvárias de 15 ratas jovens. Esses defeitos tinham 5 mm de diâmetro e foram divididos em 5 grupos de acordo com o tipo de tratamento recebido: grupo 1 – controle, sem tratamento; grupo 2 (BC) - tratados com 14 mg BoneCeramic®; grupo 3 (BCS) - tratados com 14 mg de BoneCeramic® combinado com 0,1 mg de sinvastatina em solução alcoólica; grupo 4 (EC) - tratados com esponja de colágeno (CollaTape®); e grupo 5 (ECS) - tratados com esponja de colágeno combinada com 0,1 mg de sinvastatina em solução alcoólica. Após 2 semanas da cirurgia os defeitos ósseos foram submetidos a uma avaliação por MicroCT in vivo e com 8 semanas os animais foram sacrificados e as regiões dos defeitos submetidas à avaliação histomorfométrica.

**Resultados:** Os resultados do MicroCT mostraram que ambos os grupos tratados com BC e BCS mostraram um volume ósseo (VO) superior comparados aos demais grupos (EC, ECS e C), (BC  $16,76 \pm 9,39$ ; BCS  $12,47 \pm 7,38$ ; EC  $0,00 \pm 0,01$ ; ECS  $1,00 \pm 0,19$  e C  $0,45 \pm 0,64$ ). Os grupos tratados com EC e ECS mostraram resultados semelhantes ao controle (C) nesse período de avaliação. Os resultados histológicos mostraram que a utilização local da sinvastatina favoreceu à neoformação óssea. O melhor resultado quanto à neoformação óssea foi obtido no grupo tratado com BCS, seguido do grupo BC, e mínima ou nenhuma neoformação óssea foi observada nos grupos ECS, EC e C (BCS  $12,71 \pm 1,21$ ; BC  $9,04 \pm 0,86$ ; ECS  $2,25 \pm 0,61$ , EC  $0,91 \pm 0,86$  e C  $0,00 \pm 0,00$ ). A diferença na quantidade de osso neoformado entre o grupo tratado com BCS e os demais grupos avaliados foi estatisticamente significativa. No grupo tratado com BCS a quantidade de neoformação óssea foi maior do que no grupo tratado com BC somente e ECS, e essas diferenças foram estatisticamente significativas.

**Conclusão:** Por meio deste estudo conclui-se que a sinvastatina administrada de forma local favorecer a neoformação óssea. A maior quantidade de osso neoformado deve ser esperada quando um carreador cerâmico (BoneCeramic®) for utilizado em combinação com a sinvastatina na concentração utilizada no presente estudo (0,1mg).

**Palavras-chave:** experimento animal; biomateriais; substitutos ósseos; estatinas; osso; BoneCeramic®; esponja de colágeno; neoformação óssea.



## ABSTRACT

**Objectives:** The objective of the present study was to examine the effects of local application of one of the statins (simvastatin) on bone formation in rat calvaria bone defects. Furthermore, the effects of the combination of simvastatin with BoneCeramic® (ceramic carrier) or CollaTape® (collagenous carrier) on bone formation were compared to identify a better carrier for the drug.

**Materials and Methods:** Bone defects were created bilaterally on the calvaria of fifteen Wistar rats. The defects were 5 mm in diameter and were divided into 5 groups, according to the treatment performed: group 1 - control, no treatment; group 2 (BC) - treated with 14 mg of Bone Ceramic; group 3 (BCS) - treated with 14 mg of Bone Ceramic combined with 0,1 mg of simvastatin in alcoholic solution; group 4 (EC) - treated with collagen sponge (Colla Tape); and group 5 (ECS) - treated with collagen sponge combined with 0,1 mg of simvastatin in alcoholic solution. Two weeks after surgery, the bone defects were subjected to in vivo MicroCT analysis and after 8 weeks all animals were sacrificed and histomorphometrical analyses of the defects were performed. The results of the MicroCT demonstrated that the defects of both groups treated with BC and BCS exhibited a bone volume (BV) greater than the the defects of the other groups (EC, ECS, C): (BC  $16,76 \pm 9,39$ ; BCS  $12,47 \pm 7,38$ ; EC  $0,00 \pm 0,01$ ; ECS  $1,00 \pm 0,19$  e C  $0,45 \pm 0,64$ ). The groups treated with EC and ECS showed results similar to the control (C) at this time-point. The histological findings demonstrated that local simvastatin application induced bone formation. The greater amount of bone formation was observed in the defects treated with BCS, followed by BC, and minimal to no bone formation was observed in the defects of the other groups (ECS, EC, and C): (BCS  $12,71 \pm 1,21$ ; BC  $9,04 \pm 0,86$ ; ECS  $2,25 \pm 0,61$ , EC  $0,91 \pm 0,86$  e C  $0,00 \pm 0,00$ ). The difference on the amount of newly formed bone in the group treated with BCS was statistically significant as compared with the other groups. In the BCS-treated group, the amount of newly formed bone was greater than in the BC- and ECS-treated groups, and the differences were statistically significant.

**Conclusion:** The results of the present study indicate that local administration of simvastatin induces bone formation. The greater amount of newly formed bone

should be expected when a ceramic carrier (Bone Ceramic) is used in combination with simvastatin in the concentration applied in the present study (0,1mg).

**Keywords:** animal experiments; biomaterials; bone substitutes; statins bone; BoneCeramic®; collagen sponge; bone neoformation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	A ação da sinvastatina e bifosfanato sobre a síntese do colesterol.	Pág. 25
<b>Figura 2:</b>	Balança de semi-precisão e pesagem de 14mg de BoneCeramic®.	Pág. 57
<b>Figura 3:</b>	Solução com 0,1mg de sinvastatina em 15ml de etanol.	Pág. 57
<b>Figura 4:</b>	Esquema do desenho experimental nos animais.	Pág. 60
<b>Figura 5:</b>	Rato sob anestesia preparada para o procedimento cirúrgico na calvária.	Pág. 61
<b>Figura 6:</b>	Acesso cirúrgico na calvária de uma rata.	Pág. 61
<b>Figura 7:</b>	Broca Trefina® produzindo um defeito na calvária de um rato.	Pág. 61
<b>Figura 8:</b>	Osteotomia circunferencial de 5mm para a retirada da porção cortical externa da calvária.	Pág. 61
<b>Figura 9:</b>	Defeito ósseo recebendo BoneCeramic® puro.	Pág. 62
<b>Figura 10:</b>	Defeito contra-lateral recebendo BoneCeramic® umedecido com sinvastatina.	Pág. 62
<b>Figura 11:</b>	Microtomógrafo Skyscan modelo 1076.	Pág. 64
<b>Figura 12:</b>	Exposição e retirada dos tecidos moles para preparo da amostra e descalcificação.	Pág. 66
<b>Figura 13:</b>	Defeito crítico (20x) com 5mm de diâmetro, com 60 dias de pós-operatório. Grupo 1 (C). A marcação em verde indica a área do defeito e delimita o tecido neoformado.	Pág. 69
<b>Figura 14:</b>	Defeito crítico (20x) com 5mm de diâmetro com 60 dias de pós-operatório. Grupo 2 (BC). A marcação em azul indica a região do defeito e delimita o tecido neoformado. A marcação em vermelho delimita o tecido neoformado. A área em verde indica a área ocupada por BC.	Pág. 69
<b>Figura 15:</b>	Defeito crítico (20x) com 5mm de diâmetro com 60 dias de pós-operatório. Grupo 3 (BCS). A marcação em azul indica a região do defeito e delimita o tecido neoformado. A marcação em vermelho delimita as regiões de neoformação óssea. A área em verde indica a área ocupada por BC.	Pág. 70
<b>Figura 16:</b>	Defeito crítico (20x) com 5mm de diâmetro com 60 dias de pós-operatório. Grupo 4 (EC). A marcação em azul indica a região do defeito e delimita o tecido neoformado. A marcação em verde indica as áreas de neoformação óssea.	Pág. 70
<b>Figura 17:</b>	Defeito crítico (20x) com 5mm de diâmetro com 60 dias de pós-operatório. Grupo 5 (ECS). A marcação em azul indica a região do defeito e delimita o tecido neoformado. A marcação em verde indica as áreas de neoformação óssea.	Pág. 71
<b>Figura 18(A):</b>	Micro CT das regiões tratadas com BC (lado esquerdo) e BCS (lado direito).	Pág. 73
<b>Figura 18(B):</b>	Micro CT das regiões tratadas com EC (lado esquerdo) e ECS (lado direito).	Pág. 73
<b>Figura 19(C):</b>	Micro CT das regiões tratadas com C (lado esquerdo) e BC (lado direito).	Pág. 74
<b>Figura 19(D):</b>	Micro CT das regiões tratadas com C (lado esquerdo) e BCS (lado direito).	Pág. 74
<b>Figura 20(E):</b>	Micro CT das regiões tratadas com C (lado esquerdo) e EC (lado direito).	Pág. 74
<b>Figura 20(F):</b>	Micro CT das regiões tratadas com C (lado esquerdo) e BCS (lado direito).	Pág. 74

	(lado direito)	
<b>Figura 21:</b>	Gráfico da distribuição do volume tecidual (VT)	Pág. 76
<b>Figura 22:</b>	Gráfico da distribuição do volume ósseo (VO)	Pág. 76
<b>Figura 23:</b>	Gráfico da distribuição do percentual do volume ósseo sobre o volume tecidual (VO/VT)	Pág. 77
<b>Figura 24:</b>	Distribuição do percentual da área de neoformação óssea.	Pág. 80
<b>Figura 25:</b>	Distribuição do percentual da área ocupada por partículas remanescentes de BC	Pág. 82
<b>Figura 26:</b>	Imagens A, B, C, D e E, obtidas pelo escaner <i>Aperio ePathology</i>	Pág. 83
<b>Figura 27:</b>	A presença de tecido conjuntivo no defeito sem tratamento, preenchido somente por coágulo.	Pág. 84
<b>Figura 28:</b>	Aumento (200x) do corte histológico do grupo 2 (BC).	Pág. 85
<b>Figura 29:</b>	Aumento (200x) do corte histológico do grupo 3 (BCS).	Pág. 86
<b>Figura 30:</b>	Aumento (200x) do corte histológico do grupo 4 (EC).	Pág. 87
<b>Figura 31:</b>	Aumento (200x) do corte histológico do grupo 5 (ECS).	Pág. 88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Estudos que identificaram os efeitos favoráveis, no tecido ósseo, com a utilização sistêmica da sinvastatina por via oral.	Pág. 28
<b>Tabela 2:</b>	Estudos que não identificaram os efeitos favoráveis, no tecido ósseo, com a utilização sistêmica da sinvastatina por via oral.	Pág. 29
<b>Tabela 3:</b>	Estudos sobre a utilização sistêmica da sinvastatina (SVT) por meio de injeções.	Pág. 32
<b>Tabela 4:</b>	Estudos sobre os carreadores para a sinvastatina (SVT).	Pág. 34
<b>Tabela 5:</b>	Estudos sobre as doses de sinvastatina para administração local.	Pág. 43
<b>Tabela 6:</b>	Parâmetros de aquisição de imagens no MicroCT Skyscan 1076.	Pág. 64
<b>Tabela 7:</b>	Resultados da avaliação do MicroCT na comparação dos tratamentos dos grupos BC, BCS, EC e ECS comparados com o grupo controle C após duas semanas da cirurgia.	Pág. 75
<b>Tabela 8:</b>	Resultados da avaliação do Micro CT em relação aos efeitos dos tratamentos com BC, BCS, EC e ECS na neoformação óssea em um período de 2 semanas.	Pág. 75
<b>Tabela 9:</b>	Resultados histológicos da comparação dos tratamentos BC, BCS, EC e ECS comparados com o grupo controle C após 60 dias da cirurgia.	Pág. 79
<b>Tabela 10:</b>	Resultados histológicos da comparação dos efeitos dos tratamentos BC, SVT e EC.	Pág. 81
<b>Tabela 11:</b>	Resultados histológicos da área ocupada por partículas remanescentes de BC nos defeitos ósseos dos grupos 2 e 3 após 60 dias da cirurgia.	Pág. 82

## LISTA DE SIGLAS

AON:	área de tecido ósseo neoformado
BC:	BoneCeramic®
BCS:	BoneCeramic® associado com sinvastatina
BMP2:	proteína óssea morfogenética
BMSCA:	células tronco mesequimais
C:	Coágulo
CEUA:	Comissão de Ética no Uso de Animais
DBB:	osso bovino desmineralizado
EC:	esponja de colágeno
ECS:	esponja de colágeno associado com sinvastatina
FGF <sup>2</sup> :	fator de crescimento fibroblasto
GTPases:	trifosfatases guanosinas
HA:	Hidroxiapatita
HDL:	lipoproteínas de alta densidade
HMG-CoA:	3-Hidroxi-3metilglutaril coenzima A redutase
LDL:	lipoproteínas de baixa densidade
MC <sub>3</sub> T <sub>3</sub> -E <sub>1</sub> :	células da linhagem pré-osteoblástica
Micro-CT:	microtomografia computadorizada
µL:	Microlitro
mm:	Milímetros
NO:	óxido nítrico
OVX:	Ovariectomizadas
PCL:	poli (ε-caprolactona)
PDLA:	poli (D – ácido láctico)
PDLLA:	poli (DL – ácido láctico)
PGA:	poli (ácido glicólico)
PECL:	poli (ε-prolactona e poli(etilenoglicol))
PLA:	poli (ácido láctico)
PLCL:	poli (lactídeo)-co-poli (ε-caprolactona)
PLDLA:	poli (L-co-DL ácido láctico)
PLGA:	poli (ácido láctico-co-glicólico)
PLLA:	poli (L-ácido láctico)
PTH:	paratohormônio – hormônio paratireoide
RANKL:	ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B.
Rh-BMP2:	proteína óssea morfogenética recombinante humana 2.
RNA-m:	ácido ribonucleico mensageiro
SVA:	forma ativa da sinvastatina – beta-hidroxiácido de sinvastatina
SVT:	Sinvastatina
TGFβ1:	fator de crescimento transformador beta 1
UnB:	Universidade de Brasília
VEGF:	falta de crescimento vascular endotelial
VLDL:	lipoproteínas de muita baixa densidade
VO:	volume ósseo
VO/VT:	percentual do volume ósseo sobre o volume tecidual
VT:	volume tecidual
α-TCP:	alfa tricálcio fosfato
β-TCP:	beta tricálcio fosfato

## LISTA DE ANEXOS

- ANEXO A:** Declaração de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FM. UnBDoc 44299/2012.
- ANEXO B:** Declaração Universal dos Direitos dos Animais, proclamada pela UNESCO em sessão realizada em Bruxelas, em 27 de janeiro de 1978.
- ANEXO C:** Article Submission Dircilei Nascimento de Sousa, de 23/10/2013.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
2.1 AS ESTATINAS .....	21
2.2 HISTÓRICO .....	22
2.3 CLASSIFICAÇÃO DAS ESTATINAS.....	23
2.4 AS ESTATINAS NO CONTROLE DO COLESTEROL .....	24
2,5 EFEITOS ADVERSOS APÓS ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA.....	27
2.6 SINVASTATINA USO SISTÊMICO EM ANIMAIS .....	28
2.6.1 ESTUDOS COM RESULTADOS FAVORÁVEIS AO USO DAS ESTATINAS PARA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA .....	28
2.6.2 ESTUDOS COM RESULTADOS DESFAVORÁVEIS AO USO SISTÊMICO DAS ESTATINAS NA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA.....	29
2.7 CARREADORES PARA A SINVASTATINA.....	32
2.8 VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS CARREADORES PARA O USO DA SINVASTATINA.....	33
2.9 EFEITO DA SINVASTATINA NO METABOLISMO ÓSSEO .....	41
2.10 DOSE DA SINVASTATINA PARA ADMINISTRAÇÃO LOCAL .....	42
2.12 A NECESSIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MATERIAIS PARA A NEOFORMAÇÃO ÓSSEA .....	49
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>52</b>
<b>4 OBJETIVOS GERAIS.....</b>	<b>53</b>
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	53
<b>5 METODOLOGIA.....</b>	<b>54</b>
5.1 O USO DA SINVASTATINA EM EXPERIMENTO COM ANIMAIS .....	54
5.2 FOSFATO DE CÁLCIO BIFÁSICO, BONECERAMIC® .....	55
5.3 ESPONJA DE COLÁGENO POROSA, COLLATAPE® .....	55
5.4 PREPARO DA SINVASTATINA E BONECERAMIC® .....	56
5.5 ANESTESIA E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO .....	57
5.6 GRUPO 1: GRUPO CONTROLE COÁGULO (C) .....	57
5.7 GRUPO 2: GRUPO DO BONECERAMIC® (BC) .....	58
5.8 GRUPO 3: GRUPO DO BONECERAMIC® MAIS SINVASTATINA (BCS) .....	58
5.9 GRUPO 4: GRUPO DA COLLATAPE® (EC) .....	58
5.10 GRUPO 5: GRUPO DA SINVASTATINA COMBINADA COM COLLATAPE® (ECS) .....	58
5.11 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (MICRO CT).....	62
5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO MICRO CT .....	65
5.13 EUTANÁSIA .....	66
5.14 PREPARO HISTOLÓGICO.....	66
5.15 ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	67
5.15.1 ANÁLISE DESCRITIVA .....	68
5.15.2 ANÁLISE HISTOMÉTRICA .....	68



5.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA HISTOLOGIA.....	71
<b><u>6 RESULTADOS .....</u></b>	<b><u>72</u></b>
<b><u>6.1 ANÁLISE TOMOGRÁFICA .....</u></b>	<b><u>72</u></b>
6.2 RESULTADOS ESTATÍSTICOS DA HISTOMETRIA.....	77
6.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA.....	83
6.3.1 GRUPO 1 - COÁGULO (C) .....	84
6.3.2 GRUPO 2 - BONECERAMIC® SEM SINVASTATINA (BC). .....	84
6.3.3 GRUPO 3 - BONECERAMIC® COM SINVASTATINA (BCS).....	85
6.3.4 GRUPO 4 – ESPONJA DE COLÁGENO (EC).....	87
6.3.5 GRUPO 5 - ESPONJA DE COLÁGENO COM SINVASTATINA (ECS). .....	87
<b><u>7 DISCUSSÃO .....</u></b>	<b><u>89</u></b>
<b><u>8 CONCLUSÃO .....</u></b>	<b><u>99</u></b>
<b><u>9 REFERÊNCIAS .....</u></b>	<b><u>100</u></b>
<b><u>ANEXOS.....</u></b>	<b><u>119</u></b>

## 1 INTRODUÇÃO

---

Muitos estudos relatam sobre as importantes mudanças estruturais que ocorrem no osso após doenças periodontais e extrações dos dentes, como, por exemplo, redução da altura e espessura óssea que, muitas vezes, comprometem a reabilitação oral dos pacientes, especialmente na região anterior da maxila onde o volume ósseo é importante por razões estéticas e biológicas (1,2,3,4,5).

Diferentes modalidades de tratamento, incluindo enxertos ósseos, regeneração tecidual óssea guiada e fatores de crescimento, têm sido testadas há vários anos com o objetivo de alcançar a regeneração do osso ou dos tecidos periodontais de suporte (osso alveolar, cemento e ligamento periodontal) em áreas de defeitos ósseos ou periodontais, respectivamente (6,7,8,9,10).

Há muitos anos o padrão ouro utilizado para enxerto ósseo tem sido o do tipo autógeno, ou seja, o enxerto ósseo é obtido do próprio paciente proveniente de diferentes regiões denominadas doadoras, intra ou extra-orais: ramo da mandíbula, mento, calota craniana, tibia, entre outras (11). Apresenta como vantagem o seu potencial osteogênico, osteoindutor e osteocondutor. Por outro lado, tem como desvantagem o potencial de reabsorção, dificuldade de adaptação na área receptora, além da necessidade de uma área doadora que, para alguns casos, pode ser limitada (9,12).

A busca por um substituto ósseo tem aumentado ao longo dos anos devido à limitação do volume ósseo removido da área doadora e, principalmente, pela morbidade cirúrgica (13). Um material que elimine a necessidade de abordagem da área doadora propiciará novos avanços na pesquisa de biomateriais e a produção de diferentes substitutos ósseos (14).

Vários materiais foram desenvolvidos ao longo dos anos, incluindo enxertos homogêneos, xenógenos, heterogêneos e aloplásticos. Classicamente, os materiais para enxerto ósseo podem ser classificados como osteogênicos, quando se referem a materiais orgânicos capazes de estimular a formação de osso diretamente a partir de osteoblastos; osteoindutores, os quais são capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ou condroblastos,

aumentando a formação óssea no local ou mesmo estimular a formação de osso em um sítio heterotópico; e osteocondutores (geralmente inorgânicos), que permitem a aposição de um novo tecido ósseo na sua superfície, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras (15,16,17). Um substituto ósseo deve ser biocompatível, apresentar uma quimiotaxia para formação de novos vasos sanguíneos, estimular a osteoindução, promover a osteocondução e, por último, ser substituído completamente por osso em quantidade e qualidade semelhantes ao do hospedeiro (18,19,13).

O uso de compostos farmacológicos que promovem a síntese de fatores de crescimento osteogênicos é uma técnica promissora no tratamento de defeitos ósseos (20). Há estudos na literatura sobre medicamentos que apresentam ação no tecido ósseo, tais como a calcitonina (21), os bifosfonatos (22) e as estatinas (20), sendo estas últimas amplamente utilizadas para reduzir o nível de colesterol no sangue. Pesquisas relatam que estes medicamentos podem estimular a formação óssea, verificada através do aumento da atividade da fosfatase alcalina, expressão do nível da osteocalcina, depósitos minerais e BMP-2, o que sugere um efeito anabólico sobre o tecido ósseo pelo aumento da diferenciação dos osteoblastos (23,24,25,26).

As estatinas têm mostrado efeitos promissores em várias aplicações médicas. Um dos benefícios das estatinas que chama atenção é a habilidade de aumentar a expressão da proteína morfogenética (BMP-2), fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF) e fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1) (27,26,28,29,9,30,4,31). Estudos têm investigado os efeitos da administração sistêmica e aplicação local desta droga sobre a cicatrização óssea. Alguns efeitos adversos da sinvastatina podem surgir quando altas doses desse medicamento são aplicadas sistemicamente, aumentando o risco de falhas do fígado, doenças renais e danos aos tecidos musculares, enquanto baixas doses podem ser ineficientes para a cicatrização óssea (32,10).

De acordo com alguns estudos, o efeito osteogênico da sinvastatina ocorre após aplicações locais com diferentes carreadores em vários modelos animais. O efeito sobre o crescimento ósseo é mais favorável com doses reduzidas de 2.2mg para 0,5mg, além de reduzir a inflamação para níveis clínicos mais aceitáveis

(33,34). Há evidências que as estatinas tem um efeito favorável à angiogênese quando utilizadas em baixas doses e um efeito contrário quando usadas em altas doses (27). Em contra partida, as estatinas administradas por via oral são mal distribuídas ao osso. Menos do que 5% de uma dose oral alcança a circulação sistêmica. As doses necessárias para ter um efeito sobre o osso são muito mais elevadas do que as necessárias para reduzir os níveis de colesterol, além de associadas à toxicidade inaceitáveis (35,36,37).

A dose ideal da sinvastatina para estimular o máximo de neoformação óssea sem induzir inflamação em calvária de ratos é 0,1 mg, principalmente se associada com um biomaterial osteocondutor capaz de liberar a droga gradualmente, como o  $\alpha$ -tricálcio fosfato( $\alpha$ -TCP), (9).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

---

O estudo sobre as estatinas tem despertado interesse de várias áreas da medicina como: a ortopedia, cardiologia, endocrinologia (38,39,40,41,42,43,28,44) e também algumas especialidades odontológicas como a ortodontia (45), a implantodontia (46,12,47,48,49) e a periodontia (50,51,52,53,54,55) devido aos seus efeitos positivos sobre a cicatrização óssea além dos benefícios já comprovados como a redução da hipercolesterolemia.

### 2.1 AS ESTATINAS

As estatinas são medicamentos muito utilizados nas duas últimas décadas para a redução de níveis elevados de colesterol plasmático. São inibidores competitivos da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A (HMG-CoA) redutase, enzima que catalisa a conversão do HMG-CoA a mevalonato, um intermediário importante no metabolismo do colesterol (56,57,29,58). O metabolismo do mevalonato dá origem a uma série de compostos isoprenoides vitais para diversas funções celulares. Quando este componente é inibido, as estatinas podem levar a outros efeitos benéficos, além da redução da hipercolesterolemia, como redução da inflamação, inibição da proliferação celular com propriedades anticarcinogênicas, estabilização de placas ateroscleróticas, redução do stress oxidativo, melhora da função endotelial, modulação da resposta imune, ajuda na cicatrização de lesões traumáticas cerebrais, lesões da medula espinhal cervical e ação no tecido ósseo (33,34,59,60,36,28,61,62,54,55,63,31).

Essas drogas têm sido muito bem documentadas clinicamente por seus benefícios na redução de incidência de infarto do miocárdio, mortes provenientes de doenças do coração e efeitos benéficos cardiovasculares, independente dos seus efeitos na redução do colesterol (64,65,59,66,58). Além dos efeitos antioxidantes, as estatinas têm ação anti-inflamatória e também podem promover o aumento da bioviabilidade do óxido nítrico (61,64,67,68). Alguns estudos adicionam ainda o seu efeito sobre a angiogênese (23,69,70,4).

O grau de solubilidade das estatinas está diretamente relacionado com seus efeitos secundários, sendo assim, as estatinas lipofílicas como, por exemplo, a sinvastatina apresenta maior potencial osteogênico (71,72). Além disso, exercem maior influência na via dos monócitos que regulam a produção de citocinas, induzindo uma resposta inflamatória mais controlada, tanto *in vitro* como *in vivo*, quando comparadas às hidrofílicas como a atorvastatina e fluvastatina (72).

O mecanismo pelo qual as estatinas podem afetar o esqueleto foi descoberto por Mundy et al. (1999) (73) ao estudarem a estimulação da formação óssea pelas estatinas, *in vitro* e *in vivo*, em roedores. Cerca de 30.000 compostos naturais foram testados em cultura de células ósseas murinas à procura daqueles que pudessem aumentar a produção de BMP-2. Esta proteína é um fator de crescimento que estimula a proliferação de osteoblastos, maturação e formação de novo osso. Observaram que a lovastatin, fluvastatin, sinvastatina e mevastatina aumentaram a expressão do RNA-m da proteína morfogenética-2 (BMP-2) e mais que dobraram a produção da proteína morfogenética-2 (BMP-2) *in vitro*. Da mesma forma, estudos *in vivo* também apresentaram resultados similares, sugerindo um efeito osteoindutor desses medicamentos.

A proteína óssea morfogenética BMP-2 pode iniciar todos os mecanismos moleculares requeridos para a indução da formação óssea, incluindo a ordem de migração, proliferação, e diferenciação de osteoprogenitor, além da diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos funcionais (29,30).

## 2.2 HISTÓRICO

A mevastatina foi a primeira estatina descrita, isolada de culturas de *Penicillium citrinum*. Inibe especificamente e de modo competitivo a HMG-CoA redutase, que é a enzima limitante no metabolismo do colesterol e não afeta o restante das enzimas envolvidas (74). Em 1980, Alberts et al., (75) isolaram a lovastatina, estatina estruturalmente análoga à mevastatina, a partir de culturas de *Aspergillus terreus*. A sinvastatina e a pravastatina são modificações químicas da Lovastatina, sendo consideradas formas semi-sintéticas (76,77). A sinvastatina

resulta da modificação química da lovastatin, na qual há substituição do 2-metil-butiril preso na superfície da lovastatina por um do grupo 2,2- dimetil-butiril. Constitui uma droga inativa e após a administração oral se converte em uma forma de ácido ativo dihidroxi pela enzima intracelular *cytochrome* P450 dentro do fígado (56,36). A fluvastatina, atorvastatina e cerivastatina são totalmente sintéticas (78,77).

## 2.3 CLASSIFICAÇÃO DAS ESTATINAS

### A) Quanto à solubilidade

#### a.1) hidrofóbica ou lipofílica:

- Sinvastatina (57,71,79,72)
- Cerivastatina (57)

#### a.2) Hidrofílica:

- Pravastatina (79)
- Atorvastatina (72)
- Fluvastatina (72)
- Rosuvastatina (57)

### B) Quanto à origem:

#### B.1) Natural:

- Mevastatina (74)
- Lovastatina (75)

#### B.2) Sintética:

- Fluvastatina (78,77)
- Atorvastatina (78,77)
- Cerivastatina (78,77)

#### B.3) Semi-sintética:

- Sinvastatina (76,77)
- Pravastatina (76,77)

## 2.4 AS ESTATINAS NO CONTROLE DO COLESTEROL

Para entender os efeitos das estatinas e dos bifosfonatos no organismo humano é preciso primeiro compreender como ocorre a síntese do colesterol e onde vão atuar essas drogas (80). Russel et al. (1999) (81) descreveram de forma bastante clara a síntese do colesterol (Fig.1). A HMG-CoA é convertida sob ação da HMG-CoA redutase (a qual é inibida pela droga estatina), em mevalonato. Em seguida, o mevalonato é convertido em geranyl pirofosfato, a qual, por sua vez, é convertida para farnesil pirofosfato pela enzima farnesil pirofosfato sintase, onde atua os bifosfonatos inibindo-a. Como resultado tem-se o esqualeno e finalmente o colesterol.

