

WASHINGTON MACEDO DE SANTANA

**Avaliação do efeito local da Sinvastatina associado ao
Fosfato de Cálcio Bifásico na regeneração de defeitos ósseos
pré-estabelecidos na calvária de ratos**

Brasília-DF

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

Aluno: Washington Macedo de Santana

Avaliação do efeito local da sinvastatina associado a
Fosfato de Cálcio Bifásico na regeneração de defeitos ósseos na calvária de
ratos.

Tese apresentada como requisito para a obtenção
do Título de Doutor 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

2016

Aluno: Washington Macedo de Santana

Avaliação do efeito local da sinvastatina associado a Fosfato de Cálcio Bifásico na regeneração de defeitos ósseos na calvária de ratos.

Tese apresentada como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Wagner Rodrigues Duarte

Banca examinadora:

Prof. Dr. Wagner Rodrigues Duarte
Universidade de Brasília / Fac. Ciências da Saúde - FS

Profa. Dra. Maria do Carmo Machado Guimarães
Universidade de Brasília / Fac. Ciências da Saúde - FS

Prof. Dr. Fernando Mendes de Almeida
Universidade Federal de Goiás / Inst. Ciências Biológicas - ICB

Prof. Dr. Alessandro Lourenço Januário
Instituto Ária Pós-graduação Odontologia / Brasília - DF

Prof. Dr. George Furtado Guimarães
Centro de Pesquisas Odontológicas São Leopoldo Mandic / Brasília - DF

À Deus, e vocês família querida.

Patrícia, minha esposa.

Nanda e Lucas, meus filhos.

Cris, minha irmã.

Santana, meu pai .

Antônia ,minha mãe (*in memorian*)

Vocês estiveram sempre presentes,

especialmente nos momentos de carência

e desânimo. Sem vocês eu certamente não chegaria....

Obrigado por fazerem dos meus sonhos, também os de vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na pessoa do Coordenador Profa. Eliete Neves da Silva Guerra e aos funcionários da Faculdade Ciências da Saúde.

Ao Prof. Dr. Wagner Duarte, meu orientador, pela capacidade de reunir o conhecimento, o caráter, e a comunicação, características que acompanhadas de disposição e bom senso, fazem da sua pessoa merecedor da referência "professor". Foi um privilégio tê-lo como orientador. Obrigado pelo apoio e tempo dedicados ao nosso estudo

À Profa.Dra. Vânia Ferreira, oferecendo conhecimento, tempo e experiência. Sua participação foi de grande importância.

Ao aluno de iniciação científica (PIBIC), Leonardo Nogueira, pelo envolvimento e colaboração ao trabalho

À técnica do Laboratório de Histopatologia da Faculdade de Odontologia da UnB, Maria da Glória, pelo profissionalismo e conhecimento técnico que ofereceu 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 Rivadávio Amorim pelo espaço no laboratório, conhecimento e sugestões oferecidas na qualificação deste estudo.

À Dircilei Sousa pela sua parceria e colaboração.

Aos membros da Banca Examinadora: Maria do Carmo, George, Alessandro e Fernando, pelo aceite e sugestões finais ao estudo

RESUMO

Objetivo: O propósito deste estudo foi observar histologicamente em defeitos criados em calvária de ratos, o potencial da aplicação local da sinvastatina na estimulação da formação óssea e avaliar os efeitos da associação da sinvastatina com dois tipos de carreador: Fosfato de cálcio (BoneCeramic®) ou Esponja de colágeno (CollaTape®) na neoformação óssea.

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(C) – 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 8 semanas os animais foram sacrificados e as regiões dos defeitos submetidas à coloração Hematoxilina/Eosina (HE), seguida de avaliação histomorfométrica. Além disso, no grupo (BCS) foram realizadas análises histoquímica por tricromio de Masson e picrosirius red para caracterizar o tecido neoformado.

Resultados: 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. No grupo tratado com BCS a quantidade de neoformação óssea foi maior do que no grupo tratado com BC, ECS, EC, e C, e essas diferenças foram estatisticamente significativas (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 $0,00 \pm 0,00$) Não houve diferenças na neoformação óssea nos grupos ECS, EC e C. Além disso, a análise histoquímica do grupo (BCS), evidenciou a presença de neoformação óssea com a neoformação de tecido osteóide imaturo pelo tricrômio de Masson, além de colágeno organizado tipo I ao redor das partículas do BoneCeramic.

Conclusão: Os resultados sugerem que a sinvastatina localmente administrada na concentração pré-estabelecida de 0,1mg, quando associada ao Fosfato de Cálcio Bifásico (BoneCeramic®) osteocondutor, resultou em maior neoformação óssea, comparado ao uso do Fosfato de Cálcio (BoneCeramic®) isoladamente, ou a sinvastatina associado à esponja de colágeno. Portanto a combinação de sinvastatina e BoneCeramic® pode ter um grande potencial no tratamento de defeitos ósseos.

Palavras-chave: biomateriais; substitutos ósseos; estatinas; osso; BoneCeramic®; neoformação óssea.

ABSTRACT

OBJECTIVE: The objective of the present study was to examine the potential of locally applied simvastatin on the induction of bone formation and to evaluate the combination of simvastatin with two different carriers: biphasic calcium phosphate (BoneCeramic®) or collagen sponge on stimulation of bone formation.

Methods: Thirty defects of 5mm in diameter were created bilaterally with a trephine bur in the calvariae of fifteen Wistar rats. The defects were divided into 5 groups: group 1 - control, no treatment; group 2 (BC) treated with 14mg of BoneCeramic®; group 3 (BCS) treated with 14mg of BoneCeramic® + 0.1mg simvastatin in alcoholic solution; group 4 (EC) treated with a collagen sponge (CollaTape®); and group 5 (ECS) treated with a collagen sponge + 0.1mg simvastatin in alcoholic solution. After eight weeks the animals were euthanized and their calvariae were histologically processed. Hematoxylin and eosin-stained sections were subjected to histological and histomorphometrical analyses. The area of newly formed bone was calculated and compared between groups. Furthermore, the newly formed tissue in group BCS was histochemically analyzed by Masson and picrosirius red stainings to better characterize this tissue.

Results: The histological findings showed that the local application of simvastatin induced bone neof ormation. The greater amount of a bone-like tissue was formed around the carrier in group 3 (BCS) followed by group 2 (BC). In group BCS, the amount of newly formed bone was greater than groups BC, ECS, EC, and C and these differences were statistically significant (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 $0,00 \pm 0,00$). There was no difference among groups ECS, EC and C. The histochemical analyses of the newly formed tissue from group BCS showed the presence of an osteoid tissue, as shown by the Masson's trichrome staining. Besides, the presence of organized type I collagen was evidenced around the BoneCeramic particles.

Conclusions: The results suggest that locally applied simvastatin at a concentration of 0,1mg combined with BoneCeramic® induced significantly greater amounts of newly formed bone as compared with BoneCeramic® alone or simvastatin combined with collagen sponge. Therefore, the combination of simvastatin and BoneCeramic® and has great potential for the healing of bone defects.

Keywords: biomaterials; bone substitutes; statins bone; BoneCeramic®; bone neof ormation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema da ação do bifosfonato sobre a síntese do colesterol Pág. 22
- Figura 2: Balança de semi-precisão e pesagem de 14mg de BoneCeramic®. Pág. 51
- Figura 3: Solução com 0,1mg de sinvastatina em 15ml de etanol. Pág. 51
- Figura 4: Esquema do desenho experimental nos animais. Pág. 54
- Figura 5: Rato sob anestesia preparada para o procedimento cirúrgico na calvária. Pág. 54
- Figura 6: Acesso cirúrgico na calvária de uma rato. Pág. 55
- Figura 7: Broca Trefina® produzindo um defeito na calvária de um rato. Pág. 55
- Figura 8: Osteotomia circunferencial de 5mm para a retirada da porção cortical externa da calvária. Pág. 55
- Figura 9: Defeito ósseo recebendo BoneCeramic® puro. Pág. 56
- Figura 10: Defeito contra-lateral recebendo BoneCeramic® umedecido com sinvastatina. Pág. 56
- Figura 11: Exposição e retirada dos tecidos moles para preparo da amostra e Descalcificação Pág. 57
- Figura 12: 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. 60
- Figura 13: 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. 60
- Figura 14: 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. 61

- Figura 15: 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. 61
- Figura 16: 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. 62
- Figura 17: Gráfico ilustrativo do resultado da avaliação de poder para o ANOVA post-hoc test em relação ao número de amostras por grupo Pág. 63
- Figura 18: Gráfico da distribuição do percentual da área de neoformação óssea. Pág. 65
- Figura 19: Gráfico da distribuição do percentual da área ocupada por partículas remanescentes de BC Pág. 66
- Figura 20: Imagens representativas dos 5 grupos e possibilita uma visão de toda a extensão do defeito Pág. 67
- Figura 21: A presença de tecido conjuntivo no defeito sem tratamento, preenchido somente por coágulo. Pág. 68
- Figura 22: Aumento (200x) do corte histológico do grupo 2 (BC). Pág. 69
- Figura 23: Aumento (200x) do corte histológico do grupo 3 (BCS). Pág. 70
- Figura 24: Aumento (200x) do corte histológico do grupo 4 (EC). Pág. 71
- Figura 25: Aumento (200x) do corte histológico do grupo 5 (ECS). Pág. 72
- Figura 26: Aumento (20x) Corte histológico do grupo 3 (BCS) coradas em HE, Tricrômico de Massom, e Picrosirius Red Pág. 73
- Figura 27: Aumento (40x) Aumento (20x) Corte histológico do grupo 3 (BCS) coradas em HE, Tricrômico de Massom, e Picrosirius Red Pág. 74
- Figura 28: Aumento (200x) Aumento (20x) Corte histológico do grupo 3 (BCS) coradas em HE, Tricrômico de Massom, e Picrosirius Red Pág. 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estudos que identificaram os efeitos favoráveis, no tecido ósseo, com a utilização sistêmica da sinvastatina por via oral.	Pág. 26
Tabela 2: Estudos que não identificaram os efeitos favoráveis, no tecido ósseo, com a utilização sistêmica da sinvastatina por via oral.	Pág. 27
Tabela 3: Estudos sobre os carreadores para a sinvastatina (SVT)	Pág. 31
Tabela 4: Estudos sobre as doses de sinvastatina para administração local	Pág. 41
Tabela 5: Resultados histométricos da comparação da neoformação óssea entre todos os grupos	Pág. 64
Tabela 6: Resultados histológicos da área ocupada por partículas remanescentes de BC nos defeitos ósseos dos grupos 2 e 3 após 60 dias da cirurgia.	Pág. 65

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
FGF²: 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

MC₃T₃-E₁: 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: fator de crescimento vascular endotelial
VLDL: lipoproteínas de muita baixa densidade
VO: volume ósseo
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: Artigo publicado - Simvastatin and biphasic calcium phosphate affects bone formation in critical-sized rat calvarial defects. Santana WM, Sousa DN, Ferreira VM, Duarte WR. *Acta Cir Bras* ; 2016 , 31(5):300-317

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 AS ESTATINAS	18
2.2 HISTÓRICO	20
2.3 CLASSIFICAÇÃO DAS ESTATINAS.....	20
2.4 AS ESTATINAS NO CONTROLE DO COLESTEROL	21
2.5 EFEITOS ADVERSOS APÓS ADMINISTRAÇÃO SISTÊMICA	25
2.6 SINVASTATINA USO SISTÊMICO EM ANIMAIS	25
2.6.1 ESTUDOS COM RESULTADOS FAVORÁVEIS AO USO SISTÊMICO DAS ESTATINAS PARA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA.....	25
2.6.2 ESTUDOS COM RESULTADOS DESFAVORÁVEIS AO USO SISTÊMICO DAS ESTATINAS NA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA.....	27
2.7 CARREADORES PARA A SINVASTATINA.....	30
2.8 VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS CARREADORES PARA O USO DA SINVASTATINA.....	30
2.9 EFEITO DA SINVASTATINA NO METABOLISMO ÓSSEO	40
2.10 DOSE DA SINVASTATINA PARA ADMINISTRAÇÃO LOCAL	41
2.11 A NECESSIDADE DE DESENVOLVIMENTO DE NOVOS MATERIAIS PARA A NEOFORMAÇÃO ÓSSEA	46
3. JUSTIFICATIVA	47
4 OBJETIVOS GERAIS.....	48
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
5 METODOLOGIA	48
5.1 O USO DA SINVASTATINA EM EXPERIMENTO COM ANIMAIS	48
5.2 FOSFATO DE CÁLCIO BIFÁSICO, BONECERAMIC®.....	49
5.3 ESPONJA DE COLÁGENO POROSA, COLLATAPE®.....	50
5.4 PREPARO DA SINVASTATINA E BONECERAMIC®.....	50
5.5 ANESTESIA E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	51
5.6 GRUPO 1: GRUPO CONTROLE COÁGULO (C)	52
5.7 GRUPO 2: GRUPO DO BONECERAMIC® (BC)	52
5.8 GRUPO 3: GRUPO DO BONECERAMIC® MAIS SINVASTATINA (BCS)	52
5.9 GRUPO 4: GRUPO DA COLLATAPE® (EC)	52
5.10 GRUPO 5: GRUPO DA SINVASTATINA COMBINADA COM COLLATAPE® (ECS)	58
5.11 EUTANÁSIA	56
5.12 PREPARO HISTOLÓGICO.....	57
5.13 ANÁLISE HISTOLÓGICA	58
5.13.1 ANÁLISE DESCRITIVA	58
5.13.2 ANÁLISE HISTOMÉTRICA	59
5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA HISTOLOGIA.....	62
6. RESULTADOS	63
6.1 RESULTADOS ESTATÍSTICOS DA HISTOMETRIA.....	63
6.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA.....	67

6.2.1 GRUPO 1 - COÁGULO	68
6.2.2 GRUPO 2 - BONECERAMIC® SEM SINVASTATINA (BC).	68
6.2.3 GRUPO 3 - BONECERAMIC® COM SINVASTATINA (BCS).....	69
6.2.4GRUPO 4 – ESPONJA DE COLÁGENO (EC)	71
6.2.5 GRUPO 5 - ESPONJA DE COLÁGENO COM SINVASTATINA (ECS).	72
7 ANÁLISE MORFOLÓGICA (TRICRÔMICO DE MASSON / PICROSIRIUS RED).....	73
8 DISCUSSÃO	76
9 CONCLUSÃO	89
10 REFERÊNCIAS	90
ANEXOS.....	109

1 INTRODUÇÃO

A perda de volume do rebordo alveolar após exodontias é um processo conhecido pela odontologia há vários anos (1,2). Durante o reparo alveolar pós extração, a lâmina dura de osso cortical que reveste a parte interna do alvéolo gradativamente desaparece, enquanto o espaço alveolar é preenchido por tecido de granulação, o qual gradativamente vai sendo substituído por osso inicialmente imaturo, e em seguida por osso trabecular. Porém, todo esse mecanismo de reparo alveolar tem como consequência perda variável no volume, especialmente vestibular, e que em geral leva a modificações importantes na morfologia do rebordo impactando negativamente a estética e o conforto de reabilitações odontológicas (3,4,5,6,7).

Com a finalidade de tratar estas seqüelas, diferentes modalidades de tratamento, incluindo enxertos ósseos, regeneração tecidual óssea guiada e fatores de crescimento, têm sido testadas há vários anos para 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 (8,9,10,11,12).

Devido às características biológicas, o padrão ouro para enxerto ósseo descrito na literatura tem sido o enxerto autógeno, ou seja, o enxerto ósseo obtido do próprio paciente proveniente de diferentes regiões denominadas doadoras, intra ou extra-orais: ramo da mandíbula, mento, calota craniana, tíbia, entre outras (13). 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 (11,14).

O interesse por um substituto ósseo que possibilite otimizar reconstruções ósseas e oferecer quantidade ilimitada, possibilitaria menor dependência de volume ósseo removido da área doadora e, principalmente,

menor morbidade cirúrgica (15). Um material que elimine a necessidade de abordagem de áreas doadoras ofereceria mudanças na perspectiva e futuro dos tratamentos que necessitam de enxertos ósseos (17).

