

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ
Carlos Eugenio Villaboim De Castro Lima

**INFLUÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO DA SINVASTATINA À
MATRIZ DE OSSO DESMINERALIZADO BOVINO NA
REPARAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS EM CALVÁRIA DE
RATOS**

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

Área de Concentração: Prótese Dentária
Orientadora: Profa. Dra. Ana Lia Anbinder

Taubaté
2008

CARLOS EUGENIO VILLOBOIM DE CASTRO LIMA

**INFLUÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO DA SINVASTATINA À MATRIZ DE OSSO
DESMINERALIZADO BOVINO NA REPARAÇÃO DE DEFEITOS ÓSSEOS EM
CALVÁRIA DE RATOS**

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

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____, Universidade de Taubaté

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____, Universidade _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____, Universidade _____

Assinatura: _____

Aos meus pais, não apenas por terem me trazido ao mundo, mas principalmente por todo o amor a mim confiado e pelos valores ensinados, sem os quais nada do que sou ou fiz seria desta forma.

À minha esposa que me acompanhou e me incentivou durante todo este período de árduo trabalho, mesmo nos momentos em estive ausente e principalmente naqueles em que precisei de apoio para não desistir. Tendo ela mesma participado ativamente da realização deste estudo ajudando nas cirurgias e na digitação do texto.

AGRADECIMENTOS

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

À Profa. Dra. Ana Lia Anbinder, pela orientação e tranqüilidade passada durante todo o trabalho, além da incansável participação em todas as etapas dos experimentos.

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

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

À Profa. Dra. Ana Julia Urias Santos, Diretora do Instituto Básico de Biociências.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Sabrosa, amigo de longa data, colega de turma, mestre e grande incentivador, pela sessão de seus equipamentos, que muito ajudaram na realização deste trabalho.

A todos os professores do curso de pós graduação da UNITAU, pelos ensinamentos a mim passados.

Ao meu colega de turma, Frederico Emygdio Cabral de Vasconcellos, pela paciência em ensinar assuntos além do meu domínio e pelo apoio nas horas de dificuldade pelas quais passamos no decorrer deste período.

Ao meu colega de turma Jimmy Cavalcanti Calixto, por todos os momentos bons e ruins pelos quais passamos nestes quase dois anos de convívio e pela ajuda fundamental durante todo trabalho.

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

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

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

A Equipe do Curso de Especialização em Prótese Dentária da Universidade Veiga de Almeida, que durante minha ausência fizeram com que o curso seguisse normalmente.

Aos alunos Lílian Frederico, João Gabriel Azarias Lara, João Guilherme Arantes e Flávio Monteiro, pela fundamental ajuda nas cirurgias, no período de observação, na morte dos animais

Aos animais experimentais, que deram suas vidas pelo bem da ciência.

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

RESUMO

A reparação de defeitos ósseos é uma preocupação constante em diversas áreas da odontologia. Vários materiais são usados com a finalidade de ajudar e acelerar esta reparação, tais como enxertos autógenos, xenógenos, membranas e alguns medicamentos, assim como a associação de alguns destes métodos. A sinvastatina, medicamento utilizado para redução de colesterol, em alguns estudos, tem demonstrado ação na estimulação de formação óssea. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da associação da sinvastatina à matriz desmineralizada de osso bovino na reparação de defeitos ósseos em calvária de ratos. Foram confeccionados defeitos ósseos na calvária de 48 ratos, sendo um defeito 5mm de diâmetro em cada parietal do animal. Os ratos foram divididos em três grupos de acordo com o material utilizado: grupo controle, que não recebeu nenhum tipo de substância, grupo sinvastatina-matriz óssea desmineralizada, que recebeu uma associação de sinvastatina e matriz desmineralizada de osso bovino e grupo matriz óssea desmineralizada que recebeu somente matriz desmineralizada de osso bovino como material de enxertia. Os sacrifícios foram realizados após trinta e sessenta dias. Após o sacrifício as calvárias foram radiografadas em aparelho de raios-X digital para análise de densidade radiográfica em tons de cinza e foram submetidas à preparação histológica de rotina, para posterior análise histológica descritiva e histométrica da área de matriz óssea neoformada, utilizando-se programa computacional para análise de imagens. Os dados submetidos à análise estatística ANOVA a 5% demonstraram que os animais que receberam a associação de sinvastatina-MODB apresentaram, na análise histométrica a menor área de neoformação e na análise radiográfica a menor densidade óssea. Concluiu-se, de acordo com a metodologia utilizada, que a associação sinvastatina-MODB influenciou negativamente o reparo ósseo.