Os osteoclastos usam as moléculas intermediárias farnesil pirofosfato e geranyl pirofosfato (Obtidas através da ação da farnesil pirofosfato sintase) para modificar e ativar as principais proteínas intracelulares- glutamil transpeptidase e GTPases durante o processo chamado prenilação (adição de moléculas hidrofóbicas a uma proteína) (82). Os bifosfonatos como o alendronato e risedronato, previnem a formação destes produtos lipídicos quando atuam inibindo a enzima farnesil sintase (83,84). As estatinas que atuam inibindo a enzima HMG-CoA redutase são igualmente efetivas para prevenir a ativação dos osteoclastos in vitro pela inibição da produção do mevalonato (57).

A síntese de colesterol e a ativação dos osteoclastos usam a mesma cascata bioquímica (Fig. 1).



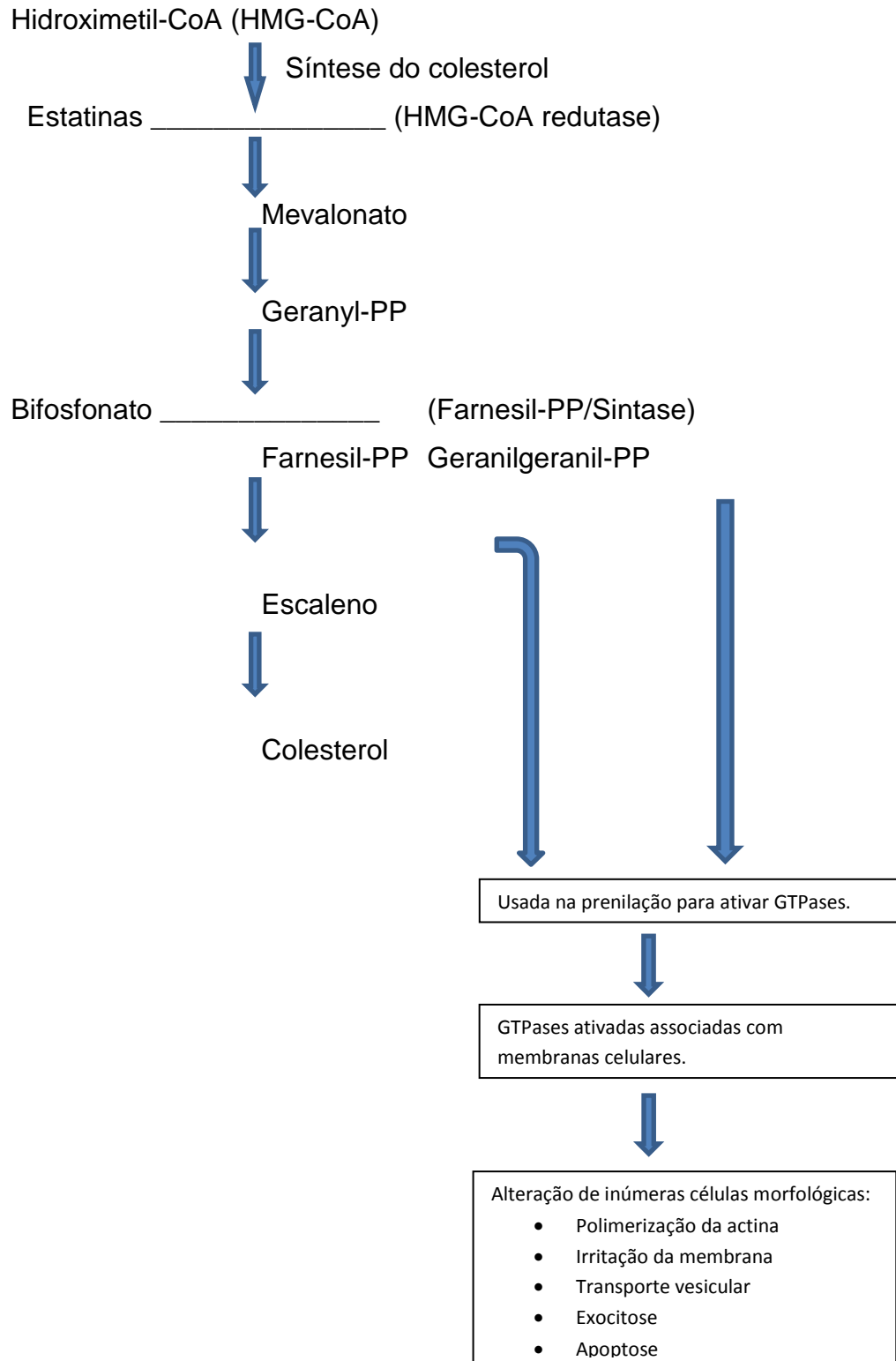


Figura 1: Esquema sobre a ação do bifosfonato sobre a síntese do colesterol. Russel et al.(1999) (81).

Os osteoclastos morrem por apoptose quando expostos às estatinas e aos bifosfonatos. O resultado disto é remodelação e reabsorção óssea reduzidas (85,86).

O colesterol, sintetizado ou derivado da dieta, tem vários papéis importantes porque é o principal esteroide humano. Este esteroide compõe, praticamente, todas as membranas plasmáticas e intracelulares (87). Esse esteroide pode ser produzido pelo fígado e por tecidos periféricos ou a partir das lipoproteínas circulantes. O colesterol circula continuamente entre o fígado e os tecidos periféricos; enquanto lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e de muito baixa densidade (VLDL) o transportam do fígado aos tecidos periféricos, as de alta densidade (HDL) transportam-no de volta ao fígado (88). O colesterol é sintetizado por vários tecidos a partir da acetil-coenzima A (acetil-CoA), mas a maior parte é sintetizada no fígado, intestino, córtex adrenal e tecidos reprodutores (87).

Garret; Mundy (2002) (89) relatam que o primeiro local onde ocorre a síntese do colesterol é o fígado. Todas as estatinas avaliadas têm sido selecionadas por sua ação no fígado e atuam na redução da biossíntese do colesterol, porém são pobremente distribuídas ao osso. Os autores defendem que a administração oral desse medicamento não produz efeitos benéficos no osso humano de forma concreta, mas existem muitas possibilidades de melhorar a sua biodistribuição para esse tecido. As concentrações desse medicamento no osso medular ainda não estão bem esclarecidas, porém talvez osteoclastos e osteoblastos sejam expostos a baixas concentrações de estatinas com regime oral existente.

O uso das estatinas para redução do colesterol em pacientes não aumentou, no plasma, os marcadores do crescimento ósseo, como a fosfatase alcalina ou osteocalcina, conforme I.R. Garret et al., 2007 (90).

Patil et al. (2009) (91) acrescentam ainda que a sinvastatina administrada de forma sistêmica por via oral, em uma concentração de 20 mg, não altera a densidade óssea mineral nos marcadores ósseos biomecânicos, como também não afeta a cicatrização de fraturas ósseas em humanos após trauma. Isto pode ser

explicado pelo fato desta droga apresentar uma baixa biodisponibilidade para o tecido ósseo.

As estatinas administradas oralmente, especialmente as hidrofílicas como a pravastatina e rovastatina, têm um alvo específico de atuação no fígado e, em doses padrão, não oferecem níveis de circulação suficientes para causarem efeito nos tecidos ósseos (57).

Um estudo clínico controlado, randomizado e prospectivo avaliou o efeito de doses moderadas e altas de sinvastatina sobre a densidade óssea mineral e marcadores ósseos. Em 212 pacientes com hiperlipidemia, pôde-se observar que após 18 meses de tratamento, utilizando 40-80 mg de sinvastatina diariamente, houve um aumento significativo da formação óssea, tendo sido observada menor reabsorção do tecido mineral e aumento da densidade óssea mineral. As estatinas lipofílicas podem oferecer um metabolismo ósseo superior e isto está relacionado com o aumento da densidade óssea mineral (72).

Ma et al. (2008) (49) descrevem que a sinvastatina é uma pró-droga que necessita ser ativada por lactonases e este processo ocorre durante o seu primeiro passo de metabolismo no fígado e por esterases no intestino.

Inúmeros estudos têm demonstrado o potencial das estatinas para aumentar a neoformação óssea (27,26,28,29,9,30,4,31,72). Embora existam muitas informações sobre os efeitos benéficos da sinvastatina na neoformação óssea, obtidos por meio de estudos pré-clínicos e clínicos, há também resultados descritos na literatura mostrando que este medicamento não tem efeito anabólico sobre o tecido ósseo (57,32,10,91,89) . Isto se deve, provavelmente, ao fato de que o efeito da sinvastatina pode ser influenciado pela forma de administração, duração da exposição em modelo experimental em animais e biodistribuição (92).

## 2,5 EFEITOS ADVERSOS APÓS ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA

A sinvastatina administrada de forma sistêmica exerce um efeito adverso sobre os tecidos moles, principalmente sobre o tecido do nervo ciático e um efeito pleiotrópico (efeito benéfico) sobre o tecido ósseo. Tais achados foram relatados por

Garip et al. (2010) (94), após administrarem 50mg/Kg/dia de sinvastatina por gavagem durante 30 dias em ratos adultos, machos. Tecidos moles como fígado, testículo e nervo ciático, bem como tecido ósseo da tíbia e fêmur foram afetados. A sinvastatina induziu, ao final do estudo, mudanças na conformação proteica e efeitos adversos nos tecidos moles como: miopatia, rabdomiólise, hepatotoxicidade, neuropatia periférica, disfunção erétil e efeitos pleiotrópicos nos tecidos duros.

## 2.6 SINVASTATINA USO SISTÊMICO EM ANIMAIS

A sinvastatina é um medicamento hipolipidêmico e alguns trabalhos observaram a sua ação anabólica no tecido ósseo após administração sistêmica, enquanto outros não verificaram este efeito.

### 2.6.1 ESTUDOS COM RESULTADOS FAVORÁVEIS AO USO DAS ESTATINAS PARA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

Tabela 1: Estudos que identificaram efeitos favoráveis no tecido ósseo com a utilização sistêmica da sinvastatina por via oral.

DOSE SISTÊMICA VIA ORAL / GAVAGEM / RESULTADOS POSITIVOS				
TIPO DE ESTUDO	DOSE DE SINVASTATINA	TEMPO DE ADMINISTRAÇÃO	RESULTADO	AUTORES
<b>Experimental <i>in vivo</i> – 20 ratos machos. Dano induzido na coluna vertebral.</b>	120mg/kg/dia	12 semanas	Os resultados histológicos, mecânicos e radiográficos revelaram que a sinvastatina promoveu uma melhor fusão da coluna vertebral, em relação ao controle sem sinvastatina.	Bostam et al. 2011 (38)
<b>Experimental <i>in vivo</i> – 32 ratas. Isquemia unilateral, induzida de membros posteriores.</b>	0,2mg/kg/dia	3 semanas	Promoveu angiogênese e melhorou a perfusão sanguínea nos grupos tratados com sinvastatina após a isquemia dos membros posteriores	Zhang et al. 2012 (70)
<b>Experimental <i>in vivo</i> – 84 ratas ovariectomizadas</b>	5mg/kg/dia ou 10mg/kg/dia	6 semanas	Melhorou a densidade óssea mineral da lombar vertebral e apresentou efeito sinérgico com o hormônio estradiol, aumentando a sua expressão. Isso poderia explicar o seu efeito no	Li et al. 2011 (42)

			tratamento da osteoporose, causada por deficiência do estrógeno.	
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal 26 ratos. Tratamento da tibia</b>	50mg/kg/dia (dose alta) X 20mg/kg/dia (dose baixa)	4 semanas	Baixas concentrações de sinvastatina (20mg/kg/dia) são mais efetivas para aumentar a resistência óssea.	Garip & Severcan 2010 (66)
<b>Animal 54 ratas ovariectomizadas</b>	10mg/kg/dia X 20mg/kg/dia	24 semanas	A concentração de 20mg proporcionou aumento significativo de células osteoblásticas e o aumento de proteínas osteogênicas no osso, o que poderia contribuir para o tratamento de osteoporose.	Ho et al. 2009 (28)
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal (54) ratas osteoporóticas. Implantes de titânio na tibia.</b>	5mg/kg/dia	4 semanas X 11 semanas	A sinvastatina melhorou a osteointegração dos implantes nesses animais com osteoporose.	Du et al. 2009 (43)
<b>Experimental <i>in vivo</i> - 212 Pacientes humanos. Estudo prospectivo randomizado, controlado com hiperlipidemia.</b>	40mg/dia X 80mg/dia	72 semanas	Houve aumento significativo de formação óssea e reduzida reabsorção, com aumento da densidade osseomineral.	Chuegsamarn et al. 2010 (72)

## 2.6.2 ESTUDOS COM RESULTADOS DESFAVORÁVEIS AO USO SISTÊMICO DAS ESTATINAS NA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

Tabela 2: Estudos que não identificaram efeitos favoráveis à utilização sistêmica da sinvastatina por via oral no tecido ósseo.

DOSE SISTÊMICA VIA ORAL / GAVAGEM / RESULTADOS NEGATIVOS				
TIPO DE ESTUDO	DOSE DE SINVASTATINA	TEMPO DE ADMINISTRAÇÃO	RESULTADO	AUTORES
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal – 72 ratas ovariectomizadas</b>	10mg/kg/dia de sinvastatina x 80ug/kg/dia de (paratohormonio)PTH	8 semanas	A sinvastatina falhou em estimular a atividade osteoblástica e a formação óssea, enquanto a concentração de PTH foi eficiente na estimulação óssea.	Stechow et al. 2003 (93)
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal – 35 ratas. Reparo dos defeitos obtidos no ângulo da</b>	20mg/kg/dia	2 / 4 e 8 semanas	A sinvastatina não teve efeito no processo de reparação óssea.	Landim et al. 2010 (94)

<b>mandíbula.</b>				
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal – 12 ratos. Tratamento de periodontite induzido por ligadura</b>	30mg/kg/dia de sinvastatina X 30mg/kg/dia de água.	4 semanas	Não houve neoformação óssea periodontal com o uso da sinvastatina. Não houve diferença de resultados nos dois grupos avaliados.	Marcondes et al. 2008 (95)
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal – 54 coelhos. Cicatrização de fratura óssea</b>	30mg/kg/dia X 10mg/kg/dia		Na dosagem maior houve efeito negativo na cicatrização óssea e na dosagem menor, não houve qualquer efeito na cicatrização óssea.	Chissas et al. 2010 (96)
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal 20 ratos.</b>	50mg/kg/dia	4 semanas	A sinvastatina induziu mudanças na conformação proteica com efeitos adversos nos tecidos moles e efeitos pleitrópicos nos tecidos duros.	Garip et al. 2010 (58)
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal – 162 ratos. Implantes inseridos para preencher defeitos ósseos, associados com beta TCP na posição coronal dos implantes</b>	5, 10 ou 50mg/kg/dia	3 semanas e meia.	Não favoreceu a cicatrização óssea e mostrou-se ineficiente, tanto para promover a reabsorção cerâmica quanto para promover a reabsorção óssea, sugerindo que as doses utilizadas eram muito baixas para produzir efeitos nas células ósseas, junto com o material de enxerto utilizado.	Ma et al., 2008 (49)
<b>Experimental <i>in vivo</i> - 6 Pacientes humanos</b>	15mg/kg/dia		Não houve efeito benéfico no metabolismo ósseo de pacientes com mielomas múltiplos.	Sondegard et al. 2009 (32)

Quando a atividade da sinvastatina (SVT) foi comparada com o efeito já conhecido do PTH (Hormônio Paratireoide 1-34) em um modelo estabelecido de ratas ovariectomizadas (OVX) constatou-se que o PTH foi eficiente em estimular a formação óssea, o que não ocorreu com o uso das sinvastatinas (93). Landim et al (2010) (94) verificaram que baixas doses de sinvastatinas administradas de forma sistêmica não tiveram efeito sobre o processo de reparação óssea em mandíbula de ratas após análise histológica e densitometria óssea. A sinvastatina não teve efeito sobre o processo de reparação óssea.

A sinvastatina administrada de forma sistêmica também não foi eficiente para reduzir a perda óssea relacionada à periodontite, em um estudo em que a periodontite foi induzida por ligadura ao redor dos primeiros molares inferiores de

doze ratos. O grupo tratado recebeu, por via oral, 30 mg/kg/dia de sinvastatina, e o grupo controle igual volume de água. Depois de 30 dias, os animais foram sacrificados e as mandíbulas removidas para avaliação da perda óssea alveolar em estereomicroscópio. Após análise estatística, não foi observada diferença entre os grupos (95).

Chissas et al. (2010) (96) relataram que doses de sinvastatina de 30mg/Kg/dia, podem ter um efeito negativo na cicatrização óssea, enquanto doses inferiores, na ordem de 10mg/kg/dia não exerceram qualquer efeito sobre a cicatrização óssea, especialmente nos estágios precoces de remodelação de fratura. Os autores investigaram neste estudo o potencial do efeito anabólico com a administração sistêmica de doses baixas de sinvastatina, na cicatrização de fraturas, obtidas em 54 coelhos. Exames bioquímicos sanguíneos, testes biomecânicos, análise histomorfométrica e tomografia computadorizada quantitativa periférica foram utilizados para analisar os resultados.

Muitos estudos em animais (38,45,66,28,43,70) demonstraram um efeito favorável ao uso sistêmico da sinvastatina na regeneração óssea (Tabela 1). Alguns autores verificaram que este efeito é possível com a utilização de doses elevadas (45,38,72,47), embora haja o risco de induzir mudanças na conformação proteica com efeitos adversos aos tecidos moles (58) e ocasionar sintomas gastro-intestinais, tais como náuseas, vômitos, constipação, dores abdominais e diarreia (32). O efeito da sinvastatina sobre o tecido ósseo não foi verificado em algumas pesquisas com a utilização sistêmica dessa droga e com doses elevadas (96,95,32).

Estatinas estimulam a formação óssea *in vitro* e *in vivo* e quando dadas em altas doses ou por prolongadas infusões, estimulam a resistência biomecânica na cicatrização de fraturas de ossos longos de ratos. Entretanto, a administração de doses orais altas ou prolongadas infusões para o sítio da fratura não constitui uma técnica terapêutica praticável para acelerar a cicatrização de fraturas em humanos (90).

Tabela 3: Estudos sobre a utilização sistêmica da sinvastatina (SVT) por meio de injeções.

DOSE SISTÊMICA / INJEÇÃO				
TIPO DE ESTUDO	DOSE DE SINVASTATINA	TEMPO DE ADMINISTRAÇÃO	RESULTADO	AUTORES
Experimental <i>in vivo</i> - Experimental <i>in vivo</i> - Animal 20 coelhos machos. Implantes cilíndricos de titânio, inseridos no fêmur.	50mg/kg/dia/via subcutanea	6 semanas	Aumento da estabilidade e adaptação óssea superior na interface osso/implante no grupo tratado com a sinvastatina.	Basarir et al. 2009 (47)
Animal – 32 ratos.	2,5mg/kg/dia	4 semanas	Favoreceu a manutenção dos resultados ortodônticos ao inibir a atividade dos osteoplastos e estimular a formação óssea. Aumento da osteoprotegerina e diminuição do RANKL.	Han et al. 2010 (45)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal 60 ratas. Implantes inseridos na tíbia	0; 0,125; 1; 5 ou 10mg/kg/dia/intr aperitonealmente	4 semanas	O efeito osteogênico da sinvastatina é obtido com doses sistêmicas consideráveis de 5 ou 10mg/kg de sinvastatina.	Aykawa et al. 2010 (97)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal 80 ratos	20mg/kg/dia/sub cutaneo.	4 semanas	Essa concentração de sinvastatina minimizou a perda óssea periodontal relacionada ao tratamento com ciclosporina A, administrados em ratos, submetidos ou não a doenças periodontais induzidas por ligadura.	Nassar et al. 2009 (61)

## 2.7 CARREADORES PARA A SINVASTATINA

Segundo Nyan et al. 2010 (98), tanigo et al. 2010 (99), Pradeep et al, 2010 (54) e Elavarasu et al. 2012 (68) os requisitos para um carreador são os seguintes:

- i. Habilidade de o sistema liberar a droga em um tempo certo e com uma dosagem apropriada;



- ii. Possuir um substrato que eleve o recrutamento de células e o potencial de quimiotaxia;
- iii. Possuir espaços que permitam a migração de células e a angiogênese;
- iv. O sistema deve ser biodegradável sem gerar uma resposta imune e inflamatória ou produtos tóxicos que possam inibir o processo de reparo;
- v. Localização e retenção das moléculas no sítio de aplicação;
- vi. O carreador deve ajudar a definir a forma do novo osso;
- vii. Reduzir a dose do medicamento liberado no local de ação;
- viii. Prover uma matriz para infiltração de células mesenquimais e um substrato para células de crescimento e diferenciação;
- ix. Média degradação que não seja capaz de inibir o crescimento ósseo e previna a formação de tecido fibroso ou encapsulação fibrótica do carreador
- x. Fácil fabricação e regulação.

## 2.8 VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS CARREADORES PARA O USO DA SINVASTATINA

Há diferentes carreadores para a sinvastatina apresentados em vários estudos com suas respectivas vantagens e desvantagens

Tabela 4: Estudos sobre os carreadores para sinvastatina.

Carreadores para sinvastatina				
Tipo de estudo	Tempo de avaliação do estudo	Carreador utilizado	Resultado	Autores
Experimental <i>In vitro</i>	72 horas	Membrana colágeno	Liberação eficiente da sinvastatina. Não tóxica, não alérgica e não irritante.	Suthanthiran et al. 2012 (63)
Experimental <i>In vitro</i>	168 horas	Forma ativa da sinvastatina (SVA) + cimento de fosfato de cálcio pré-misturados	Liberação lenta da sinvastatina e estimulação da osteogênese.	Montazerolghaem et al. 2013 (100)

Experimental <i>In vitro</i>	72 horas	Micropartículas de poli (ε-caprolactona e poli (etileno glicol) (PECL)	Oferece maior biodisponibilidade da sinvastatina, quando associadas à ela, comparado com o uso de forma livre.	Liu et al. 2013 (41)
Experimental <i>In vitro</i>	192 horas	Beta tricalcio fosfato (β-TCP) derivada de corais	Liberação lenta e continuada da sinvastatina com revestimento externo de apatita o beta TCP proporcionou liberação mais lenta e continuada da droga, comparado com beta TCP sem o revestimento externo, contribuindo para esta droga sustentar o efeito no reparo e cicatrização óssea.	Chou et al.,2013 (10)
Experimental <i>In vivo</i> – Animal – 18 defeitos alveolares inferiores de coelhos	5 semanas	Hidrogel	Este carreador promoveu a liberação da sinvastatina sincronizada com a biodegradação do hidrogel	Tanigo et al. 2010 (98)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – calvária de 45 ratos	8 semanas	Alpha tricalcio fosfato (α – TCP)	Biomaterial osseocondutor capaz de liberar sinvastatina de forma gradual.	Nyan et al. 2009 (9)
Experimental <i>In vivo</i> - Animal – 32 defeitos alveolares de mini porcos	8 semanas	Gel de metilcelulose (injeção)	A associação da sinvastatina com este carreador estimulou a regeneração do osso alveolar em regiões de furca.	Chen et al. 2011 (51)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – proximal da tíbia de 162 ratos	6 semanas	Implantes com Beta TCP + sinvastatina x implantes com beta TCP + proteína óssea morfogenética recombinante humana 2 (rhBMP-2)	A sinvastatina aplicada topicamente era prejudicial para cicatrização óssea nesse modelo. Ambas, sinvastatina e rhBMP-2 não produziram efeitos satisfatórios na neoformação óssea.	Ma et al. 2008 (49)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – calvária de 64 ratos	8 semanas	DBB (osso bovino desmineralizado)	A associação da sinvastatina com o DBB teve impacto negativo na neoformação óssea.	Lima et al. 2011 (101)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – osso nasal de 20 coelhos	12 semanas	Esponja de colágeno x hidrogel	Os dois carreadores associados à sinvastatina mostraram similar expressão de BMP-2 e nova formação óssea.	Mucozawa et al. 2011 (102)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal –	8 semanas	Gelatina de hidrogel	Foi eficiente para obter resultados	Fukui et al. 2012 (31)

fêmur de 60 ratos fêmeas			terapêuticos satisfatórios através da liberação local com baixa dose de sinvastatina e aplicação única.	
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – 42 coelhos tibia e fêmur	4 semanas	Gelatina de hidrogel	Aumento da neovascularização e VEGF.	Okashinaya et al. 2013 (40)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – 7 cães beagles, lesão de furca classe II	4 semanas	Gel de metilcelulose (injeção)	Este carreador não foi adequado, segundo os autores, devido à viscosidade do gel que dificultou a retenção do medicamento nos defeitos periodontais e, conseqüentemente, ausência de neoformação óssea nesses sítios.	Morris et al. 2008 (52)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – 20 ratas ovariectomizadas – ramo da mandíbula	4 semanas	Membrana de poli (ácido láctico) (PLA) + gel de metilcelulose	Este carreador foi eficiente para sinvastatina por promover aumento da atividade BMP-2, NO, com aumento de formação óssea.	Bradley et al. 2007 (69)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal 90 ratas. Mandíbula	4 semanas	Gel de metilcelulose (injeção) x membrana de ácido polilático	Com o carreador de gel metilcelulose obteve-se maior percentual de formação de novo osso (60%) e mínimo inchaço de tecidos moles, comparado com a membrana de ácido polilático (43%) de aumento ósseo.	Lee et al. 2008 (34)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – mandíbula de 18 coelhos – distração osteogênica	2 semanas	Esponja de gelatina	Este carreador, associado à sinvastatina não foi eficiente no aumento da neoformação óssea e distrações osteogênicas. Efeito limitado do método para neoformação óssea.	Kiliç et al. 2008 (77)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – 72 ratos calvária.	8 semanas	AlphaTCP X Beta TCP X Hidroxiapatita	O carreador alpha TCP proporcionou maior formação óssea e maior reabsorção do biomaterial, comparado com o betaTCP e hidroxiapatita.	Rojbani et al. 2011 (103)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – calvária de 45	4 semanas	Sulfato de cálcio	O sulfato de cálcio, associado à sinvastatina	Nyan et al. 2007 (104)

ratos			proporcionou neoformação óssea satisfatória e superior, em relação à quantidade e qualidade óssea, quando comparado com a utilização do sulfato de cálcio sozinho.	
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – ratos com osteoporose induzida. Coxa direita.	3 semanas	Cimento de apatita com 6% de sinvastatina.	Este cimento favorecia liberação lenta da sinvastatina para as áreas osteoporóticas.	Hamada et al. 2012 (44)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – calvária de ratos	3 semanas	Alpha TCP	Os achados histológicos mostraram que as partículas do alpha TCP proveem espaços, dentro dos quais as células osteoprogenitoras são recrutadas e migram para favorecer a osteogênese.	Nyan et al. 2010 (98)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – alvéolo, pós-exodontias de 60 ratos	12 semanas	Poli (ácido lático – co-glicólico) (PLGA)	O carreador mostrou-se efetivo quanto à liberação da sinvastatina e rápida degradação, favorecendo a promoção da formação óssea e prevenindo a reabsorção do rebordo residual.	Wu et al. 2008 (36)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – tibia de 45 ratas	8 semanas	Poli (l-co-DL-ácido lático) PLDLA	Liberação controlada da sinvastatina e cicatrização óssea, sugerindo efeito osteogênico do fármaco e biocompatibilidade no tecido ósseo.	Moda et al. 2012 (105)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – calvária de 90 ratos	24 semanas	Membrana acelular de Poli $\epsilon$ -caprolactona (PEC)	Formação de osso mineralizado no leito dos canais macro da membrana, biodegradação controlada e excelentes características elásticas.	Piski et al. 2009 (106)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – osso nasal de 12 coelhos	4 semanas	Esponja de colágeno (Teruplug, Terumo Japão).	O carreador escolhido proporcionou resultados similares entre a pravastatina e rhBMP-2 quanto à	Alam et al. 2009 (29)

			capacidade de neoformação óssea e expressão de BMP-2.	
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – calvária de 32 ratos	4 semanas	Estroma de células adiposas humanas e plasma rico em plaquetas (PRP) – injetável.	Associado com a sinvastatina observou-se nova formação óssea nas regiões dos defeitos, aumento significativo da espessura do osso; pode induzir o estroma de células derivadas do tecido adiposo humano para diversas diferenciações osteoblásticas.	Zhou et al.,2010 (107)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal- 36 ratos- Tíbia	4 semanas	Implantes de titânio	A sinvastatina impregnada nos poros da superfície do óxido de titânio promoveu uma aceleração no processo da osseointegração e formação óssea peri-implantar.	Nyan et al. 2013 (12)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – tíbias de 96 ratas ovariectomizadas	12 semanas	Implantes de titânio	Houve formação óssea precoce sobre a superfície dos implantes com sinvastatina e maior quantidade e contato osso – implante ao longo da superfície dos implantes com sinvastatina e melhor osseointegração.	Yang et al. 2012 (46)
Experimental <i>in vivo</i> Animal – 200 ratas não ovariectomizadas	6 semanas	Implantes revestidos com polímeros bioativos poli(DL-ácido láctico) (PDLLA) + sinvastatina x implantes revestidos com polímeros bioativos + rhBMP-2.	Os implantes revestidos com polímeros bioativos, associados à sinvastatina favoreceram a cicatrização de fraturas e os resultados osteogênicos foram favoráveis e similares aos efeitos dos implantes revestidos com polímeros bioativos + rhBMP-2.	Pauly et al. 2009 (30)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal – 80 ratas – fêmur	8 semanas	Implantes de titânio + PDLLA + sinvastatina	O carreador PDLLA, quando associado à sinvastatina resultou em integração prejudicada dos implantes de titânio. O contato osso / implante encontrava-se reduzido.	Pauly et al. 2012 (48)

Experimental <i>in vivo</i> Animal – 15 ratos com periodontite induzida	10 semanas	50 microlitros de solução salina de fosfato de cálcio (injeção)	A associação desse carreador com a sinvastatina reverteu o processo de reabsorção óssea alveolar. Os achados histológicos mostraram que, além do osso alveolar, o ligamento periodontal e o tecido conjuntivo foram restabelecidos.	Seto et al. 2008 (108)
Experimental <i>in vivo</i> - Humanos. 72 pacientes com periodontite	24 semanas	Gel de metilcelulose	Não tóxico, não irritante, não alérgico, fácil manuseio. Associado com a sinvastatina favoreceu a regeneração do periodonto em pacientes com periodontite crônica e lesões de furca classe II.	Pradeep et al. 2010 e 2012. (54,55)

A esponja de colágeno mostrou-se um carreador efetivo para a liberação da sinvastatina com resultados favoráveis para a neoformação óssea (29,102). Segundo Suthanthiran et al. (2012) (63), a membrana colágena tem como vantagem o fato de não ser tóxica, não-irritante e não-alérgica. Naturalmente, os derivados de colágeno geralmente oferecem as vantagens de adesão celular e interações celulares específicas, porém é uma barreira mecânica pobre e não há formação de uma barreira rígida para facilitar a osteogênese e impedir o colapso tecidual para o defeito (109).