Com este objetivo, inúmeros materiais têm sido desenvolvidos ao longo dos anos, incluindo enxertos homogêneos, xenogêneos, 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 os osteocondutores (geralmente inorgânicos), permitem a aposição de um novo tecido ósseo na sua superfície, requerendo a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras (17,18,19). 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 às do hospedeiro (15, 20,21).

A utilização de produtos farmacológicos que promovem a síntese de fatores de crescimento para reconstrução de tecido ósseo é uma técnica promissora no tratamento de defeitos deste tecido (22). Há estudos na literatura sobre medicamentos que apresentam ação no tecido ósseo, tais como a calcitonina (23), os bifosfonatos (24) e as estatinas (22), sendo estas últimas amplamente utilizadas para reduzir o nível de colesterol no sangue.

Muitos estudos relatam que estes compostos 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 (25,26,27,28).

No caso das estatinas, têm sido demonstrado seus efeitos no reparo tecidual 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- β 1) (28,29,30,31,32,33).

Estudos têm investigado os efeitos da administração sistêmica e aplicação local desta droga sobre o reparo ósseo.(31,32). Alguns efeitos adversos da sinvastatina podem surgir quando altas doses desse medicamento são aplicadas sistemicamente, aumentando o risco de danos ao fígado, doenças renais e alterações nos tecidos musculares, enquanto baixas doses podem ser ineficientes para o reparo ósseo (11, 34).

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 (35, 36). Há evidências que as estatinas têm um efeito favorável à angiogênese quando utilizadas em baixas doses e um efeito contrário quando usadas em altas doses (29). Em contrapartida, 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 poderem estar associadas à toxicidade (37,38,39).

Segundo Nyan et al (2009), 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 α -tricálcio fosfato(α -TCP) (11) .

2 REVISÃO DE LITERATURA

O tecido ósseo quando lesado por trauma ou por procedimentos cirúrgicos passa por uma fase inflamatória inicial, seguida de reparo e, por fim, remodelação. O reparo ósseo é um processo complexo com eventos celulares e extracelulares, sendo influenciado por uma variedade de fatores incluindo o tipo de osso (cortical ou trabecular), modalidade do trauma e idade sendo o reparo bem sucedido aquele com reconstituição de continuidade tecidual, com baixa perda tecidual. O estudo sobre as estatinas tem despertado interesse de várias áreas da medicina como: a ortopedia, cardiologia, endocrinologia (30,40,41,42,43,44,45,46) e também algumas especialidades odontológicas como a cirurgia bucomaxilofacial, a ortodontia, a periodontia, e a implantodontia (13,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57) em razão do seu potencial efeito positivo sobre o reparo ósseo, 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 (31,58,59,60). 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 no reparo de lesões traumáticas cerebrais, lesões da medula espinhal cervical e ação no tecido ósseo (30,33,35,36,38,56,57,61,62,64,65).

Essas drogas têm sido muito bem documentadas clinicamente por seus benefícios na redução de incidência de infarto do miocárdio, mortes provenientes de cardiopatias e efeitos benéficos cardiovasculares, independente dos seus efeitos na redução do colesterol (61,60,66,67,68). Além dos efeitos antioxidantes, as estatinas têm ação anti-inflamatória e também podem promover o aumento da bioviabilidade do óxido nítrico (63,66,69,70). Alguns estudos adicionam ainda o seu efeito sobre a angiogênese (6,25,71,72).

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 (73,74). 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 (74).

O mecanismo pelo qual as estatinas podem afetar o esqueleto foi descoberto por Mundy et al. (1999) (75) 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 lovastatina, fluvastatina, 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. 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 (31, 32).

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 (76). Em 1980, Alberts et al. (77) 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 (78,79). A sinvastatina resulta da modificação química da lovastatina, na qual há substituição do 2-metil- butiril ligado 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 citocromo P450 dentro do fígado (38,58). A fluvastatina, atorvastatina e cerivastatina são totalmente sintéticas (79,80).

2.3 CLASSIFICAÇÃO DAS ESTATINAS (59,73,74,76,77,78,79,80, 81)

A) Quanto à solubilidade

a.1) Hidrofóbica ou Lipofílica:

- Sinvastatina
- Cerivastatina

a.2) Hidrofílica:

- Pravastatina
- Atorvastatina
- Fluvastatina
- Rovastatina

B) Quanto à origem:

B.1) Natural:

- Mevastatina

- Lovastatina

B.2) Sintética:

- Fluvastatina
- Atorvastatina
- Cerivastatina

B.3) Semi-sintética:

- Sinvastatina
- Pravastatina

2.4 AS ESTATINAS NO CONTROLE DO COLESTEROL

As estatinas são drogas desenvolvidas primariamente para interferirem na síntese do colesterol(82). Russel et al. (1999) (83) descreveram de forma bastante clara como ocorre 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) (84). Os bifosfonatos como o alendronato e risedronato, previnem a formação destes produtos lipídicos quando atuam inibindo a enzima farnesil sintase (85,86). 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 (59).

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

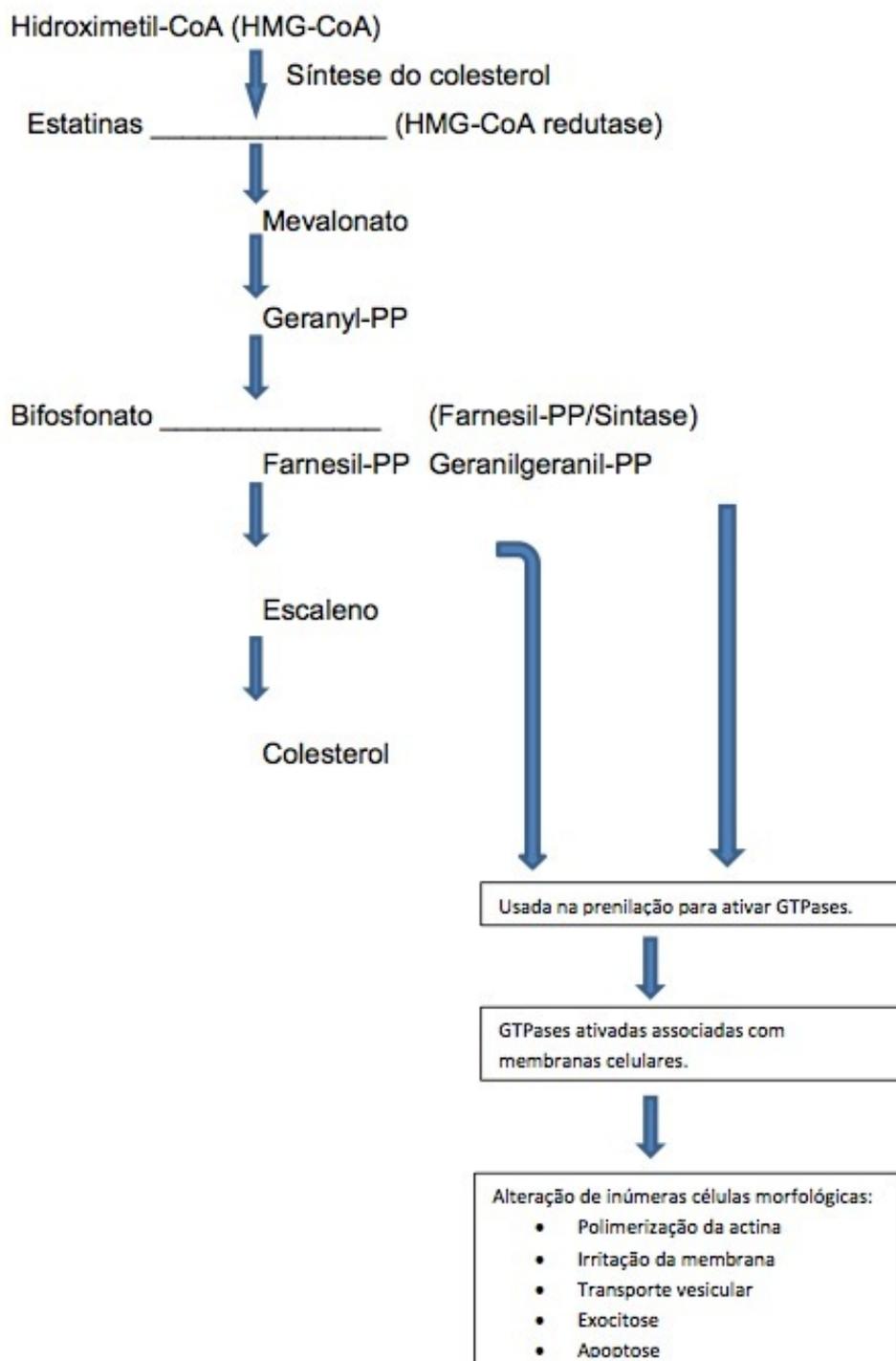


Figura 1: Esquema da ação do bifosfonato sobre a síntese do colesterol. Russel et al. (1999)

Os osteoclastos morrem por apoptose quando expostos às estatinas e aos bifosfonatos. O resultado disto é remodelação e reabsorção óssea reduzidas (87,88).

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 (89). 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 muita baixa densidade (VLDL) o transportam do fígado aos tecidos periféricos, as de alta densidade (HDL) transportam-no de volta ao fígado (90). 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 (89).

Em 2002, Garret; Mundy (91) 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 o 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 publicaram em 2007 Garret et al (92).

Em 2009, Patil et al. (93) 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 (59).

Ma et al., em 2008, (51) 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.

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 (74).

Inúmeros estudos têm demonstrado o potencial das estatinas para aumentar a neoformação óssea (11,28,29,30,31,32,33,74). Por outro lado, 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 (12,34,59,91,93). 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 (94).

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. em 2010 (96), 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 USO SISTÊMICO DA SINVASTATINA 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, conforme já relatado anteriormente.

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 ESTUDO	DE DOSE SINVASTATIN A	DE TEMPO ADMINISTRAÇÃO O	DE RESULTADO	AUTORES
Animal – 20 ratos machos. Dano induzido na coluna vertebral.	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
Animal – 32 ratas. Isquemia unilateral, induzida de membros posteriores.	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
Animal – 32 ratos.	2,5mg/kg/dia (dose alta)	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
Animal – 84 ratas ovariectomizadas	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 tratamento da osteoporose, causada por deficiência do estrógeno.	Xu Li et al. 2011
Animal 26 ratos. Tratamento da tíbia	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 & Cervecan 2010.
Animal 54 ratas ovariectomizadas	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

Animal (54) ratas osteoporóticas. Implantes de titânio na tíbia.	5mg/kg/dia	4 semanas X 11 semanas	A sinvastatina melhorou a osteointegração dos implantes nesses animais com osteoporose.	Du et al. 2009
212 Pacientes humanos. Estudo prospectivo randomizado, controlado com hiperlipidemia.	40mg/dia X 80mg/dia	72 semanas	Houve aumento significativo de formação óssea e reduzida reabsorção, com aumento da densidade osseomineral.	Chuegsama rn et al. 2010

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
Animal – 72 ratas ovariectomizadas	10mg/kg/dia de sinvastatina x 80ug/kg/dia de (paratormônio)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. 2011
Animal – 35 ratas. Reparo dos defeitos obtidos no ângulo da mandíbula.	20mg/kg/dia	2 / 4 e 8 semanas	A sinvastatina não teve efeito no processo de reparação óssea.	Landim et al. 2002.
Animal – 12 ratos. Tratamento de periodontite induzido por ligadura	30mg/kg/dia de sinvastatina X 30mg/kg/dia de água.	4 semanas	Não houve regeneração óssea periodontal com o uso da sinvastatina. Não houve diferença de resultados nos dois grupos avaliados.	Marcondes et al. 2008

Animal – 54 coelhos. Cicatrização de fratura óssea	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
Animal 20 ratos.	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
Animal – 162 ratos. Implantes inseridos para preencher defeitos ósseos, associados com beta TCP na posição coronal dos implantes	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.	Bingkui et al. 2008
6 Pacientes humanos	15mg/kg/dia		Não houve efeito benéfico no metabolismo ósseo de pacientes com mielomas múltiplos.	Sondegaard et al. 2009

Foram comparados os efeitos da sinvastatina (SVT) com o PTH (Hormônio Paratireoide) (1-34) em um modelo estabelecido de ratas ovariectomizadas (OVX), e constatou-se que o PTH foi eficiente em estimular a formação óssea, o que não ocorreu com o uso das sinvastatinas (95). Da mesma forma, Landim et al, em 2010 (96) 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 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. 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 (97).

Além disso, em 2010, Chissas et al. (98) 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 (30,40,45,47,68,72) 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 (40,47,49,74,), embora haja o risco de induzir efeitos adversos aos tecidos moles (60) e ocasionar sintomas gastro-intestinais, tais como náuseas, vômitos, constipação, dores abdominais e diarreia (34). Por outro lado, o efeito da sinvastatina sobre o tecido ósseo não foi verificado em algumas pesquisas com a utilização sistêmica dessa droga mesmo com doses elevadas (34,97,98).

Apesar das estatinas estimularem a formação óssea *in vitro*, e *in vivo*, quando dadas em altas doses ou por prolongadas infusões na cicatrização de fraturas de ossos longos de ratos, a administração de doses orais altas ou prolongadas infusões para o sítio da fratura não vem sendo utilizada clinicamente para acelerar a cicatrização de fraturas em humanos, devido aos efeitos adversos nessas condições (92).

2.7 CARREADORES PARA A SINVASTATINA

Segundo Nyan et al. 2010 (100), tanigo et al. 2010 (101), 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 e formas farmacêuticas para a sinvastatina apresentados em vários estudos com suas respectivas vantagens e desvantagens (tabela 3).

Tabela 3: Estudos sobre os carreadores para sinvastatina.

Carreadores para sinvastatina			
Tipo de estudo	Carreador utilizado	Resultado	Autores
In vitro	Hidrogel	Este carreador promoveu a liberação da sinvastatina sincronizada com a biodegradação do hidrogel	Tanigo et al. 2010
In vitro	Membrana colágeno	Liberação eficiente da sinvastatina. Não tóxica, não alérgica e não irritante.	Suthanthiran et al. 2012
In vitro	Forma ativa da sinvastatina (SVA) + cimento de fosfato de cálcio pré-misturados	Liberação lenta da sinvastatina e estimulação da osteogênese.	Montazerlghaem et al. 2013
In vitro	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
In vitro	Beta fosfato tricalcio (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
Animal – calvária de 45 ratos	Alpha fosfato tricalcio (α – TCP)	Biomaterial osseocondutor capaz de liberar sinvastatina de forma gradual.	Nyan et al. 2009
Animal – 32 defeitos alveolares de mini porcos	Gel de metilcelulose (injeção)	A associação da sinvastatina com este carreador estimulou a regeneração do osso alveolar em regiões de furca.	Sham et al. 2011

Animal – proximal da tíbia de 162 ratos	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 regeneração óssea.	Bingkui et al. 2008
Animal – calvária de 64 ratos	DBB (osso bovino desmineralizado)	A associação da sinvastatina com o DBB teve impacto negativo na regeneração óssea.	Lima et al. 2011
Animal – osso nasal de 20 coelhos	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
Animal – fêmur de 60 ratos fêmeas	Gelatina de hidrogel	Foi eficiente para obter resultados terapêuticos satisfatórios através da liberação local com baixa dose de sinvastatina e aplicação única.	Furkui et al. 2012
Animal – 42 coelhos tíbia e fêmur	Gelatina de hidrogel	Aumento da neovascularização e VEGF.	Okashinaya et al. 2013
Animal – 7 cães beagles, lesão de furca classe II	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 regeneração óssea nesses sítios.	Morris et al. 2008
Animal – 20 ratas ovariectomizadas – ramo da mandíbula	Membrana de poli (ácido lático) (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
Animal 90 ratas. Mandíbula	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

Animal – mandíbula de 18 coelhos – distração osteogênica	Esponja de gelatina	Este carreador, associado à sinvastatina não foi eficiente no aumento da regeneração óssea e distrações osteogênicas. Efeito limitado do método para regeneração óssea.	Kiliç et al. 2008
Animal – 72 ratos calvária.	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
Animal – calvária de 45 ratos	Sulfato de cálcio	O sulfato de cálcio, associado à sinvastatina proporcionou regeneração óssea satisfatória e superior, em relação à quantidade e qualidade óssea, quando comparado com a utilização do sulfato de cálcio sozinho.	Nyan et al. 2007
Animal – ratos com osteoporose induzida. Coxa direita.	Cimento de apatita com 6% de sinvastatina.	Este cimento favorecia liberação lenta da sinvastatina para as áreas osteoporóticas.	Hamada et al. 2012
Animal – calvária de ratos	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
Animal – alvéolo, pós-exodontias de 60 ratos	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
Animal – tíbia de 45 ratas	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
Animal – calvária de 90 ratos	Membrana acelular de Poli ε-caprolactona (PEC)	Formação de osso mineralizado no leito dos canais macro da membrana, biodegradação controlada e excelentes características elásticas.	Piski et al. 2008

DOSE SISTÊMICA / INJEÇÃO				
TIPO DE ESTUDO	DOSE DE SINVASTATINA	TEMPO DE ADMINISTRAÇÃO	R RESULTADOS	AUTOR AUTORES
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
Animal 32 ratos	2,5mg/Kg/dia	4 semanas	Favoreceu a manutenção dos resultados ortodônticos ao inibir atividade dos osteoclastos	Han et al. 2010
Animal 60 ratas. Implantes inseridos na tíbia	0; 0,125; 1; 5 ou 10mg/kg/dia/ intraperitonealm ente.	4 semanas	O efeito osteogênico da sinvastatina é obtido com doses sistêmicas consideráveis de 5 ou 10mg/kg de sinvastatina.	Aykawa et al. 2010
Animal 80 ratos	20mg/kg/dia/ subcutaneo.		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.
Animal – osso nasal de 12 coelhos	Esponja de colágeno (Teruplug, Terumo Japão).	O carreador escolhido proporcionou resultados similares entre a pravastatina e rhBMP-2 quanto à capacidade de regeneração óssea e expressão de BMP-2.		Alam et al. 2009
Animal – calvária de 32 ratos	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

Animal- 36 ratos- Tíbia	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
Animal – tíbias de 96 ratas ovariectomizada s	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
Animal – 200 ratas não ovariectomizada s	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
Animal – 80 ratas – fêmur	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
Animal – 15 ratos com periodontite induzida	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
Humanos. 72 pacientes com periodontite	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.