Palavras-chave: Defeito ósseo. Matriz desmineralizada de osso bovino. Sinvastatina. Análise histológica.

ABSTRACT

Bone defect healing is a constant concern to several areas of Dentistry. A great variety of materials is currently used to help in the healing process as well as to speed it up. Materials such as autografts, xenografts, membranes, some drugs, and the association of some of them are being used. Simvastatin, a substance used to reduce cholesterol levels, has shown, in some studies, a capacity to stimulate bone formation. The purpose of the present experimental study is to evaluate the influence of the association of simvastatin with bovine demineralized bone matrix on the healing of bone defects in rats' calvariae. Bone defects were produced in the calvariae of 48 rats, thus each animal had a defect in each parietal bone measuring 5mm of diameter. The rats were grouped according to the graft material used: the control group which didn't receive any substance; the simvastatin-demineralized bone matrix group which received an association of simvastatin and bovine demineralized bone matrix; and the demineralized bone matrix group which received bovine demineralized bone matrix. The animals were sacrificed after thirty or sixty days. After the sacrifices, digital radiographies were taken of the calvariae in order to analyse the radiographic density in shades of gray. They were also submitted to routine histological preparation for future descriptive histological and histomorfometric analyses of the new formed bone matrix through the use of a software to analyse the images. The data submitted to statistical analysis ANOVA (5%) showed that the animals which received the association simvastatin-demineralized bone matrix presented the smallest density and area of new bone formation of the three groups. According to the methodology used, we concluded that the association simvastatin-demineralized bone matrix influenced negatively the bone healing.

Key-words: Bone defect. Bovine demineralized bone matrix. Simvastatin. Histological analysis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - análise de variância

BMP - proteína morfogenética óssea

COBEA - colégio brasileiro de experimentação animal

COX - cicloxigenase

DBBG - osso bovino desproteinado granulado

DBX - matriz óssea desmineralizada com ácido hialurônico

DFDBA - osso desmineralizado congelado à vácuo

E 2 - estrogênio

HA – hidroxiapatita

HE - hematoxilina eosina

MOD - matriz óssea desmineralizada

MODB - matriz de osso desmineralizado bovino

MODB-SIN - associação de matriz de osso desmineralizado bovino e sinvastatina

NS - não significativo estatisticamente

OVX - ovariectomia

PDS - polydioxanone

PHA - hidroxiapatita porosa

PLA - membrana polilática

PTH - paratormônio

Rh BMP - proteína morfogenética óssea recombinante humana

RX - raios X

S - estatisticamente significativo

SIN - sinvastatina

SHAM - falso operado

TC - tomografia computadorizada

TCP - fosfato tricálcico

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 MATERIAIS PARA REPARAÇÃO ÓSSEA	13
2.2 SINVASTATINA	26
2.3 ESTATINA ASSOCIADA À MATRIZ ÓSSEA DESMINERALIZADA	33
3 PROPOSIÇÃO	34
4 MÉTODO	35
4.1 ANIMAIS	35
4.2 REALIZAÇÃO DOS DEFEITOS ÓSSEOS	35
4.3 PREPARAÇÃO DO MEDICAMENTO	36
4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS	37
4.5 SACRIFÍCIO	37
4.6 DENSITOMETRIA RADIOGRÁFICA	39
4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMÉTRICA	40
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5 RESULTADOS	44
5.1 ANÁLISE RADIOGRÁFICA	44
5.1.1 Tempo de Trinta Dias	45
5.1.2 Tempo de Sessenta Dias	46
5.1.3 Tempo de Trinta e Sessenta Dias	47
5.2 ANÁLISE HISTOMÉTRICA	47
5.2.1 Tempo de Trinta Dias	48
5.2.2 Tempo de Sessenta Dias	49
5.2.3 Tempo de Trinta e Sessenta Dias	50
5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA	51
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS	65
ANEXO	70

1 INTRODUÇÃO

A reparação de defeitos ósseos e a utilização de enxertos são uma preocupação constante na odontologia, principalmente em áreas como periodontia, cirurgia bucomaxilofacial, prótese e implantodontia. Para tanto, são comumente usados diversos materiais como osso autógeno, membranas, hidroxiapatita, e matriz desmineralizada de osso bovino (MODB)(KARABUDA et al., 2001; RICHARDSON et al., 1999).