Outros carreadores como o alfa-TCP, beta-TCP e DBB têm a vantagem de serem também osseocondutores. Associados à sinvastatina (droga com potencial osseoindutor), poderiam contribuir de forma substancial para a neoformação óssea. Ao comparar três carreadores osseocondutores como: alfa-TCP, beta-TCP e hidroxiapatita, o primeiro foi o que proporcionou maior formação óssea e maior reabsorção do biomaterial no estudo Rojbani et al., 2011 (103). Segundo Nyan et al. (2010) (98), o carreador alfa-TCP preenche todos os requisitos necessários que um carreador deve possuir.

Um estudo realizado por Stechow et al., (2003) (93) verificou que o beta-TCP derivado de corais e com revestimento externo de apatita proporcionou liberação mais lenta e continuada da sinvastatina do que o beta-TCP sem o revestimento

externo da apatita. Os autores previram que isto permitiria uma liberação terapêutica satisfatória contribuindo para sustentar o efeito osteogênico da sinvastatina no reparo e cicatrização de fraturas ósseas. Além de ser um método de baixo custo, as estratégias de produção da síntese do fosfato de cálcio constitui um método com controle preciso da morfologia e composição química.

O cimento de apatita foi o carreador escolhido por Hamada et al. (2012) (44) para liberação da sinvastatina no tratamento de osteoporose em um modelo animal com osteoporose induzida. De acordo com os autores, os implantes com cimento de apatita, com 6% de sinvastatina têm a vantagem de mudar a quantidade de liberação da droga, quando implantados dentro do corpo, conforme as mudanças internas. No estudo, o sistema de liberação, considerado como inteligente, era influenciado pela atividade óssea celular e, uma vez implantado dentro do corpo, propiciava a liberação lenta da sinvastatina para as áreas osteoporóticas.

Alguns pesquisadores relatam sobre a importância da associação de um substituto ósseo sintético com a sinvastatina, pois esses biomateriais, quando utilizados de forma isolada, apresentam como desvantagem reabsorção e substituição por um novo osso de forma incompleta, podendo permanecer no local por muitos anos. Diferentemente, quando associado à sinvastatina, a combinação dos efeitos deste fármaco sobre os osteoclastos e osteoblastos aumenta a reabsorção deste material substituto. Além disso, potencializa a ação dos fatores de crescimento dentro de defeitos ósseos (49,13,29). O biomaterial sulfato de cálcio associado à sinvastatina proporcionou uma neoformação óssea satisfatória quantitativa e qualitativamente superior, quando comparado ao seu uso isolado (104). Um estudo recente realizado por Montazerolghaem et al (2013) (100) verificou que a associação da sinvastatina com o cimento de fosfato de cálcio favorece uma liberação lenta da sinvastatina e, em consequência, a osteogênese.

O hidrogel é também um carreador para a sinvastatina utilizado com sucesso em alguns estudos (99,102,31,40). Apresenta como vantagem liberação da sinvastatina de forma sincronizada com a sua biodegradação. Portanto, o problema de remanescentes de carreadores presentes no local da regeneração por períodos prolongados estaria resolvido com a sua utilização. Outra vantagem é que os

carreadores à base de água ou hidrofílicos produzem menor extensão da inflamação, comparados aos com pouca quantidade de água ou hidrofóbicos (99).

O gel de metilcelulose é um carreador muito utilizado nos estudos para liberação local da sinvastatina (51, 34, 52, 69,33, 54, 55). Mostrou-se eficiente para a liberação da sinvastatina em regiões de furca de mini porcos, onde estimulou a neoformação óssea alveolar (51). Morris et al., (2008) (52) não encontraram resultados favoráveis com este carreador. Relatam em seu estudo sobre a viscosidade do gel de metilcelulose e a dificuldade de retenção dos medicamentos nos defeitos periodontais com consequente ausência de neoformação óssea. O maior percentual para formação de novo osso (45%) e mínimo edema dos tecidos foi obtido com gel de metilcelulose mais sinvastatina nos estudos realizados por Stein et al., (2005) (33) e Lee et al., (2008) (34). Resultados favoráveis à regeneração periodontal foram observados nos estudos realizados por Pradeep et al., (2010 e 2012) (54, 55), em 72 pacientes com lesões de furca classe II. Os defeitos foram tratados com raspagem e aplainamento radicular, seguidos de aplicação local de sinvastatina carregada por gel de metilcelulose. A metilcelulose é amplamente utilizada em uma variedade de formulações farmacêuticas tópicas e orais como medicamentos oftálmicos, ciprofloxacina e nimesulida, em cosméticos e produtos alimentares. É definido como material não-tóxico, não-alérgico, não-irritante (54).

Moda et al. (2012) (105) descreveram que microesferas de copolímero bioabsorvível l-co-dl-ácido láctico (PLDLA) são eficientes na encapsulação da sinvastatina mantendo a integridade das estruturas do polímero e do fármaco. A utilização desse dispositivo é justificada por ser um método de simples obtenção das microesferas, por sua morfologia e diâmetro variável entre 4 e 60µm, que favorecem a liberação controlada dos fármacos.

Excelentes resultados foram observados quando a sinvastatina foi incorporada na superfície de implantes de titânio nos estudos realizados por Nyan et al., (2013) (12); Yang et al., (2012) (46). O tratamento de superfície dos implantes de titânio com a sinvastatina proporcionou aumento da expressão dos fatores de crescimento, proliferação, migração, recrutamento e diferenciação das células osteogênicas e subsequente formação de novo osso diretamente na superfície dos implantes (12) Houve precoce formação óssea sobre a superfície dos implantes



revestidos com sinvastatina, maior contato osso/implante ao longo de sua superfície e, em consequência, melhor osseointegração (46).

## 2.9 EFEITO DA SINVASTATINA NO METABOLISMO ÓSSEO

Estudos *in vitro* demonstraram que as estatinas hidrofóbicas incluindo as sinvastatinas, atorvastatinas, e cerivastatinas aumentam consideravelmente a expressão de VEGF mRNA em células osteoblásticas não transformadas (MC3T3-E1). Isto não ocorreu com as estatinas hidrofílicas, como as pravastatinas (79). Segundo Hugues et al. (2007) (57), as estatinas hidrofóbicas, cerivastatina e sinvastatina, são mais efetivas em inibir a reabsorção óssea do que as hidrofílicas, como a rovastatina e a pravastatina. As sinvastatinas, por sua vez, são estatinas hábeis em aumentar a atividade da fosfatase alcalina, nível de expressão da osteocalcina e deposição de minerais em células humanas (BMSCs). Em cultura de *ex-vivo* e o seu efeito anabólico no osso acontece pela promoção da diferenciação osteoblástica (23). A calciclina (S100A6) foi identificada em células obtidas de calvária de ratos (MC3T3-E1) como uma proteína que, quando induzida pela sinvastatina, tem importante papel no efeito anabólico da sinvastatina sobre o osso. Uma vez estimulada por estatina, também pode funcionar como ativadora importante para a indução da produção de BMP-2 ou óxido nítrico NO (110). A sinvastatina pode também afetar levemente o metabolismo celular e aumentar a diferenciação e a expressão de genes osteogênicos em células osteoblásticas alveolares primárias e células do ligamento periodontal. Isto foi relacionado ao seu potencial de promover a formação óssea alveolar e regeneração periodontal (50). O aumento da expressão de agregano e colágeno tipo II, induzido pela sinvastatina, é parcialmente mediado por um aumento da expressão de BMP-2, por meio do efeito desta droga na cascata de produção e ação do mevalonato (27).

Em alguns estudos de aplicação local da sinvastatina em animais foi verificado que este medicamento pode atuar no metabolismo ósseo favorecendo uma neoformação do tecido mineralizado (98,4,29).

A sinvastatina mantém alta a atividade da fosfatase alcalina e aumenta a formação de nódulos ósseos em células de calvária de ratos de forma dose-

dependente, mostrando que esta droga aumenta e mantém níveis altos da função osteoblástica. Imagens de microtomografia revelaram que o tratamento com este medicamento reverteu o processo de reabsorção óssea alveolar, induzido por ligaduras, com recuperação de 46% da altura óssea. Os achados histológicos mostraram que não somente osso alveolar, mas também ligamento periodontal e tecido conjuntivo foram restabelecidos no grupo tratado com sinvastatina (108). Quando este medicamento foi aplicado adjacente ao periósteo mandibular de ratos, aumentou de forma significativa a atividade da BMP-2 e NO ao redor dos tecidos, confirmando a habilidade da sinvastatina em estimulá-los *in vivo*, (69). Fukui et al (2012) (31) observaram ainda que a sinvastatina favorece o aumento da angiogênese e osteogênese com recrutamento de células progenitoras endoteliais. A neovascularização e aumento da expressão do VEGF promovida pela sinvastatina também foram observados por Oka shinya et al. (2013) (40) através de análises histológicas, imunohistoquímicas em seu estudo realizado em 45 coelhos.

Nas investigações *in vitro* e *vivo* elaboradas por Zhou et. al. (2010) (107), observou-se que a sinvastatina aumentou de forma significativa a expressão da BMP-2, cbfa1 (fator de transcrição relacionada ao osso e essencial para a diferenciação dos osteoblastos em precursores mesenquimais e formação óssea), VEGF e mRNA FGF-2 (fator de crescimento fibroblasto básico estimula a diferenciação de osteoblastos em um estágio precoce). Entretanto, houve dificuldade para se determinar o fator principal responsável pela diferenciação dos osteoblastos, uma vez que estes fatores agem mutuamente, um influenciando o outro. Constatou-se, ainda, que a expressão destes fatores pode ocorrer como resultado da ação direta da sinvastatina ou via resposta secundária devido ao aumento de moléculas secundárias.

## 2.10 DOSE DA SINVASTATINA PARA ADMINISTRAÇÃO LOCAL

Vários estudos averiguaram a concentração adequada de sinvastatina para promoção da neoformação óssea, ver tabela 5 a seguir.

Tabela 5: Estudos sobre doses de sinvastatina para administração local.

TIPO DE ESTUDO	TEMPO DE ESTUDO	DOSE LOCAL DA SINVASTATINA	CARREADOR	RESULTADO	AUTORES
Experimental - <i>In vitro</i>	72 horas	0,5;1;1,5 e 2mg	Membrana colágena	Entre as doses avaliadas, a de 1,5 mg foi a que produziu melhor efeito sobre o metabolismo das células osteoblásticas humanas SaSOS-2	Suthanthiran et al. 2012 (63)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal-defeitos de 5mm em calvária de 45 ratos	8 semanas	0; 0,01; 0,1; 0,25 e 0,5 mg	Alfa-TCP	A dose ideal para estimular o máximo de neoformação óssea nos defeitos obtidos nas calvárias e com menor inflamação foi de 0,1 mg de sinvastatina	Nyan et al. 2009 (9)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal-defeitos alveolares estabelecidos em 32 dentes de 4 porcos pequenos	8 semanas	0,5mg/50µl; 1,5mg/50µl; 2,2mg/50µl	Gel de metilcelulose (Injeção)	A melhor dose de sinvastatina gel para estimular a neoformação óssea foi de 0,5mg	Chen et al. 2011 (51)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal-90 ratas, região bilateral da mandíbula	3,5 semanas	0,1mg 0,5mg; 1,0mg; 1,5mg; 2,2mg	Gel de metilcelulose e membrana de ácido polilático(doses únicas)	Redução da dose de sinvastatina de 2,2mg para 0,5mg reduziu a inflamação para níveis clínicos mais aceitáveis sem sacrifício do potencial do medicamento no crescimento ósseo	Stein et al. 2005 (33)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal-80 ratas-Implantes /fêmur	8 semanas	90µg/implant 5,5µg/implante	Polímero PDLLA- Poli-D,L,Lático	Integração prejudicada dos implantes de titânio inseridos intramedular no fêmur dos animais com	Pauly et al. 2012 (55)

				aplicação local de sinvastatina para as duas doses utilizadas e comparadas ao controle sem utilização deste medicamento	
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal- 200 ratas não ovariectomizadas- Redução de fraturas de tibia</b>	6 semanas	50µg/implant 3µg/implante	Implantes com superfície tratada com polímero PDLLA-Poli,D,L,Lático	Observou-se reabsorção e formação óssea elevadas com doses altas de sinvastatina e diminuídas com doses baixas. As doses altas tiveram efeito anabólico no osso similar ao efeito das BMPs. As doses baixas não tiveram efeito anabólico e nem catabólico sobre o tecido ósseo, revelando um efeito dose-dependente da droga	Pauly et al. 2009 (54)
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal 96 ratas ovariectomizadas- implantes inseridos nas tíbias</b>	12 semanas	10 menos 7mol/l 10 menos 6 mol/l	Implantes- concentrações da sinvastatina foram incorporadas nos poros da superfície dos implantes	Observou-se nova formação óssea precoce sobre a superfície dos implantes testes com uma semana de tratamento. As duas concentrações de sinvastatina mostraram significativo aumento da área óssea e contato osso/implante, comparada aos implantes controles sem a adição deste fármaco	Yang et al. 2012 (46)
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal 36 ratos- Implantes</b>	2 semanas	25µg 50µg	Implantes- as concentrações de sinvastatina foram impregnadas nos poros da	As duas concentrações de sinvastatina associadas aos implantes ofereceram um	Nyan et al. 2013 (12)

inseridos em tíbias			superfície do óxido de titânio	maior contato osso/implante, maior aposição mineral e aumento do volume ósseo peri-implantar, em relação ao grupo de animais que receberam implantes sem o tratamento adicional de sinvastatina em sua superfície	
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal- 45 ratos-defeitos de 8mm de diâmetro obtidos na calvária de ratos</b>	4 semanas	1mg de pó de sinvastatina	60mg de pó de sulfato de cálcio	Após oito semanas, a área óssea e conteúdo mineral tornaram-se significativamente e maior comparada aos grupos avaliados com 2 e 4 semanas	Nyan et al. 2007 (104)
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal- 5 ratos-região vestibular do segundo molar direito</b>	4 semanas	0,5mg	Gel de metilcelulose	Indução da expressão de BMP-2 e a formação óssea no pequeno ambiente mandibular	Bradley et al. 2007 (69)
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal – 72 ratos-fratura de fêmur</b>	4 semanas	1 e 1,5µg/dia-doses liberadas localmente de nanopartículas de Lovastatina	Polímero biodegradável de PDLLA	Dose de 1,5µg/dia de lovastatina resultou em maior índice radiográfico, menor <i>gap</i> da fratura e maior resistência biomecânica	Garret et al. 2007 (90)
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Humanos - 72 pacientes - lesões de furca classe II</b>	24 semanas	1,2 mg	Gel de metilcelulose (injetável)	Dose efetiva para diminuir o índice gengival e profundidade de sondagem. Maior ganho de inserção clínica com maior preenchimento ósseo,	Pradeep & Thorat et al. 2010; Pradeep et al. 2012 (54, 55)

				comparado ao grupo tratado apenas com raspagem e aplainamento radicular	
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal – 49 ratas ovariectomizadas com doença periodontal induzida</b>	4 semanas	0,05ml		Menor colapso periodontal e menor perda óssea. Efeito protetor contra a degeneração tecidual em condições clínicas inflamatórias	Vaziri et al. 2007 (53)
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal – mandíbula bilateral de 90 ratas (ângulo da mandíbula)</b>	3,5 semanas	0,5mg	Gel de metilcelulose (injeções)	Múltiplas injeções de 0,5mg reduziram efetivamente o inchaço do tecido mole enquanto promoveu a preservação do crescimento ósseo (60% de aumento ósseo) no período de 24 dias.	Lee et al., 2008 (34)
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal – 60 tíbias de ratos</b>	4 semanas	Injetada dentro dos defeitos ósseos no dia da cirurgia e de forma transdérmica nos dois dias seguintes	Sem carreador	A sinvastatina favoreceu a cicatrização óssea nos defeitos criados artificialmente na tíbias dos ratos após 5 dias de aplicação das injeções, porém o resultado não foi mantido após o período de 10 dias da aplicação do medicamento	Ayukawa et al., 2009 (26)
<b>Experimental <i>in vivo</i> - Animal – osso nasal de 12 coelhos</b>	6 semanas	10mg de pravastatina dissolvido em 0,2ml de água x rhBMP-2 (5µg) dissolvida em 0,2ml de água	Esponja de colágeno (TERUPLUG, TERUMO, Japão)	Aumento da expressão de BMP-2 e neoformação óssea com 10mg de pravastatina. Efeito similar ao do rhBMP-2	Alam et al., 2009 (29)
<b>Experimental</b>	12	2,5mg/ml de	Esponja de	Aumento da	Mucozawa et al.

<b>ntal in vivo - Animal – osso nasal de 20 coelhos</b>	semanas	sinvastatina dissolvida em 0,2 ml de água	colágeno (TERUPLUG, TERUMO, Japão).	expressão de BMP-2 e nova formação óssea	2011 (102)
---	---------	---	-------------------------------------	--	------------

Pauly et al. (2009) (30) observaram que a reabsorção e neoformação óssea foram mais elevadas com a utilização de doses altas de sinvastatina e diminuídas com doses baixas. As doses elevadas mostraram um efeito anabólico no tecido ósseo similar as BMPs, enquanto as doses baixas não produziram efeito anabólico nem catabólico, sugerindo um efeito dose/dependente deste medicamento.

Segundo Nyan et al. (2009) (9), a dose ideal para estimular o máximo de regeneração nos defeitos obtidos nas calvárias dos ratos sem induzir inflamação é a combinação de 0,1mg de sinvastatina com Alfa-TCP. A redução da dose de sinvastatina de 2,2mg para 0,5mg associada a 30µl de gel de metilcelulose e membrana de ácido polilático reduziu a inflamação para um nível clínico mais aceitável sem sacrifício do potencial para o crescimento ósseo. Isto foi observado no estudo estabelecido por Stein et al., (2005) (33), quando várias concentrações deste fármaco foram testadas de forma bilateral na mandíbula de 90 ratas. Outros pesquisadores constataram que a concentração ideal da sinvastatina, quando associada ao gel de metilcelulose, para obter o máximo de regeneração sem induzir inflamação é de 0,5 mg, com base em estudos realizados em ratos (69, 34, 51). Pradeep et al., (2010; 2012) (54, 55) verificaram que a dose de 1,2mg associada ao gel de metilcelulose, após raspagem e aplainamento radicular em pessoas com periodontite crônica, foi efetiva para favorecer a cicatrização do periodonto, conforme exames clínicos e radiográficos. A sinvastatina é dose/carreador dependente e para cada carreador existe uma concentração adequada deste medicamento para estimular a osteogênese. Para a esponja de colágeno (Teruplug, Terumo, Japão) e hidrogel, a concentração de 2,5mg/ml de sinvastatina dissolvida em 0,2 ml de água foi satisfatória para promover a expressão de BMP-2 e neoformação óssea, em defeitos criados no osso nasal de 20 coelhos (102).

Um estudo anterior verificou que essa mesma esponja de colágeno (Teruplug, Terumo, Japão), quando associada a 10mg de Pravastatina dissolvida em 0.2ml de

água, também foi eficiente para estimular a expressão de BMP-2 e neoformação óssea em defeitos obtidos no osso nasal de 12 coelhos (29). A dose ideal da sinvastatina combinada com membrana de colágeno no intuito de favorecer a neoformação óssea foi de 1,5 mg, resultado obtido de uma investigação *in vitro* realizado por Suthanthiran et al. (2012) (63). Diversos estudos sobre o uso local de sinvastatina em doses variadas em diferentes carreadores obtiveram resultados favoráveis quanto à neoformação óssea (Tabela 5).

A forma de administração local da Sinvastatina seja através de cirurgias (104, 9, 98, 12, 103, 40, 44, 36, 102, 31, 40, 46, 30, 105, 4), ou injeções (51, 34, 53, 90, 26, 107, 54, 55) foi a que apresentou resultados mais uniformes e consistentes em relação a neoformação óssea comparada ao seu uso sistêmico que além de tudo, ainda têm a desvantagem dos efeitos colaterais. A forma injetável de ação local é defendida pelos autores acima como uma forma de utilização simples, conservadora e bastante promissora para alcançar a neoformação óssea com um mínimo de inchaço, inflamação e permitir a manutenção da integridade do periósteo- importante fonte de nutrição ao periodonto.

Atualmente os pesquisadores têm focado os seus estudos na ação local da sinvastatina para neoformação óssea (100, 41, 12, 9, 104, 98, 103, 51, 102, 31, 40, 105, 107, 44, 54, 55, 10, 46, 48, 29, 26). Os efeitos pleitrópicos da ação tópica da sinvastatina descritos por esses autores são: Efeito antioxidante, anti-inflamatório, aumento da angiogênese, aumento da expressão de VEGF, fatores de crescimento como- BMP2, TGF-B1 e mRNA-TGF-2, cicatrização óssea precoce, regeneração periodontal, osseointegração de implantes com osso maior contato osso/implante e melhor qualidade óssea, densidade óssea melhorada em osso osteoporótico, aumento da resistência óssea, maior formação óssea, diminuição da expressão do Rankl, proliferação, migração, recrutamento e diferenciação das células osteogênicas e subsequente formação de novo osso. Nassar et al., 2009 (61) relatam que o efeito anti-inflamatório da sinvastatina na presença de inflamação como no caso das doenças periodontais, este efeito pode ser explicado pelo fato desse fármaco talvez atuar na regulação da produção da interleucina 1B e prostaglandina E2. A concentração local da droga no tecido pode ser favorecida pela incorporação do agente ativo deste fármaco dentro de um sistema de liberação



controlado e ser aplicado diretamente no local da área que se deseja uma neoformação óssea (68). A aplicação local deve ser simples e rápida, e em algumas situações a forma ideal de administração deve ser através de um gel o qual permite uma aplicação mais rápida e generalizada das áreas afetadas (54,55). As vantagens da aplicação local soma-se a ausência de efeitos colaterais como mencionados com a utilização sistêmica desta droga. Segundo Elavarasu et al., 2012 (68); O aspecto mais crítico é o método do sistema de liberação da droga pelo qual o ingrediente ativo da droga é liberado para o sítio de ação.

## 2.12 A NECESSIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MATERIAIS PARA A NEOFORMAÇÃO ÓSSEA

A procura por substitutos que apresentassem as mesmas propriedades que o osso autógeno, com o objetivo de reduzir a morbidade dos procedimentos cirúrgicos, fez com que as pesquisas desenvolvessem materiais sintéticos, ao mesmo tempo em que os bancos de ossos foram tornando-se mais confiáveis. Vários materiais foram desenvolvidos, entre eles: enxertos homogêneos, xenógenos, membranas biológicas, vidros bioativos e derivados de hidroxiapatita (29). Morris et al., 2008 (52) concordaram que novos procedimentos menos invasivos e de custo baixo devem ser pesquisados, uma vez que os existentes requerem um tecido doador ou têm custo elevado, como os fatores de crescimento biológicos, incluindo a proteína óssea morfogenética (BMP-2).

A pesquisa por um material de enxerto ideal continua sendo um desafio para as pesquisas (111). Embora o osso autógeno apresente excelentes propriedades biológicas (osteocondução e osteoindução), oferecem, em contrapartida, inconveniências que levam os pesquisadores a procurar novos substitutos ósseos. Um biomaterial ideal com características biológicas e mecânicas satisfatórias ainda não foi desenvolvido. Além disso, entre as características dos biomateriais, a forma e o tamanho das partículas são muito importantes para modular a resposta inflamatória (112).

O material de enxerto deve obedecer aos seguintes requisitos: 1) Fornecimento ilimitado sem comprometer a área doadora; 2) promover a osteogênese; 3) não apresentar resposta imunológica do hospedeiro; 4) revascularizar rapidamente; 5) estimular a osteocondução; 6) promover a osteoindução; 7) ser substituído completamente por osso em quantidade e qualidade semelhantes ao hospedeiro (19,18). Um biomaterial ideal necessita promover crescimento ósseo e, sequencialmente, restabelecer a função do tecido (113). Adicionalmente, segundo Jensen et al. (2006) (13), um substituto ósseo deve estimular a proliferação de novos vasos sanguíneos, processo fundamental para novo crescimento ósseo.

O uso de compostos farmacológicos para estimular os fatores de crescimento como a BMP-2 com consequente aumento da produção de osso autógeno, poderia ser uma excelente alternativa em relação ao custo/benefício e alternativa ao tratamento de defeitos ósseos sem cirurgia (52).

Estudos sobre carreador ideal e métodos inovadores para restaurar a função do tecido ósseo constituem uma tendência atual na pesquisa em bioengenharia óssea. Dessa forma, Zambuzzi et al. (2012) (113) avaliaram o comportamento do osso bovino inorgânico como carreador de osteoblastos em defeitos ósseos de tamanho crítico. Os autores concluíram que grânulos deste biomaterial podem ser usados como suporte para os osteoblastos, além de promoverem o recrutamento de células que favorecem a restauração de novo tecido.

Embora existam muitas informações indicando o efeito benéfico da sinvastatina na neoformação óssea, resultados de estudos pré-clínicos e clínicos têm mostrado resultados conflitantes com a sua utilização. Os estudos apontam que os efeitos da sinvastatina podem ser influenciados por alguns fatores, tais como método de administração, duração da exposição, vetores para a administração. Não há consenso em relação ao melhor carreador para a droga, o que tem encorajado vários pesquisadores a investigar sobre novos métodos e vetores. Os materiais com propriedades osseointegradoras que dispomos para a neoformação óssea são caros e ainda inacessíveis para muitos pacientes. Esta razão justifica a existência de diversas pesquisas sobre um biomaterial eficiente e, ao mesmo tempo, acessível para a maioria da população (23, 33, 92). Alguns autores ressaltam ainda sobre a

importância de novas pesquisas para comprovar a possível utilização de drogas/fatores osseoindutores na Odontologia. Especialmente, matérias de uso tópico que atuem, por exemplo, no reparo de defeitos ósseos causados por lesões intra-ósseas ou fraturas têm sido investigados. Estes poderiam, ainda, atuar em adjunto na terapia periodontal e no processo de osseointegração (114).

Landim et al. (2002) (94) defendem que tais drogas/fatores podem ser uma alternativa de tratamento ao enxerto autógeno, em casos de grandes perdas ósseas resultantes de cistos, infecções, tumores e traumas. Dentre esses fatores, as proteínas morfogenéticas, fatores de crescimento e compostos farmacológicos são comumente incorporados ao sistema de liberação das drogas. A sinvastatina é uma estatina solúvel em lipídios, que estimula a formação óssea quando aplicada localmente e tem como vantagens o custo e a estabilidade química (12).

### 3 JUSTIFICATIVA

---

Este estudo justifica-se pela necessidade de estudos adicionais sobre os benefícios da sinvastatina na neoformação óssea e dos fatores que influenciam sua ação.

A sinvastatina foi a estatina escolhida porque, dentre as diferentes estatinas, pertence à classe das lipofílicas e são as que produzem melhores resultados sobre o tecido ósseo (79,30).

## 4 OBJETIVOS GERAIS

---

Avaliar o efeito local da sinvastatina na estimulação da formação óssea em defeitos criados nas calvárias de ratos.

### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar os efeitos da associação da sinvastatina a um carreador cerâmico (BoneCeramic® - fosfato de cálcio bifásico) na neoformação óssea. O fosfato de cálcio bifásico ainda não foi testado como carreador para a sinvastatina.

Avaliar se a utilização da sinvastatina combinada com BoneCeramic® é melhor do que a utilização isolada deste biomaterial.

Verificar se o carreador cerâmico (BoneCeramic®) é melhor carreador para a sinvastatina do que um carreador colágeno (CollaTape®).

## 5 METODOLOGIA

---

Foram seguidos todos os princípios propostos por alguns autores (115) (Russel WMS, Burch RL. *The principles of humane Experimental Technique*. London: Methuer;1959) e ratificados pela UNESCO, em 1978, que elaborou a Declaração dos Direitos dos Animais. O experimento norteou-se nos critérios estabelecidos quanto aos cuidados necessários para se evitar o sofrimento dos animais (116) (Zimmermann M. *Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious Animals* (Pain.1983;16: 109-10). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade de Brasília (UnB).

### 5.1 O USO DA SINVASTATINA EM EXPERIMENTO COM ANIMAIS

O presente estudo é caracterizado como do tipo experimental em animais. Foram utilizados no estudo quinze 15 ratos Wistar (raça *rattus norvegicus albinus*), fêmeas, com dois meses de idade, pesando, em média, 300 g, cedidos pelo Biotério da Faculdade Sena Aires (Valparaíso de Goiás-GO). Os animais foram mantidos durante o período de uma semana para habituação no Laboratório de Patologia, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília (FM/UnB). Alojados em grupos de cinco por caixa, foram mantidos em condições padronizadas com água e ração *ad libitum*, temperatura ambiente e ciclo de luz claro/escuro de doze horas (06:00-18:00h) e obedecendo aos critérios de acordo com as normas estabelecidas pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da FM/UnB, UnBdoc 44299-2012. Os procedimentos experimentais e as avaliações comportamentais foram realizados no Laboratório de Patologia, da Faculdade de Medicina.

Dois diferentes carreadores para a sinvastatina foram testados: o Bone Ceramic (Strauman®) e a esponja de colágeno (CollaTape-Zimmer®).

## 5.2 FOSFATO DE CÁLCIO BIFÁSICO, BONECERAMIC®

Straumann® BoneCeramic constitui um substituto ósseo 100% sintético, com ótima morfologia para estimular a formação de osso vital. Trata-se de um produto que oferece flexibilidade de aplicação em vasto espectro de procedimentos de neoformação óssea. As excelentes propriedades umectantes e o desenho exclusivo da embalagem facilitam a sua manipulação e aplicação. Este biomaterial funciona como uma estrutura de suporte para a adesão do osso durante o processo de osteogênese. A estabilidade mecânica do volume aumentado é mantida graças à lenta reabsorção da hidroxiapatita, que impede o excesso de reabsorção. Além disto, oferece índice de porosidade de 90%, com poros interconectados de diâmetro entre 100 a 500 micrometros. Este elevado grau de porosidade permite o máximo espaço para a vascularização, migração de osteoblastos e adesão óssea. Ao contrário do que sucede com outros fosfatos de cálcio bifásicos, Straumann® BoneCeramic® não é mera mistura de hidroxiapatita e tricálcio fosfato e sim um compósito sintetizado quimicamente, a fim de assegurar distribuição homogênea das duas fases. Material totalmente sintético denominado fosfato de cálcio bifásico que consiste de 60% de hidroxiapatita (HA), e 40% da forma beta do tricálcio fosfato ( $\beta$ -TCP) tem sido amplamente usado como substituto ósseo em ortopedia e cirurgia oral e maxilo-facial. Com partículas em tamanho de 500-1000mm e nome comercial de Straumann BoneCeramic (117) (*Institut Straumann AG, Basel, Switzerland*).

## 5.3 ESPONJA DE COLÁGENO POROSA, COLLATAPE®

A esponja de colágeno porosa CollaTape®, constitui um agente hemostático de colágeno de origem bovina, absorvível, que promove a agregação plaquetária, acelerando o processo de coagulação. Comercialmente são apresentadas em forma de tiras: CollaTape®, CollaCote®, ou em forma de tampão para alvéolo dentário: CollaPlug®. Facilmente manipulado, ao ser aplicado diretamente na área de sangramento do leito cirúrgico, ocasiona hemostasia entre dois a cinco minutos, após ser mantido por pressão (118).

#### 5.4 PREPARO DA SINVASTATINA E BONECERAMIC®

Um teste prévio foi elaborado no Laboratório de Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília/DF para se averiguar a quantidade ideal de biomaterial e de solução de sinvastatina para preencher um defeito ósseo de 5 mm de diâmetro. Utilizou-se para tal uma silicona de condensação, na qual se criou um defeito, utilizando trefina de 5mm de diâmetro Neodent®, igualmente à que foi, posteriormente, no experimento com os animais. O passo seguinte foi pesar com uma balança de semi-precisão (Fig.1) a quantidade de BoneCeramic® suficiente para preencher completamente o espaço obtido. A quantidade necessária de solução foi testada com uma micropipeta de 20µl. Nesta fase, utilizou-se água sobre uma membrana Cola-Tape já cortada e adaptada no defeito. Este teste permitiu observar que 14 mg de Boneceramic® e 15µl de solução foram suficientes para preencher o defeito idealizado. A solução de sinvastatina, 0,1 mg de sinvastatina em 15µl de Etanol, (9) foi manipulada pela Farmogral® (Farmacêutica responsável-Tatiane R. da Silva/CRF-DF-4564), (Fig.2).



**Figura 2.** Balança de semi-precisão e pesagem de 14mg de BoneCeramic



**Figura 3.** Solução com 0,1mg de sinvastatina em 15µl de Etanol (Farmogral, Brasília, Brasil)



## 5.5 ANESTESIA E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados com ketamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg), via intramuscular antes de proceder aos defeitos bilaterais na calvária dos ratos (FIG.5). Em seguida, realizou-se antissepsia na região da calota craniana com gaze embebida em solução degermante: polivinil pirrolidona iodo (PVP-I) contendo 1% de iodo ativo. Todos os instrumentais foram previamente esterilizados e durante os procedimentos a equipe cirúrgica utilizou avental cirúrgico, máscara, gorro e luvas estéreis. O acesso a cortical da calota craniana foi obtido por retalho total com incisão na pele e no perióstio de forma linear na linha sagital mediana, utilizando uma lâmina de bisturi 15c, seguida da divulsão do tecido por meio do instrumental de periodontia (Molt). Após exposição do tecido ósseo, os defeitos foram obtidos com uma broca Trefina Neodente®, Curitiba, PR, Brasil) de 5mm de diâmetro. A broca foi utilizada bilateralmente no osso parietal dos ratos, sob constante irrigação com solução salina a fim de evitar o superaquecimento do osso (Fig.7). Alguns cuidados foram pré-estabelecidos para a confecção dos defeitos como: distância da sutura mediana no mínimo 2,00 mm para o início das osteotomias bilaterais (direita e esquerda) e pressão mínima da broca, evitando-se dano a dura-máter importante fonte de nutrição para a região (ver fig. 8). Para remoção da cortical externa utilizou-se um cinzel de periodontia (ver fig.8). Um total de 30 defeitos foram criados na calvária de quinze animais, divididos em três grupos incluindo cinco animais em cada grupo(ver Fig. 4). Os grupos foram classificados de acordo com tratamento estabelecido em cada defeito. Após a confecção e preenchimento dos defeitos ósseos realizou-se sutura com pontos simples e fio mononáilon 5.0 Ethicon.

## 5.6 GRUPO 1: GRUPO CONTROLE COÁGULO (C)

Composto por cinco defeitos e não receberam nenhum tipo de tratamento. Neste grupo, os defeitos do lado esquerdo foram deixados vazios, sem nenhum material de preenchimento (cicatrização natural). Os defeitos do lado direito foram preenchidos com diferentes materiais como BoneCeramic® BC, BoneCeramic® + sinvastatina (BCS), Esponja de colágeno (EC), Esponja de colágeno + sinvastatina (ECS) e Coágulo (C) (sem tratamento).

### 5.7 GRUPO 2: GRUPO DO BONECERAMIC® (BC)

Composto por cinco defeitos, localizados no lado esquerdo das calvárias de cinco ratos. Os defeitos do lado esquerdo foram preenchidos com 14mg de BoneCeramic® (BC), umedecidos com 15µl de etanol (Fig. 9).

### 5.8 GRUPO 3: GRUPO DO BONECERAMIC® MAIS SINVASTATINA (BCS)

Composto por cinco defeitos localizados no lado direito das calvárias de cinco ratos e adjacentes aos defeitos preenchidos apenas com BoneCeramic® no lado esquerdo das calvárias desses animais. Os defeitos incluídos neste grupo receberam 14 mg de Boneceramic® umedecidos com 15µl de solução contendo 0,1mg de sinvastatina (BCS), (Fig.10).

### 5.9 GRUPO 4: GRUPO DA COLLATAPE® (EC)

Neste grupo, os defeitos do lado esquerdo foram preenchidos apenas com esponja de colágeno (CollaTape®) cortada e adaptada ao formato do defeito (EC), sem efeito para neoformação óssea. Os defeitos deste grupo localizavam-se nas calvárias de cinco ratos e eram adjacentes aos defeitos preenchidos com a esponja de colágeno umedecida com 15µl de solução contendo 0,1 mg de sinvastatina.

### 5.10 GRUPO 5: GRUPO DA SINVASTATINA COMBINADA COM COLLATAPE® (ECS)

Este foi composto por cinco animais, nos quais os defeitos do lado direito da calvária dos animais eram completados com 15µl de solução contendo 0,1 mg de sinvastatina combinada com uma esponja de colágeno de colágeno (CollaTape®) já cortada e inserida ao defeito ósseo (ECS).

O defeito ósseo neste estudo é definido como crítico. Este defeito tem sido reportado para prevenir a cicatrização espontânea do defeito durante o tempo de vida do animal ou ao longo da duração do estudo (102). Ao término do procedimento

cirúrgico, uma sutura com pontos simples utilizando-se fio de sutura mononáilon 5.0 Etichon® foi realizada na calvária dos ratos. Todos os instrumentais cirúrgicos foram esterilizados em autoclave. Após a cirurgia foi administrado, para controle de dor, ácido acetil salicílico Aspirina® via oral 150 mg/kg, a cada seis horas pela técnica de gavagem, quatro vezes ao dia, no primeiro dia da cirurgia. Todos os animais (quinze ratos) foram observados diariamente quanto aos sinais clínicos de inflamação.

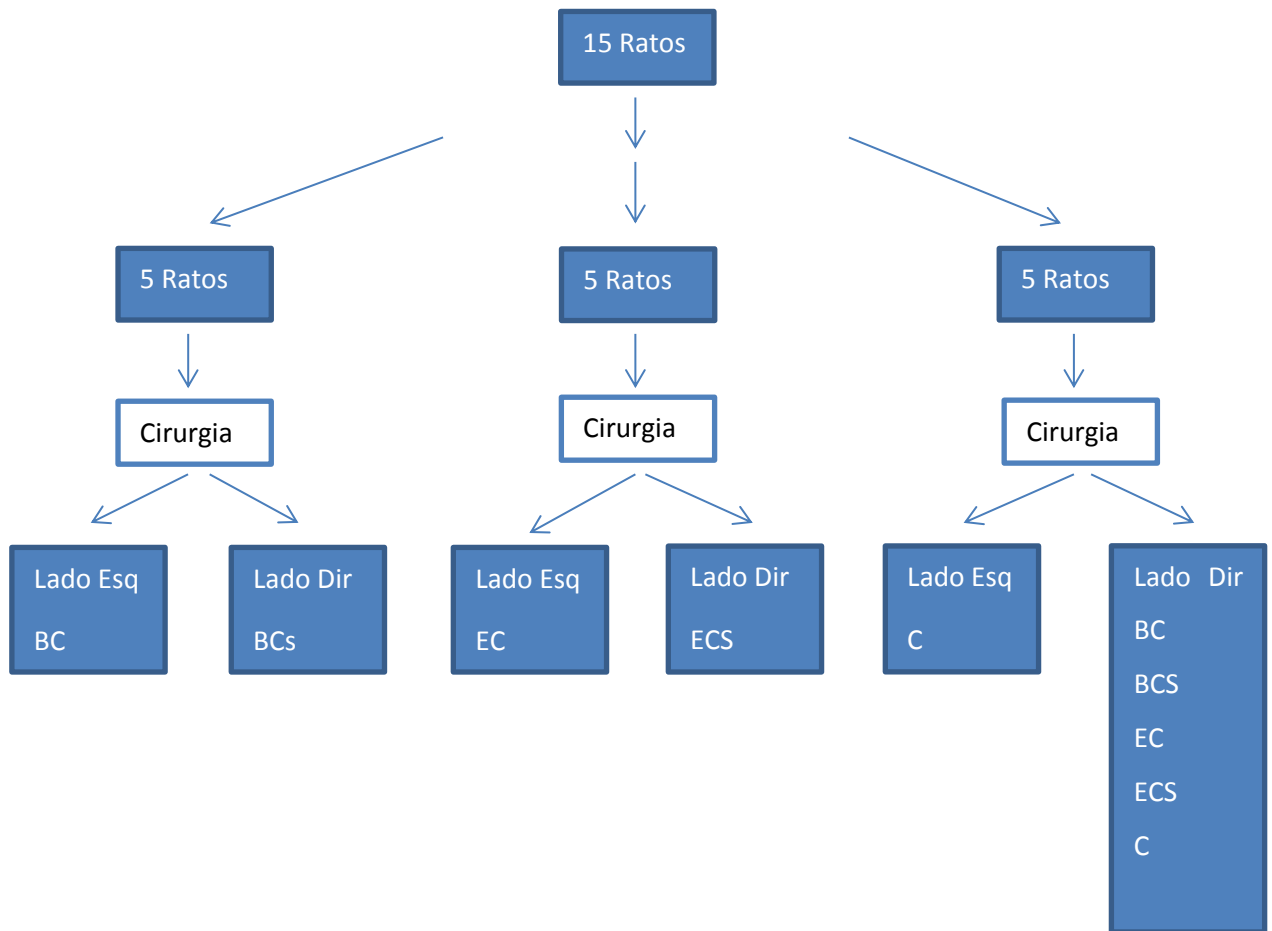


Figura 4: Esquema do desenho experimental nos animais

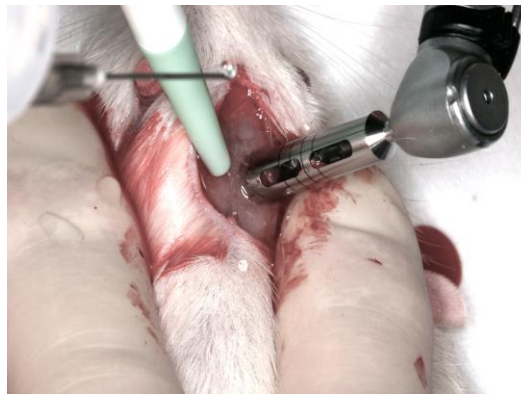
Legenda: (C) Controle – Grupo 1; (BC) BoneCeramic® - Grupo 2; (BCS) BoneCeramic® + sinvastatina – Grupo 3; (EC) Esponja de colágeno – Grupo 4; (ECS) Esponja de colágeno + sinvastatina – Grupo 5.



**Figura 5.** Rato sob anestesia pronto para o procedimento na calvária



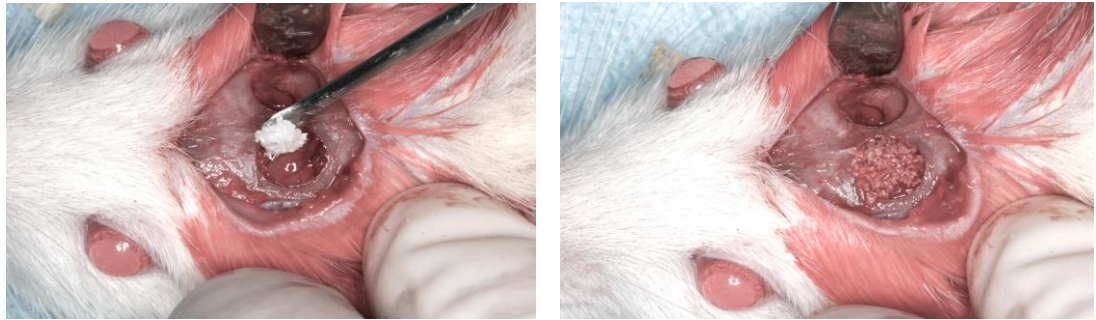
**Figura 6.** Acesso cirúrgico na calvária de um rato



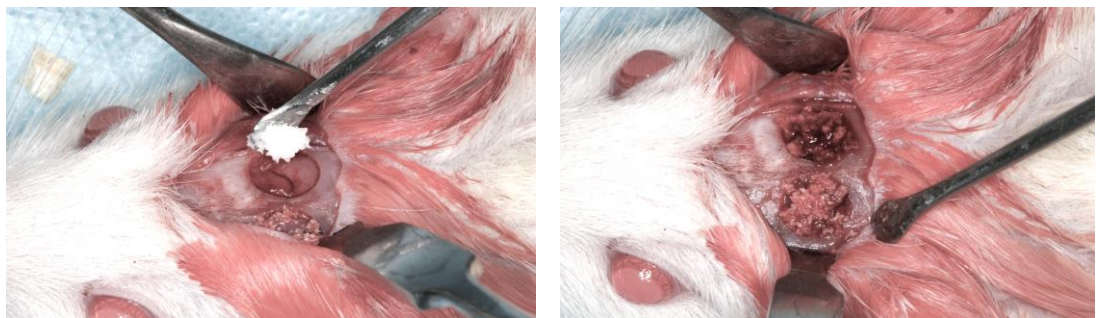
**Figura 7.** Broca trefina produzindo um defeito na Calvária de um rato



**Figura 8.** Osteotomia circunferencial de 5mm para a retirada da cortical externa da calvária



**Figura 9.** Defeito recebendo BoneCeramic® puro



**Figura 10.** Defeito contra-lateral recebendo BoneCeramic® umedecido com Sinvastatina

Os animais foram submetidos à avaliação tomográfica, utilizando-se equipamento de microtomografia computadorizada (Micro-CT) no período de duas semanas. Concluído o procedimento, sob sedação, permaneceram no laboratório de patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília/DF até a época do sacrifício. Este ocorreu por decaptação em oito semanas após o início do experimento- tempo necessário para uma cicatrização óssea dos animais e posterior avaliação histomorfométrica.

#### 5.11 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (MICRO CT)

Para aquisição de imagens os animais foram avaliados radiograficamente através do Micro-CT para animais pequenos *in vivo*, decorrido um período de duas semanas pós- cirúrgico para se observar a neoformação óssea em todos os defeitos. Um Microtomógrafo Skycan modelo 1076 (Skycan Kontich Bélgica) (Fig. 11) foi utilizado para a produção de imagens e cortes tomográficos, localizado no

laboratório de Nanobiotecnologia do departamento de Morfologia e Genética do instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

O aparelho Skyscan 1076 é composto por um tubo de raios-X de microfoco com fonte de alta tensão (de 20 até 100kV/)-250 $\mu$ A). Possui um detector baseado em uma câmera-CCD (Charge Coupled Device) especial de raio-X, de 10 Megapixel (4000 X 2300 pixels), ligado a um sensor-CCD, conectados a um computador com processador Dual Intel Xeon 3.0GHz (512KB cache), 400MHz system bus, 4GB PC800 RAM, 1.8 TB HD, conectado por uma rede local a um cluster de computadores, cuja função é a reconstrução das imagens tomográficas. O equipamento utiliza software que controla todo o sistema e capta as imagens e outro software para a reconstrução das imagens adquiridas.

Para a captura das imagens, cada animal era sedado com ketamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg), via intramuscular. Após 15-20 minutos, cada animal era posicionado na horizontal com a cabeça apoiada em um isopor e barriga para cima. Depois a cabeça era imobilizada com um esparadrapo e iniciava-se o escaneamento, um por vez. Cada um demorava em torno de dez minutos utilizando 35  $\mu$ m (tamanho do pixel). Depois de inserido o animal no microtomógrafo, o software Skyscan 1076 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica), realizava automaticamente uma fotografia segmentada.

Previamente ao início das tomadas tomográficas foi feito um estudo prévio com um animal, padronizando-se alguns parâmetros na aquisição das imagens, demonstrados a seguir:

Tabela 6: Parâmetros de aquisição de imagens no MicroCT Skyscan 1076.

Parâmetros na aquisição de imagens - Skycan 1076	
Potência da fonte do raio-X	100kV e 100 $\mu$ A
Filtro	Alumínio 1mm
Tamanho do pixel	35 $\mu$ m
Rotação do tubo de raio-x/detector	180
Passo de rotação	0.7
Frame averaging	4
Tempo de exposição	4
Tempo de escaneamento	10 min.
Reconstrução 3D (programa N Recon)	Todas as imagens obtidas foram reconstruídas de forma padronizada; Smoothing: 1
Redução de artefatos:	8
Beem Hadden:	50%
Histograma (seleção do ganho):	valor máximo – 0.312704
Histograma (seleção do ganho):	valor mínimo – 0.029512



Figura 11: Microtomógrafo Skyscan modelo 1076 (Skyscan Kontich Bélgica)

Para avaliar os resultados foram utilizados os softwares NRecon, Dataviewer, CT-analyzer, todos fornecidos pelo fabricante do microtomógrafo, de acordo com



Milanetti et al., 2011 (119), Roshan-Ghias et al., 2010 (120); Hughes et al., 2007 (57).

Foi realizado o escaneamento e reconstruções microtomográficas da calvária de cada rato. Na etapa posterior efetuou-se as visualizações coronal, transversal e sagital. A segmentação e visualização 2D dos defeitos dos tecidos de reparo ósseo foram obtidas parametrizando os seguintes algoritmos de processamento de imagem: a) *thresholding* para binarização das reconstruções microtomográficas; b) delimitação da região de interesse contendo o tecido de reparo e o tecido adjacente; c) segmentação do tecido de reparo do tecido adjacente com operações morfológicas de abertura e fechamento (119).

As imagens foram limitadas, no *Ct Analyzer*, utilizando-se a funcionalidade do *set botton* (limite inferior) e do *set top* (limite superior), no intuito de padronizar uma espessura de análise igual para todos os defeitos. Foram utilizados 20 cortes, entre os limites máximo e mínimo, para cada lado dos defeitos, direito e esquerdo. Posteriormente, selecionou-se um círculo de 2,5mm de diâmetro, utilizando da funcionalidade do *Raw-Image* região de interesse (ROI), que era inserido dentro do defeito das imagens selecionadas com espessura padronizada. Manteve-se uma distância de 1,25mm da borda de cada defeito, de acordo com a metodologia descrita por Kolambkar et al. (2013) (121) e Stephan et al. (2010) (122). A região selecionada era armazenada pelo ícone *save roy*. Na última etapa, selecionava-se a imagem binária, que era padronizada na parte superior e inferior para todas as regiões selecionadas. Na fase seguinte processava-se a imagem através da sua densidade e os elementos como volume tecidual, volume total (VT), volume ósseo (VO) e percentual do volume ósseo sobre o volume tecidual (VO/VT), mesmos parâmetros utilizados nas pesquisas de Stechow et al., 2003 (93) e Nyan et al., 2007 (104).

## 5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO MICRO CT

Micro CT – Todas as variáveis contínuas foram avaliadas quanto à normalidade pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* e observou-se que todas se aproximam da distribuição normal. Os resultados foram reportados em termos de

média  $\pm$  desvio padrão. Os grupos foram comparados em relação a diversos parâmetros: VT (volume tecidual); VO (volume ósseo), VO/VT (volume ósseo sobre o volume tecidual), pelo uso de análise de variância (ANOVA), utilizando o método *post-hoc* para as comparações múltiplas *post-hoc*, com o método de Fisher *least significant difference* (LSD). O valor  $p < 0,05$  foi estabelecido como o critério para a significância estatística. A análise estatística foi realizada usando-se SAS 9.3.

### 5.13 EUTANÁSIA

Decorridos 60 dias dos procedimentos cirúrgicos, a eutanásia dos animais foi realizada por decaptação, seguida da secção do crânio, divulsão e retirada dos tecidos moles para preparo das peças para a descalcificação (Fig.12).



**Figura 12.** Exposição e retirada dos tecidos moles para preparo da amostra e descalcificação.

### 5.14 PREPARO HISTOLÓGICO

O preparo das peças foi realizado no laboratório de histopatologia do setor de patologia bucal da Faculdade de Medicina e laboratório de histopatologia do setor de patologia bucal da Faculdade de Odontologia, ambos da Universidade de Brasília (UnB).

Realizada a eutanásia, as amostras obtidas da região do osso parietal bilateral foram fixadas em formol neutro a 10% durante 24h e, na sequência, lavadas

em água corrente por mais 24h. Após a fixação, as amostras foram submetidas à descalcificação em uma solução de Ácido Fórmico 50% e Citrato de Sódio 20%.

Concluída a descalcificação, as peças foram preparadas no laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UnB, onde foram realizados os seguintes passos: 1) Coleta, 2) identificação do material (avaliação Macroscópica), 3) fixação/clivagem: Dividiram-se as peças ao meio no sentido longitudinal separando os lados direito e esquerdo, 4) desidratação (uso do álcool etílico em concentrações progressivas: 70%, 80%, 95%, 100%, 100% com tempo de permanência de 60 minutos em cada fase. Foram realizados dois banhos no álcool a 100% para afastar de moléculas de água residuais; 5) Diafanização com xilol I, xilol II e Xilol III, 6) Impregnação ( Banhos de parafina / estufa), 7) inclusão (caixas de papel, metal e acrílico), 8) Microtomia, cortes semisseriados com espessura de 5µm no sentido longitudinal das peças, 9) montagem, coloração-padrão a base de hematoxilina e eosina e etiquetagem das lâminas crilato desidratadas, clarificadas e incluídas em parafina. Posteriormente, as peças foram submetidas às avaliações microscópicas de luz binocular (Zeiss) por dois examinadores. Durante o preparo histológico, todas as lâminas foram codificadas isoladamente de forma que, durante as análises histométrica e histológica descritiva, o examinador desconhecia qual o grupo pertencia o corte histológico analisado.

Os valores de porcentagens obtidos dos cortes de cada calvária foram utilizados para fins estatísticos. Os percentuais de tecido ósseo neoformado (ON), do biomaterial remanescente (BC) e do tecido mole, foram observados e calculados.

### 5.15 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para a realização das análises histométrica e histológica descritiva, todas as lâminas anteriormente avaliadas e selecionadas através de microscópio foram escaneadas e as imagens obtidas de todos os cortes foram digitalizadas e importadas de um programa de computador, *Aperio & Pathology*. Cinco amostras dos defeitos cirúrgicos, de cada grupo, foram analisadas.

### 5.15.1 ANÁLISE DESCRITIVA

Na análise descritiva, os cortes histológicos foram examinados considerando a morfologia do tecido neoformado presente na área dos defeitos ósseos das calvárias dos animais. As análises foram realizadas nas imagens digitalizadas de cada grupo com aumentos de 20x e 200x.

### 5.15.2 ANÁLISE HISTOMÉTRICA

Foi utilizado para a análise histométrica o *software ImageScope*.

Para a análise estatística, os cortes histológicos mais centrais de cada defeito cirúrgico (123) foram selecionados e os seguintes critérios observados, conforme pesquisas de Melo et al. (2005) (123) e Garcia et al. (2013) (124), para padronizar a análise histomorfométrica das imagens digitais:

a) A área total analisada correspondeu a toda área do defeito cirúrgico original. A área total foi delimitada incluindo todo o tecido presente entre as duas extremidades do defeito ósseo cirúrgico.

b) A área total foi mensurada em milímetros quadrados e considerada na sua integralidade. A área do novo tecido ósseo foi mensurado, em milímetros quadrados, e calculado como uma porcentagem da área total. O resultado dessas porcentagens foi submetido à análise estatística a fim de verificar a diferença entre os grupos

Após a delimitação da área total do defeito ósseo, foi delimitado o tecido ósseo neoformado e o espaço ocupado pelas partículas do biomaterial ainda presente, utilizando-se o *software ImageScope* (Figs. 13 a 17). A manipulação do programa de imagem foi realizada por um examinador cego e calibrado. Primeiramente, foi realizado o treinamento do examinador em conjunto com um

professor doutor na área de Patologia Bucal. Após a análise do examinador, uma segunda análise foi realizada por dois outros examinadores calibrados.