A esponja de colágeno mostrou-se um carreador efetivo para a liberação da sinvastatina com resultados favoráveis para a neoformação óssea (31,104). Segundo Suthanthiran et al. (2012) (65), 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 (111).

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 (105). Segundo Nyan et al. (2010) (100), o carreador alfa-TCP preenche todos os requisitos necessários que um carreador deve possuir.

Um estudo realizado por Stechow et al. (2003) (95) 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) (46) 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 (15,31,51). O biomaterial sulfato de cálcio associado à sinvastatina proporcionou uma neoformação óssea satisfatória quantitativa e qualitativamente superior, quando comparado ao seu uso isolado (106). Um estudo recente realizado por Montazerolghaem et al (2013) (102) 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 (33,42,101,103). 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 (101).

O gel de metilcelulose é um carreador muito utilizado nos estudos para liberação local da sinvastatina (35,36,53,54,56,57). Mostrou-se eficiente para a liberação da sinvastatina em regiões de furca de mini porcos, onde estimulou a neoformação óssea alveolar (53). Morris et al., (2008) (54) 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) (35) e Lee et al., (2008) (36). Resultados favoráveis à regeneração periodontal foram observados nos estudos realizados por Pradeep et al., (2010 e 2012) (56,57), 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, ciprofloxacino e nimesulida, em cosméticos e produtos alimentares. É definido como material não-tóxico, não-alérgico, não-irritante (56).

Moda et al. (2012) (107) 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 de obtenção das microesferas, por sua morfologia e diâmetro variável entre 4 e 60 μ m, 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) (14); Yang et al., (2012) (48). 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. 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 (48).

2.9 EFEITO DA SINVASTATINA NO METABOLISMO ÓSSEO

Estudos *in vitro* demonstraram que as estatinas hidrofóbicas incluindo as sinvastatinas 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 (81). Segundo Hugues et al. (2007) (59), 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 (25). 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) (112). 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 (52). O aumento da expressão de agrecano 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 (29).

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 (6,31,100).

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 (110). 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* (71). Fukui et al (2012) (33) 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) (42) através de análises histológicas, imunohistoquímicas em seu estudo realizado em 45 coelhos.

Nas investigações *in vitro* e *in vivo* elaboradas por Zhou et. al. (2010) (109), 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 4 a seguir.

Tabela 4: Estudos sobre as doses de sinvastatina para administração local

TIPO DE ESTUDO	TEMPO DE ESTUDO	DOSE 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	Suthanthiran et al. 2012 (65)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal-	8 semanas	0; 0,01; 0,1; 0,25 e 0,5 mg	Alfa-TCP	A dose ideal para estimular o maior neoformação óssea nos defeitos obtidos nas calvárias e com menor inflamação foi de 0,1 mg de	Nyan et al. 2009 (11)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal	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 (53)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal	3,5 semanas	0,1mg 0,5mg; 1,0mg; 1,5mg; 2,2mg	Gel de metil celulose e membrana de ácido polilático(doses únicas)	Redução da dose de sinvastatina de 2,2mg para 0,5mg reduziu a inflamação para melhores níveis clínicos, sem prejuízo potencial do crescimento ósseo	Stein et al. 2005 (35)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal	8 semanas	90µg/implant 5,5µg/implante	Polímero PDLLA- Poli-D,L,Lático	prejuízo com a aplicação local de sinvastatina para as duas doses utilizadas, quando comparadas ao controle sem medicamento	Pauly et al. 2012 (57)
Experimental <i>in vivo</i> -Animal- Redução de fraturas de tibia	6 semanas	50µg/implant 3µg/implante	Implantes com superfície tratada com polímero PDLLA- Poli,D,L,Lático	As doses baixas não tiveram efeito anabólico e nem catabólico sobre o tecido ósseo, revelando um efeito dose-dependente	Pauly et al. 2009 (56)
Experimental <i>in vivo</i> -Animal ratas -implantes inseridos nas tíbias	12 semanas	10 menos 7mol/l 10 menos 6 mol/l	Implantes- concentrações de sinvastatina foram incorporadas nos poros da superfície dos implantes	Neo formação óssea precoce sobre a superfície dos implantes testes com uma semana de tratamento. As duas concentrações mostraram significativo aumento da área óssea e contato osso/implante, comparada aos implantes controles.	Yang et al. 2012 (48)
Experimental <i>in vivo</i> -Animal ratos- Implantes inseridos em tíbias	2 semanas	25µg 50µg	Implantes- as concentrações de sinvastatina foram impregnadas nos poros da superfície do óxido de titânio	As duas concentrações ofereceram um maior contato osso/implante, maior aposição mineral e aumento do volume ósseo peri-implantar, em relação ao grupo de animais que receberam implantes sem sinvastatina	Nyan et al. 2013 (14)

Experimental <i>in vivo</i> -Animal-ratos- defeitos em calvária de ratos	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 maior comparada aos grupos avaliados com 2 e 4 semanas	Nyan et al. 2007 (106)
Experimental <i>in vivo</i> - Animal-ratos- região vestibular do segundo molar direito	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 (71)
Experimental <i>in vivo</i> -Animal – ratos- fratura de fêmur	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 (92)
Experimental <i>in vivo</i> -Humanos - 72 pacientes- lesões de furca classe II	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, comparado ao grupo tratado apenas com raspagem e aplainamento radicular	Pradeep & Thorat et al. 2010; Pradeep et al. 2012 (56, 57)
Experimental <i>in vivo</i> -Animal – 49 ratas ovariectomizadas com doença periodontal induzida	4 semanas	0,05ml	Gel de metilcelulose (injetável)	Menor colapso periodontal e menor perda óssea. Efeito protetor contra a degeneração tecidual em condições clínicas inflamatórias	Vaziri et al. 2007 (55)
Experimental <i>in vivo</i> -Animal – mandíbula bilateral de 90 ratas	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 (36)
Experimental <i>in vivo</i> -Animal – 60 tíbias de ratos	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 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 (28)
Experimental <i>in vivo</i> -Animal – osso nasal de 12 coelhos	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 (31)
Experimental <i>in vivo</i> -Animal – osso nasal de 20 coelhos	12 semanas	2,5mg/ml de sinvastatina dissolvida em 0,2 ml de água	Esponja de colágeno (TERUPLUG, TERUMO, Japão).	Aumento da expressão de BMP-2 e nova formação óssea	Mucozawa et al. 2011 (104)

Pauly et al. (2009) (32) 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) (11), 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) (35), 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 (36,53,71). Pradeep et al., (2010; 2012) (56,57) 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 (31). 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* realizada por Suthanthiran et al. (2012) (65). Diversos estudos sobre o uso local de sinvastatina em doses variadas em diferentes carreadores obtiveram resultados favoráveis quanto à neoformação óssea (Tabela 4).

A forma de administração local da Sinvastatina seja através de cirurgias, ou injeções foi a que apresentou resultados mais uniformes e consistentes em relação a neoformação óssea comparada ao seu uso sistêmico que além de tudo, ainda podem evitar alguns dos efeitos colaterais (6, 11, 14, 28, 32, 33, 36, 38, 42, 46, 48, 53, 55, 56, 57, 92, 100,104,105,107,109). As formas locais, defendida pelos autores acima, constituem maneiras de utilização bastante promissoras para alcançar a neoformação óssea com um pouco trauma e inflamação.

Atualmente os pesquisadores têm focado os seus estudos na ação local da sinvastatina para neoformação óssea (11,12,14, 28, 31, 33, 42, 43, 46, 50, 53, 56, 57, 100, 102, 105,106, 107,109). Os efeitos pleitrópicos da ação tópica da sinvastatina descritos por esses autores são: efeito antioxidante e 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 Rank L, proliferação, migração, recrutamento e diferenciação das células osteogênicas e subsequente formação de novo osso. Nassar et al., 2009 (63) 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 controlada e ser aplicado diretamente no local da área que se deseja uma neoformação óssea (70). 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 permita uma aplicação mais rápida e generalizada das áreas afetadas (56, 57). As vantagens da aplicação local soma-se à ausência de efeitos colaterais como mencionados com a utilização sistêmica desta droga. Segundo Elavarasu et al. 2012 (70), o aspecto mais crítico é o método como o sistema de liberação da droga é liberado para o sítio de ação.

2.11 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 (31). Morris et al., 2008 (54) 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 (113). Embora o osso autógeno apresente excelentes propriedades biológicas (osteocondução, osteogênese e osteoindução), oferecem, em contrapartida, inconveniências que levam os pesquisadores a procurarem 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 (114).

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 (20,21). Um biomaterial ideal necessita promover crescimento ósseo e, sequencialmente, restabelecer a função do tecido (115). Adicionalmente, segundo Jensen et al. (2006) (15), 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 (54).

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) (115) 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 se dispõem 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 (25, 35, 94). Alguns autores ressaltam ainda sobre a importância de novas pesquisas para comprovar a possível utilização de drogas/fatores osseointdutores na Odontologia, especialmente biomateriais de uso tópico que atuem, por exemplo, no reparo de defeitos ósseos causados por lesões intra-ósseas ou fraturas. Estes poderiam, ainda, atuar em adjunto na terapia periodontal, em reconstrução de defeitos ósseos, e no processo de osseointegração (116).

Landim et al. (2002) (96) 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 baixo custo e a estabilidade química (14).

3 JUSTIFICATIVA

Este estudo justifica-se em razão da procura por substitutos ósseos e moduladores biológicos que apresentem as mesmas propriedades que o osso autógeno, com o objetivo de reduzir a morbidade dos procedimentos cirúrgicos e melhorar os resultados dos procedimentos reconstrutivos. O Fosfato de Cálcio Bifásico, apesar de já demonstrar na literatura ser eficiente como arcabouço e bastante biocompatível, tem somente propriedades osteocondutivas. A Sinvastatina, por outro lado, vem demonstrando ser uma possível alternativa como osteoindutor para uso local, com poucos efeitos adversos, além de ter baixo custo, comparativamente a outras substâncias com o mesmo fim. Portanto, a necessidade de estudos adicionais sobre o potencial benefício da sinvastatina na neoformação óssea, e dos fatores e mecanismos que influenciam sua ação, justificam investigações e investimento científico em pesquisas esclareçam sua ação (32, 81).

4 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o potencial da sinvastatina localmente aplicada e seu efeito na neoformação óssea em defeitos pré-estabelecidos nas calvárias de ratos.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Avaliar os efeitos na neoformação óssea do uso de uma solução de sinvastatina na concentração de 0,1mg associado a um carreador cerâmico (BoneCeramic® - fosfato de cálcio bifásico), e comparar com seu uso isolado.
- B) Comparar se a utilização da sinvastatina, isolada ou associada com carreador cerâmico (BoneCeramic® - fosfato de cálcio bifásico) é melhor do que a utilização isolada deste biomaterial.
- C) Comparar os efeitos de dois carreadores: Substituto Ósseo Cerâmico (BoneCeramic®) e Esponja de colágeno (CollaTape®).

5 METODOLOGIA

A metodologia foi realizada conforme recomendado por Russel e Burch, 1959 (117) 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, propostos por Zimmermann em 1983 (118). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade de Brasília (UnB).

5.1 FORMATO DO EXPERIMENTO E MANUSEIO DOS 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 (β -TCP) tem

sido amplamente usado como substituto ósseo em ortopedia e cirurgia oral e maxilo-facial. O produto é apresentado em partículas em tamanho de 500-1000µm e nome comercial de Straumann BoneCeramic (119) (Institut Straumann AG, Basel, Switzerland).

5.3 ESPONJA DE COLÁGENO (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 (120).

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 utilizada no experimento com os animais. O passo seguinte foi pesar com uma balança de semi-precisão (Fig.2) 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.3).



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

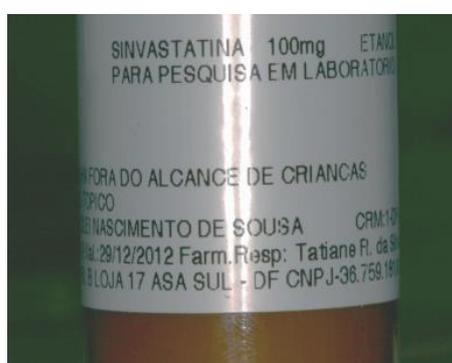


Figura 3. Solução com 0,1mg de sinvastatina em 15µl de Etanol (Farmogral, Brasília, Brasil)

5.5 ANESTESIA E PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados com ketamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg), via intramuscular antes de proceder os 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 de um descolador Molt de periodontia (fig.6). Após exposição do tecido ósseo, os defeitos foram obtidos com uma broca Trefina Neodent®, 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 (fig. 8). Para remoção da cortical externa utilizou-se um cinzel de periodontia (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: 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. 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: 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: BONECERAMIC® + 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: ESPONJA COLÁGENO 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). 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: ESPONJA COLÁGENO COLLATAPE® + SINVASTATINA (ECS)

Este foi composto por cinco defeitos, nos quais os defeitos do lado direito da calvária dos cinco 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. As dimensões deste defeito tem sido reportado para evitar o reparo espontâneo do defeito durante o tempo de vida do animal ou ao longo da duração do estudo (102). 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.