O uso de osso autógeno como enxerto é o meio mais largamente difundido, devido ao seu superior potencial osteogênico, pela abundante presença de células osteogênicas mesenquimais no enxerto e a facilidade de incorporação ao osso hospedeiro. Entretanto duas desvantagens são notadas. Primeiro, a necessidade de uma cirurgia adicional para a obtenção do osso a ser enxertado, o que muitas vezes leva a morbidade do sítio doador; segundo, pode existir necessidade de maior quantidade de osso do que a área doadora pode oferecer. Por este motivo diversos autores começaram a pesquisar materiais alternativos que pudessem substituí-lo (INODA; YAMAMOTO; HATTORI, 2007; MATSUSHITA et al., 2006).

A matriz óssea desmineralizada (MOD) é comumente utilizada como enxerto devido a presença de proteínas osseoindutoras, o que proporciona a este material a capacidade de estimular a neoformação óssea (WANG J.C. et al., 2007).

A associação de substâncias químicas, medicamentos ou fatores sanguíneos aos materiais utilizados para enxertos tem sido feita, com diferentes graus de sucesso, na tentativa de melhorar a performance destes biomateriais e diminuir o tempo em que se possa atuar na área enxertada, possibilitando desta forma

devolver ao paciente sua função e estética com maior presteza (WONG; RABIE, 2003; MANNAI, 2006)

As estatinas (inibidores da enzima 3-hidroxi 3 metilglutaril coenzima A reductase), como por exemplo a sinvastatina, são medicamentos largamente utilizados para a redução do colesterol, porém foi observada uma indução de formação óssea tanto em culturas de tecido, quanto em ratos e camundongos (MUNDY et al., 1999), fato que despertou enorme interesse na comunidade científica, pela possibilidade destas poderem ser utilizadas em patologias ósseas.

Com base no acima descrito o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da associação da sinvastatina a MODB na reparação de defeitos ósseos em calvária de ratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MATERIAIS PARA REPARAÇÃO ÓSSEA

Jazayeri et al. (1994) compararam alguns sistemas carreadores para MOD. Para isto confeccionaram defeitos de 9 x 9mm em calvárias de cinquenta ratos machos. Os materiais utilizados foram polydioxanone (PDS) (Ethicon Inc., Sommerville, NJ); polietileno poroso (Medpor) (Porex Surgical, College Park, GA); celulose oxidada regenerada (Surgicel) (Johnson & Johnson Products, Inc., New Brunswick, NJ); e esponja de gelatina absorvível (Gelfoam) (The Upjohn Company, Kalamazoo, MI) Os animais foram divididos em cinco grupos de acordo com o material utilizado, cada um com dez animais: grupo 1, recebeu MOD com Surgicel; grupo 2, MOD com PDS; grupo 3, MOD com Medpor; grupo 4, MOD com Gelfoam e grupo 5, apenas MOD e foram mortos após dois meses. Os resultados mostraram neoformação em todos os grupos, com apenas uma pequena área de 0,5mm x 0,5mm de tecido mole na região central do defeito, excetuando-se o grupo 4 onde não houve formação óssea. Os autores concluíram que apenas Gelfoam não foi efetivo como sistema carreador.

Froum et al. (1998) avaliaram o uso de matriz inorgânica de osso bovino associada ou não a osso autógeno. Os autores estudaram 113 casos de elevações de seio maxilar onde foram usados matriz inorgânica de osso bovino sozinha, associada a osso autógeno e a osso desmineralizado congelado a vácuo (DFDBA). Após o período de cicatrização óssea (seis a nove meses), foram feitas biópsias

ósseas nas regiões que receberam os enxertos e o material removido foi submetido à análise histomorfométrica. Os autores realizaram também análise radiográfica. Concluíram que a matriz inorgânica de osso bovino foi efetiva em 98,2% dos casos e que sua performance e neoformação óssea melhoravam moderadamente quando associada a osso DFDBA e melhorava acentuadamente quando associada a osso autógeno.