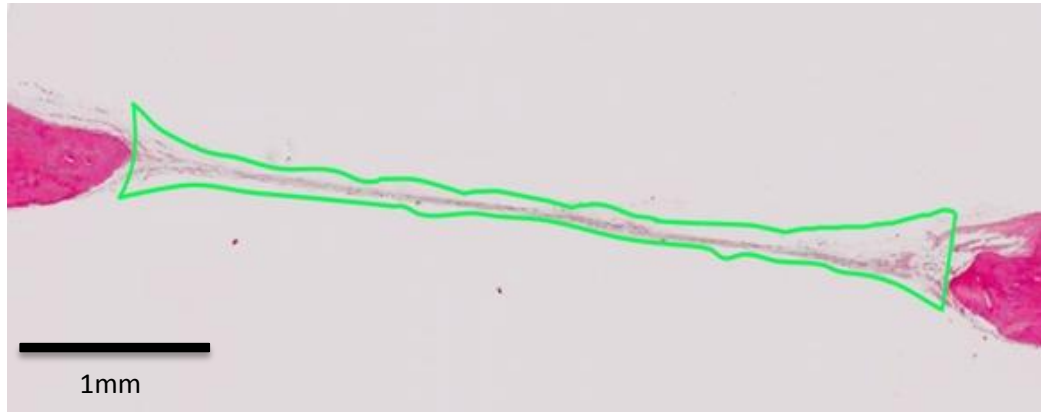


Figura 13: Defeito crítico (20x) com 5mm de diâmetro, com 60 dias de pós-operatório. Grupo 1 (C). A marcação em verde indica a área do defeito e delimita o tecido neoformado.

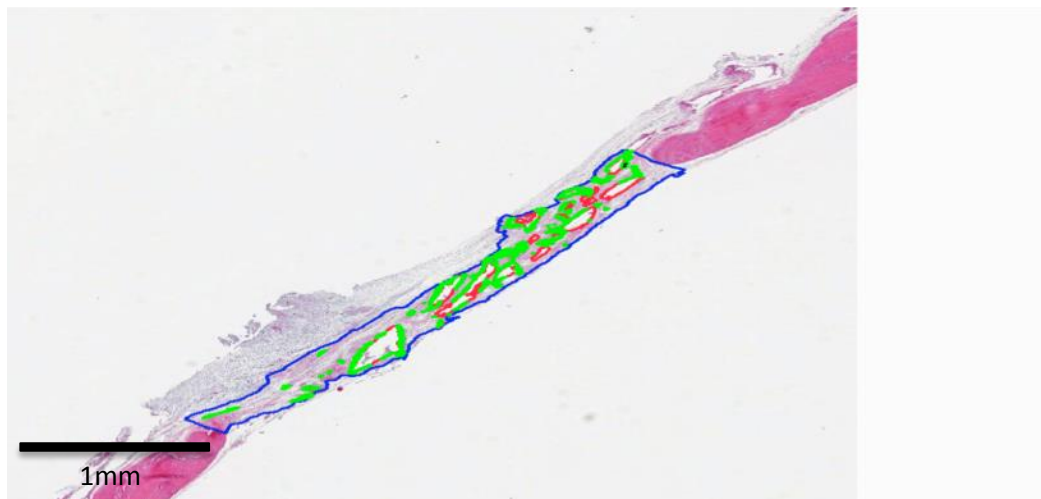


Figura 14: Defeito crítico (20x) com 5mm de diâmetro com 60 dias de pós-operatório. Grupo 2 (BC). A marcação em azul indica a região do defeito e delimita o tecido neoformado. A marcação em vermelho delimita o tecido neoformado. A area em verde indica a área ocupada por BC.

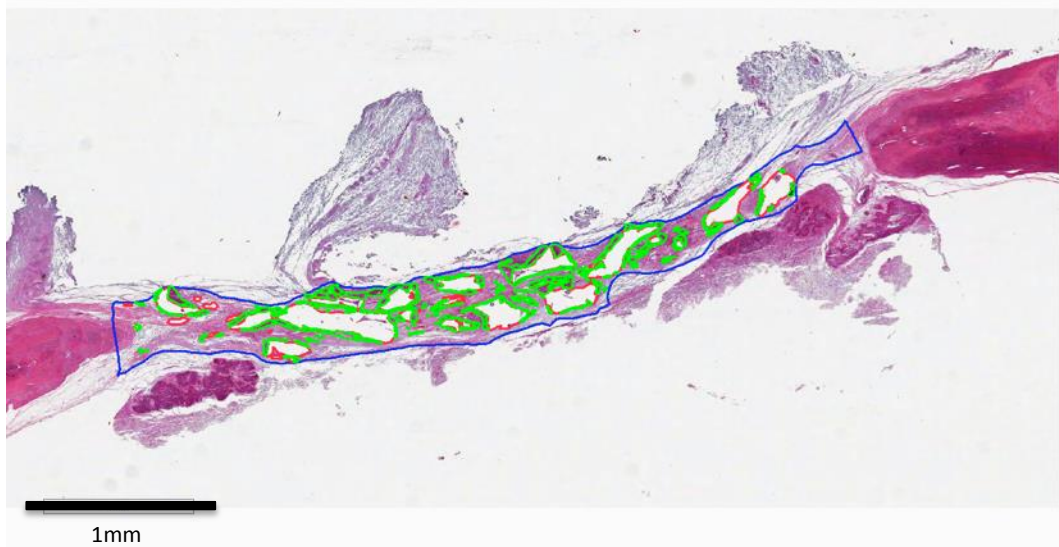


Figura 15: Defeito crítico (20x) com 5mm de diâmetro com 60 dias de pós-operatório. Grupo 3 (BCS). A marcação em azul indica a região do defeito e delimita o tecido neoformado. A marcação em vermelho delimita as regiões de neoformação óssea. A area em verde indica a área ocupada por BC.

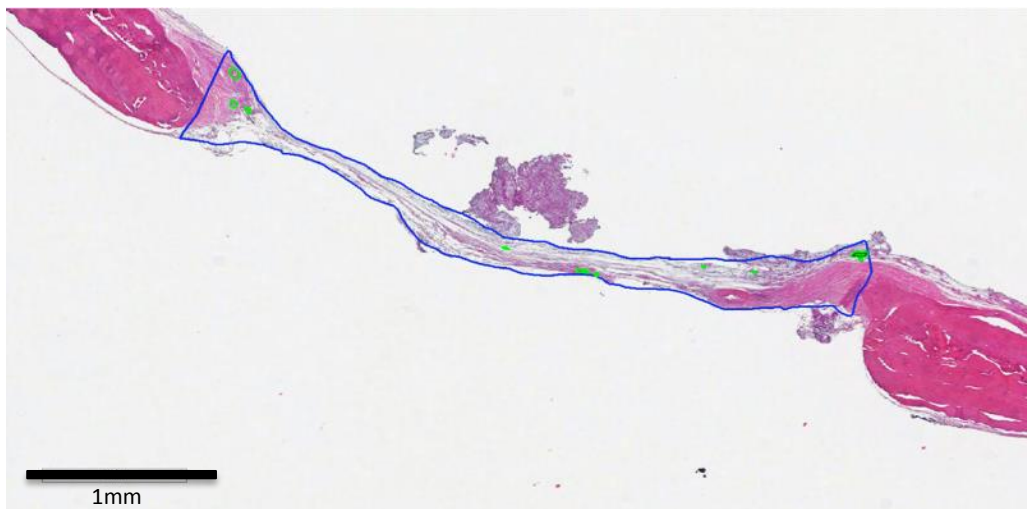


Figura 16: Defeito crítico (20x) com 5mm de diâmetro com 60 dias de pós-operatório. Grupo 4 (EC). A marcação em azul indica a região do defeito e delimita o tecido neoformado. A marcação em verde indica as áreas de neoformação óssea.

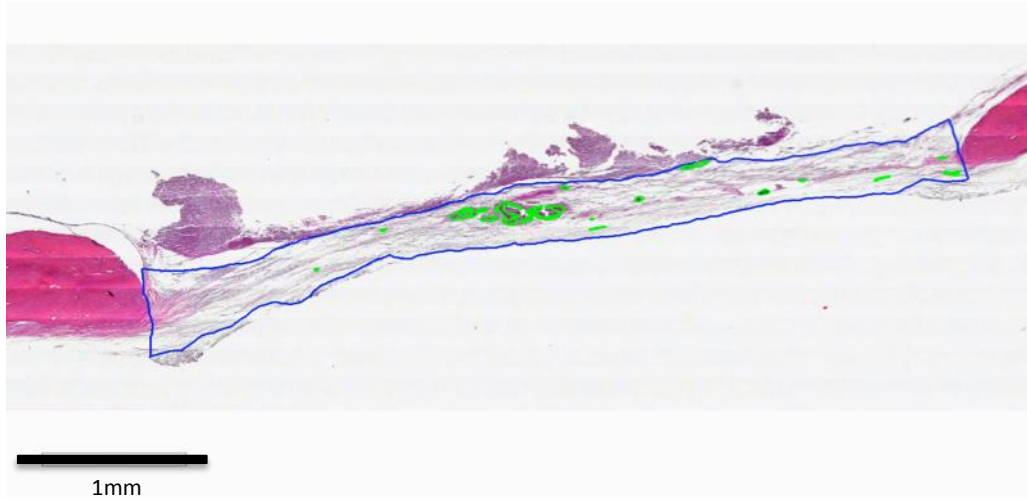


Figura 17: Defeito crítico (20x) com 5mm de diâmetro com 60 dias de pós-operatório. Grupo 5 (ECS). A marcação em azul indica a região do defeito e delimita o tecido neoformado. A marcação em verde indica as áreas de neoformação óssea.

## 5.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA HISTOLOGIA

No que refere à análise estatística da histologia, a variável AON (Área de tecido ósseo neoformado) foi avaliada quanto a normalidade através do teste de Kolmogorov-Smirnov e observou-se que a mesma se aproxima da distribuição normal. Os resultados foram reportados em termos de média  $\pm$  desvio padrão. Os grupos foram comparados em relação aos valores de AON pelo uso de análise de variância (ANOVA), utilizando-se o método *post-hoc* para as comparações múltiplas com o método de Fisher *Least Significant Difference* (LSD). O valor  $p < 0,05$  foi estabelecido como o critério para a significância estatística. A análise estatística foi realizada usando-se o software SAS 9.3.

## 6 RESULTADOS

---

Durante o pós-operatório observou-se uma satisfatória recuperação clínica dos ratos, os quais não apresentaram qualquer imobilização e mantiveram suas funções e atividades semelhantes aos ratos não operados. Os animais tratados com sinvastatina (BCS- Grupo 2; ECS- Grupo 3), apresentaram por volta de uma semana uma leve inflamação da pele nas regiões operadas. A inflamação foi classificada como leve, pela presença de vermelhidão e volume um pouco aumentado nas regiões operadas nesses grupos, sem evolução para úlceras e crostas. Após duas semanas estavam completamente cicatrizadas.

### 6.1 ANÁLISE TOMOGRÁFICA

As figuras 18, 19 e 20 são imagens representativas das análises por MicroCT realizadas *in vivo* nas regiões dos defeitos. Os resultados do MicroCT estão expressos nas Tabelas 7 e 8. Observa-se na Tabela 7 que os valores médios do volume total da área analisada (VT), nos quatro grupos de tratamento (BC, BCS, EC, ECS), não diferem significativamente do valor médio do grupo controle (C). Os valores médios do volume ósseo neoformado (VO) do grupo 2 ( $0,44 \pm 0,25$ ) e do grupo 3 ( $0,33 \pm 0,19$ ) são significativamente maiores que os valores médios do (VO) do grupo 1 (controle), ( $0,01 \pm 0,02$ ) enquanto os valores médios do VO do grupo 5 ( $0,00 \pm 0,00$ ) e do grupo 4 ( $0,00 \pm 0,00$ ), não diferem significativamente dos valores médios do grupo controle ( $0,01 \pm 0,02$ ). Os valores médios de VO/VT (%) são significativamente maiores nos grupos 2 e 3 ( $16,76 \pm 9,39$  ;  $12,47 \pm 7,38$ ) que os valores médios de VO/VT (%) do grupo controle ( $0,45 \pm 0,64$ ), enquanto os valores médios de VO/VT (%) do grupo 5 ( $1,00 \pm 0,19$ ) e do grupo 4 ( $0,00 \pm 0,01$ ) não diferem significativamente dos valores médios de VO/VT (%) do grupo controle ( $0,45 \pm 0,64$ ). Ao comparar os valores VO e VO/VT, pode-se constatar que os tratamentos com BC (grupo 2) e BCS (grupo 3) apresentaram resultados significativamente superiores comparados ao grupo controle (1), o qual não recebeu nenhum tipo de tratamento enquanto os resultados observados nos grupos tratados com ECS



(Grupo 5) e EC (Grupo 4) não foram estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle.

Os efeitos dos tratamentos com BC, BCS, ECS e EC são comparados na TABELA 8. Observa-se que o melhor efeito na neoformação óssea são produzidos com BC (Grupo 2) e BCS (Grupo 3). Os valores médios de VO e VO/VT não diferem significativamente entre esses dois grupos, mas diferem significativamente dos demais grupos tratados com ECS (Grupo 5), EC (Grupo 4). Embora o preenchimento do defeito ósseo com ECS produziu um valor médio de VO/VT superior em relação ao grupo 4 (grupo 5-  $1,00 \pm 0,19 >$  grupo 4 -  $0,00 \pm 0,001$ ) esses valores não foram estatisticamente significativos. Por meio dos resultados observados, pode-se relacionar em ordem decrescente o material mais efetivo para a neoformação óssea nesse estudo; [BC ( $16,76, \pm 9,39$ ) > BCS ( $12,47 \pm 7,38$ ) > ECS ( $1,00 \pm 0,19$ ) > EC ( $0,00 \pm 0,001$ )].

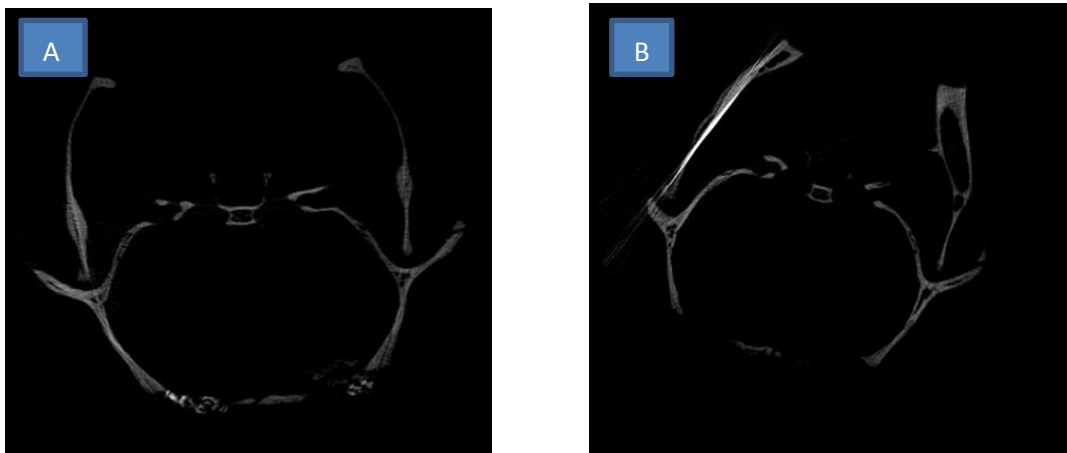


Fig. 18 (A): Micro CT das regiões tratadas com BC (lado esquerdo) e BCS (lado direito).  
Fig. 18 (B): Micro CT das regiões tratadas com EC (lado esquerdo) e ECS (lado direito).



Fig. 19 (C): Micro CT das regiões sem tratamento (C, lado esquerdo) e BC (lado direito).  
Fig. 19 (D): Micro CT das regiões sem tratamento (C, lado esquerdo) e BCS (lado direito).

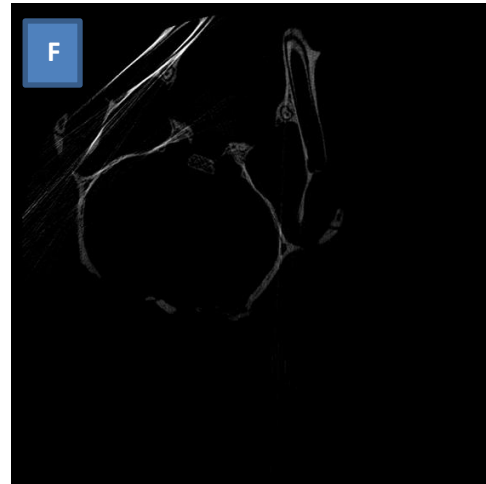
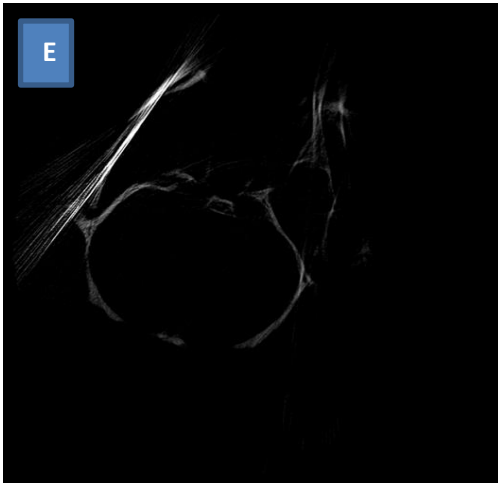


Fig. 20 (E): Micro CT das regiões tratadas com C (lado esquerdo) e EC (lado direito).  
Fig. 20 (F): Micro CT das regiões tratadas com C (lado esquerdo) e BCS (lado direito).

Tabela 7 – Resultados da avaliação do Micro CT na comparação dos tratamentos BC, BCS, EC e ECS, versus C após 2 semanas dos procedimentos cirúrgicos.

	Controle (1)	Bone Ceramic (2)	Bone Ceramic + Sinvastatina (3)	CollaTape(4)	Sinvastatina + CollaTape (5)	p*			
Parâmetro	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)	(2)X(1)	(3)X(1)	(4)X(1)	(5)X(1)
VT	2,47 ± 0,39	2,64 ± 0,00	2,64 ± 0,00	2,64 ± 0,00	2,64 ± 0,00	0,1291	0,1296	0,1293	0,1289
VO	0,01 ± 0,02	0,44 ± 0,25	0,33 ± 0,19	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	<b>0,0001</b>	<b>0,0020</b>	0,9174	0,8952
BO/VT (%)	0,45 ± 0,64	16,76 ± 9,39	12,47 ± 7,38	0,00 ± 0,01	1,00 ± 0,19	<b>0,0001</b>	<b>0,0020</b>	0,9174	0,8952

Valores mais ou menos representam média ± desvio padrão. Análise estatística foi realizada por ANOVA com comparação post-hoc usando o método de *Fisher least significant* (LSD). \* Valores em negrito indicam significância estatística de  $p < 0,05$   
(BC) BoneCeramic®; (BCS) BoneCeramic® + sinvastatina; (EC) Esponja de colágeno; (ECS) Esponja de colágeno + sinvastatina; (C) Controle

Tabela 8 – Resultados da avaliação do Micro CT em relação aos efeitos dos tratamentos com BC, BCS, EC e ECS na neoformação óssea em um período de 2 semanas.

	Bone Ceramic (2)	Bone Ceramic + Sinvastatina (3)	CollaTape (4)	Sinvastatina + CollaTape (5)	p*		
Parâmetro	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)	(2)X(3)	(4)X(5)	(3)X(5)
VT	2,64 ± 0,00	2,64 ± 0,00	2,64 ± 0,00	2,64 ± 0,00	0,9983	0,9984	0,9990
VO	0,44 ± 0,25	0,33 ± 0,19	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,2197	0,9776	<b>0,0016</b>
VO/VT (%)	16,76 ± 9,39	12,47 ± 7,38	0,00 ± 0,01	1,00 ± 0,19	0,2197	0,9776	<b>0,0016</b>

Valores mais ou menos representam média ± desvio padrão. Análise estatística foi realizada por ANOVA com comparação post-hoc usando o método de *Fisher least significant* (LSD). \* Valores em negrito indicam significância estatística de  $p < 0,05$   
(BC) BoneCeramic®; (BCS) BoneCeramic® + sinvastatina; (EC) Esponja de colágeno; (ECS) Esponja de colágeno + sinvastatina; (C) Controle

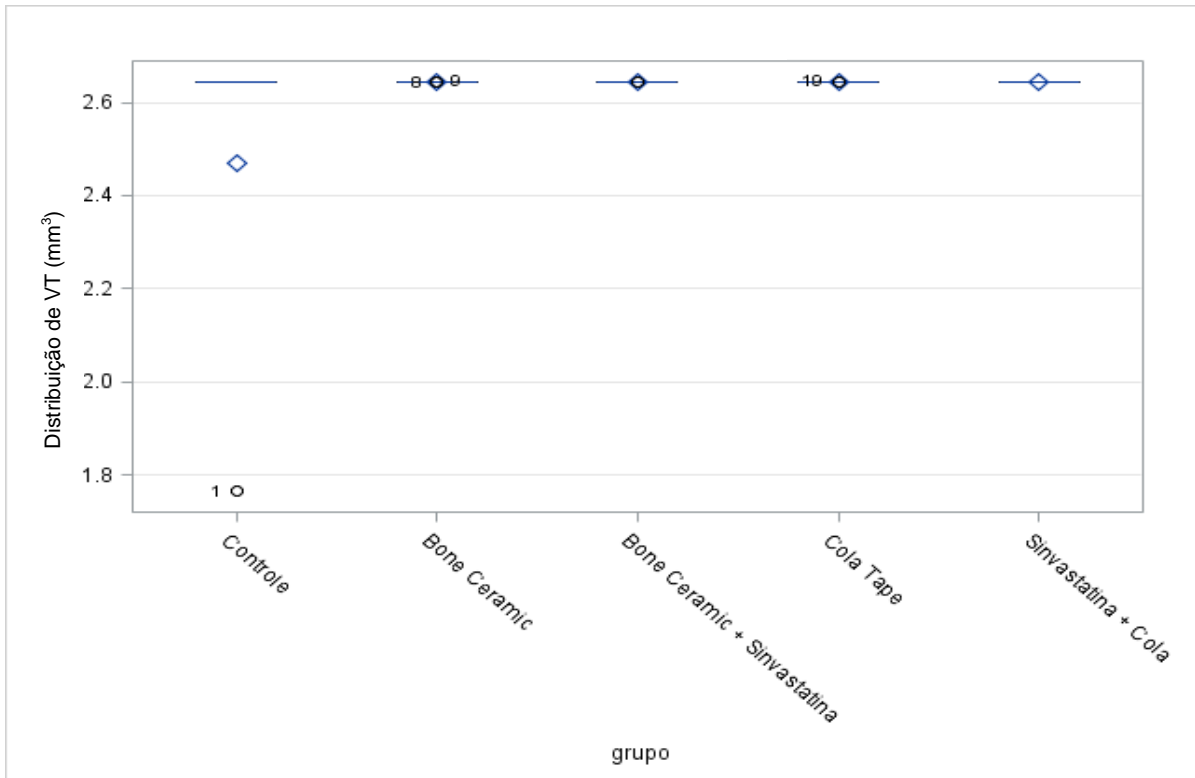


Figura 21: Distribuição do volume tecidual.

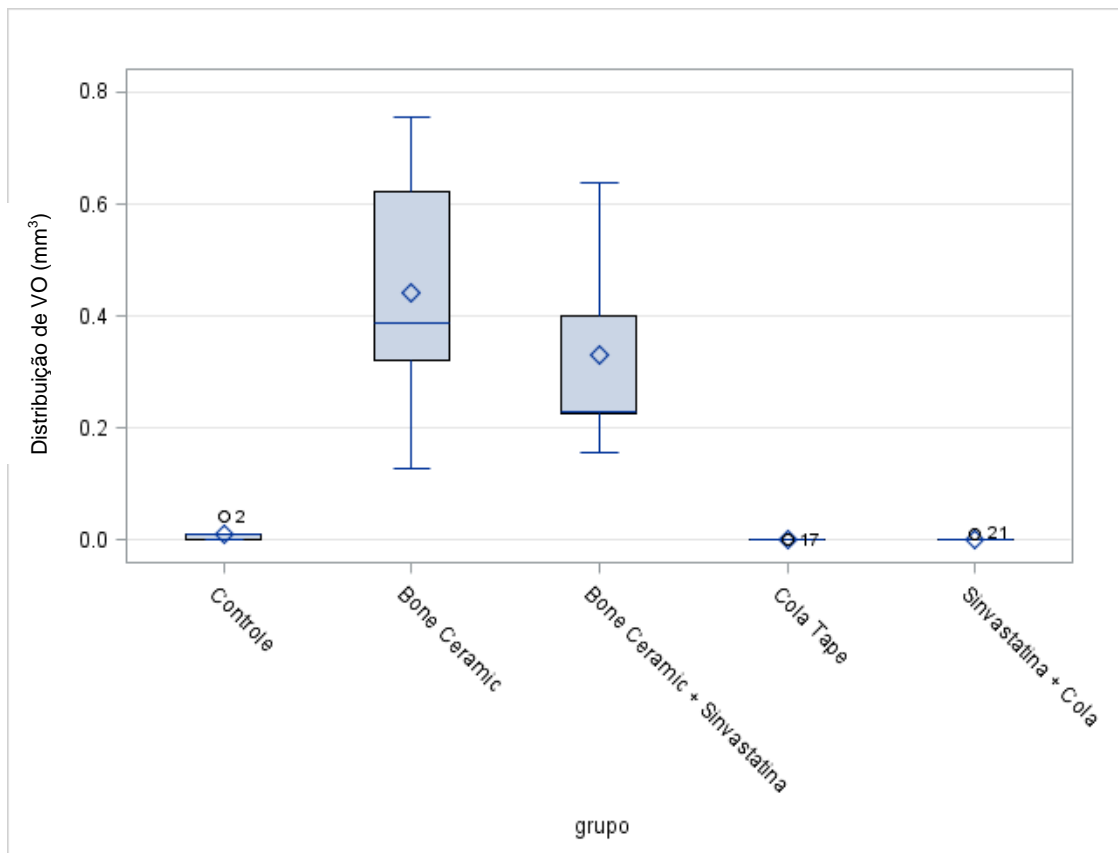


Figura 22: Distribuição do volume ósseo

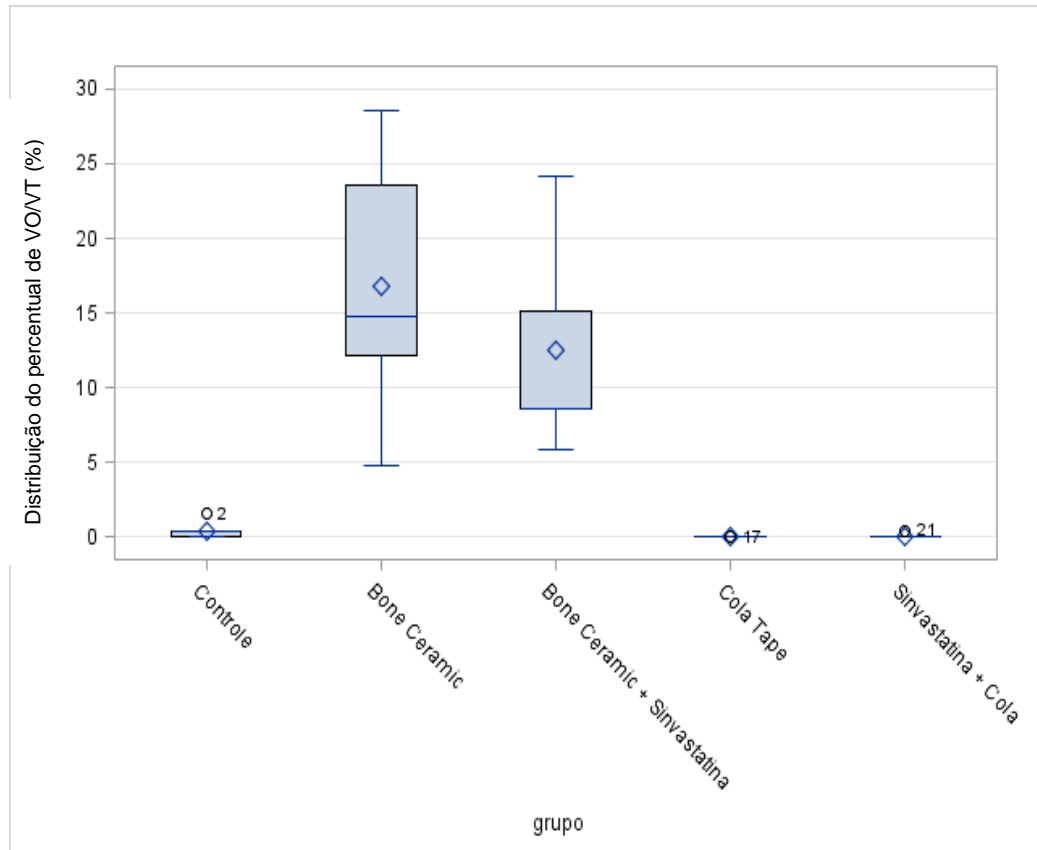


Figura 23: Distribuição do percentual de volume ósseo (VO) sobre o volume tecidual

## 6.2 RESULTADOS ESTATÍSTICOS DA HISTOMETRIA

Os resultados da análise histométrica estão apresentados nas Tabelas 9, 10 e 11 e nas figuras 24 e 25. De acordo com a Tabelas 9, verifica-se que os valores médios de AON (área de tecido ósseo neoformado), nos grupos BoneCeramic® + Sinvastatina, BoneCeramic® e Sinvastatina + CollaTape® foram significativamente maiores que o valor médio de AON, no grupo controle. O valor médio de AON no grupo CollaTape® não difere significativamente do valor médio de AON do grupo controle. A distribuição do percentual das áreas de neoformação óssea está apresentada na figura 24.