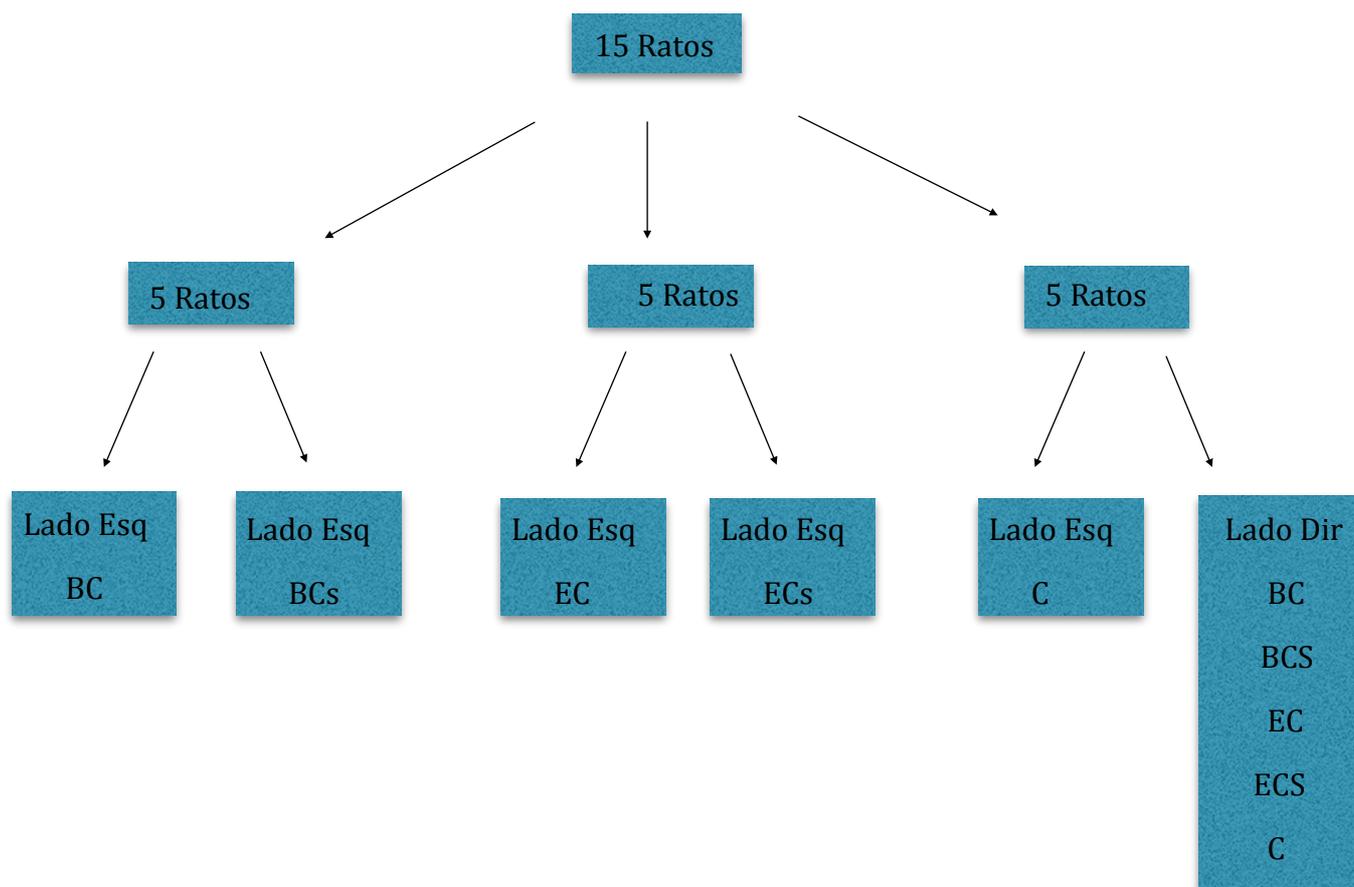


Figura 4: Esquema do desenho experimental nos animais

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 preparado para o procedimento cirúrgico 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

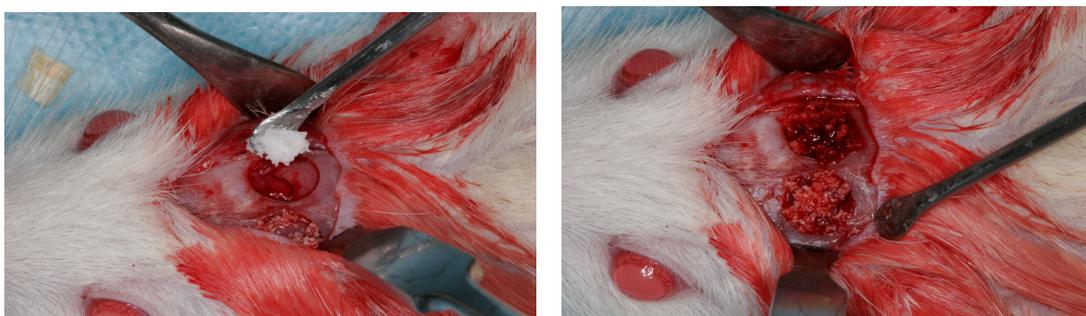


Figura 10. Defeito contra-lateral recebendo BoneCeramic® umedecido com Sinvastatina

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 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.11).



Figura 11. Exposição e retirada dos tecidos moles para preparo da amostra e descalcificação.

5.12 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 5 μ m 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.

Além da coloração padrão Hematoxilina e eosina, foram realizadas coloração de Tricromio de Masson e Picrosirius red para caracterização tecidual da matriz de colágeno no grupo BCS.

5.13 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.

5.13.1 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. No grupo BCS, além da análise descritiva feita com Hematoxilina e Eosina, foi

realizado análise das características do colágeno em lâminas do Tricrômio de masson e Picrosirius Red sob luz polarizada em diferentes aumentos, 20X, 40X e 200X.

5.13.2 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. 12 a 16). 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.

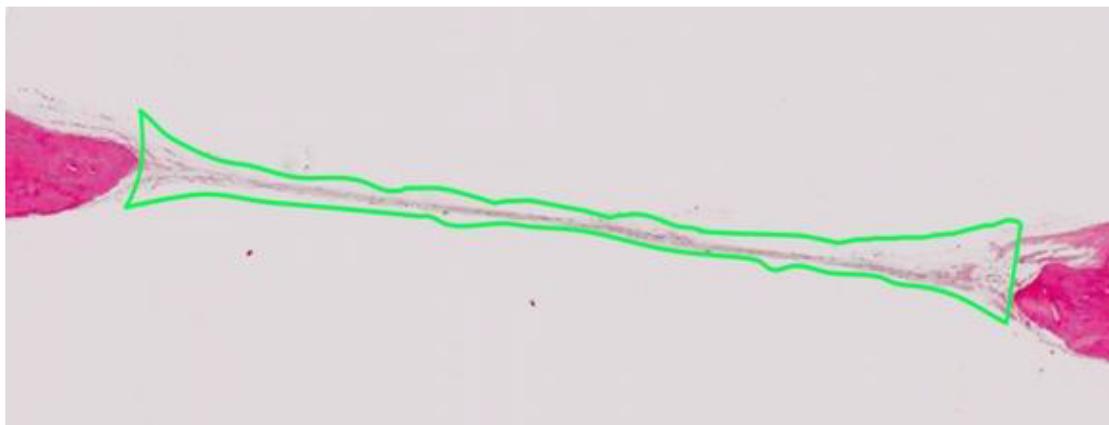


Figura 12: Defeito crítico (20x) com 5mm de diâmetro, com 60 dias de pós-operatório. Grupo 1 (C). A marcação em verde indica a área do defeito e delimita o tecido neoformado.

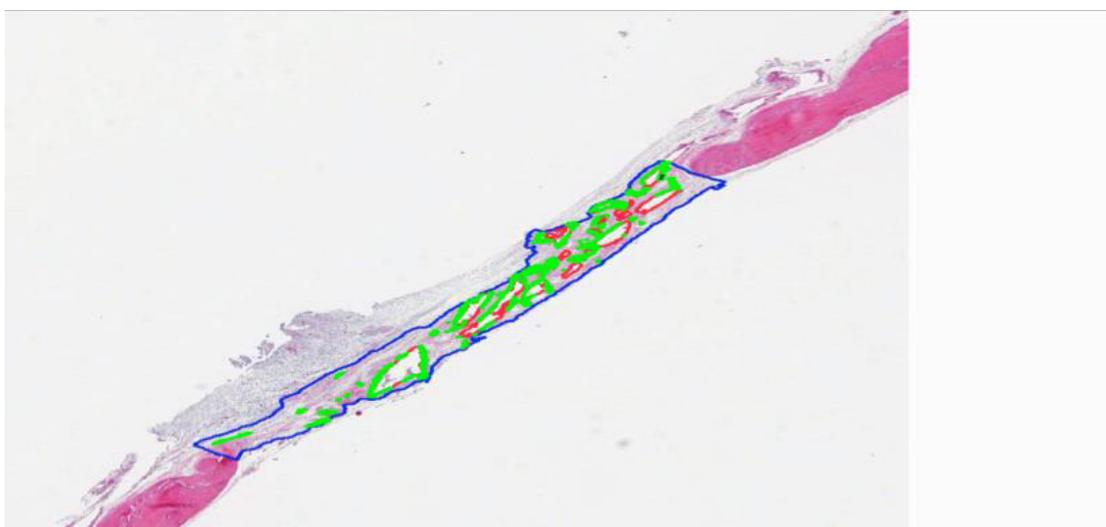


Figura 13: Defeito crítico (20x) com 5mm de diâmetro com 60 dias de pós-operatório. Grupo 2 (BC). A marcação em azul indica a região do defeito e delimita o tecido neoformado. A marcação em vermelho delimita o tecido neoformado. A área em verde indica a área ocupada por BC.

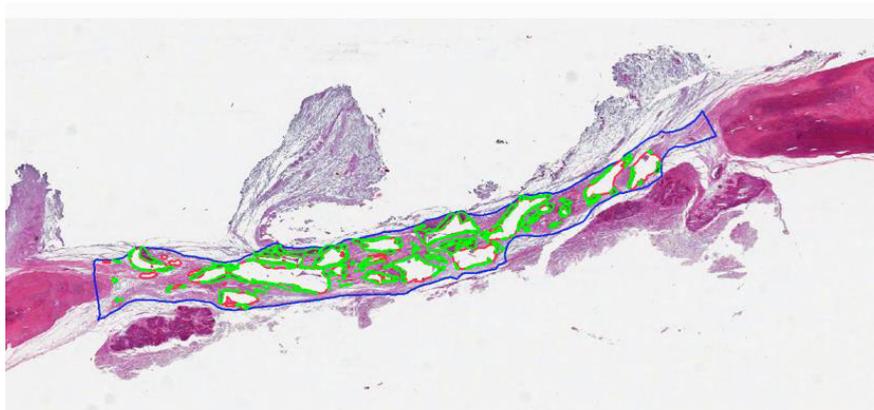


Figura 14: Defeito crítico (20x) com 5mm de diâmetro com 60 dias de pós-operatório. Grupo 3 (BCS). A marcação em azul indica a região do defeito e delimita o tecido neoformado. A marcação em vermelho delimita as regiões de neoformação óssea. A área em verde indica a área ocupada por BC.

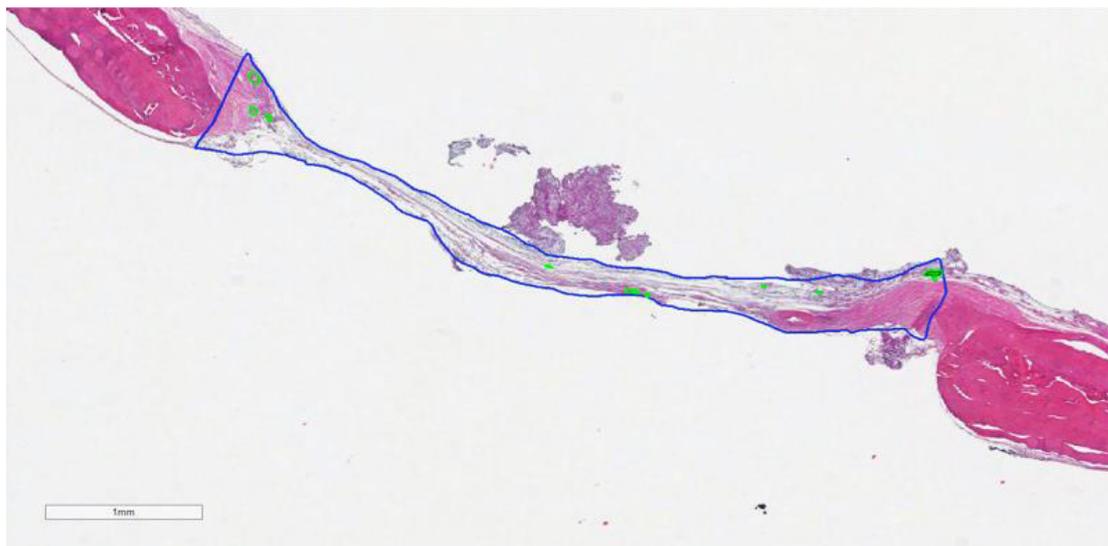


Figura 15: Defeito crítico (20x) com 5mm de diâmetro com 60 dias de pós-operatório. Grupo 4 (EC). A marcação em azul indica a região do defeito e delimita o tecido neoformado. A marcação em verde indica as áreas de neoformação óssea.

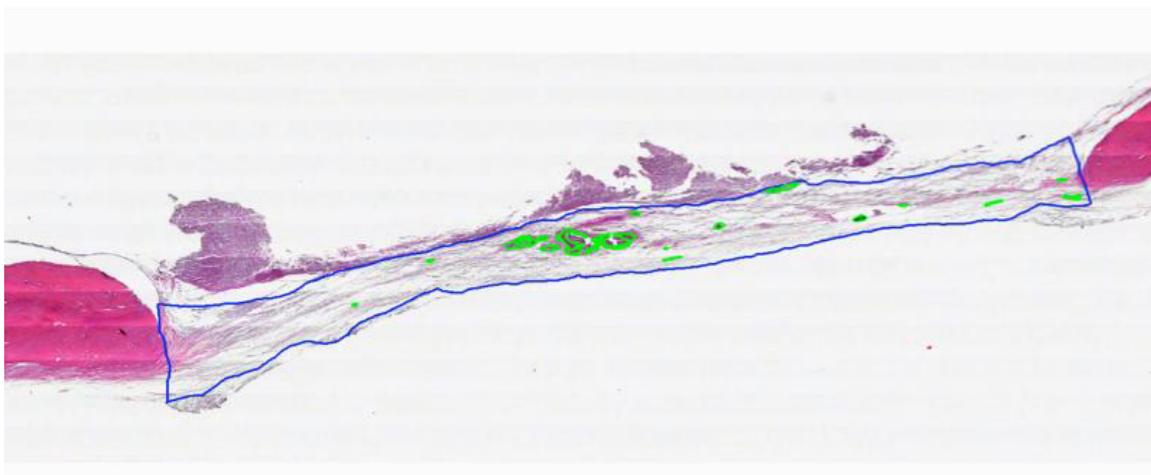


Figura 16: Defeito crítico (20x) com 5mm de diâmetro com 60 dias de pós-operatório. Grupo 5 (ECS). A marcação em azul indica a região do defeito e delimita o tecido neoformado. A marcação em verde indica as áreas de neoformação óssea.

5.14 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. Para testar o poder da análise de variância (ANOVA) para 5 amostras em 5 grupos ser suficiente para a confiabilidade dos resultados, foi realizado um teste power post-hoc pelo software G*power 3.05 (Franz Faul, Universitat Kiel, Germany). Quanto maior o valor, mais confiável a amostra, e considera-se aceitável valores acima de 0.80 . Para a amostra do estudo o teste de poder mostrou valores de 1.00, demonstrando suficiência e confiabilidade da amostra do estudo, conforme demonstrado na Figura 17. Desta forma, 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 Turkey. Os resultados foram reportados em termos de média \pm desvio padrão. O valor $p < 0,05$ foi estabelecido como o critério para a significância estatística. A análise estatística entre os grupos foi realizada usando-se o software SAS 9.3.