Richardson et al. (1999) compararam um derivado bovino xenógeno (DBX) Bio-Oss (Giestlich, Zurich, Switzerland) e DFDBA em defeitos infraósseos periodontais em humanos. Foram tratados 17 pacientes saudáveis com periodontite de moderada a severa. Foram selecionados trinta defeitos que foram tratados aleatoriamente com DBX ou DFDBA. As medições dos defeitos de tecidos moles e ósseos foram feitas no dia da cirurgia e seis meses depois. Os resultados mostraram que 26 defeitos responderam significativamente ao tratamento, enquanto em quatro defeitos não houve resposta. Não foram notadas diferenças estatísticas entre materiais.

Wang e Glimcher (1999) estudaram a osteogênese e as diferenças da resposta celular à MOD enxertadas em calvárias e subcutaneamente em ratos. Para isto utilizaram MOD de ratos e bovina, que foram enxertadas em defeitos ósseos de 8 mm nas calvárias ou subcutaneamente no tórax dos ratos. Os animais foram mortos do dia dois ao 12 e nos dias 14, 21 e 28 para análises morfológicas e nos dias dois, cinco, sete, dez, 14 e 21 para análises bioquímicas. Foram avaliados seis animais a cada dia de morte. Os resultados mostraram que nos defeitos subcutâneos houve formação de células cartilaginosas pelos dez primeiros dias, que foram reabsorvidas e substituídas por osso subseqüentemente. Já nos defeitos das calvárias em que se utilizou MOD de ratos, osteoblastos apareceram a partir do

terceiro dia, seguidos rapidamente da formação de matriz óssea e calcificação até o 21º dia, quando não se observou mais cartilagem. Nos animais em que se utilizou MODB, a seqüência foi semelhante, porém mais lenta e com menor quantidade de osso ao final, sendo que aos 28 dias ainda se observavam pequenas porções de cartilagem. Observaram ainda que a formação óssea subcutânea foi bastante menor que em calvárias. Os autores concluíram que a indução de formação óssea é diferente em sítios subcutâneos e calvárias.

Herculiani et al. (2000) avaliaram o tratamento de defeito ósseo em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a MODB. Para isto foram confeccionados defeitos de 12mm de diâmetro em calvária de 37 cobaias. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais com 15 animais cada, um grupo controle com cinco animais e um grupo zero hora, com dois animais. Os grupos experimentais foram subdivididos em três, de acordo com o tempo de sacrifício de um, três ou seis meses após as cirurgias. As lesões do grupo I foram preenchidas com coágulo sangüíneo e recobertas com membrana. O grupo II teve seus defeitos preenchidos por MODB aglutinada com coágulo e recobertos com membrana. O grupo controle e o 0 hora não receberam tratamento, sendo que o sacrifício do controle foi aos seis meses e o do 0 hora, imediatamente após as cirurgias. Foram realizadas análises radiográfica e histológica, onde foi observado que em ambos os grupos experimentais houve maior formação óssea do que no grupo controle, chegando aos seis meses com 52% (grupo I) e 62% (grupo II) das lesões preenchidas por osso. O grupo II ainda apresentava áreas de reabsorção da MODB. Os autores concluíram que o enxerto de MODB sofre reabsorção e promove formação de ilhas de osso no interior da lesão e o enxerto de MODB associado a

membrana auxilia na manutenção do espaço da lesão, aumentando o efeito osteogênico na região.