Na tabela 10 observa-se que o valor médio de AON do grupo (1) é significativamente maior que o valor médio de AON do grupo (2), que é

significativamente maior que o valor médio no grupo (3), que é significativamente maior no grupo (4). O valor médio de AON no grupo (2) é significativamente maior que o valor médio no grupo (4). O valor médio de AON no grupo (1) é significativamente maior que o valor médio no grupo (3).

Na tabela 11 observa-se que o valor médio da área ocupada pelas partículas remanescentes do BoneCeramic® não difere significativamente entre os grupos 2 e 3. A distribuição do percentual da área ocupada por partículas remanescentes de BoneCeramic® está apresentada na figura 25.

Tabela 9 – Resultados histométricos da comparação dos tratamentos BC, BCS, EC e ECS versus C, após 60 dias dos procedimentos cirúrgicos.

	Controle (1)	Bone Ceramic (2)	Bone Ceramic + Sinvastatina (3)	CollaTape (4)	Sinvastatina + CollaTape (5)	p*			
Parâmetro	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)	(2)X(1)	(3)X(1)	(4)X(1)	(5)X(1)
% AON	0,00 ± 0,00	9,04±0.86	12,71±1.21	0,91± 0.86	2,25± 0.61	<b>0,0001</b>	<b>0,001</b>	0,0925	<b>0,003</b>

Valores mais ou menos representam média ± desvio padrão. Análise estatística foi realizada por ANOVA com comparação post-hoc usando o método de Fisher *least significant* (LSD). \* Valores em negrito indicam significância estatística de  $p < 0,05$

(BC) BoneCeramic®; (BCS) BoneCeramic® + sinvastatina; (EC) Esponja de colágeno; (ECS) Esponja de colágeno + sinvastatina; (C) Controle

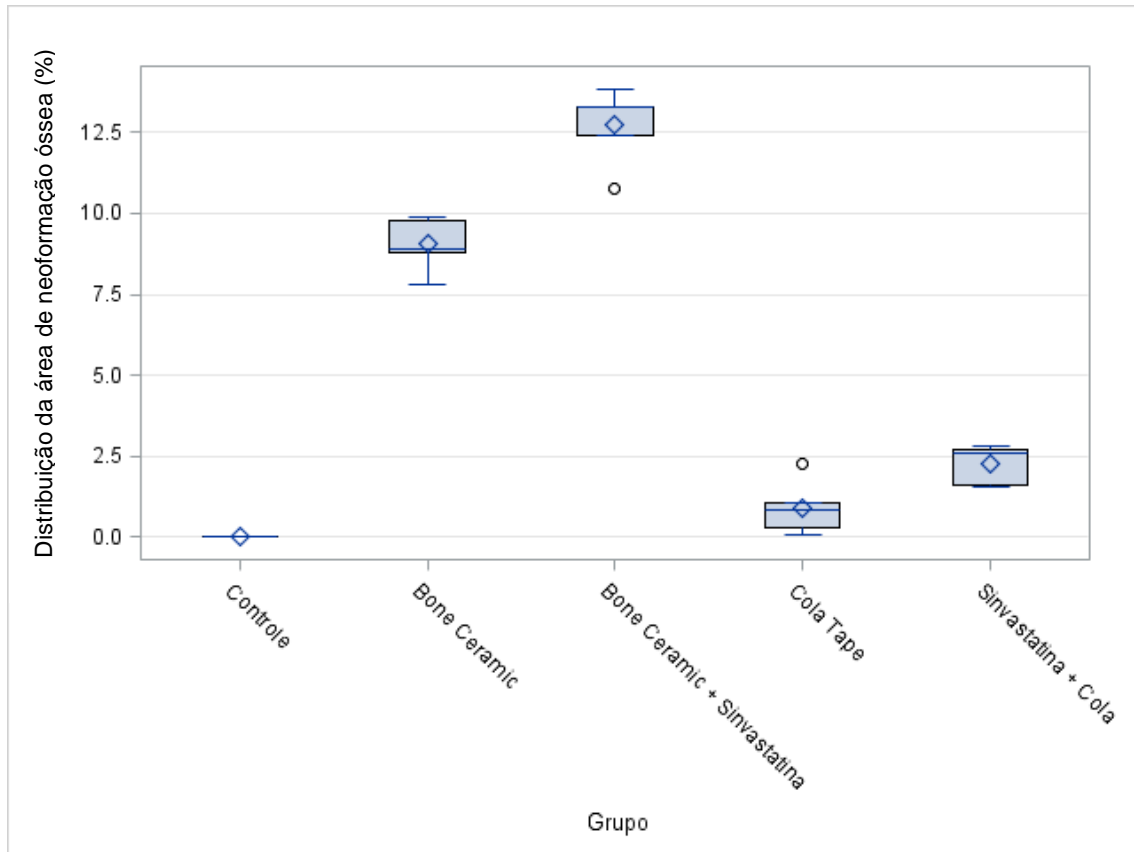


Figura 24: Distribuição do percentual das áreas de neoformação óssea



Tabela 10 – Resultados histométricos da comparação dos efeitos dos tratamentos BC, BCS, EC e ECS.

	Bone Ceramic (2)	Bone Ceramic + Sinvastatina (3)	CollaTape (4)	Sinvastatina + CollaTape (5)	p*				
Parâmetro	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)	(n = 6)	(3) X (2)	(2) X (5)	(5) X (4)	(2) X (4)	(3) X (5)
% AON	9.04±0.86	12.71±1.21	0.91± 0.86	20,25± 0.61	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,033</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>

Valores mais ou menos representam média ± desvio padrão. Análise estatística foi realizada por ANOVA com comparação post-hoc usando o método de *Fisher least significant (LSD)*. \*Valores em negrito indicam significância estatística de  $p < 0,05$

(BC) BoneCeramic®; (BCS) BoneCeramic® + sinvastatina; (EC) Esponja de colágeno; (ECS) Esponja de colágeno + sinvastatina; (C) Controle

Tabela 11 - Resultados histométricos da área ocupada por partículas remanescentes de BC nos defeitos ósseos dos grupos 2 e 3, com 60 dias de avaliação

	Bone Ceramic (2)	Bone Ceramic + Sinvastatina (3)	p*
% Bone Ceramic	18,00±0,02	20,00±0,07	0,6234

Valores mais ou menos representam média ± desvio padrão. Análise estatística foi realizada por *t-student*. \* Valores em negrito indicam significância estatística de  $p < 0,05$

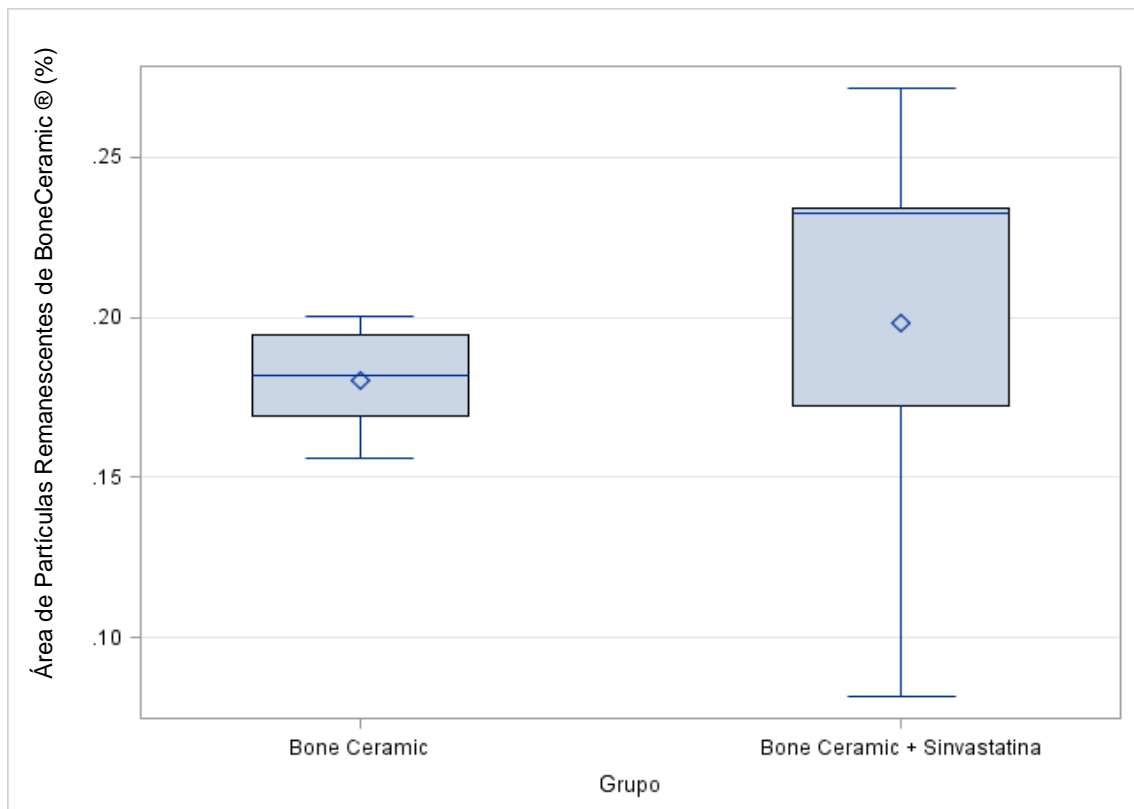


Figura 25: Distribuição do percentual da área ocupada por partículas remanescentes de BoneCeramic®

### 6.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA

A figura 26 mostra imagens representativas dos 5 grupos e possibilita uma visão de toda a extensão do defeito e dos tecidos neoformados nos diferentes grupos.

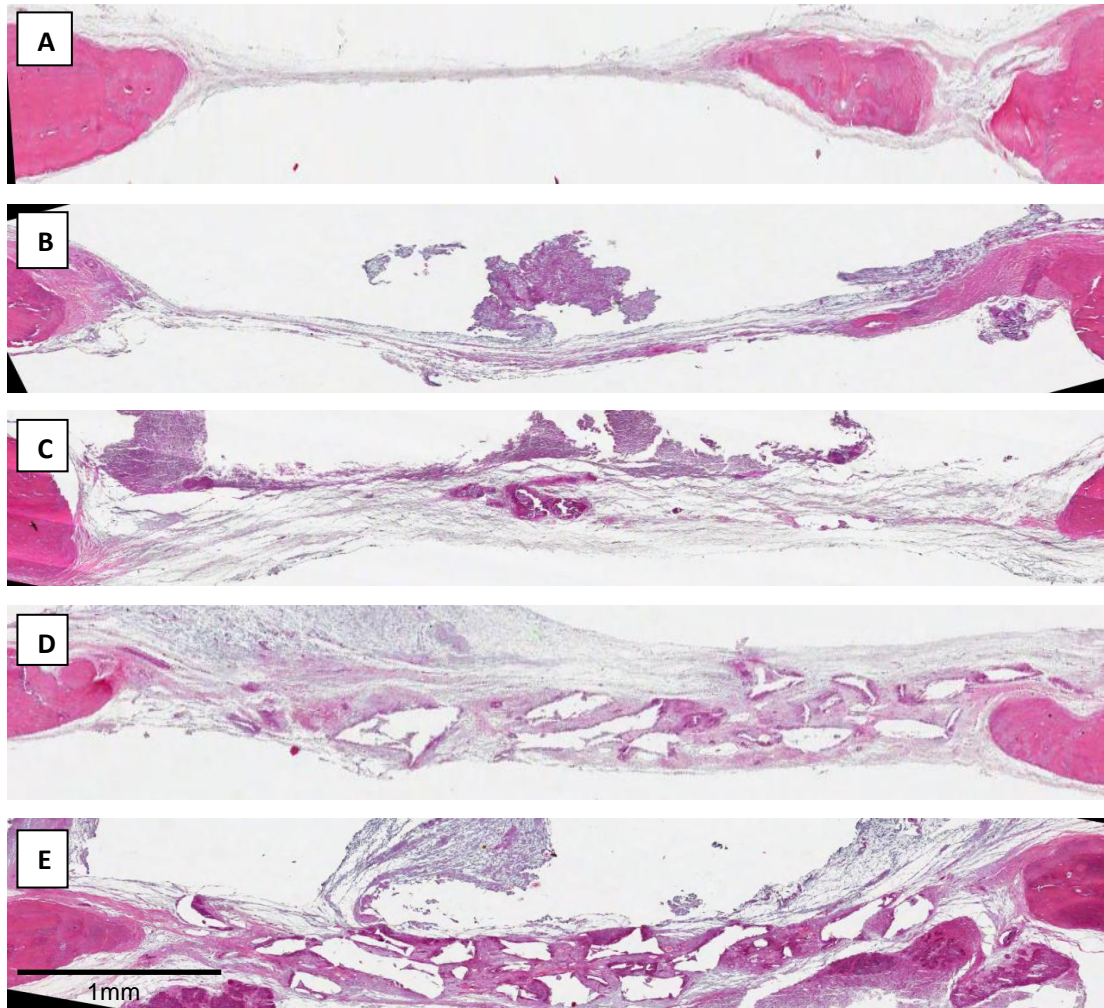


Figura 26: Imagens obtidas com o scanner *Aperio ePathology*, para análise digitalizada com software *Scan Scope*. A: Defeito sem preenchimento (Grupo 1); B: Defeito preenchido com esponja de colágeno (Grupo4) ; C: Defeito preenchido com esponja de colágeno combinado com sinvastatina (Grupo5); D: Defeito preenchido com BoneCeramic® (Grupo 2); E: Defeito preenchido com BoneCeramic® combinado com sinvastatina (Grupo 3). As imagens foram aumentadas em 20x.

Nesse menor aumento (20X) através de uma visão panorâmica dos defeitos, as seguintes características foram observadas:

### 6.3.1 GRUPO 1 - COÁGULO (C)

Neste grupo o defeito não recebeu nenhum tratamento, pois foi preenchido somente com coágulo, não foi observada neoformação óssea, mas apenas a presença de um tecido fibroso bastante delgado, unindo as bordas do defeito (Fig. 26A). Em um maior aumento (200x), observou-se um tecido fibroso e a presença de alguns vasos sanguíneos (Fig. 27).

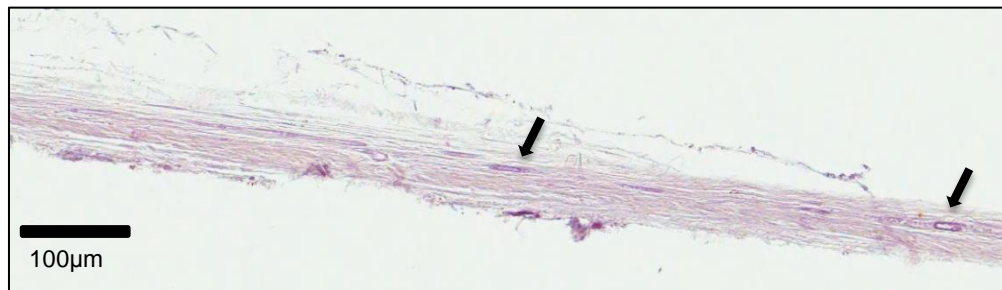


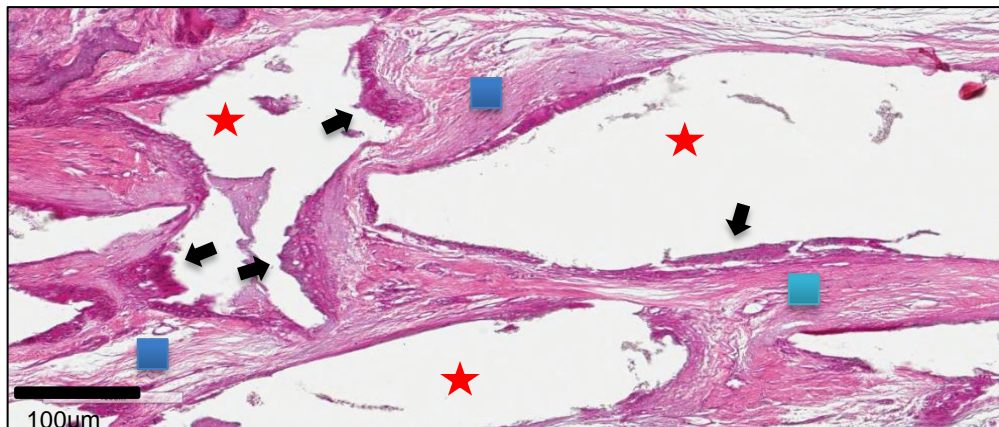
Figura 27: A presença de tecido conjuntivo no defeito sem tratamento, preenchido somente por coágulo. Observa-se a presença de poucos vasos sanguíneos (setas).

### 6.3.2 GRUPO 2 - BONECERAMIC® SEM SINVASTATINA (BC).

Presença de tecido sugestivo de osso com coloração mais intensa semelhante a coloração do tecido ósseo das bordas do defeito. Ao contrário do grupo controle (Grupo1) observou-se neste grupo um preenchimento total do defeito por um tecido mais espesso, como observado no Grupo 3 (BCS). Em toda a extensão do defeito há a formação de um tecido fibroso com uma coloração menos intensa do que a coloração do tecido ósseo das bordas (Fig. 26D). Partículas não absorvidas do BC, representadas por lacunas após o processamento histológico, ainda estavam presentes após 2 meses de cicatrização.

Em um maior aumento, 200X, observou-se presença de células cuboides alinhadas na superfície das partículas de BC com características morfológicas de osteoblastos. Essas células estão circundadas por um tecido semelhante com matriz

óssea e em algumas regiões mais de uma camada de células são evidentes. Essas características da localização das células na superfície de BC e da morfologia do novo tecido formado indica que se trata de osteoblastos em atividade de síntese matriz óssea. O tecido conjuntivo fibroso presente apresenta-se com grande número de células (fibroblastos, vasos sanguíneos) entre as partículas do biomaterial (Fig. 28).



**Figura 28:** Aumento em 200x do corte histológico do Grupo 2 (BC), onde há lacunas do BoneCeramic® (estrelas), desmineralizado com o processamento histológico. Lâmina de BoneCeramic® sem sinvastatina, demonstrando neoformação de tecido ósseo ao redor das partículas do BoneCeramic (setas) e tecido conjuntivo (quadrados).

### 6.3.3 GRUPO 3 - BONECERAMIC® COM SINVASTATINA (BCS)

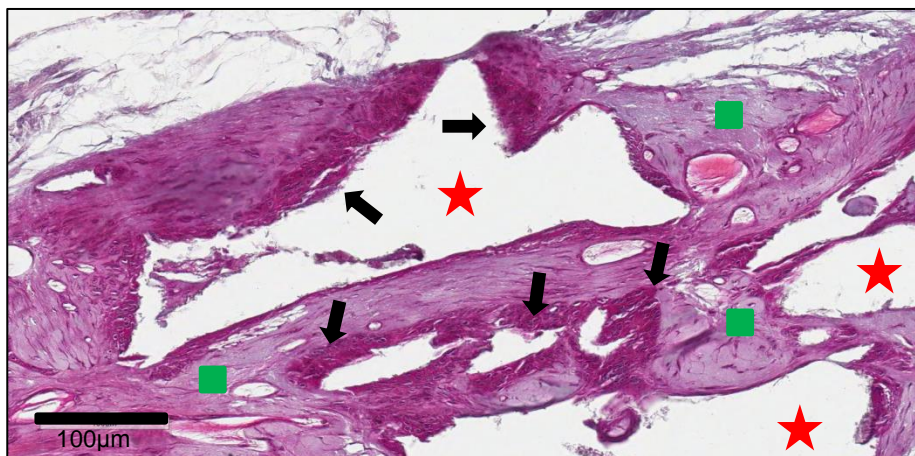
A neoformação óssea observada na área de defeito crítico no grupo 03, que recebeu BoneCeramic® umedecido com sinvastatina, apresentou-se mais evidente comparada aos outros grupos avaliados (ver Fig. 26E). Foi observado a neoformação de um tecido sugestivo de tecido ósseo justaposto as partículas BC (lacunas deixadas pelas partículas após a desmineralização). Nota-se neste grupo um preenchimento total do defeito semelhante ao grupo 2, por um tecido com uma espessura semelhante as bordas do defeito.

O tecido sugestivo de osso apresenta uma coloração mais intensa no grupo 3 (BCS) comparada ao grupo 2 (BC) e visualmente em maior quantidade (Fig. 26E).

Em ambos os grupos 2 e 3, partículas de BoneCeramic® (representadas pela lacunas nos cortes histológicos) ainda não absorvidas encontravam-se presentes.

Uma maior quantidade de tecido conjuntivo fibroso pode ser detectada ao longo do defeito no Grupo 3 por haver uma maior quantidade de uma coloração mais intensa comparada aos demais grupos 1,2,4 e 5 (Fig. 26E).

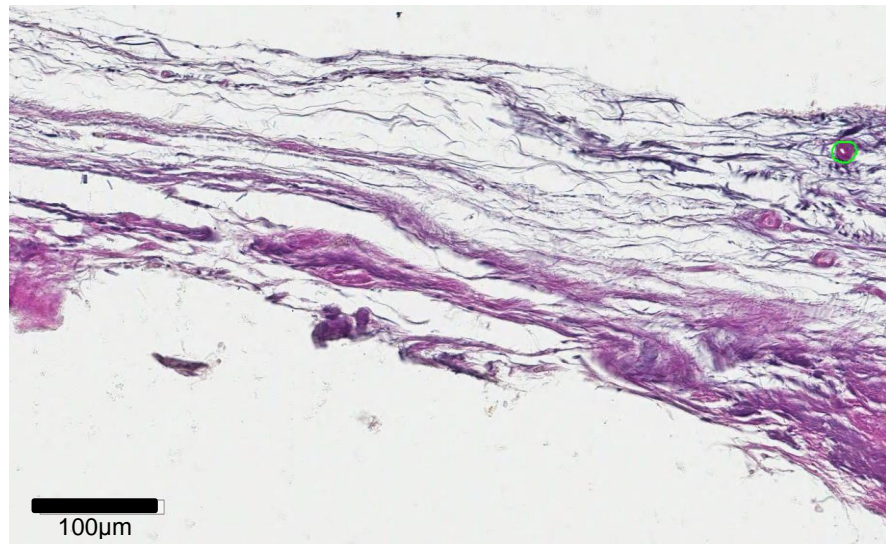
Durante a análise do grupo BCS, com aumento de 200X, observou-se na superfície de BC um maior número de células cuboides alinhadas, várias regiões com muitas camadas de células (osteoblastos) e a presença de camadas espessas de matriz óssea, próximas ou ao redor, dessas células, sugerindo uma grande atividade de síntese de matriz óssea por esses osteoblastos (Fig 29). Também verificou-se um tecido conjuntivo com a presença de um grande número de células (fibroblastos) e vasos sanguíneos (Fig. 29).



**Figura 29:** Aumento em 200x do corte histológico do Grupo 3 (BCS), onde há lacunas do BoneCeramic® (estrelas), desmineralizado com o processamento histológico. Observa-se a neoformação óssea em maior quantidade e varias camadas de células ao redor das partículas do BoneCeramic® (setas) e tecido conjuntivo entre as partículas do BC (quadrado).

#### 6.3.4 GRUPO 4 – ESPONJA DE COLÁGENO (EC)

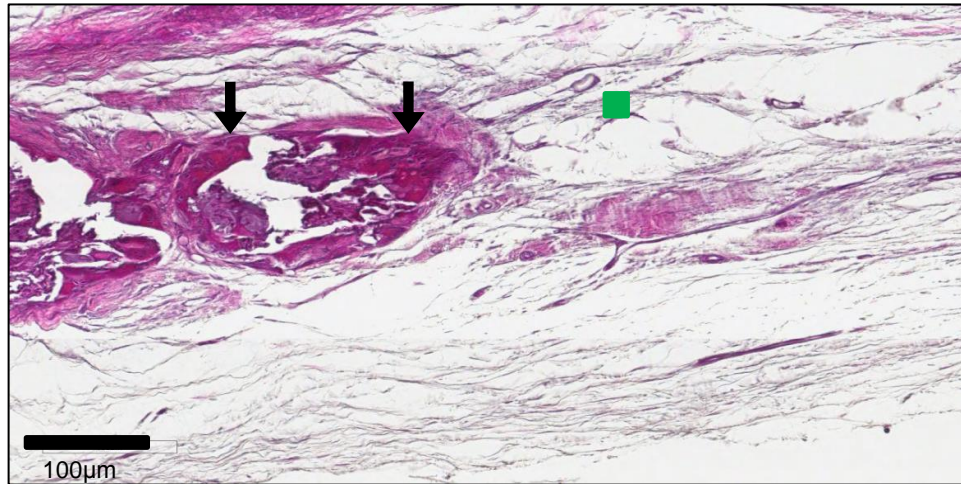
Nesse período de 60 dias, observou-se um tecido fibroso aparentemente mais espesso do que o controle, unindo as bordas do defeito (Fig. 26B) Na região próxima ao centro do defeito nota-se a presença de um tecido com coloração um pouco mais intensa e com características diferentes do tecido fibroso presente. Não foi observado resquícios algum da esponja de colágeno (EC). Em um aumento de 200X constatou-se apenas algumas células e alguns vasos sanguíneos (Fig 30).



**Figura 30:** Aumento em 200x. (A) Corte histológico do Grupo 4 (EC) ColliTape® sem sinvastatina, demonstrando um tecido conjuntivo fibroso espesso do que o controle, sem evidências de formação óssea.

#### 6.3.5 GRUPO 5 - ESPONJA DE COLÁGENO COM SINVASTATINA (ECS).

Constatou-se a presença de um tecido fibroso, mais espesso do que os grupos 1 e 4 (Controle e EC, respectivamente). Na porção mais central do defeito, percebe-se a presença de uma ilhota de um tecido compatível com o tecido ósseo, devido à sua coloração e morfologia (Fig. 26C). Em maior aumento (200x), verificou-se a presença de células cubóides alinhadas, características de osteoblastos e circundadas por matriz óssea no centro do defeito.



**Figura 31:** Aumento em 200x. Corte histológico do Grupo 5 (ECS) CollaTape® com simvastatina, demonstrando ilhotas de neoformação óssea (setas) no meio de tecido conjuntivo fibroso (quadrado).



## 7 DISCUSSÃO

---

Os resultados dos estudos envolvendo a aplicação local da sinvastatina na neoformação óssea têm sido encorajadores e o seu efeito no metabolismo ósseo têm despertado muito interesse nas áreas médica e odontológica. Muitos estudos observaram uma cicatrização óssea precoce com este medicamento (114, 43, 46, 12, 97). No estudo atual, a sinvastatina foi utilizada com dois carreadores distintos, e o impacto na neoformação de defeitos ósseos foi avaliado. Semelhante a vários estudos prévios, os resultados do presente estudo mostram que a utilização dessa droga de fato resulta em maior neoformação óssea quando aplicada em defeitos na calvária de ratos. Essas evidências demonstram que a sinvastatina tem grande potencial para ser utilizada para este fim, além de representar uma alternativa simples e economicamente viável aos medicamentos/materiais de enxerto utilizados atualmente em reconstruções ósseas, os quais muitas vezes são inacessíveis para uma grande parte da população que necessita de enxerto ósseo e posterior reabilitação com implantes osseointegrados (52, 23, 33, 39).

Mundy et al., 1999 (73) foram os primeiros a reportarem que a sinvastatina estimula a formação óssea. Os autores testaram mais de 30.000 compostos sobre o efeito no tecido ósseo. Observaram em seus estudos *in vivo* (ratas ovariectomizadas ou não) e *in vitro* (culturas de células de calvária de ratos) que as estatinas aumentam a formação de osso. Recentemente há muitos estudos *in vitro* e *in vivo* sobre os efeitos positivos das estatinas no tecido ósseo, principalmente quando aplicadas localmente (108, 79, 50, 41, 39, 102, 9, 98, 103). Atualmente dois estudos foram realizados em humanos, comprovando a eficácia do tratamento local da sinvastatina na regeneração do tecido periodontal (54,55). No presente estudo foi utilizado administração local da sinvastatina porque apresenta as seguintes vantagens sobre o uso sistêmico: permite a utilização de doses mais elevadas sem causar efeitos colaterais gastrointestinais, e alcança uma concentração ideal no tecido periférico. A administração sistêmica desta droga oferece uma biodistribuição insatisfatória para os tecidos periféricos com resultados deficientes ou negativos

para neoformação óssea (58, 96, 95, 32). A elevação das doses para obter uma melhor ação no tecido ósseo provoca uma redução drástica na produção do colesterol, uma substância necessária para a manutenção da integridade das membranas celulares (58, 32).

Vários estudos realizados em animais tiveram como objetivo determinar a melhor concentração da sinvastatina na indução da formação óssea. Stein et al., (2005) (33) demonstraram que 0,1 mg de sinvastatina foi a dose que produziu mínima inflamação local e os estudos realizados por Nyan et al., (2009; 2010) (9, 98) ; Robjani et al., (2011) (103) verificaram que esta concentração de sinvastatina associada a um carreador cerâmico (tricálcio-fosfato - alfa-TCP), induziu uma maior formação óssea e menor inflamação tecidual. Os pesquisadores acima citados, definiram esta dose como ideal para este carreador. Portanto, no presente estudo a dose de sinvastatina utilizada foi de 0,1 mg.