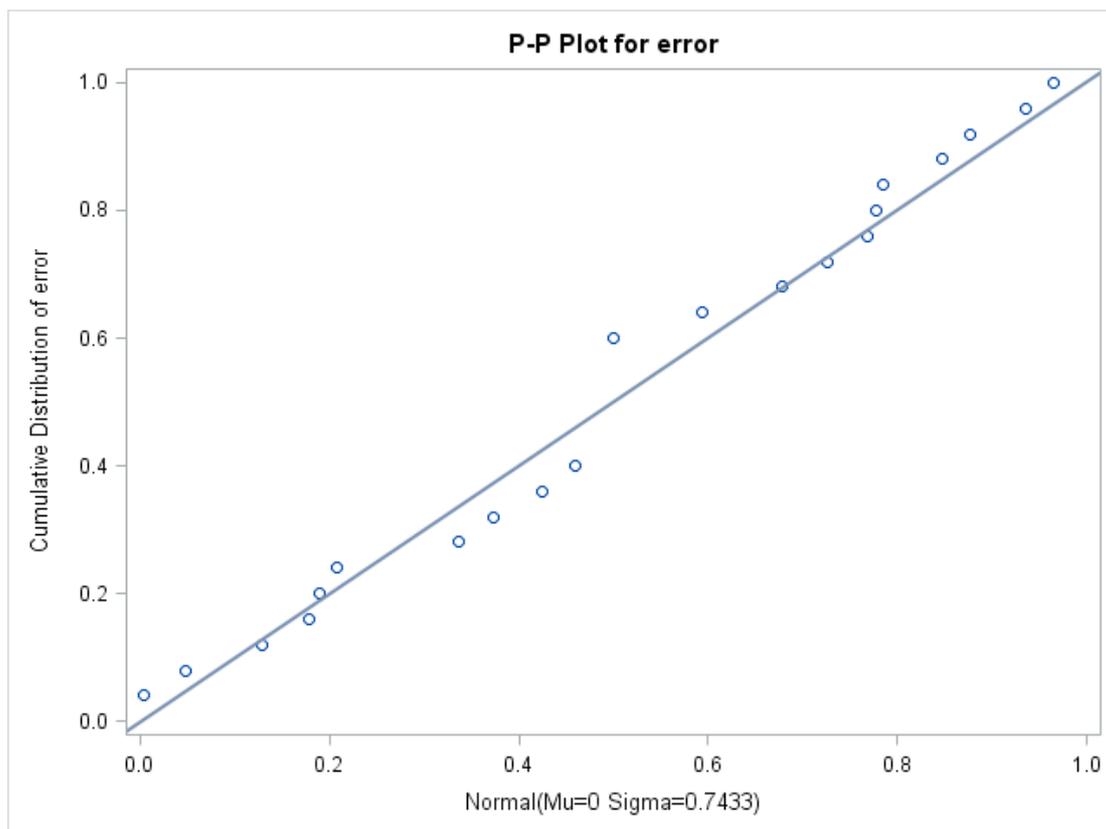


Figura 17: Gráfico ilustrativo resultado da avaliação de poder para o ANOVA post-hoc test em relação ao número de amostras por grupo

6 RESULTADOS

6.1 RESULTADOS ESTATÍSTICOS DA HISTOMETRIA

Os resultados da análise histométrica estão apresentados nas Tabelas 5, 6 e nas Figuras 17 e 18. De acordo com a Tabela 5 foram realizadas comparações entre os grupos. Verifica-se que os valores médios de AON (área de tecido ósseo neoformado), nos grupos BoneCeramic® + Sinvastatina (BCS) e BoneCeramic® (BC) foram significativamente maiores que o valor médio de AON, no grupo controle. O valor médio de AON no

grupo CollaTape® (EC) e Sinvastatina + CollaTape® (ECS), não foram significativamente diferentes do valor médio de AON do grupo controle. A distribuição do percentual das áreas de neoformação óssea está apresentada na Figura 17.

Na tabela 6 observa-se que o valor médio da área ocupada pelas partículas remanescentes do BoneCeramic® não difere significativamente entre os grupos 2 (BC) e 3 (BCS). A distribuição do percentual da área ocupada por partículas remanescentes de BoneCeramic® está apresentada na figura 19.

Tabela 5 – Resultados histométricos da comparação da neoformação óssea entre todos os grupos.

Grupos	AON± Dsv.Padrão	P-valor	P-valor
1 (C) (n = 5)	0.00 ± 0.00		
2 (BC) ^{a,b} (n = 5)	9.04±0.86	< 0.0001 ^a	
3 (BCS) ^{a,b} (n = 5)	12.71±1.21	< 0.0001 ^a	< 0.001 ^b
4 (EC) ^{a,c} (n = 5)	0.91± 0.86	0.4188 ^a	
5 (ECS) ^{a,c} (n = 5)	2.25± 0.61	0.0024 ^a	0.1062 ^c

AON, área de neoformação óssea; C, controle; BC, BoneCeramic®; BCS, BoneCeramic®+Sinvastatina; EC, Esponja de Colágeno - CollaTape®; ECS, Esponja de Colágeno - CollaTape®+Sinvastatina; SD, standard deviation.

^aComparação de todos os grupos com o grupo controle. Todos os grupos apresentaram diferenças significativas com o grupo Controle, $P < 0.05$.

^bComparação entre os grupos 2 (BC) e 3 (BCS). Grupo 3 com diferença significativa em relação ao grupo 2, $P < 0.05$.

^cComparação entre os grupos 4 (EC) e 5 (ECS). Grupo 5 sem diferença significativa em relação ao grupo 4, $P < 0.05$.

Valores média \pm , representam o desvio padrão

Análise estatística foi realizada por ANOVA com comparação post-hoc usando o método de Tukey.

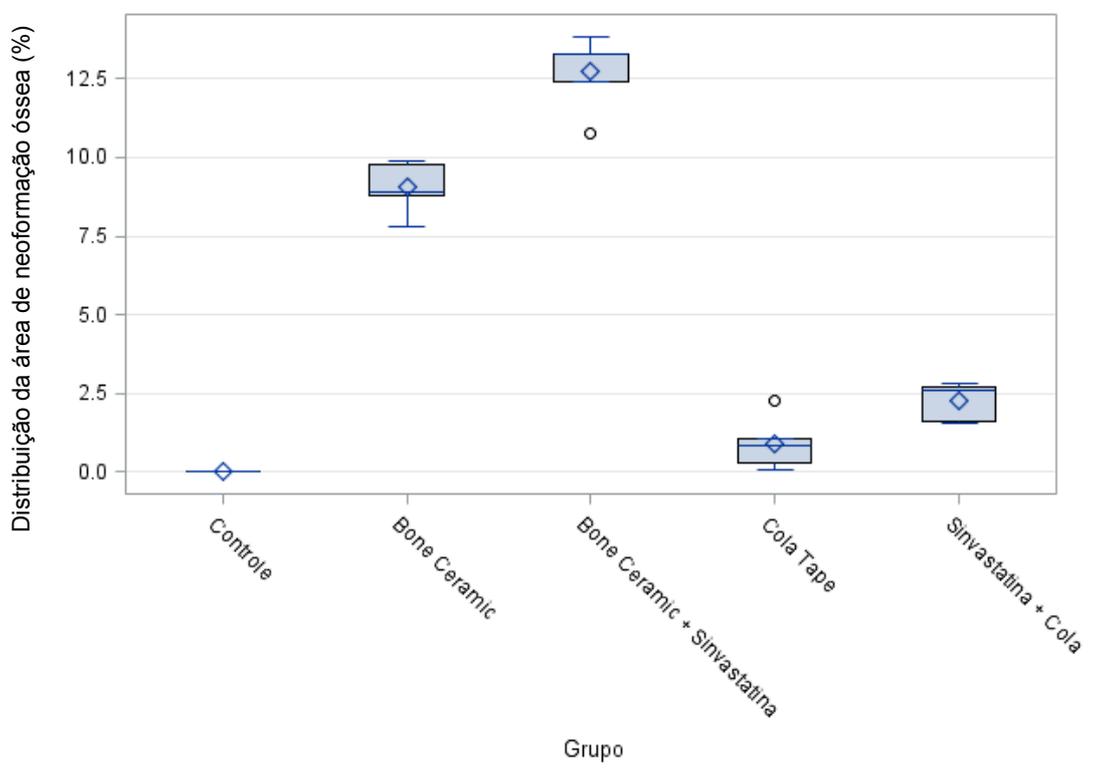


Figura 18: Gráfico da distribuição do percentual das áreas de neoformação óssea

Tabela 6 - Resultados histométricos da área ocupada por partículas remanescentes de Bone Ceramic nos defeitos ósseos dos grupos 2 (BC) e 3 (BCS), 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 $p < 0,05$

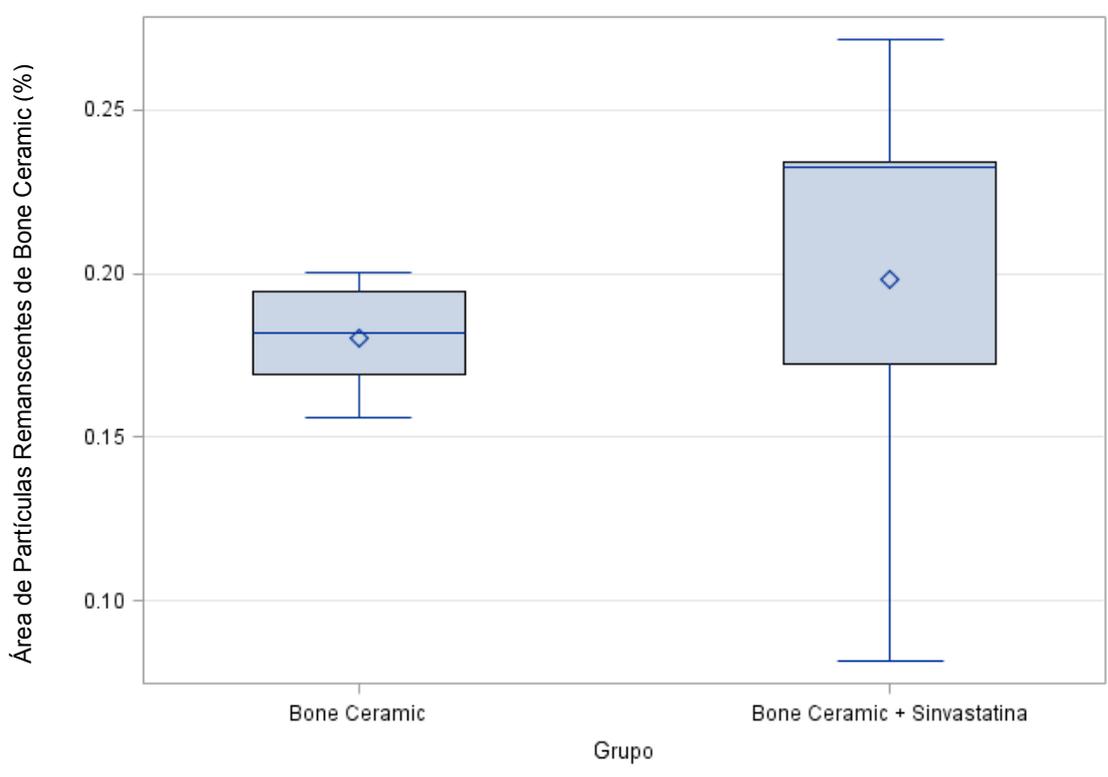


Figura 19: Gráfico da distribuição do percentual da área ocupada por partículas remanescentes de BoneCeramic©

6.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA - Hematoxilina / Eosina

A figura 20 mostra imagens representativas dos 5 grupos e possibilita uma visão de toda a extensão do defeito e dos tecidos neoformados nos diferentes grupos.

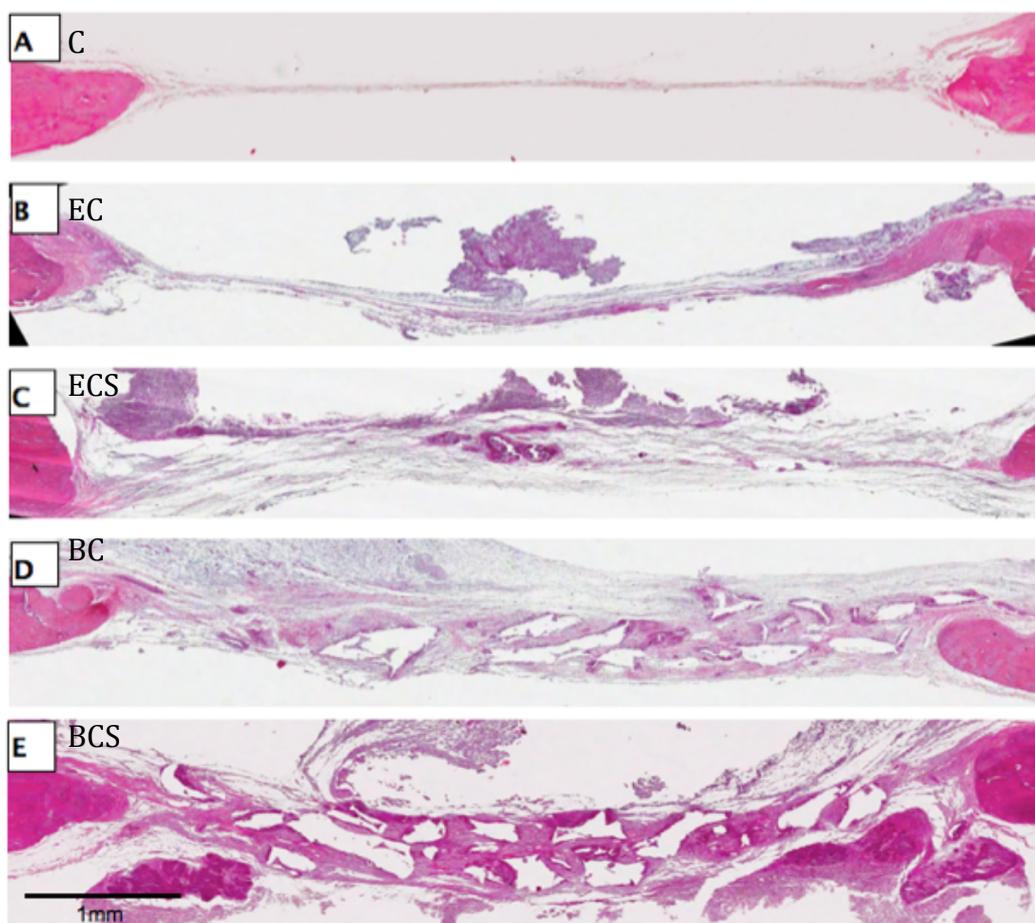


Figura 20: Imagens representativas dos 5 grupos que possibilita uma visão de toda a extensão do defeito

6.2.1 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. 20A). Em um maior aumento (200x), observou-se um tecido fibroso e a presença de alguns vasos sanguíneos (Fig. 21).

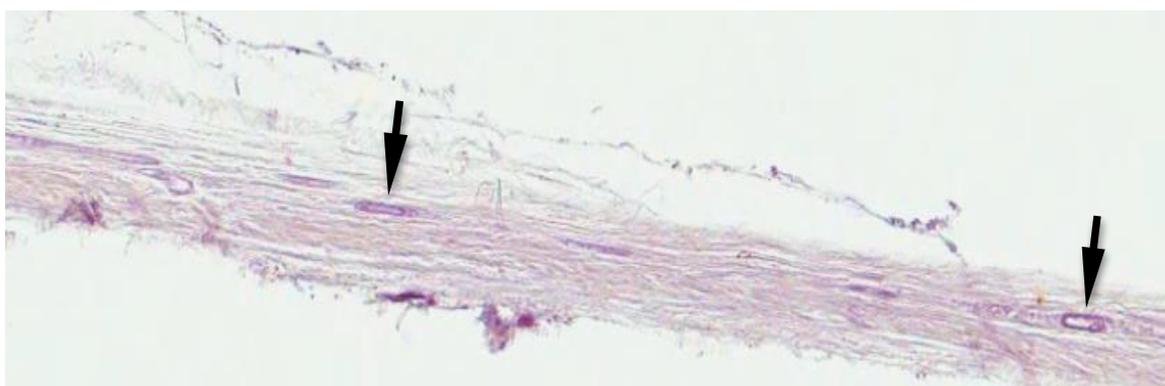


Figura 21: A presença de tecido conjuntivo no defeito sem tratamento, preenchido somente por coágulo. Observa-se a presença de poucos vasos sanguíneos (setas).

6.2.2 GRUPO 2 - BONECERAMIC® (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. 20D). 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) e vasos sanguíneos entre as partículas do biomaterial (Fig. 22).