Karabuda et al. (2001) avaliaram clínica e histologicamente três tipos de materiais para enxerto em elevações de seio maxilar. Utilizaram osso bovino desproteinado granulado (DBBG), pó de DFDBA, e hidroxiapatita porosa (PHA). Foram realizados 19 implantes em oito pacientes, três pacientes foram tratados em dois estágios: um para a elevação de seio e outro para a colocação dos implantes, momento no qual foi feita a coleta do material para avaliação. Os casos restantes foram realizados em um estágio apenas, sendo a colocação dos implantes concomitantemente à elevação de seio. As biópsias ósseas foram realizadas no momento da reabertura dos implantes. Após seis meses de cicatrização foram confeccionadas próteses fixas sobre os implantes. Todos os implantes obtiveram sucesso, porém no grupo em que se utilizou DFDBA, houve maior formação óssea (70 a 75%) do que no DBBG (50%) e no PHA (20 a 35%). Os autores chegaram à conclusão de que DFDBA reabsorve mais cedo do que PHA e DBBG.

Braz et al. (2003) avaliaram o emprego de MODB e hidroxiapatita (HA) no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. Para isto utilizaram vinte ratos, nas calvárias dos quais foram confeccionados defeitos de 5mm de diâmetro. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo I onde os defeitos foram preenchidos com uma associação de MODB e HA e grupo II onde nada foi empregado. Os animais foram mortos aos trinta e sessenta dias após as cirurgias e foi feita análise histológica. Os resultados analisados estatisticamente mostraram diferenças significativas entre os grupos tanto aos trinta, quanto aos sessenta dias. Aos trinta dias, no grupo I já havia grande quantidade de osteoblastos e aparecimento de cartilagem, enquanto no grupo II ainda havia osteoclastos e ocorria reabsorção

óssea. Aos sessenta dias, os ratos somente do grupo I apresentaram osso mineralizado e o defeito quase totalmente reparado. Os autores concluíram que a combinação de MODB e HA favoreceu a formação óssea.

Mardas et al. (2003) avaliaram a influência da MOD na formação óssea na regeneração tecidual guiada. Os autores utilizaram trinta ratos machos, nos ramos das mandíbulas dos quais foram implantadas cápsulas de teflon com 5mm de diâmetro preenchidas com MOD de um lado e sem preenchimento no lado oposto. Os animais foram divididos em três grupos de dez animais cada, de acordo com o tempo de sacrifício de 15, trinta e 120 dias. Os resultados das análises histológicas mostraram que houve formação óssea tanto no grupo experimental quanto no grupo controle, sem diferença estatística entre eles, porém o osso neoformado do grupo experimental pareceu mais denso aos 120 dias. Os autores concluíram então que a MOD usada como coadjuvante na regeneração tecidual guiada não influencia na neoformação óssea, porém melhora a densidade do osso neoformado.

Marins et al. (2004) avaliaram a reparação de defeitos ósseos em calvárias de ratos, utilizando enxerto em bloco de MODB. Para isto utilizaram 25 ratos nos quais foram confeccionados defeitos de 8mm de diâmetro, que foram divididos em dois grupos, grupo experimental com 15 animais, cujos defeitos foram preenchidos com blocos de MODB (Gen-ox, Baumer SA, Brasil) e grupo controle com dez animais, cujos defeitos foram preenchidos apenas com coágulo. Os animais do grupo experimental foram mortos após um, três e seis meses e os do grupo controle, imediatamente e seis meses após as cirurgias. Os resultados das análises radiográficas e histológicas mostraram que o material foi lentamente reabsorvido e serviu como preenchedor de espaço, favorecendo a angiogênese, migração e adesão celular, e a neoformação óssea a partir das bordas dos defeitos. Porém, em

alguns animais do grupo tratado, houve reação granulomatosa que impediu a neoformação óssea. Os autores concluíram que com aperfeiçoamentos o material pode tornar-se uma boa alternativa para a reparação óssea devido a sua alta capacidade osseocondutora.