Por outro lado, estudos relatam que doses locais altas da sinvastatina (2,2 mg) levam a inflamação da pele sobre os defeitos sem acréscimo na quantidade de osso formado enquanto doses muito baixas (0,01 mg) não estimulam neoformação óssea (9,51, 33, 30, 34,). No presente estudo, verificou-se clinicamente a presença de inflamação leve da pele sobre o local da cirurgia nos grupos tratados com sinvastatina (BCS e ECS) na região operada as quais desapareceram por volta de 10 dias e esta inflamação foi semelhante à descrita nos estudos de Nyan et al., (2009) (9) e Rojbani et al.,(2011) (103), as quais também reduziram por volta de 10 dias pós-cirurgia. STEIN et al., 2005 (33), observaram uma redução no potencial da sinvastatina para indução da formação óssea quando ela era associada a aplicação local de um anti-inflamatório (inibidor de COX-2) e concluíram que a inflamação parece ser necessária para a formação óssea e ativação dos osteoblastos. De fato, vários estudos têm demonstrado que a inibição de COX-2 e subsequentemente a síntese de PGE-2 resulta em um número reduzido de osteoblastos na superfície óssea. Dessa forma, no presente estudo, não foi administrado anti-inflamatório após a cirurgia nos animais.

Stein et al., 2005.,(33); Lee et al., 2008 (34); Nyan et al., 2009 (9); Rojbani et al., 2011 (103) não encontraram inflamação significativa com o uso local de 0,1 mg

de sinvastatina assim como também não foi observado na presente investigação. Nyan et al., 2009 (9) e Rojbani et al., 2011 (103) verificaram uma inflamação considerável a partir da dose de 0,25 mg de sinvastatina, enquanto Stein et al., 2005 (33) e Lee et al., 2008 (34) observaram inflamação mais intensa apenas com doses superiores a 0,5 mg. Foi observada inflamação com a dose de 0,5 mg mas não foi considerada importante (33,34), porque propiciou uma quantidade significativa de osso novo formado. No presente estudo também foi verificado a presença de inflamação, mas esta foi classificada como leve e não influenciou a cicatrização óssea, pois os grupos em que os defeitos ósseos foram preenchidos com 0,1 mg de sinvastatina apresentaram maior área de novo osso formado. Certamente esta inflamação não foi suficiente para estimular grandes concentrações de citocinas e conseqüentemente prejudicar a diferenciação e/ou mineralização dos osteoblastos.

O efeito osteogênico da sinvastatina é dose/carreador dependente, ou seja, para cada carreador existe uma concentração adequada para a associação com a sinvastatina (9). Para associar a sinvastatina com o gel de metilcelulose a concentração adequada é de 0,5 mg de sinvastatina segundo Chen et al., 2011 (51), Stein et al., 2005 (33) e Lee et al., 2008 (34). Para a sua associação com alfa ou beta-TCP a concentração ideal é 0,1mg de sinvastatina (9,98), conforme utilizado no presente estudo. A combinação desse medicamento com a esponja de colágeno (Teruplug, Terumo, Japão) foi efetiva com uma dose de 2,5 mg/ml de sinvastatina dissolvida em 0,2ml de água de acordo com o estudo estabelecido por Mucozawa et al., 2011 (102). No presente estudo a comparação de diferentes doses para diferentes carreadores não foi realizada, apesar de ter sido utilizado dois carreadores diferentes (BC e EC). O objetivo foi utilizar doses menores da sinvastatina o que é benéfico em termos de menor reação inflamatória. O BC é utilizado como material de enxerto ósseo cujas propriedades osteocondutoras são bem estabelecidas (125, 126, 127, 128), ao passo que a EC não é considerada um material de enxerto ideal para regeneração de defeitos ósseos, pois não é osteocondutora, sua absorção é rápida, e é incapaz de manter o arcabouço que facilita a neoformação óssea (129, 130, 131, 132, 133). Este fato é evidente nos resultados histológicos da presente investigação onde observou-se uma incapacidade da EC em manter a espessura da calvária dos ratos. Mesmo assim, a

EC foi utilizado como carreadora da sinvastatina para verificar se a presença da droga seria suficiente para suplantiar algumas dessas deficiências da EC. De acordo com os resultados, o carreador ideal nesse estudo foi o BC, pois além de resultar em uma formação óssea significativa quando associado à sinvastatina, o mesmo foi capaz de servir como arcabouço permitindo a formação óssea.

Mukozawa et al., 2011 (102) verificaram em seu estudo uma quantidade significativa de neoformação óssea, após oito semanas de inserção de uma esponja de colágeno com 2,5 mg/ml de sinvastatina em defeitos ósseos de 5mm de diâmetro feitos no osso nasal de coelhos, sugerindo que a esponja de colágeno pode ser um bom carreador para a sinvastatina. No estudo atual, a esponja de colágeno utilizada como carreadora para a sinvastatina, estimulou uma quantidade menor de osso novo formado diferente daquele observado por Mukozawa et al., 2011 (102). Essa diferença pode ser atribuída à metodologia empregada nos experimentos, uma vez que os autores mencionados utilizaram uma concentração de 2,5mg/ml de sinvastatina dissolvida em 0,2ml de água, enquanto que na presente investigação utilizou-se uma concentração de sinvastatina de 0,1mg dissolvida em 15µl de etanol. Além disso, apesar da esponja colágena (EC) utilizada na presente pesquisa ter sido de origem bovina assim como aquela utilizada por Mukozawa et al., 2011 (102), a composição das mesmas são diferentes. Enquanto a CollaTape® é composta de colágeno tipo I extraído de tendão bovino, a esponja utilizada por Mukozawa et al., 2011 (102) era composta de 85 a 95% de colágeno tipo I e entre 5 a 15% de colágeno tipo III. Alguns estudos demonstraram que essa esponja de colágeno utilizada por Mukozawa et al., 2011 (102), tem a capacidade de induzir a formação de osso (134, 135, 136), enquanto que o mesmo não acontece com o CollaTape® (137). Desta forma, no estudo de Mukozawa et al., 2011 (102) o próprio carreador poderia favorecer uma neoformação óssea, o que explica os resultados obtidos pelos autores. Além disso, os dois estudos utilizaram modelos animais diferentes em suas avaliações.

A sinvastatina é hidrofóbica, portanto é insolúvel em água. Nesta investigação ela foi dissolvida em etanol porque segundo Morris et al., 2008 (52) ela é fácil de ser diluída no etanol, fácil de ser utilizada em pequenos espaços quando comparada ao

gel de metilcelulose. Outros estudos também utilizaram o etanol para diluir a sinvastatina em suas pesquisas (49, 51, 46, 103). A acetona também pode ser utilizada para esta finalidade, como descrito no estudo de Moda et al., 2012 (105).

De modo diverso, Tanigo et al., (2010) (99), defendem que ao incorporar a sinvastatina em um hidrogel de gelatina biodegradável consegue-se favorecer a liberação do medicamento com menor ou nenhuma inflamação já que os carreadores a base de água ou hidrofílicos produzem uma menor extensão de inflamação do que os com pouca quantidade de água ou hidrofóbicos.

Muitos pesquisadores têm investigado fosfato de cálcio como material de enxerto ósseo, porque ele oferece uma ótima biocompatibilidade, que foi introduzido com sucesso como material de substituto ósseo (138, 139) e tem sido usado como carreador para antibióticos e fatores de crescimento como as BMPs (140,141,142). Entre os diferentes fosfatos de cálcio utilizou-se neste estudo o fosfato de cálcio bifásico (BoneCeramic®) totalmente sintético, porque ele tem demonstrado ser seguro, biocompatível e efetivo como matriz para a formação de novo osso em diversos defeitos no rebordo alveolar e seio maxilar (125, 126, 127, 128). A condutividade óssea desse biomaterial foi constatada no presente estudo entre os grupos tratados com fosfato de cálcio bifásico (BoneCeramic® - BC). Nos defeitos ósseos dos grupos 2 e 3 preenchidos com o fosfato de cálcio bifásico (BoneCeramic®) de forma isolada (grupo-BC) ou associada com a sinvastatina (BCS), respectivamente, observou-se uma maior quantidade de neoformação óssea comparado aos defeitos dos outros grupos (1,4 e 5), sem preenchimento (1), ou preenchidos com carreador colágeno combinados(5) ou não(4) com SVT. Esses resultados foram estatisticamente significativos (Tabela 9) e estão de acordo com a literatura onde o Bone Ceramic é tido como matriz efetiva para a formação de novo osso em defeitos ósseos diversos (125,126,127,128). Observou-se também que o fosfato de cálcio bifásico (BoneCeramic®) associado com 0,1mg de sinvastatina promoveu maior quantidade de osso neoformado comparado a utilização do Bone Ceramic de forma isolada, sem a adição da sinvastatina. Esses resultados sugerem que a combinação BCS resulta em um carreador osseocondutor com propriedades indutoras, conferidas pela sinvastatina. Resultados semelhantes foram verificados

quando a sinvastatina foi associada com um biomaterial a base de fosfato de cálcio (104,9,103). A combinação da sinvastatina e sulfato de cálcio é vista como um novo substituto ósseo promissor, aumentando o crescimento ósseo (104).

O substituto ósseo ideal deve ser absorvido com o tempo para permitir e favorecer uma nova formação óssea mantendo suas propriedades osseocondutoras apenas no período necessário da regeneração não mais do que isso (99,29). Porém JENSEN et al., 2005 (13) relatam que em algumas situações clínicas uma baixa taxa de substituição pode ser benéfica quando o suporte físico do material de enxerto mantém o aumento de volume e previne o colapso do tecido mole. Nyan et al., 2007 (104); NYAN et al., 2009 (9) defendem que a baixa degradação do carreador tendo como consequência a liberação gradual da sinvastatina é preferível para a rápida formação óssea em defeitos, sem induzir uma inflamação extensa.

Neste estudo a quantidade de substituto ósseo remanescente observado em oito semanas foi 19,71% quando este era associado com 0,1mg de sinvastatina e 18,17% quando não era associado com a sinvastatina sem diferenças significativas entre esses dois grupos (Tabela 11). Esses resultados divergem dos encontrados por Rojbani et al., 2011 (103). Esses pesquisadores verificaram em seu estudo um percentual inferior a 10% de partículas remanescentes do biomaterial Alfa-TCP com ou sem sinvastatina, mais de 30% de partículas remanescentes do biomaterial Beta-TCP sem sinvastatina e quase 20% quando este era associado com sinvastatina, e mais de 40% de partículas remanescentes de HA com ou sem sinvastatina. Isto pode ser explicado pelas propriedades físico-químicas e mecânicas do BoneCeramic, em que a estabilidade do volume aumentado é mantida graças à lenta absorção da hidroxiapatita.

Ao contrário do que sucede com outros fosfatos de cálcio bifásicos, Straumann® BoneCeramic não é mera mistura de hidroxiapatita e tricálcio fosfato, sendo esse um compósito sintetizado quimicamente, a fim de assegurar uma distribuição homogênea das duas fases (117). É interessante constatar que o BoneCeramic apresentou uma média de absorção, quando comparado aos resultados dos biomateriais alfa-TCP, beta-TCP e HA descritos por Rojbani et al., 2011 (103).

Os resultados tomográficos apresentados, após duas semanas de cicatrização, mostraram resultados superiores significativos nos defeitos ósseos tratados com BoneCeramic associados ou não com sinvastatina, em relação aos defeitos tratados com esponja de colágeno com ou sem sinvastatina e grupo controle. Isto pode ser explicado pelo fato de que as partículas do BoneCeramic® ainda estavam presentes nesses grupos BC e BCS, diferente dos sítios implantados com uma esponja de colágeno que nesse período já teria sido degradada, pois a mesma é absorvida entre 10 e 14 dias (130,131). A maior radiopacidade dos sítios tratados com BoneCeramic® pode ter contribuído para os resultados significativamente maiores nesses grupos em relação aos demais. As diferenças nos resultados entre BC e BCS, embora não significativas, podem ser atribuídas pelo fato de ter havido maior absorção inicial das partículas de BC quando estas estavam associadas com a sinvastatina. Neste grupo (BCS) observou-se uma inflamação temporal na região operada. Isto pode ter contribuído para uma aceleração da degradação das partículas BC e, por isso, os resultados foram inferiores neste grupo. Este período de avaliação não é suficiente para afirmar sobre os efeitos da sinvastatina na neoformação óssea, por isso os valores dos grupos com sinvastatina são semelhantes aos valores dos grupos sem ela. A matriz óssea nesse período provavelmente ainda não estava em um estado de mineralização maduro suficiente para ser detectada no MicroCT. Estes achados estão de acordo com os resultados encontrados por Nyan et al., 2007 (104), pois verificaram uma maior formação de novo osso (área de neoformação óssea-  $1,09 \pm 0,04$ ) e conteúdo mineral ( $56,3 \pm 2,18$ ) no grupo tratado apenas com o biomaterial (sulfato de cálcio sem adição da sinvastatina) e foi um resultado superior em relação aos demais grupos (controle e o grupo do sulfato de cálcio associado com a sinvastatina), no período de duas semanas após a cirurgia.

Por outro lado, Nyan et al., 2007 (104) verificaram no grupo em que os defeitos foram preenchidos com o biomaterial osseocondutor (sulfato de cálcio), associado com a sinvastatina, apresentaram menor formação óssea nos períodos de duas e quatro semanas pós-cirurgia e no período de oito semanas este grupo apresentou o melhor resultado ( $1,15 \pm 0,01$ ) de neoformação óssea; e ( $79,48 \pm 3,23$ ) de conteúdo mineral, em relação ao grupo tratado apenas com fosfato de cálcio

( $0,98 \pm 0,05$  de neoformação óssea;  $68,2 \pm 3,26$  de conteúdo mineral) e essa diferença foi estatisticamente significativa. Resultado semelhante foi observado no presente estudo onde o melhor resultado foi verificado no grupo tratado apenas com o biomaterial osseocondutor (BC) no período de duas semanas, avaliados por meio de exame tomográfico. Resultado oposto foi observado nas avaliações histométricas após oito semanas de preenchimento dos defeitos ósseos, onde o melhor resultado neste período de avaliação foi obtido no grupo em que a sinvastatina foi associada ao biomaterial osseocondutor (BC) e foi estatisticamente significativo. Os autores descreveram que o atraso na formação óssea pode ser resultado da inflamação observada no tecido mole quando a sinvastatina era associada ao sulfato de cálcio em defeitos criados em calvária de ratos e a partir da quinta semana, quando a inflamação tinha desaparecido, uma maior quantidade de osso começou a se formar.

No presente estudo, o máximo de neoformação óssea foi observado nos defeitos tratados com Bone Ceramic combinado com 0,1mg de sinvastatina (BCS) dissolvida em 15 $\mu$ l de etanol, obtendo-se 12,71% de osso neoformado. O Bone Ceramic umedecido com 15 $\mu$ l de etanol sem sinvastatina (BC), resultou em 9,04% de novo osso formado. Essa diferença entre o BCS e o BC foi estatisticamente significativa. Já nos defeitos tratados com ECS, obteve-se 2,25% de osso novo formado, e no grupo tratado com EC, apenas 0,91%. Esses resultados mostram não só uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com BCS ou BC, mas também entre os grupos tratados com BCS e ECS. Esses resultados indicam que a utilização do Bone Ceramic (material cerâmico) é superior que o CollaTape® (material colágeno) como carreador para a sinvastatina (ver tabela 2 e gráfico 2) nesse modelo de estudo. A quantidade de osso formado quando o BC foi utilizado como carreador é muito superior quando comparado com a utilização da EC. Isto pode ser explicado, devido as diferenças na liberação da droga e/ou propriedades dos dois carreadores utilizados, ou talvez a concentração da sinvastatina e a substância utilizada para a sua diluição (etanol), não foi apropriada para ser utilizada em conjunto com a esponja de colágeno. O BoneCeramic® por si só já é um material osseocondutor e muito utilizado na prática clínica, atua na preservação do espaço do defeito e funciona como um arcabouço para a



proliferação vascular e de osteoblastos. Já a esponja de colágeno não exerce nenhuma influência na cicatrização óssea, funciona apenas como um hemostático sendo degradada por volta de 15 dias (129, 33, 131, 130, 132). Por fim, todos os grupos apresentaram uma neoformação óssea superior ao grupo controle (C), embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa entre os grupos EC e C.

Na análise histológica foi observado que a porção central dos defeitos do grupo controle, os quais não receberam qualquer tipo de tratamento, era preenchida apenas com tecido conjuntivo fibroso. Resultados semelhantes foram descritos por Nyan et al., (2009) (9); Rojbani et al.,(2011) (103). Esses pesquisadores não observaram, após análise dos resultados histológicos, neoformação óssea na porção central dos defeitos do grupo controle (sem tratamento) apenas tecido conjuntivo fibroso. No presente estudo os resultados histológicos da esponja de colágeno (EC) aplicada sobre os defeitos ósseos nas calvárias dos animais, mostraram uma densa camada de tecido conjuntivo fibroso na porção central desses defeitos quando comparada aos do grupo controle (C). Essa é uma vantagem desse material, defendida por diversos autores (129, 130, 131, 132, 133), pois favorece a formação do tecido conjuntivo fibroso de forma acelerada, proporcionando maior quantidade. Verificou-se ainda no estudo, remanescentes de partículas do fosfato de cálcio bifásico (BoneCeramic®) nos cortes centrais dos defeitos dos grupos 1 e 2. Os defeitos, nesses grupos, eram preenchidos por ilhotas de novo tecido semelhante ao tecido ósseo e com características de tecido ósseo imaturo. Foram observadas ao longo dos cortes histológicos desses grupos (BC;BCS) células osteoblásticas alinhadas ao redor das partículas do fosfato de cálcio bifásico e ausência de células inflamatórias como descrito nos estudos de Nyan et al., (2010) (98); Rojbani et al., (2011) (103).

No presente estudo observou-se uma maior quantidade de osso novo formado nos grupos 2 e 3 comparados ao demais. Este resultado está de acordo com o estudo de Rojbani et al., 2011 (103) no qual defendem o uso da combinação de um substituto ósseo com a sinvastatina pois esta pode modificar favoravelmente as características do material estimulando a neoformação óssea. A liberação gradual

da sinvastatina através de um carreador a base de fosfato de cálcio pode contribuir para uma exposição local e continuada dos osteoblastos à sinvastatina e como consequência provocar um aumento da expressão de BMP-2 e subsequente migração de células mesenquimais para estimular a diferenciação osteoblástica (9).

Outros estudos demonstraram que as estatinas induzem uma proliferação significativa de osteoblastos (73,79, 23, 110, 50), resultando em maior formação óssea. A contagem de células não foi realizada no presente estudo, mas nos cortes histológicos dos defeitos tratados com BC+SVT, observou-se a presença de várias camadas de osteoblastos na superfície do osso novo formado, sendo essas camadas visivelmente mais espessas do que a dos outros grupos. As células osteoprogenitoras são diferenciadas a partir das células da duramáter (9,103).

A combinação das propriedades osseocondutoras de BC e indutoras de SVT, aplicadas localmente, demonstrou ser promissora para neoformação óssea. Sugere-se que essa associação pode ser utilizada como opção de tratamento ósseo regenerativo na área da odontologia como, por exemplo, em cirurgias de levantamento de seio maxilar, neoformação óssea após perda dentária, regeneração de defeitos ósseos periodontais, e favorecer o processo de osseointegração de implantes de titânio. Estudos futuros devem ser conduzidos em humanos com o objetivo de certificar os benefícios da associação BC + SVT nessas diversas situações clínicas.

## 8 CONCLUSÃO

---

Os resultados do presente estudo possibilitam que as seguintes conclusões sejam feitas:

- a) A aplicação local da SVT foi benéfica para estimular a neoformação óssea em defeitos na calvária de ratos.
- b) O biomaterial cerâmico BoneCeramic® (BC) foi melhor carreador para a SVT do que a esponja de colágeno Colla Tape (EC), pois houve maior neoformação óssea com a combinação BC + SVT.
- c) A combinação de um biomaterial fosfato de cálcio bifásico (BC) com SVT foi melhor para estimular a neoformação óssea do que a utilização apenas de um biomaterial osseocondutor (BC).

A combinação das propriedades osseocondutoras de BC e indutoras de SVT, aplicadas localmente, demonstrou ser promissora para neoformação óssea. Sugere-se que essa associação pode ser utilizada como opção de tratamento ósseo regenerativo na área da odontologia como, por exemplo, em cirurgias de levantamento de seio maxilar, neoformação óssea após perda dentária, regeneração de defeitos ósseos periodontais, e favorecer o processo de osseointegração de implantes de titânio. Estudos futuros devem ser conduzidos em humanos com o objetivo de certificar os benefícios da associação BC + SVT nessas diversas situações clínicas.

## 9 REFERÊNCIAS

---

1. Covani U, Bortolaia C, Barone A, Sbordone L. Bucco-lingual crestal bone changes after immediate and delayed implant placement. *J. Periodontol.* 2004;75(12):1605-12.
2. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J. Clin. Periodontol.* 2005;32(2):212-18.
3. Araujo MG, Sukekava F, Wennström JL, LINDHE J. Ridge alterations following implant placement in fresh extraction sockets: an experimental study in the dog. *J. Clin. Periodontol.* 2005;32(6):645-52.
4. Liu C, Wu Z, Sun H. Effect of Simvastatin on mRNA Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1, Bone Morphogenetic Protein-2 and Vascular Endothelial Growth Factor in Tooth Extraction Socket. *Int J Oral Sci.* 2009;1(2):90-8.
5. Crespi R, Capparè P, Gherlone E. Magnesium-enriched hydroxiapatite compared to calcium sulfate in the healing of human extraction sockets: radiographic and histomorphometric evaluation at three months. *J. Periodontol.* 2009;80(2):210-18.
6. Garret S. Periodontol Regeneration around natural teeth. *Ann Periodontol.* 1996;1:626-30.
7. Trombelli L, Bottega S, Zucchelli G. Supracrestal soft tissue preservation with enamel matrix proteins in treatment of deep intrabony defects. *Journal of Clinical Periodontology.* 2002;29:433-39.
8. Francetti L, Del Fabbro M, Basso M, Testori T, Weinstin R. Enamel matrix proteins in the treatment of intra-bony defects. A prospective 24-month clinical trial. *J Clin*

Periodontol. 2004;31(1):52-59.

9. Nyan M, Sato D, Kihara H, Machida T, Ohya K, Kasugai S. Effects of the combination with alpha-tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. Clin Oral Implants Res. 2009;20(3):280-7.

10. Chou J, Ito T, Otsuka M, Ben-Nissan B, Milthorpe B. Controlled Release of Simvastatin from Biomimetic  $\beta$ -TCP Drug Delivery System. PloS One. 2013;8(1) e54676.

11. Veis A, Tsirlis T, Parisis N. A. Effect of autogenous harvest site location on the outcome of ridge augmentation for implant dehiscences. Int. J. Periodontics Restorative Dent. 2004;24:155-63.

12. Nyan M, Hao J, Miyahara T, Noritake K, Rodriguez R, Kasugai S. Accelerated and Enhanced Bone Formation on Novel Simvastatin-Loaded Porous Titanium Oxide Surfaces. Clin Implant Dent Relat Res. 2013 [Epub ahead of print].

13. Jensen SS, Brogini N, Hjrting-Hansen E, Schenk R. & Buser D. Bone Healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and  $\beta$ -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in mandibles of minipigs. Clin. Oral Impl. Res. 2006;17:237-43.

14. Mazzone R. Reconstruções em periodontia: protocolos clínicos para o sucesso e previsibilidade. Nova Odessa: Napoleão, 2009.

15. Urist MR. Bone. Formation by autoinduction. Science. 1965;150:893.

16. Urist MR, Huo YK, Brownell AG, Hohl WM, Buyske J, Lietze A, Tempst P, Hunkapiller M, Delange RJ. Purification of bovine bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81(2):371-5.

17. Masters DH. Implants. Bone and bone substitutes. *CDA J.* 1988;16(1):56-65.
18. Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J. Oral Surg.* 1980;38(8):613-16.
19. Artzi Z, Koslovsky A, Nemcovsky Ce, Weinreb M. The amount of newly formed bone in sinus grafting procedures depends on tissue depth as well as the type and residual amount of the grafted material. *J. Clin. Periodontol.* 2005;32(2):193-99.
20. Jeon JH, Piepgrass WT, Lin YL, Thomas MV, Puleo DA. Localized intermittent delivery of simvastatin hydroxyacid stimulates bone formation in rats. *J Periodontol.* 2008;79(8):1457-64.
21. Arnett TR, Dempster DW. A comparative study of disaggregated chick and rat osteoclasts in vitro: effects of calcitonin and prostaglandins. *Endocrinol.* 1987;120(2):602-8.
22. Osterman T, Virtamo T, Kippo K, Laurén L, Pasanen I, Hannuniemi R, Sellman R. Distribution of clodronate in the bone of the adults rats and its effects on trabecular and cortical bone. *J Pharm Exp Ther.* 1997;280(2):1051-56.
23. Baek KH, Young Lee W, Oh KW, Tae HJ, Lee JM, Lee EJ, Han JH, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Young Son H, Kang SK. The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Korean Med Sci.* 2005; 20:438-44.
24. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001;280:874-77.
25. Ohnaka, K, Shimoda S, Nawata H, Shimokawa H, Kaibuchi K. Pitavastatin enhanced bmp-2 and osteocalcin expression by inhibition of rho-associated kinase in

human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;287:337-42.

26. Ayukawa Y, Yasukawa E, Moriyama Y, Ogino Y, Wada H, Atsuta I, Koyano K. Local application of statin promotes bone repair through the suppression of osteoclasts and the enhancement of osteoblasts at bone-healing sites in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(3):336-42.

27. Zhang H, Lin CY. Simvastatin stimulates chondrogenic phenotype of intervertebral disc cells partially through BMP-2 pathway. *Spine (Phila Pa 1976).* 2008;15;33(16):525-31.

28. Ho ML, Chen YH, Liao HJ, Chen CH, Hung SH, Lee MJ, Fu YC, Wang YH, Wang GJ, Chang JK. Simvastatin increases osteoblasts and osteogenic proteins in ovariectomized rats. *Eur J Clin Invest.* 2009;39(4):296-303.

29. Alam S, Ueki K, Nakagawa K, Marukawa K, Hashiba Y, Yamamoto E, Sakulsak N, Iseki S. Statin-induced bone morphogenetic protein (BMP) 2 expression during bone regeneration: an immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(1):22-9.

30. Pauly S, Luttosch F, Morawski M, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B. Simvastatin locally applied from a biodegradable coating of osteosynthetic implants improves fracture healing comparable to BMP-2 application. *Bone.* 2009;45(3):505-11.

31. Fukui T, Li M, Shoji T, Matsumoto T, Mifune Y, Kawakami Y, Akimaru H, Kawamoto A, Kuroda T, Saito T, Tabata Y, Kuroda R, Kurosaka M, Asahara T. Therapeutic effect of local administration of low-dose simvastatin-conjugated gelatin hydrogel for fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2012;27(5):1118-31.

32. Sondergaard TE, Pedersen PT, Andersen TL, S e K, Lund T, Østergaard B, Garnero P, Delaisse J-M, Plesner T. Sondergaard, TE, Pedersen, PT, Andersen, TL,

Søe K, Lund T, Østergaard B, Garnero P, Delaisse J-M, Plesner T. A phase II clinical trial does not show that high dose simvastatin has beneficial effect on markers of bone turnover in multiple myeloma. *Hematol Oncol.* 2009; 27:17–22

33. Stein, D, Lee Y, Schmid MJ, Killpack B, Genrich MA, Narayana N, Marx DB, Cullen DM, Reinhardt RA. Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. *J Periodontol.* 2005; 76(11):1861–70.

34. Lee Y, Schmid MJ, Marx DB, Beatty MW, Cullen DM, Collins ME, Reinhardt RA. The effect of local simvastatin delivery strategies on mandibular bone formation in vivo. *Biomaterials.* 2008;29(12):1940–49.

35. Gutierrez G.E, Lalka D, Garrett IR, Rossini G., & Mundy, G. R. Transdermal application of lovastatin to rats causes profound increases in bone formation and plasma concentrations. *Osteoporosis international.* 2006; 17(7):1033-42.

36. Wu Z, Liu C, Zang G, Sun H. The effect of simvastatin on remodelling of the alveolar bone following tooth extraction. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008;37(2):170-6.

37. Yamashita M, Otsuka F, Mukai T, et al. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor-alpha inhibition of bone morphogenetic proteins-2-induced osteoblast differentiation by regulating Smad signaling and Ras/Rho-mitogen-activated protein kinase pathway. *J Endocrinol.* 2008;196:601.

38. Bostan B, Gunes T, Asci M, Sen C, Kelestemur MH, Erdem M, Koseoglu RD, Erkorkmaz U. Simvastatin improves spinal fusion in rats. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2011;45(4):270-75.

39. Park YS, David AE, Park KM, Lin CY, Than KD, Lee K, Park JB, Jo I, Park KD, Yang VC. Controlled Release of Simvastatin from *In situ* Forming Hydrogel Triggers Bone Formation in MC3T3-E1 Cells. *THE AAPS Journal.* 2013;15(2).