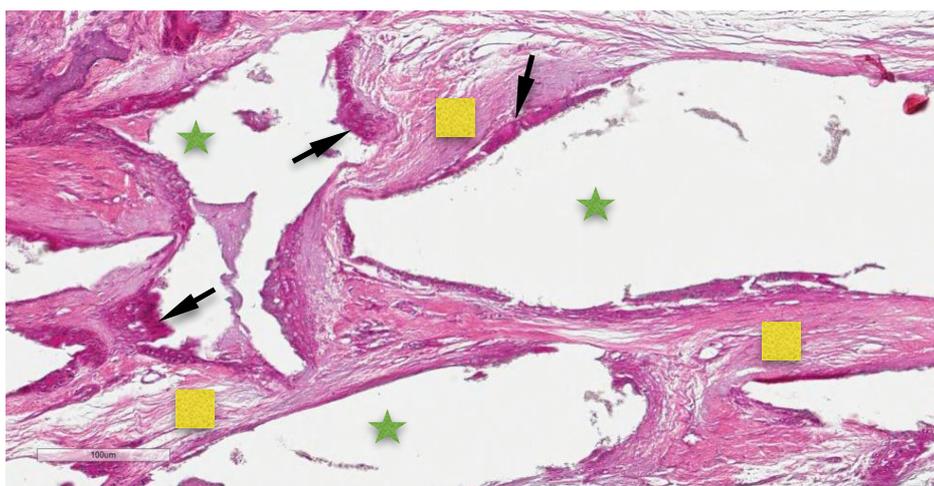


Figura 22: Aumento em 200x do corte histológico do Grupo 2 (BC), onde há lacunas do BoneCeramic® (estrelas), desmineralizado com o processamento histológico. Lâmina de BoneCeramic® sem sinvastatina, demonstrando neoformação de tecido ósseo ao redor das partículas do BoneCeramic (setas) e tecido conjuntivo (quadrados).

6.2.3 GRUPO 3 - BONECERAMIC® + 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 (Fig. 20E). 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. 20E).

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. 20E).

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 23). Também verificou-se um tecido conjuntivo com a presença de um grande número de células (fibroblastos) e vasos sanguíneos (Fig. 23).

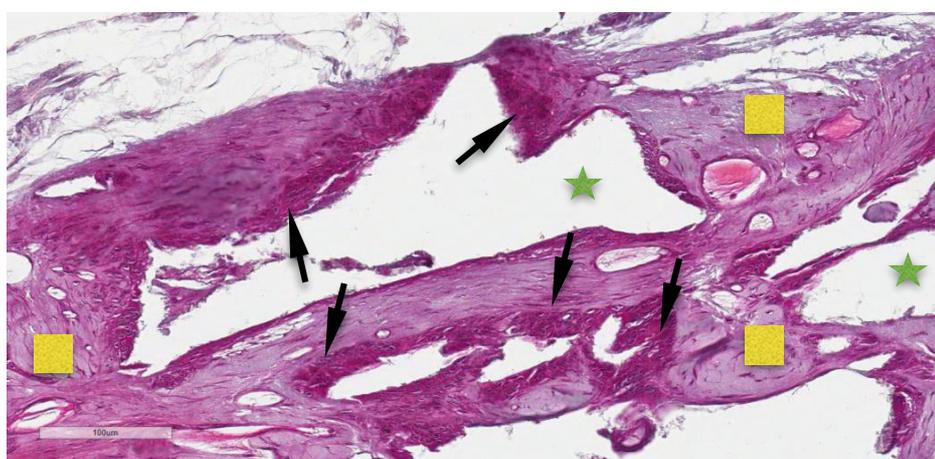


Figura 23: Aumento em 200x do corte histológico do Grupo 3 (BCS), onde há lacunas do BoneCeramic® (estrelas), desmineralizado com o processamento histológico. Observa-se a neoformação óssea em maior quantidade e varias camadas de células ao redor das partículas do BoneCeramic® (setas) e tecido conjuntivo entre as partículas do BC (quadrado).

6.2.4 GRUPO 4 – ESPONJA DE COLÁGENO (EC)

Nesse grupo, após um período de 60 dias, observou-se um tecido fibroso aparentemente mais espesso do que o controle, unindo as bordas do defeito (Fig. 20B) 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 24).

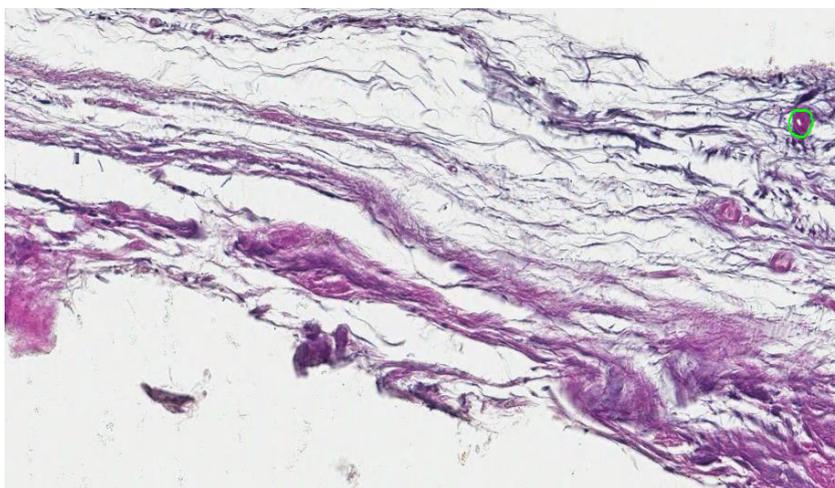


Figura 24: Aumento em 200x. (A) Corte histológico do Grupo 4 (EC) ColliTape® sem sinvastatina, demonstrando um tecido conjuntivo fibroso espesso do que o controle, sem evidências de formação óssea.

6.2.5 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. 20C). Em maior aumento (200x), verificou-se a presença de células cubóides alinhadas, características de osteoblastos e circundadas por matriz óssea no centro do defeito (Fig.25)

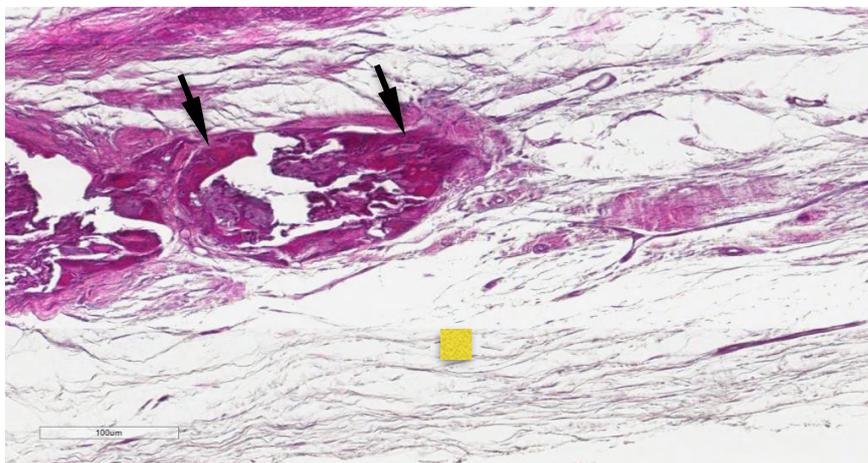


Figura 25: Aumento em 200x. Corte histológico do Grupo 5 (ECS) CollaTape® com sinvastatina, demonstrando ilhotas de neoformação óssea (setas) no meio de tecido conjuntivo fibroso (quadrado).

7 ANÁLISE MORFOLÓGICA (HE / TRICRÔMICO DE MASSON / PICROSIRIUS RED)

Com o objetivo de conhecer em maiores detalhes a morfologia e a qualidade da neoformação óssea demonstrada no Grupo 3 (BCS), e quantificada na coloração Hematoxilina / Eosnina (HE), foi realizado colorações para identificar e caracterizar o colágeno deste tecido, que no caso do tecido ósseo, se apresenta predominantemente na forma Tipo I

No aumento de 20X, foi observado na lâmina em HE, a presença de tecido osteóide ao redor das partículas de BoneCeramic entremeadas em tecido conjuntivo. No Tricrômico de Massom, nota-se o colágeno corado em azul e tecido osteóide circundando as partículas do BoneCeramic. Na coloração Picrosirius Red sob luz polarizada, evidencia-se a birrefringência da malha de colágeno entremeadando as partículas do boneCeramic (Fig. 26)

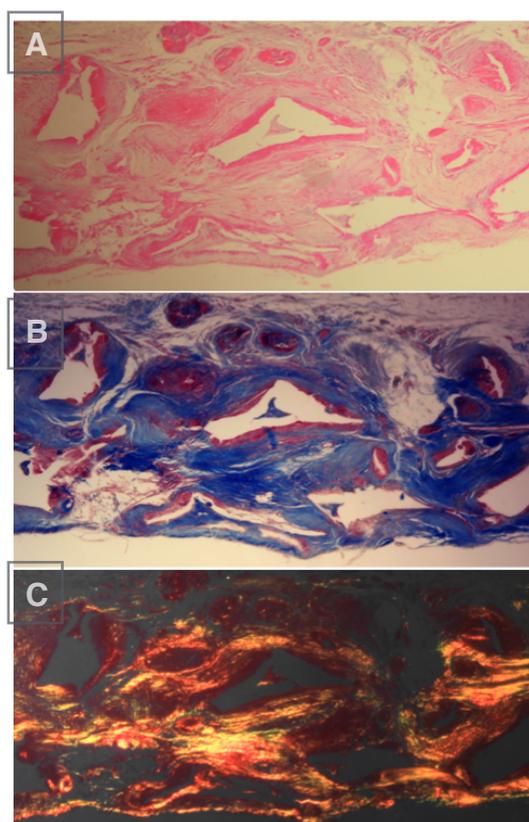


Figura 26: Aumento 20x. Corte histológico do grupo 3 (BCS), onde observa-se a mesma região da lâmina coradas em HE acima (A) , Tricrômico de Massom (B) na imagem ao centro, e Picrosirius Red (C) abaixo. Com HE, observamos a presença de tecido osteóide ao redor das Partículas de BoneCeramic entremeadas em tecido conjuntivo. No Tricrômico de

Massom, nota-se o colágeno corado em azul e tecido osteóide circundando as partículas do BoneCeramic. Na coloração Picrosirius Red sob luz polarizada, evidencia-se a birrefringência da malha de colágeno entremeando as partículas do boneCeramic.

Em 40X de aumento, observa-se a presença de células ao redor da partícula de BoneCeramic e a disposição do tecido Conjuntivo circunjascente. Na coloração com Tricrômico de Masson, evidencia-se o Tecido Osteóide em vermelho e a presença de fibras colágens Tipo I coradas em azul. A organização deste colágeno pode ser observada na coloração Picrosirius Red à direita, com as camadas de fibras de colágeno coradas em em vermelho próximo à partícula, e subjacente, fibras colágenas amarelo-alaranjado, em processo de maturação (Fig.27).

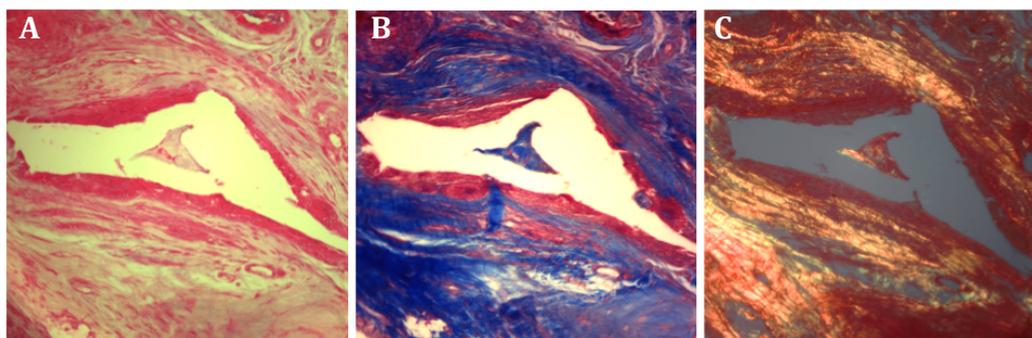


Figura 27: Aumento 40X. Corte histológico do grupo 3 (BCS), onde observa-se a mesma região da lâmina coradas em HE a esquerda (A) , Tricrômico de Massom (B) na imagem ao centro, e Picrosirius Red (C) à direita. Com HE observa-se a presença de células ao redor da partícula de BoneCeramic e a disposição do tecido Conjuntivo evoluindo ao redor. Na coloração com Tricrômico de Masson, nota-se o Tecido Osteóide em vermelho e a presença de fibras colágens Tipo I que se mostra em azul. A organização deste colágeno pode ser observada na coloração Picrosirius Red à direita, com as camadas de fibras de colágeno coradas em em vermelho próximo à partícula, e amarelo-alaranjado de fibras colágeno em processo de maturação.

Em maior aumento com 200x a coloração em HE, possibilita observar a organização em camadas de células de tecido ósseo em aposição na superfície da partícula de BoneCeramic. Essas camadas celulares do tecido osteóide também é observada na coloração em Tricrômico de Masson em

vermelho sobre a superfície do BoneCeramic, além do aspecto azulado que caracteriza a presença de colágeno Tipo I. Detalhes da organização das fibras colágenas podem ser notados pela birrefringência da luz polarizada com Picrisirius Red, observa-se continuidade das fibras colágenas próximo a superfície da partícula de BoneCeramic, coradas em vermelho mais organizadas e amarelo-laranja com menor processo de maturação (Fig. 28).

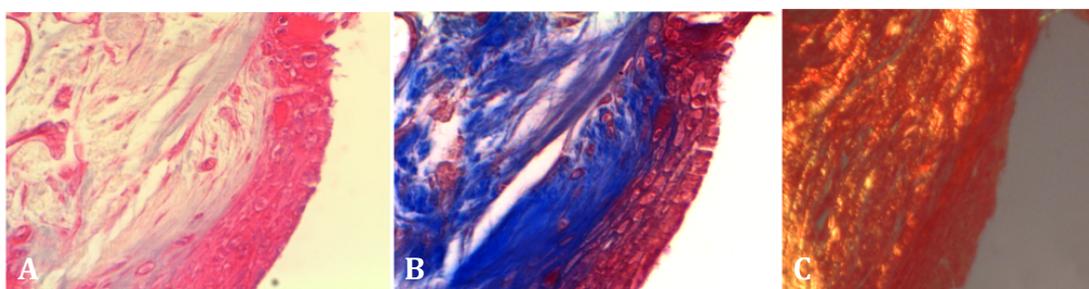


Figura 28: Aumento 200X. Corte histológico do grupo 3 (BCS), onde observa-se a mesma região da lâmina coradas em HE a esquerda (A) , Tricrômico de Masson (B) na imagem ao centro, e Picrosirius Red (C) à direita. Neste maior aumento pode-se observar em maior detalhe na coloração em HE, a organização em camadas de células de tecido ósseo em aposição na superfície da partícula de BoneCeramic. Essas camadas celulares do tecido osteóide também é observada na coloração em Tricrômico de Masson em vermelho sobre a superfície do BoneCeramic, além do aspecto azulado que caracteriza a presença de colágeno Tipo I. Detalhes da organização das fibras colágenas podem ser notados pela birrefringência da luz polarizada com Picrisirius Red, observa-se continuidade das fibras colágenas próximo a superfície da partícula de BoneCeramic, coradas fortemente em vermelho.

8 DISCUSSÃO

A busca por substitutos teciduais que ofereçam resultados no reparo ósseo nos mesmos níveis de qualidade do osso autógeno, tem sido foco de interesse de várias especialidades médicas. Em especial aquelas que necessitam deste processo para tratamento de sequelas de patologias, ou condições que podem levar a perdas ósseas por trauma ou processo degenerativo.

O osso autógeno ainda é considerado o padrão ouro quando se necessita de reconstruções de defeitos ósseos. Porém, aspectos como a necessidade de um sítio doador, e evidentemente os diferentes limites e quantidade óssea disponível que a anatomia destes locais determinam, associado ainda a impossibilidade de garantir um armazenamento e otimização para uso em volume e momento apropriado, tem levado cada vez mais pesquisadores a buscar uma forma de obter regeneração óssea a partir de engenharia tecidual que não dependa de tecidos autógeno ou heterógeno (3,4,5,7).