Moghadam et al. (2004) avaliaram histomorfometricamente a regeneração óssea utilizando materiais alógenos e aloplásticos. Para isto utilizaram trinta coelhos machos adultos que foram divididos em três grupos com dez animais cada, de acordo com o tipo de material utilizado. Foram confeccionados defeitos de 15mm de diâmetro nos ossos parietais dos animais que foram preenchidos da seguinte forma. Grupo I, MOD em um defeito e no outro não foi colocado nenhum material; grupo II MOD em um defeito e MOD com hidróxido de cálcio no defeito contra lateral e grupo III onde foram testados dois tipos de cimento fosfato de cálcio, Norian CRS (Norian Corp., Cupertino, CA) em um defeito e Bone Source (Howmedica Leibinger, Dallas, TX) no outro. Cinco animais de cada grupo foram sacrificados em seis semanas, e outros cinco em doze semanas. Os resultados mostraram que os defeitos tratados com MOD apresentaram mais formação óssea em doze semanas do que em todos os outros grupos, porém sem diferença estatística significativa em relação ao grupo MOD hidróxido de cálcio. Os demais grupos não diferiram do grupo onde os defeitos foram deixados vazios, que não apresentaram neoformação óssea. Os autores concluíram que a MOD é um material efetivo para estimular a reparação óssea e que a adição de hidróxido de cálcio não altera sua performance, enquanto os demais materiais não promoveram reparação óssea.

Colnot et al. (2005) avaliaram os mecanismos de ação da MOD na reparação de defeitos ósseos corticais. Para isto utilizaram uma associação de MOD com ácido hialurônico (DBX) em camundongos adultos com três a cinco meses de idade, nas

tíbias dos quais foram confeccionados defeitos de 1mm de diâmetro. Os animais foram divididos em três grupos: grupo 1, onde os defeitos foram preenchidos com DBX; grupo 2, onde os defeitos foram preenchidos com DBX desnaturada, desnaturação que teve como objetivo inativar as propriedades osseointegradoras da DBX, e grupo 3 onde os defeitos foram preenchidos com matriz de colágeno. Os animais foram sacrificados aos três, cinco, sete, dez, 14, 21 ou 28 dias. Os resultados das análises histológicas mostraram que a DBX melhora a reparação óssea por indução da deposição precoce de matriz osteogênica e por servir de arcabouço para a adesão dos osteoblastos, além de ser efetivamente reabsorvida durante a reparação óssea, o que é muito importante no processo de formação e mineralização óssea.

Acarturk e Hollinger (2006) estudaram a MOD, associada a diversos carreadores ou isoladamente. Os materiais utilizados foram os seguintes: DBX preparada pela Musculoskeletal Transplant Foundation combinada com hialuronato (Synthes USA, West Chester, Pa.); rede de Poly (DL- lactide) (Synthes USA, West Chester, Pa.); DBX associada a rede de Poly (DL-lactide) (Synthes USA, West Chester, Pa.); MOD de osso humano preparada pela Musculoskeletal Transplant Foundation (Jessup, Pa.); Grafton, MOD de osso humano preparada pela Musculoskeletal Transplant Foundation com carreador glicerol (Osteotech, Eatontown, N.J.); Regenafil: MOD de osso humano com gelatina (Regeneration Technologies, Inc., Alachua, Fla.); Dynagraft, MOD de osso humano com um carreador poloxamer (Gensci Regeneration Sciences, Inc., Toronto, Ontário, Canadá); Allomatrix, MOD de osso humano com um carreador de sulfato de cálcio (Wright Medical Technology, Inc., Arlington, Tenn.). Foram confeccionados defeitos de 8mm de diâmetro em calvária de 144 ratos adultos, que foram divididos em oito

grupos de acordo com o tipo de material utilizado, e subdivididos em três grupos de acordo com o tempo de sacrifício que foram definidos em duas, quatro e oito semanas. Após os sacrifícios as calvárias foram descalcificadas e analisadas histológica e histomorfometricamente. Os resultados analisados estatisticamente mostraram que Allomatrix, Dynagraft, Regenafil e rede de Poly (DL-lactide) apresentaram menos formação óssea que MOD, Grafton, DBX com hialuronato e DBX com rede de Poly (DL-lactide). Dentre os grupos que apresentaram maior formação óssea não houve diferença estatística, o mesmo valendo para os que se enquadraram nos de menor formação óssea.