40. Oka S, Matsumoto T, Kubo S, Matsushita T, Sasaki H, Nishizawa Y, Matsuzaki T, Saito T, Nishida K, Tabata Y, Kurosaka M, Kuroda R. Local Administration of Low-Dose Simvastatin-Conjugated Gelatin Hydrogel for Tendon–Bone Healing in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. *Tissue Engineering Part A*. May;19(9-10):1233-43.
41. Liu X, Li X, Zhou L, Li S, Sun J, Wang Z, Gao Y, Jiang Y, Lu H, Wang Q, Dai J. Effects of simvastatin-loaded polymeric micelles on human osteoblast-like MG-63 cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013;1;102:420-7.
42. Li X, Song QS, Wang JY, Leng HJ, Chen ZQ, Liu ZJ, Dang GT, Song CL. Simvastatin induces estrogen receptor-alpha expression in bone, restores bone loss, and decreases ER $\alpha$  expression and uterine wet weight in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab*. 2011;29(4):396-403.
43. Du Z, Chen J, Yan F, Xiao Y. Effects of Simvastatin on bone healing around titanium implants in osteoporotic rats. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(2):145-50.
44. Hamada H, Ohshima H, Otsuka M. Dissolution medium responsive simvastatin release from biodegradable apatite cements and the therapeutic effect in osteoporosis rats. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2012;26;10(1):22-8.
45. Han G, Chen Y, Hou J, Liu C, Chen C, Zhuang J, Meng W. Effects of simvastatin on relapse and remodeling of periodontal tissues after tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2010;138(5):550.e1-7.
46. Yang G, Song L, Guo C, Zhao S, Liu L, He F. Bone responses to simvastatin-loaded porous implant surfaces in an ovariectomized model. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2012;27(2):369-74.
47. Başarır K, Erdemli B, Can A, Erdemli E, Zeyrek T. Osseointegration in arthroplasty: can simvastatin promote bone response to implants? *International*

Orthopaedics. 2009;33(3):855-59.

48. Pauly S, Back D, Kaeppler K, Haas N, Schmidmaier G., & Wildemann B.. Influence of Statins locally applied from orthopedic implants on osseous integration. *BMC musculoskeletal disorders*. 2012;13(1):208.

49. Ma B, Clarke SA, Brooks RA, & Rushton N.. The effect of simvastatin on bone formation and ceramic resorption in a peri-implant defect model. *Acta biomaterialia*. 2008;4(1):149-55.

50. Liu S, Bertl K, Sun H, Liu ZH, Andrukhov O, Rausch-Fan X. Effect of simvastatin on the osteogenetic behavior of alveolar osteoblasts and periodontal ligament cells. *Hum Cell*. 2012;25(2):29-35.

51. Chen Shan YANG, Sheng-Yan ZHANG, Lei FENG., & Jing REN.. Effects of simvastatin gel on bone regeneration in alveolar defects in miniature pigs. *Chinese Medical Journal*. 2011;124(23):3953-58.

52. Morris MS, Lee Y, Lavin MT, Giannini PJ, Schmid MJ, Marx DB, & Reinhardt RA.. Injectable simvastatin in periodontal defects and alveolar ridges: pilot studies. *Journal of periodontology*. 2008;79(8):1465-73.

53. Vaziri H, Naserhojjati-Roodsari R, Tahsili-Fahadan N, Khojasteh A, Mashhadi-Abbas F, Eslami B, Dehpour AR. Effect of simvastatin administration on periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. *J Periodontol*. 2007;78(8):1561-7.

54. Pradeep AR, Thorat MS. Clinical effect of subgingivally delivered simvastatin in the treatment of patients with chronic periodontitis: a randomized clinical trial. *J Periodontol*. 2010;81(2):214-22.

55. Pradeep AR, Priyanka N, Kalra N, Naik SB, Singh SP, Martande S. Clinical efficacy of subgingivally delivered 1.2-mg simvastatin in the treatment of individuals

with class II furcation defects: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2012;83(12):1472-9.

56. Jadhav SB, & Jain GK.. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2006;58(1):3-18.

57. Hughes A, Rogers MJ, Idris AI, Crockett JC. A comparison between the effects of hydrophobic and hydrophilic statins on osteoclast function in vitro and ovariectomy-induced bone loss in vivo. *Calcif Tissue Int.* 2007;81(5):403-13.

58. Garip S, Yapici E, Ozek NS, Severcan M, Severcan F. Evaluation and discrimination of simvastatin-induced structural alterations in proteins of different rat tissues by FTIR spectroscopy and neural network analysis. *Analyst.* 2010;135(12):3233-41.

59. Edwards, C. J., & Spector, T. D.. Statins as modulators of bone formation. *Arthritis research.* 2002;4(3):151-53.

60. Folli C, Descalzi D, Bertolini S, Riccio AM, Scordamaglia F, Gamalero C, Barbieri M, Passalacqua G, Canonica GW. Effect of statins on fibroblasts from human nasal polyps and turbinates. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2008 Nov;40(3):84-9.

61. Nassar PO, Nassar CA, Guimarães MR, Aquino SG, Andia DC, Muscara MN, Spolidorio DM, Rossa C Jr, Spolidorio LC. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res.* 2009;44(4):479-88.

62. Lee JH, Tigchelaar S, Liu J, Stammers AM, Streijger F, Tetzlaff W, Kwon BK. Lack of neuroprotective effects of simvastatin and minocycline in a model of cervical spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2010;225(1):219-30.

63. Suthanthiran TK, Elavarasu S, Naveen D, Nagarathinam U, Arun KV, & Srinivasan N. Collagen with simvastatin promotes cell metabolism in osteoblast-like

SaOS-2 cells. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012;4(Suppl 2):142.

64. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Crowe T, Sasiela WJ, Tsai J, Ganz P. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352(1):29-38.

65. Kastelein JJ, & Bots ML. Statin therapy with ezetimibe or niacin in high-risk patients. *N Engl J Med.* 2009;361(22):2180-3.

66. Garip S, Severcan F. Determination of simvastatin-induced changes in bone composition and structure by Fourier transform infrared spectroscopy in rat animal model. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;1;52(4):580-8.

67. Sata M, Nishimatsu H, Suzuki E, Sugiura S, Yoshizumi M, Ouchi Y, Nagai R. Endothelial nitric oxide synthase is essential for the HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin to promote collateral growth in response to ischemia. *The FASEB Journal.* 2001;15(13):2530-32.

68. Elavarasu S, Suthanthiran TK, & Naveen D. Statins: A new era in local drug delivery. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012;4(Suppl 2):248-51.

69. Bradley JD, Cleverly DG, Burns AM, Helm NB, Schmid MJ, Marx DB, Reinhardt RA. Cyclooxygenase- 2 inhibitor reduces simvastatin- induced bone morphogenetic protein- 2 and bone formation in vivo. *J Periodontol Research.* 2007;42(3):267-73.

70. Zhang Y, Zhang R, Li Y, He G, Zhang D, Zhang F. Simvastatin augments the efficacy of therapeutic angiogenesis induced by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of hindlimb ischemia. *Mol Biol Rep.* 2012;39(1):285-93.

71. Izumo N, Fujita T, Nakamuta H, & Koida, M. Lipophilic statins can be osteogenic by promoting osteoblastic calcification in a Cbfa1-and BMP-2-independent manner. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2001;23(7):389-94.

72. Chuengsamarn S, Rattanamongkoulgul S, Suwanwalaikorn S, Wattanasirichaigoon S, Kaufman L. Effects of statins vs. non-statin lipid-lowering therapy on bone formation and bone mineral density biomarkers in patients with hyperlipidemia. *Bone*. 2010;46(4):1011-5.
73. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*. 1999;286:1946-49.
74. Endo A, Kuroda M, Tanzawa K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B, fungal metabolites having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett*. 1976;72:323-6.
75. Alberts AW, Chen J, Kuron G, Hunt V, Huff J, Hoffman C, Springer J. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1980;77(7):3957-61.
76. Hoffman WF, Alberts AW, Anderson PS, Chen JS, Smith RL, Willard AK. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1986;29(5):849-52.
77. Kiliç E, Ozeç I, Yeler H, Korkmaz A, Ayas B, Gümüş C. Effects of simvastatin on mandibular distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66(11):2233-8.
78. Maron D, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation* 2000; 101:207-13.
79. Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology*. 2003;144(2):681-92.

80. Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, ... & Reszka AA. Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. *PNAS*. 1999;96(1):133-38.
81. Russell RGG, Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, Fleisch, HA. The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. *J Bone Miner Res*. 1999;14(S2):53-65.
82. Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annual review of biochemistry*. 1996;65(1):241-69.
83. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res*. 1998;13(4):581-9.
84. van Beek E, Pieterman E, Cohen L, Löwik C, & Papapoulos S. Farnesyl pyrophosphate synthase is the molecular target of nitrogen-containing bisphosphonates. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;264(1):108-11.
85. McClung MR, Geusens P, Miller PD, Zippel H, Bensen WG, Roux C, ... & Reginster JY. Effect of risedronate on the risk of hip fracture in elderly women. *N Engl J Med*. 2001;344(5):333-40.
86. Cummings SR, Black DM, Thompson DE, Applegate WB, Barrett-Conner E, Musliner TA, Palermo L, Prineas R, Rubin SM, Scott JC, Vogt T, Wallace R, Yates AJ, LaCroix AZ, for the Fracture Intervention Trial Research Group. Effects of alendronate on risk of fracture in women with low bone density but without vertebral fractures: Results from the Fracture Intervention Trial. *JAMA*. 1998;280:2077-82.

87. Glew RH. Metabolismo de lipídeos II: vias do metabolismo de lipídeos especiais. In: Devlin TM, coordenador. Manual de bioquímica com correlações clínicas. 4° ed. São Paulo: Edgard Blücher; 1998: 328-67.
88. Voet D, Voet JG, Pratt CW. Metabolismo dos lipídeos. In: Voet D, Voet JG, Pratt CW. Fundamentos da bioquímica. Porto Alegre: Artmed; 2000: 563-610.
89. Garrett IR, & Mundy GR. The role of statins as potential targets for bone formation. *Arthritis research*. 2002;4(4):237-40.
90. Garrett IR, Gutierrez GE, Rossini G, Nyman J, McCluskey B, Flores A. and Mundy GR. Locally delivered lovastatin nanoparticles enhance fracture healing in rats. *J. Orthop. Res*. 2007;25:1351–57.
91. Patil S, Holt G, Raby N, McLellan AR, Smith K, O’Kane S, Beastall G, Crossan JF. Prospective, double blind, randomized, controlled trial of simvastatin in human fracture healing. *J Orthop Res*. 2009 Mar;27(3):281-5.
92. Park JB. The use of simvastatin in bone regeneration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009;1;14(9):485-8.
93. Stechow DV, Fisch S, Yahalom D, Bab I, Chorev M, Müller R, Alexander JM. Does simvastatin stimulate bone formation *in vivo*? *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2003;4:8.
94. Landim KT, Junqueira JC, da Rocha RF. Influência da simvastatina na reparação óssea de mandíbulas de ratas. *Brazilian Dental Science*. 2010;5(1).
95. Marcondes MS, da Cunha Gomes F, Anbinder AL.. Influência do tratamento com simvastatina na periodontite induzida em ratos. *Rev. bras. Odontol*. 2008;65(1):122-25.

96. Chissas D, Stamatopoulos G, Verettas D, Kazakos K, Papalois A, Agrogiannis G, Papaeliou A, Agapitos E, Balanika A, Papadopoulou E, Anastopoulos G, Ntagiopoulos PG, Asimakopoulos A. Can low doses of simvastatin enhance fracture healing? An experimental study in rabbits. *Injury*. 2010;41(7):687-92.
97. Ayukawa Y, Ogino Y, Moriyama Y, Atsuta I, Jinno Y, Kihara M, Tsukiyama Y, Koyano K. Simvastatin enhances bone formation around titanium implants in rat tibiae. *J Oral Rehabil*. 2010;37(2):123-30.
98. Nyan M, Miyahara T, Noritake K, Hao J, Rodriguez R, Kuroda S, Kasugai S. Molecular and tissue responses in the healing of rat calvarial defects after local application of simvastatin combined with alpha tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;93(1):65-73.
99. Tanigo T, Takaoka R, Tabata Y. Sustained release of water-insoluble simvastatin from biodegradable hydrogel augments bone regeneration. *J Control Release*. 2010;19;143(2):201-6.
100. Montazerolghaem M, Engqvist H, Ott MK. Sustained release of simvastatin from premixed injectable calcium phosphate cement. *J Biomed Mater Res A*. 2013 (Epub ahead of print].
101. Lima CEVC. Influência da associação entre simvastatina e matriz óssea bovina desmineralizada na reparação óssea em ratos. *Braz. Res orais*. 2011;25(1).
102. Mukozawa A, Ueki K, Marukawa K, Okabe K, Moroi A, Nakagawa K. Bone healing of critical-sized nasal defects in rabbits by statins in two different carriers. *Clin Oral Implants Res*. 2011;22(11):1327-35.
103. Rojbani H, Nyan M, Ohya K, Kasugai S. Evaluation of the osteoconductivity of  $\alpha$ -tricalcium phosphate,  $\beta$ -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or



without simvastatin in rat calvarial defect. *J Biomed Mater Res A*. 2011;15;98(4):488-98.

104. Nyan M, Sato D, Oda M, Machida T, Kobayashi H, Nakamura T, Kasugai S. Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical-sized rat calvarial defect. *J Pharmacol Sci*. 2007;104:384-86.

105. Moda M, Santos CC, Leonato DD, Esposito AR, Mas BA, Cattani SMM, Martins, KF, Barbo MLP, Duek EAR. Estudo da influência da simvastatina encapsulada em microesferas de PLDLA na neoformação óssea. Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais. Brasil., 22-25 de agosto de 2012, Natal.

106. Pişkin E, Işoğlu IA, Bölgen N, Vargel I, Griffiths S, Cavuşoğlu T, Korkusuz P, Güzel E, Cartmell S. In vivo performance of simvastatin-loaded electrospun spiral-wound polycaprolactone scaffolds in reconstruction of cranial bone defects in the rat model. *J Biomed Mater Res A*. 2009; 15;90(4):1137-51.

107. Zhou Y, Ni Y, Liu Y, Zeng B, Xu Y, Ge W. The role of simvastatin in the osteogenesis of injectable tissue-engineered bone based on human adipose-derived stromal cells and platelet-rich plasma. *Biomaterials*. 2010;31(20):5325-35.

108. Seto H, Ohba H, Tokunaga K, Hama H, Horibe M, Nagata T. Topical administration of simvastatin recovers alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res*. 2008;43(3):261-7.

109. Wong RWK, & Rabie ABM. Statin collagen grafts used to repair defects in the parietal bone of rabbits. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2003;41(4):244-48.

110. Hwang R, Lee EJ, Kim MH, Li SZ, Jin YJ, Rhee Y, ... & Lim SK. Calcyclin, a Ca<sup>2+</sup> ion-binding protein, contributes to the anabolic effects of simvastatin on bone. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(20):21239-47.

111. Nagahara K, Isogai M, Shibata K, & Meenaghan MA. Osteogenesis of hydroxyapatite and tricalcium phosphate used as a bone substitute. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 1992;7(1):72.
112. Accorsi-Mendonça T, Zambuzzi WF, Bramante CM, Cestari TM, Taga R, Sader M, Soares GDA, Granjeiro JM. Biological monitoring of a xenomaterial for grafting: an evaluation in critical-size calvarial defects. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2011;22(4):997-1004.
113. Zambuzzi WF, Fernandes GVO, Iano FG, Fernandes MS, Granjeiro JM, Oliveira RC. Exploring anorganic bovine bone granules as osteoblast carriers for bone bioengineering: a study in rat critical-size calvarial defects. *Braz. Dent. J.* [serial on the Internet]. 2012;[cited 2013 Nov 17]; 23( 4 ): 315-21.
114. Anbinder AL, Quirino MRS, Rocha RF. As estatinas e o tecido ósseo: revisão de literatura. *Revista de Odontologia da UNESP*. 2006;35(4):239-46.
115. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Techniques* 1959. London: Methuen & Co. 238 pp. (Reprinted as a Special Edition in 1992 by the Universities Federation for Animal Welfare.)
116. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983;16:109-10
117. Institut Straumann AG, Basel, Switzerland. <<http://www.straumann.com/en/home/about-straumann/products-services-and-solutions/product-portfolio/regenerative-solutions.html>> Acessado em 25/11/2013.
118. Zimmer Dental Inc: Returns Department 1900 Aston Avenue Carlsbad, CA 92008 <[http://www.dentalglam.com/public/files/zimmer\\_Regenerative\\_Products.pdf](http://www.dentalglam.com/public/files/zimmer_Regenerative_Products.pdf)> Acessado em 24/11/2013.

119. Milanetti MR, Alves JM, Silva AH, Introini SO. Avaliação do reparo ósseo por microtomografia por raio-x. *Rev Med (São Paulo)*. 2011;90(2):89-93.
120. Roshan-Ghias A, Terrier A, Bourban PE, & Pioletti DP. (2010). In vivo cyclic loading as a potent stimulatory signal for bone formation inside tissue engineering scaffold. *Eur Cell Mater*. 2010; 19(1):41-49.
121. Kolambkar YM, Dupont KM, Boerckel JD, Huebsch N, Mooney DJ, Hutmacher DW, Guldberg RE. (2011). An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects. *Biomaterials*. 2011;32(1):65-74.
122. Stephan SJ, Sunil ST, Gross B, Petrien-Aronin CE, Botchway EA, Nair LS, Ogle RC, Park SS. Injectable tissue-engineered bone repair of a rat calvarial defect. *Laryngoscope*. 2010;120(5):895-901.
123. Melo LGN, Nagata MJH, Bosco AF, Ribeiro LLG, Leite CM. Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials. A histological and histometric study in rat tibias. *Clin. Oral Impl. Res*. 2005;16:683–91.
124. Garcia VG, Conceição JM, Fernandes LA, Almeida JM, Nagata MJH, Bosco AF, Theodoro LH. Effects of LLLT in combination with bisphosphonate on bone healing in critical size defects: a histological and histometric study in rat calvaria. *Lasers Med Sci*. 2013;28:407-14.
125. Daculsi G, LeGeros RZ, Nery E, Lynch K, Kerebel B. Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics in vivo: ultrastructural and physicochemical characterization. *J Biomed Mater Res*. 1989;(23):883–94.
126. Daculsi G, Weiss P, Bouler JM, Gauthier O, Millot F, Aguado E. Biphasic calcium phosphate/hydrosoluble polymer composites: a new concept for bone and

dental substitution biomaterials. *Bone*. 1999;(25)2:59–61.

127. Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2008;(19):796–803.

128. Froum SJ, Wallace SS, Cho S, Elian N, Tarnow DP. Histomorphometric comparison of a biphasic bone ceramic to anorganic bovine bone for sinus augmentation: 6- to 8-month postsurgical assessment of vital bone formation. A pilot study. *Int. J. Periodontics Restorative Dent*. 2008;28(3):273-81.

129. Minabe M, Kodama T, Hori T, & Watanabe Y. Effects of atelocollagen on the wound healing reaction following palatal gingivectomy in rats. *Journal of periodontal research*. 1989;24(3):178-85.

130. al-Khateeb TL, Marouf HA, Anwar MM. Modified bovine type I collagen membrane as a wound graft material in oral surgery (an experimental study). *J Ir Dent Assoc*. 1996;42(3):46-50.

131. Roussille G, Barthet B, Serrano P. The use of a resorbable biological matrix in periodontal surgery: clinical observations of 230 cases. *Revue d'odontostomatologie*. 1990;20(2):129-38.

132. Witherspoon DE, & Gutmann JL. (1996). *Haemostasis in periradicular surgery. International endodontic journal*. 1996;29(3):135-49.

133. Shanmugam M, Kumar TSS, Arun KV, Arun RS, Karthik J. Clinical and histological evaluation of two dressing materials in the healing of palatal wounds. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2010;14(4).

134. Shinji K, Kazuhisa B, Kazuma F, Yasunori O, Jun'Ya S, Kenji K, Tadahiko I.

Experimental study of bone inducing ability of recombinant human bone morphogenetic protein-2 with atelo-collagen sponge (Teruplug) as a carrier- Comparison with atelo-peptide collagen (Cellmatrix LA) as a carrier. *Japanese J Oral Maxillofac Surg.* 2003;49(4):241-45.

135. Kim JH, Kim CH, Kim KW. Bone Healing capacity of the collagen bone filler (TERUPLUG(R)) and rhBMP-2 in the rabbit cranium defect. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2008;34(2):113-20.

136. Marukawa K, Ueki K, Okabe K, Nakagaw K, Yamamoto E. Use of self-setting alpha-tricalcium phosphate for maxillary sinus augmentation in rabbit. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(6):606-12.

137. Ahn JJ, Cho SA, Byrne G, Kim JH, Shin HI. New bone formation following sinus membrane elevation without bone grafting: histologic findings in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011;26(1):83-90.

138. Yoshimine Y, Akamine A, Mukai M, Maeda K, Matsukura M, Kimura Y, Makishima T. Biocompatibility of tetracalcium phosphate cement when used as a bone substitute. *Biomaterials.* 1993;14:403-6.

139. Alcaide M, Serrano MC, Pagani R, Sanchez-Salcedo S, Vallet-Regi M, Portoles MT. Biocompatibility markers for the study of interactions between osteoblasts and composite biomaterials. *Biomaterials.* 2009;30:45-51.

140. Yan WZ, Zhou DL, Yin SY, Yin GF., Gao LD. & Zhang Y. Osteogenesis capacity of a novel BMP/  $\alpha$ -TCP bioactive composite bone cement. *Journal of Wuhan University of Technology – Materials Science.* 2004;19:30-4.

141. Ginebra MP, Traykova T & Planell JA. (2006) Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review. *Journal of Controlled Release.* 2006;113:102-10.

142. Saito A, Suzuk Y, Kitamura M, Ogata S, Yoshihara Y, Masuda S, Ohtsuki C & Tanihara M. Repair of 20-mm long rabbit radial bone defects using BMP-derived peptide combined with an  $\alpha$ -tricalcium phosphate scaffold. *J. Biomed. Mater. Res.* 2006;77(A):700-6.

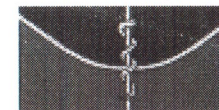
## **ANEXOS**

---

Anexo A: Declaração de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FM. UnBDoc 44299/2012.

Anexo B: Declaração Universal dos Direitos dos Animais, proclamada pela UNESCO em sessão realizada em Bruxelas, em 27 de janeiro de 1978.

Anexo C: Article Submission Dircilei Nascimento de Sousa, de 23/10/2013.

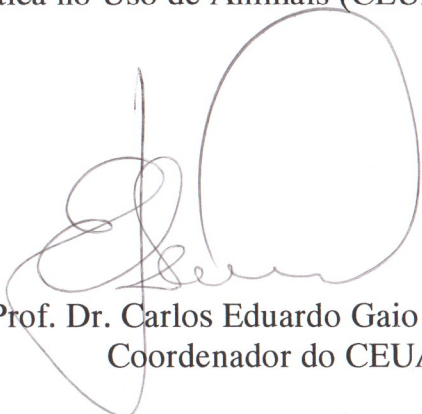


---

Brasília, 25 de abril de 2012

## **DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto intitulado “Estudo do efeito local da sinvastatina na regeneração óssea em defeitos pré-estabelecidos na calvária de ratos”, UnBDoc 44299/2012, sob responsabilidade da Dircilei Nascimento de Sousa, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.



**Prof. Dr. Carlos Eduardo Gaio V. dos Santos**  
**Coordenador do CEUA-FM**



# **DECLARAÇÃO UNIVERSAL DOS** **DIREITOS DOS ANIMAIS**

## **PREÂMBULO**

- Considerando que todo o animal possui direitos,
- Considerando que o desconhecimento e o desprezo destes direitos têm levado e continuam a levar o homem a cometer crimes contra os animais e contra a natureza,
- Considerando que o reconhecimento pela espécie humana do direito à existência das outras espécies animais constitui o fundamento da coexistência das outras espécies no mundo,
- Considerando que os genocídios são perpetrados pelo homem e há o perigo de continuar a perpetrar outros.
- Considerando que o respeito dos homens pelos animais está ligado ao respeito dos homens pelo seu semelhante,
- Considerando que a educação deve ensinar desde a infância a observar, a compreender, a respeitar e a amar os animais.

## **PROCLAMA-SE O SEGUINTE:**

Art. 1º - Todos os animais nascem iguais perante a vida e têm os mesmos direitos à existência.

Art. 2º

1. Todo o animal tem o direito a ser respeitado.
2. O homem, como espécie animal, não pode exterminar os outros animais ou explorá-los violando esse direito; tem o dever de pôr os seus conhecimentos ao serviço dos animais.
3. Todo o animal tem o direito à atenção, aos cuidados e à proteção do homem.

Art. 3º

1. Nenhum animal será submetido nem a maus tratos nem a atos cruéis.
2. Se for necessário matar um animal, ele deve de ser morto instantaneamente, sem dor e de modo a não provocar-lhe angústia.

Art. 4º

1. Todo o animal pertencente a uma espécie selvagem tem o direito de viver livre no seu próprio ambiente natural, terrestre, aéreo ou aquático e tem o direito de se reproduzir.
2. toda a privação de liberdade, mesmo que tenha fins educativos, é contrária a este direito.

Art. 5º

1. Todo o animal pertencente a uma espécie que viva tradicionalmente no meio ambiente do homem tem o direito de viver e de crescer ao ritmo e nas condições de vida e de liberdade que são próprias da sua espécie.
2. Toda a modificação deste ritmo ou destas condições que forem impostas pelo homem com fins mercantis é contrária a este direito.

Art. 6º

1. Todo o animal que o homem escolheu para seu companheiro tem direito a uma duração de vida conforme a sua longevidade natural.
2. O abandono de um animal é um ato cruel e degradante.

Art. 7º

Todo o animal de trabalho tem direito a uma limitação razoável de duração e de intensidade de trabalho, a uma alimentação reparadora e ao repouso.

Art. 8º

1. A experimentação animal que implique sofrimento físico ou psicológico é incompatível com os direitos do animal, quer se trate de uma experiência médica, científica, comercial ou qualquer que seja a forma de experimentação.
2. As técnicas de substituição devem de ser utilizadas e desenvolvidas.

Art. 9º

Quando o animal é criado para alimentação, ele deve de ser alimentado, alojado, transportado e morto sem que disso resulte para ele nem ansiedade nem dor.

Art. 10º

1. Nenhum animal deve de ser explorado para divertimento do homem.
2. As exibições de animais e os espetáculos que utilizem animais são incompatíveis com a dignidade do animal.

Art. 11º

Todo o ato que implique a morte de um animal sem necessidade é um biocídio,

isto é um crime contra a vida.

Art. 12º

1. Todo o ato que implique a morte de um grande número de animais selvagens é um genocídio, isto é, um crime contra a espécie.
2. A poluição e a destruição do ambiente natural conduzem ao genocídio.

Art. 13º

1. O animal morto deve de ser tratado com respeito.
2. As cenas de violência de que os animais são vítimas devem de ser interditas no cinema e na televisão, salvo se elas tiverem por fim demonstrar um atentado aos direitos do animal.

Art. 14º

1. Os organismos de proteção e de salvaguarda dos animais devem estar apresentados a nível governamental.
2. Os direitos do animal devem ser defendidos pela lei como os direitos do homem.

(\* ) A Declaração Universal dos Direitos dos Animais foi proclamada pela UNESCO em sessão realizada em Bruxelas - Bélgica, em 27 de Janeiro de 1978

## Article submission - Dircilei Nascimento de Sousa

---

De: **Dircilei Nascimento de Sousa** (dircileinascimento@hotmail.com)

Enviada: quarta-feira, 23 de outubro de 2013 00:57:30

Para: sgolden@terra.com.br (sgolden@terra.com.br)

Cco: Vania Ferreira (vmmf@unb.br); Juliano Couto Gondim Naves (julianocouto@hotmail.com)

2 anexos

Sousa et al - Cover letter ACB.doc (30,0 KB) , Sousa et al. - manuscript ACB.doc (448,5 KB)

Brasília, DF, Brazil, October 22<sup>nd</sup>, 2013

Saul Goldenberg

Editor-in-Chief, Acta Cirúrgica Brasileira

Dear Dr. Goldenberg,

We are submitting the article entitled “**Behavioural and cognitive effects of simvastatin dose used in stimulation of bone regeneration: an experimental study**” to be considered for publication in Acta Cirúrgica Brasileira as an original research article. We would like to inform you that:

- ) all co-authors have read, approve of, and concur with the submitted manuscript;
- ) all authors have made substantial contributions that meet the stated requirements for authorship;
- ) all relevant ethical safeguards have been met in relation to animal experiments.
- ) none of the original material contained in the manuscript has been previously published elsewhere;

Sincerely yours,

Dircilei Nascimento de Sousa, MSc

Universidade de Brasília (UnB)

Faculdade de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Campus Universitário Darcy Ribeiro (Asa Norte)

27/12/13

Mensagem de Impressão do Outlook

70910-900 Brasília-DF-Brazil

e-mail: [dircileinascimento@hotmail.com](mailto:dircileinascimento@hotmail.com)

Phone: +55 61 9984-0106