Dentre as várias linhas de pesquisa que vem buscando alternativas para melhorar os resultados de procedimentos regenerativos para defeitos ósseos, em 1999, Mundy et al (75) foram os primeiros a chamar atenção dos possíveis efeitos benéficos da sinvastatina no reparo ósseo. Eles testaram mais de 30.000 compostos, e em seus estudos tanto com metodologias *in vivo*, quanto *in vitro*, demonstraram que as estatinas melhoraram a formação de osso. A partir deste estudo, seguiram-se vários outros que observaram uma melhora do reparo ósseo em um tempo de cicatrização menor (14, 45, 48, 99, 116). Apesar disso, os reais benefícios da Sinvastatina tem apresentado resultados conflitantes em relação a sua capacidade de melhorar ou acelerar o processo de reparo tecidual do osso. Muitas dúvidas permanecem quanto a quantidade ideal da droga, melhor forma de administração, tempo necessário de exposição, e qual o melhor carreador (25, 26, 29, 30). Portanto, estudos como este que tem como objetivo

contribuir no esclarecimento do potencial da sinvastatina em oferecer melhores resultados nos mecanismos biológicos da cicatrização óssea e podem justificar a pesquisa realizada.

Considerando que a Sinvastatina é um medicamento desenvolvido para uso sistêmico, e primariamente para auxílio no controle dos níveis de colesterol, algumas investigações sobre o potencial no reparo ósseo e benefícios na modulação da reabsorção e densidade, foram realizados por diversos autores com resultados positivos, especialmente em condições de osteoporose (30, 40, 44, 45, 68, 72, e 74). Porém, a administração sistêmica da droga encontra na literatura resistência entre muitos autores (34, 51, 60, 95, 96, 97, 98), os quais não encontraram resultados favoráveis nessa forma de uso. Estes descreveram que doses baixas não obtiveram efeito, e doses altas promovem efeitos adversos como náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreia. Por estas razões, a maior parte dos estudos recentes que correlacionam o uso da sinvastatina à neoformação óssea, tiveram como metodologia formas locais para utilização da droga (11, 65, 53, 35, 57, 56, 48, 14, 106, 71, 92, 56, 57, 55, 36, 28, 31, 104).

Diante do exposto acima, neste estudo, optou-se pela administração local da Sinvastatina, usando como carreadores um substituto ósseo sintético bifásico composto de Hidroxiapatita e Trifosfato de cálcio, e como outro carreador uma esponja de colágeno. O fato de materiais cerâmicos como os fosfatos de cálcio, isoladamente encontrarem evidências de favorecimento à neoformação óssea por mecanismos osteocondutores, a metodologia deste estudo procurou esclarecer os benefícios da associação da sinvastatina em relação ao uso isolado desta cerâmica como enxerto (127, 129, 141).

Quanto a concentração ideal da droga que estimule a formação óssea, e que ofereça baixo potencial de promover efeitos deletérios, alguns autores como Nyan et al, em 2009 e 2010, Stein et al, em 2005, Robjani et al. , 2011 (11,100, 35, 105) recomendam a partir dos resultados obtidos em estudos com várias concentrações diferentes, que 0,1 mg foi a melhor concentração para promoção óssea, e com baixo nível de infamação tecidual. Nos resultados deste estudo, o grupo em que os defeitos ósseos foram

preenchidos com 0,1 mg de sinvastatina associado ao fosfato de cálcio Bifásico foi o que apresentou maior área de novo osso formado, sugerindo um efeito positivo para neoformação óssea. Corroborando com estes resultados, outros estudos demonstraram que baixas doses de 0,01 mg não tiveram efeito algum no reparo ósseo, e doses elevadas de 2,2 mg, além de não melhorar os resultados, ofereceram um efeito prejudicial aos tecidos, com elevados níveis de inflamação tecidual, que sabidamente pode comprometer a complexa cicatrização que envolve o tecido ósseo (Pauly et al, 2009 (32), Lee et al, 2008 (36), Chen et al, 2011 (53). Possivelmente, para alguns autores, isso pode ser explicado em razão do fato de que a elevação das doses para obter uma melhor ação no tecido ósseo, provoca uma redução acentuada na produção do colesterol, o qual exerce papel fundamental para a manutenção da integridade das membranas celulares (34, 69).

Quanto às observações histológicas, neste estudo foi verificado a presença de inflamação, mas esta foi classificada como leve e não influenciou na cicatrização óssea. Os resultados sugerem que esta inflamação não foi suficiente para estimular grandes concentrações de citocinas e conseqüentemente prejudicar a diferenciação e mineralização dos osteoblastos, em razão do efeito positivo observado quando a sinvastatina foi associada ao Bone Ceramic comparado ao Bone Ceramic puro. Com resultados semelhantes, Stein et al., 2005.,(35); Lee et al., 2008 (36); Nyan et al., 2009 (11); Rojbani et al., 2011 (105) não encontraram inflamação significativa com o uso local de 0,1 mg de sinvastatina. Apesar disso, Nyan et al., 2009 (11) e Rojbani et al., 2011 (105) verificaram uma inflamação considerável a partir da dose de 0,25 mg de sinvastatina. Já Stein et al., 2005 (35) e Lee et al., 2008 (36) observaram inflamação mais intensa apenas com doses superiores a 0,5 mg. Mesmo assim, esta inflamação com a dose de 0,5 mg, em ambos os estudos, não foi considerada importante porque propiciou resultados melhores para a regeneração dos defeitos. Apesar das preocupações em relação à modulação da inflamação para o processo de cicatrização óssea, Stein et al., 2005 (35), 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). Os autores concluíram que a inflamação parece ser necessária para a formação óssea e ativação dos osteoblastos. Isso vem de encontro a vários estudos que 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 e pode interferir no processo biológico de reparo do tecido ósseo .

Quando se discute a aplicação local de moduladores biológicos como a Sinvastatina, um aspecto de muita importância está relacionado ao carreador usado para levar e manter a droga ativa no defeito ósseo. No estudo atual, a sinvastatina foi utilizada com dois carreadores (Bone Ceramic e Colla Tape) , 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, especialmente quando associado a um carreador cerâmico. O Bone Ceramic tem sido utilizado em inúmeros estudos como material de enxerto ósseo pelas propriedades osteocondutoras já bem estabelecidas (127, 128, 129, 130), ao passo que a EC (Esponja de Colágeno) não é considerada um material de enxerto ideal para regeneração de defeitos ósseos, pois não é osteocondutora, e sua absorção é rápida, desta forma sendo incapaz de manter o arcabouço que facilita a neoformação óssea (131, 132, 133, 134, 135). Por isso neste estudo a metodologia e formatação de um grupo com a droga associada à esponja de colágeno (EC), poderia evidenciar com maior clareza os benefícios da sinvastatina isoladamente sem associação, e com uma cerâmica osteocondutora.

O efeito osteogênico da sinvastatina é dose/carreador dependente, ou seja, para cada carreador existe uma concentração adequada para a associação com a sinvastatina (11). Para associar a sinvastatina com o gel de metilcelulose a concentração adequada é de 0,5 mg de sinvastatina segundo Chen et al.,2011 (53), Stein et al., 2005 (35) e Lee et al., 2008 (36). Já para outros autores para sua associação com alfa ou beta-TCP a

concentração ideal seria 0,1mg de sinvastatina (11, 100), conforme utilizado no presente estudo. A combinação desse medicamento com a esponja de colágeno (Teruplug, Terumo, Japão) foi utilizada e efetiva com uma dose de 2,5 mg/ml de sinvastatina dissolvida em 0,2 ml de água no estudo estabelecido por Mucozawa et al., 2011 (104). Eles também observaram, como neste estudo, ao avaliar os resultados histológicos da presente investigação que existe uma incapacidade da EC em manter a espessura da calvária dos ratos nos grupos controles. Isso explicaria, de acordo com os resultados, o carreador com melhor desempenho no presente estudo ter sido o Bone Ceramic, pois demonstrou uma formação óssea significativamente maior com a sinvastatina, seguido do uso isolado somente do Bone Ceramic, quando comparados ao controle ou a sinvastatina com Collatape. Possivelmente esses achados estão relacionados as propriedades de manutenção do arcabouço e hidrofiliidade do material.

Mukozawa et al. (104), em 2011, 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 carreador para a sinvastatina, apresentou uma quantidade menor de neoformação óssea, diferente daquele observado por Mucozawa et al., 2011 (104), onde em seu estudo a Sinvastatina estimulou um relevante desempenho na regeneração óssea. 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., em 2011 (104), 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. 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 (104), tem a capacidade de manter espaço para a formação de osso (136, 137, 138), enquanto que o mesmo não acontece com o CollaTape® (139). Desta forma, no estudo de Mukozawa et al., 2011 (104) o próprio carreador poderia favorecer uma neoformação óssea, o que poderia explicar os resultados obtidos pelos autores terem sido diferentes dos obtidos neste estudo. Além disso, os dois estudos utilizaram modelos animais diferentes em suas avaliações.

A sinvastatina é hidrofóbica, portanto é insolúvel em água. Nesta investigação, foi dissolvida em etanol porque segundo Morris et al. , em 2008 (54), é facilmente diluída no etanol, conseqüentemente mais fácil de alcançar pequenos espaços quando comparada ao gel de metilcelulose. Outros estudos também utilizaram o etanol para diluir a sinvastatina em suas pesquisas (48,51, 53, 105). A acetona também pode ser utilizada para esta finalidade, como descrito no estudo de Moda et al., em 2012 (107). Por outro lado, Tanigo et al., (2010) (101), 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.

Materiais cerâmicos como substitutos ósseos já vem sendo utilizados como enxerto ósseo há vários anos. As características destes biomateriais a base de fosfato de cálcio tais como biocompatibilidade, ser de origem sintética, oferecer diferentes velocidades de substituição por osso, dependendo da estrutura físico-química, e ainda excelente capacidade osteocondutiva, têm cada vez mais despertado o interesse dentre pesquisadores e clínicos que lidam com reconstrução óssea (140, 141). Além disso, outra vantagem que tem sido descrita é a possibilidade de associar estes materiais a moduladores biológicos, fatores de crescimento ou antibióticos que poderiam ter perspectivas de controle do tempo e quantidade

da droga para um aproveitamento e efeito direcionado a um defeito tecidual local (142,143,144).

Nesta pesquisa, o BoneCeramic® foi o material de enxerto escolhido para ser um dos carreadores para avaliar o potencial da sinvastatina de melhorar o reparo ósseo de um material cerâmico sintético que possui propriedades somente osteocondutoras, sem nenhum efeito osteoindutor ou osteogênico. Ou seja, tem sua ação biológica por oferecer uma matriz para a neoformação óssea, conforme vários estudos atestando estas características e sua boa performance clínica (127, 128, 129, 130).

Robjani et al., (2011) (105) verificaram que na concentração de 0,1 mg de sinvastatina associada a um carreador cerâmico (alfa-TCP), foi o grupo que induziu uma maior formação óssea. Esses resultados, sugerem como neste estudo com o BoneCeramic, que a sinvastatina quando associada a um carreador de características osteocondutiva promoveu os melhores resultados, quando comparado à sinvastatina embebida em estruturas de colágeno de degradação rápida.

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, sem preenchimento (1), ou preenchidos com carreador colágeno combinados ou não com SVT (4,5). Esses resultados foram estatisticamente significativos, conforme a tabela 5, e estão de acordo com a literatura onde o Bone Ceramic é conceituadamente tido como matriz efetiva para a formação de novo osso em defeitos ósseos diversos (127,128,129,130). 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 em outros estudos foram verificados quando a sinvastatina foi associada com um biomaterial a base de fosfato de cálcio (11, 106, 105). A combinação da sinvastatina e sulfato de cálcio é vista por autores como Nyan et al como um possível novo substituto ósseo promissor, com características osteocondutora e osteoindutora (100, 106).

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, e não mais do que isso (31, 101). Porém, essa opinião encontra resistência entre outros autores como Jensen et al., 2005 (15), onde relatam que em algumas situações clínicas uma baixa taxa de substituição pode ser benéfica, especialmente quando a estrutura física do material de enxerto previne o colapso do tecido mole e mantém o aumento de volume por longo tempo . Nyan et al., 2007 (106); Nyan et al., 2009 (11) 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. Nos resultados deste estudo observou-se que quando a sinvastatina foi usada com uma esponja de colágeno, não houve diferença significativa com os controles, ao contrário do uso com carreador de fosfato de cálcio bifásico. Possivelmente, uma menor inflamação pela liberação lenta da sinvastatina poderia ser a resposta para a diferença estatística da neoformação óssea entre os dois tipos de carreadores.

Ao contrário do que sucede com outros fosfatos de cálcio bifásicos, Straumann® BoneCeramic não é uma simples mistura de hidroxiapatita e tricálcio fosfato, sendo esse um compósito sintetizado quimicamente e agrupado os dois compósitos em cada partícula, a fim de assegurar uma distribuição homogênea das duas fases na mesma partícula (119).

Outro aspecto observado neste estudo diz respeito aos resultados da quantidade de substituto ósseo remanescente observado em oito semanas. A histometria demonstrou 19,71% quando este era associado com 0,1mg de sinvastatina, e 18,17% quando não era associado com a sinvastatina. A

estatística não evidenciou diferenças significativas entre esses dois grupos, conforme descrito na tabela 6. Esses resultados divergem dos encontrados por Rojbani et al., 2011 (105). 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 entre as diferentes cerâmicas osteocondutoras. Como o BoneCeramic apresenta uma fase de rápida substituição pelo TCP, e outra de muito baixa pela HA, isso oferece capacidade de reparo ósseo, onde a estabilidade do volume aumentado é mantida graças à lenta absorção da hidroxiapatita, mas sem perder a degradação parcial para o crescimento osteoblástico, fator importante para a quimiotaxia celular e vascularização do enxerto.

Além disso, os resultados deste estudo demonstraram que o máximo de neoformação óssea foi observado nos defeitos tratados com Bone Ceramic combinado com 0,1mg de sinvastatina (BCS) dissolvida em 15µl de etanol, obtendo-se 12,71% de osso neoformado. O Bone Ceramic umedecido com 15µl de etanol sem sinvastatina (BC), resultou em 9.04% de novo osso formado. Essa diferença entre o BCS e o BC foi estatisticamente significativa. Ao contrário dos defeitos tratados com ECS x EC, que não foram estatisticamente diferentes, onde obteve-se 2,25% e 0,91% de osso novo formado, respectivamente. Outro dado importante foi que a análise estatística entre os grupos mostraram 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) foi superior ao CollaTape® (material colágeno) como carreador para a sinvastatina, na metodologia usada nesta pesquisa. A quantidade de osso formado quando o BC foi utilizado como carreador também foi muito superior quando comparado com a utilização da EC. Isto pode ser explicado, devido às diferenças na liberação da droga e/ou propriedades dos dois carreadores utilizados, ou talvez a concentração da

sinvastatina e a sua diluição em etanol, ou ainda a incapacidade da esponja de colágeno em manter o espaço pelo tempo necessário para a neoformação óssea. Apesar destas hipóteses, considerando as características físico-químicas anteriormente citadas, o BoneCeramic® por si só já é um material osseocondutor muito utilizado na prática clínica, atuando como matriz e mantenedor do espaço em defeitos ósseos. Portanto oferece o tempo necessário para o favorecimento da proliferação vascular e de osteoblastos. Ao contrário, a esponja de colágeno não exerce nenhuma influência na cicatrização óssea, e do ponto de vista clínico tem sido usada apenas como um hemostático sendo degradada entre 10 e 15 dias (35, 131, 132, 133, 134). Quando considerou-se os grupos que receberam a Sinvastatina, todos apresentaram uma neoformação óssea superior ao grupo controle (C), porém essa diferença não mostrou-se estatisticamente significativa entre os grupos Esponja Colágeno (EC) x Esponja Colágeno + Sinvastatina (ECS) x Controle (C).

Considerando ainda as observações histológicas, foi observado que a porção central dos defeitos do grupo controle, os quais não receberam qualquer tipo de tratamento, foi preenchida apenas com tecido conjuntivo fibroso. Resultados semelhantes foram descritos por Nyan et al., (2009) (11); Rojbani et al.,(2011) (105). Esses trabalhos também não observaram, após análise histológica dos resultados, neoformação óssea na porção central dos defeitos do grupo controle (sem tratamento). Foi encontrado 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 alguns autores (131, 132, 133, 134, 135), pois tem demonstrado favorecer a formação do tecido conjuntivo fibroso de forma acelerada, proporcionando maior espessura de tecido mole, podendo ser de interesse clínico em algumas circunstâncias. Além disso, remanescentes de partículas do fosfato de cálcio bifásico (BoneCeramic®) foram evidentes nos cortes centrais dos defeitos dos grupos 2 e 3 (BC e BCS). 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, células osteoblásticas alinhadas ao redor das partículas do fosfato de cálcio bifásico e ausência de células inflamatórias. Achados semelhantes também foram descritos nos estudos de Nyan et al., (2010) (100); Rojbani et al., (2011) (105).

Rojbani et al., (2011) (105) também encontraram maior quantidade de neoformação óssea quando associaram a Sinvastatina na concentração de 0,1 mg com um substitutos ósseos cerâmicos, também de origem aloplástica. Da mesma forma, os resultados deste estudo demonstraram maior quantidade de neoformação óssea nos grupos 2 e 3 (BC e BCS) comparados ao demais. Esses resultados permitem sugerir o uso da combinação de um substituto ósseo como o BoneCeramic, com a sinvastatina na concentração 0,1 mg, pois esta pode modular favoravelmente as características do material estimulando um reparo ósseo otimizando a cicatrização e a neoformação óssea. O carreador à base de fosfato de cálcio pode contribuir para uma liberação gradual da sinvastatina, que pode ser mantida pelo material osteocondutor no sítio do defeito, favorecendo os mecanismos de reparo como: angiogênese, quimiotaxia celular para migração e estimulação de células indiferenciadas, além da possibilidade de potencializar a expressão de fatores de crescimento tecidual.

Conforme descrito na revisão da literatura deste estudo, acredita-se que as estatinas, em especial a Sinvastatina, podem induzir uma maior proliferação de osteoblastos por estes mecanismos acima citados, e consequentemente promover uma maior formação óssea (25, 52, 75, 81, 105, 112). Esses mecanismos podem possivelmente explicar, nos cortes histológicos dos defeitos tratados no grupo 3 (BCS), a presença de várias camadas de osteoblastos na superfície do material enxertado. Pode-se observar esses achados tanto na coloração HE, quanto nas observações com Tricrômio de Massom e Picrossirius red.

O colágeno é a maior classe de proteína fibrosa insolúvel encontrada na matriz extracelular e nos tecidos conjuntivos. É uma família de proteínas

relacionadas, geneticamente diferentes, cuja principal função é estrutural. Apesar de existirem mais de 18 tipos, os colágenos tipo I, II e III são os mais abundantes no organismo. O tipo I está presente na pele, tendão e osso; o tipo II, em cartilagem e humor vítreo; e o tipo III, em pele e músculos (146, 147).

Diferentes tipos celulares podem sintetizar colágeno, dependendo de cada tecido. O colágeno tipo I é o principal produto de secreção do osteoblasto, célula responsável pela síntese da matriz óssea orgânica. Cerca de 90% da matriz extracelular óssea é constituída por colágeno tipo I, e os 10% restantes por proteínas não colágenas, como a osteocalcina, osteonectina, e outras como fatores de crescimento (146).

A coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) é a técnica mais utilizada na coloração dos tecidos devido à sua simplicidade, e a sua capacidade de permitir visualizar uma grande quantidade diferente de estruturas teciduais. A hematoxilina cora de azul os núcleos, apresentando por vezes, até alguns detalhes intranucleares. A eosina cora o citoplasma das células e a maioria das fibras do tecido conjuntivo de forma e intensidade diferentes, variando do rosa ao laranja ou vermelho. Para melhor visualizar diferentes estruturas, que naturalmente ou patologicamente podem existir, muitas vezes se torna necessário utilizar corantes específicos. No caso do osso, para detalhar as características qualitativas do tecido, a coloração com HE torna-se limitada. Nestes casos, técnicas que são utilizadas para a coloração do tecido conjuntivo, dentre estes o tecido ósseo, fundamentadas na histoarquitetura do colágeno como as tricrômicas e Picrosirius com polarização, tem contribuído significativamente para identificação e compreensão da organização e metabolismo do colágeno (145,147, 148, 149,150).

As técnicas Tricrômicas permitem seletivamente evidenciar o músculo, fibras de colágeno, fibrina e eritrócitos, e podem caracterizar os diferentes tecidos conjuntivos, inclusive osso, em razão de derivados peptídeos que tem afinidade a colorações ácidas em diferentes níveis (146,147). Como o tecido ósseo pelas suas características pode apresentar diferentes níveis de maturação e mineralização, tem sido recomendado se lançar mão dessas

colorações como o Tricrômio de Masson e o Tricrômio de Goldner, respectivamente, para estudar tais aspectos (145). Na coloração Tricrômio de Masson o colágeno no osso é corado de azul e o tecido osteóide de vermelho (150). Nos resultados demonstrados na análise histológica descritiva das lâminas coradas com Tricrômio de Masson, pode-se observar ao redor das partículas de BoneCeramic a presença de tecido com características de tecido osteóide imaturo (vermelho), entremeado em fibras de coloração azul com características compatíveis com colágeno organizado de tecido ósseo.

As técnicas de colorações de luz polarizada podem ser mais efetivas para identificação positiva de colágeno que as colorações de colágeno sobre microscopia de luz convencionais. Sirius red, ou também chamado Picrosirius red, que rotineiramente é usado para identificar amilóides, é uma excelente coloração para visualizar fibras colágenas (150). A especificidade do método é baseada na presença de aminoácidos básicos nas moléculas do colágeno que reagem fortemente com o corante ácido (sírius-red). Essa reação aumenta a birrefringência normal do colágeno, composto por moléculas agregadas. A diferenciação dos tipos do colágeno também é possível, sendo o tipo I fortemente birrefringente, fibras espessas amarelas ou vermelhas; tipo III pouco birrefringentes, esverdeados e o tipo II ainda menos refringentes (149,151,152). Neste estudo a análise descritiva das lâminas coradas com picrosirius-red e analisadas sob luz polarizada, evidenciou a presença de fibras organizadas ao redor das partículas de BoneCeramic fortemente coradas em vermelho e amarelo, características associadas ao colágeno Tipo I, já citado anteriormente como principal produto secretado pelos osteoblastos, formando 90% da matriz extracelular do tecido ósseo.

Desse modo pode-se sugerir pela interpretação da análise histológica com HE, Tricrômio de Masson e Picrosirius red que houve maior maturação e crescimento celular de tecido fortemente indicativo para a neoformação óssea.

9 CONCLUSÃO

Diante dos resultados do presente estudo pode-se concluir que :

- a) A utilização local da Sinvastatina demonstrou ser positiva para melhorar a neoformação óssea em defeitos na calvária de ratos, quando associado ao fosfato de cálcio bifásico BoneCeramic®, comparativamente ao uso isolado.
- b) A associação do fosfato de cálcio bifásico BoneCeramic (BC) com a Sinvastatina apresentou resultado superior para neoformação óssea, quando comparado a utilização apenas do fosfato de cálcio bifásico BoneCeramic isoladamente.
- c) O fosfato de cálcio bifásico BoneCeramic® (BC) se apresentou como melhor carreador para a Sinvastatina, quando comparado à esponja de colágeno Colla Tape (EC)

10 REFERÊNCIAS

1. Pietrokovski J, Massler M. Alveolar ridge resorption following tooth extraction. *J Prosthet Dentistry* 1967; (17): 21-7.
2. Amler, M H. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1969; (27): 309 – 18.
3. 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.
4. Araújo MG, Lindhe J. Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *J. Clin. Periodontol.*, 2005;32(2):212-18.
5. 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.
6. Liu C, Wu Z, Sun H. Effect of Simvastatin on mRNA Expression of Transforming Growth Factor- β 1, Bone Morphogenetic Protein-2 and Vascular Endothelial Growth Factor in Tooth Extraction Socket. *Int J Oral Sci.* 2009;1(2):90-8.
7. Crespi R, Capparè P, Gherlone E. Magnesium-enriched hydroxiapatite compared to calcium sulfate in the healing of human extraction sockets: radiographic and histomophormetric evaluation at three months. *J. Periodontol.*, 2009;80(2):210-18.
8. Garret S. Periodontol Regeneration around natural teeth. *Ann Periodontol* 1996;1:626-30.
9. 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.

10. Francetti L, Del Fabbro M, Basso M, Testori T, Weinstein 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.
11. 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.
12. Chou J, Ito T, Otsuka M, Ben-Nissan B, Milthorpe B. Controlled Release of Simvastatin from Biomimetic β -TCP Drug Delivery System. *PLoS One*. 2013;8(1) e54676.
13. Veis A, Tsirlis T, Parisi 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.
14. 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].
15. Jensen SS, Brogini N, Hjrting-Hansen E, Schenk R. & Buser D. Bone Healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and β -tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in mandibles of minipigs. *Clin. Oral Impl. Res*. 2006;17:237-43.
16. Glimcher MJ. Comparison, structure and organization of bone and other mineralized tissues and the mechanism of calcification. *American Physiological Society* 1976; (7): 25–48
17. Urist MR. Bone. Formation by autoinduction. *Science*. 1965;150:893.
18. 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.

19. Masters DH. Implants. Bone and bone substitutes. *CDA J.* 1988;16(1): 56-65.
20. Boyne PJ, James RA. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *J. Oral Surg.* 1980;38(8):613-16.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.

28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. Sondergaard TE, Pedersen PT, Andersen TL, S e K, Lund T,  stergaard B, Garnero P, Delaisse J-M, Plesner T. Sondergaard, TE, Pedersen, PT, Andersen, TL, S e K, Lund T,  stergaard 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
35. 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.
 36. 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.
 37. 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.
 38. 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.
 39. Yamashita M, Otsuka F, Mukai T, et al. Simvastatin antagonizes tumor necrosis factor- α 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.
 40. 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.
 41. 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).
 42. 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.
43. 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.
44. 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 α expression and uterine wet weight in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab*. 2011;29(4): 396-403.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.

50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. Jadhav SB, & Jain GK.. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 2006;58(1):3-18.

59. 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.
60. 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.
61. Edwards, C. J., & Spector, T. D.. Statins as modulators of bone formation. *Arthritis research.* 2002;4(3):151-53.
62. 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 N(3):84-9.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.

67. Kastelein JJ, & Bots ML. Statin therapy with ezetimibe or niacin in high-risk patients. *N Engl J Med*. 2009;361(22):2180-3.
68. 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.
69. 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.
70. Elavarasu S, Suthanthiran TK, & Naveen D. Statins: A new era in local drug delivery. *J Pharm Bioallied Sci*. 2012;4(Suppl 2):248-51.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. 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.

75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. Maron D, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation* 2000; 101:207-13.
81. 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.
82. 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.

83. 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.
84. Zhang FL, Casey PJ. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annual review of biochemistry.* 1996;65(1): 241-69.
85. 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.
86. 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.
87. 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.
88. 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 Trail. *JAMA.* 1998;208:2077-82.
89. 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.
90. 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.

91. Garrett IR, & Mundy GR. The role of statins as potential targets for bone formation. *Arthritis research*. 2002;4(4):237-40.
92. 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.
93. 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.
94. Park JB. The use of simvastatin in bone regeneration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009;1;14(9):485-8.
95. 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.
96. Landim KT, Junqueira JC, da Rocha RF. Influência da simvastatina na reparação óssea de mandíbulas de ratas. *Brazilian Dental Science*. 2010;5(1).
97. 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.
98. Chissas D, Stamatopoulos G, Verettas D, Kazakos K, Papalois A, Agrogiannis G, Papaeliou A, Agapitos E, Balanika A, Papadopoulou E, Anastopoulos G, Ntagiopoulou PG, Asimakopoulos A. Can low doses of simvastatin enhance fracture healing? An experimental study in rabbits. *Injury*. 2010;41(7):687-92.
99. 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.

100. 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.
101. 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.
102. 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].
103. Lima CEVC. Influência da associação entre simvastatina e matriz óssea bovina desmineralizada na reparação óssea em ratos. *Braz. Res orais.* 2011;25(1).
104. 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.
105. Rojbani H, Nyan M, Ohya K, Kasugai S. Evaluation of the osteoconductivity of α -tricalcium phosphate, β -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. *J Biomed Mater Res A.* 2011;15;98(4):488- 98.
106. 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.
107. 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.

108. 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.
109. 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.
110. 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.
111. 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.
112. Hwang R, Lee EJ, Kim MH, Li SZ, Jin YJ, Rhee Y, ... & Lim SK. Calcyclin, a Ca²⁺ ion-binding protein, contributes to the anabolic effects of simvastatin on bone. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(20):21239-47.
113. 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.
114. 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.
115. 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.
116. 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.
117. 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.)
118. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1983;16:109-10
119. 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.
120. Zimmer Dental Inc: Returns Department 1900 Aston Avenue Carlsbad, CA 92008 <http://www.dentalglam.com/public/files/zimmer_Regenerative_Products.pdf> Acessado em 24/11/2013.
121. 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.
122. 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.
123. Kolambkar YM, Dupont KM, Boerckel JD, Huebsch N, Mooney DJ, Huttmacher DW, Gulberg 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.

124. 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.
125. 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.
126. 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.
127. 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.
128. 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.
129. Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann BoneCeramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 2008;(19):796–803.
130. 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.

131. 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.
132. 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.
133. Roussille G, Barthet B, Serrano P. The use of a resorbable biological matrix in periodontal surgery: clinical observations of 230 cases. *Revue d'odonto- stomatologie*. 1990;20(2):129-38.
134. Witherspoon DE, & Gutmann JL. (1996). Haemostasis in periradicular surgery. *International endodontic journal*. 1996;29(3):135-49.
135. 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).
136. 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.
137. 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.
138. 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.

139. 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.
140. 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.
141. 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.
142. Yan WZ, Zhou DL, Yin SY, Yin GF., Gao LD. & Zhang Y. Osteogenesis capacity of a novel BMP/ α -TCP bioactive composite bone cement. *Journal of Wuhan University of Technology – Materials Science*. 2004;19:30-4.
143. 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.
144. 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 α -tricalcium phosphate scaffold. *J. Biomed. Mater. Res*. 2006;77(A):700-6.
145. Pires, MA, Travassos SF, Gärtner F. *Atlas de Patologia Veterinária*. Lidel; Porto; 2004; 157-71
146. Vargas DM, Audí L, Carrascosa A. Peptídeos derivados do colágeno: novos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. *Rev. Ass. Med. Brasil*, 1997; 43(4): 367-70
147. Triffit JT. The special proteins of bone tissue. *Clin. Sci*. 1987; 72: 399-408

148. Carneiro CG, Sennes LU, Saldiva PHN, Tsuji DH, Ximenes Filho JA . Avaliação da deposição de colágeno após implante de fascia lata e de gordura na prega vocal de Coelho: Estudo histomorfométrico. Rev. Bras. Otorrinolaringol. 2005; 71 (6): 798-02

149. Junqueira LCU, Montes GS, Sanches EM. The influence of Thickness on the study of collagen by the Picrosirius-Polarization method. Histochemistry; 1982, 74 : 153-156.

150. Bancroft JD, Gamble M. Bone: In Theory and Practice Histological Techniques. 6 ed. Churchill Livingstone; 2007

151. Montes GS, Junqueira LCU. The use of the Picrosirius-Polarization method for the study of biopathology of collagen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1991; 86: 1-11

152. Vidal BC, Mello ML, Pimentel ER. Polarization Microscopy and Microspectrophotometry of Sirius Red, Picrosirius and Chlorantine Fast Red Aggregates and their complexes with Collagen. Histochemical J. ; 1982; 14: 857-878

ANEXOS

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

Anexo B: Artigo publicado - Simvastatin and biphasic calcium phosphate affects bone formation in critical-sized rat calvarial defects. Santana WM, Sousa DN, Ferreira VM, Duarte WR. *Acta Cir Bras* ; 2016 , 31(5):300-317