Develioğlu et al. (2006) avaliaram o efeito da cerâmica bifásica na resposta óssea em defeitos em calvárias de ratos. Para tanto confeccionaram defeitos de 5mm de diâmetro em ossos parietais de vinte ratos. O defeito esquerdo foi deixado vazio como controle e o defeito direito foi preenchido com cerâmica bifásica Ceraform (Teknimed AS, Vic-em Bigorre, França). Os animais foram divididos em dois grupos de dez animais cada, com tempo de sacrifício de três ou seis meses. Após este tempo, as calvárias foram analisadas histologicamente e os resultados mostraram que os defeitos do grupo controle foram preenchidos por tecido conjuntivo fibroso tanto aos três quanto aos seis meses. Nos defeitos do grupo experimental, no terceiro mês foi observado tecido fibrovascular ao lado do enxerto e no sexto mês, tecido colágeno denso na mesma área. Não foi observada nenhuma reação adversa no sítio enxertado, porém não houve diferença significativa na regeneração óssea entre os grupos. Os autores concluíram que o Ceraform é biocompatível, porém não apresenta efeito na regeneração óssea.

Knesser et al. (2006) avaliaram a MODB medular associada ou não a osteoblastos singênicos. Para isto utilizaram 96 ratos nas calvárias dos quais foram

confeccionados defeitos de 8mm de diâmetro, e que foram divididos em três grupos de acordo com o tratamento recebido: grupo A, composto por quarenta animais que receberam discos de MODB medular associado à osteoblastos singênicos; grupo B, composto por 28 animais que receberam apenas discos de MODB medular e grupo C, composto por 28 animais que não receberam tratamento, e serviu como controle. Os animais foram mortos após um, dois e quatro meses. Os resultados das análises histomorfométricas demonstraram que após um mês havia pequenas áreas periféricas com formação de osso e que houve significativa neoformação óssea e reabsorção da MODB após dois e quatro meses nos grupos A e B, sem diferenças estatísticas entre ambos. No grupo C, não foi observada significativa reparação dos defeitos. Os autores concluíram que a MODB medular é um promissor material para o reparo de defeitos ósseos.

Mannai (2006) avaliou a associação de osso autógeno (25 a 30%) ao osso xenógeno bovino (70 a 75%), misturados a plasma rico em plaquetas. Foram colocados 314 implantes (ITI, Straumann, Waldenburg, Switzerland) em 97 pacientes, submetidos a elevação de seio e instalação dos implantes simultaneamente, com 97,8% de sucesso. Após três meses, foram realizadas tomografias computadorizadas (TC), que comparadas com TC realizadas no período pré-operatório, mostraram excelente maturação óssea. Verificou-se excelente reparação de tecidos moles e duros. O autor concluiu que a associação do concentrado de plasma a osso autógeno e xenógeno acelera a reparação de tecidos moles e duros.

Matsushita et al. (2006) estudaram um novo biomaterial artificial com capacidade de indução óssea e biodegradabilidade que pudesse substituir materiais alogênicos, provenientes de animais ou biomateriais não reabsorvíveis. Para isso

desenvolveram uma base polimérica (beta fosfato tricálcico - β TCP) para substituir materiais de origem animal e ser usada como carreadora de proteínas morfogenéticas ósseas recombinantes-2 (rhBMP-2). Os autores confeccionaram defeitos de 6,5mm de diâmetro e 5mm de profundidade nos fêmures de trinta coelhos, que foram divididos em grupos de acordo com o tipo de preenchimento dos defeitos. Grupo BMP-H, que recebeu 30mg do biomaterial com 0,0025% de rhBMP-2; grupo BMP-L, que recebeu 30mg do biomaterial com 0,000625% de rhBMP-2; grupo controle A, que recebeu 30mg do biomaterial e grupo controle B, onde os defeitos não foram preenchidos. Os animais foram mortos após duas, quatro e seis semanas e foram feitas análises com tomografia computadorizada e histomorfométrica. O grupo BMP-H mostrou maior formação óssea do que os grupos BMP-L e controle A, que não diferiram entre si, e estes apresentaram maior formação óssea do que o grupo controle B. De acordo com os resultados, parece ser possível usar o material como substituto de enxertos ósseos para reparação de defeitos ósseos.

Moon et al. (2006) investigaram o efeito do vidro de fosfato de cálcio na regeneração óssea. Foram utilizadas partículas de pó de vidro de fosfato de cálcio de dois tamanhos (400 μ m e 40 μ m). Foram criados defeitos de 8mm em calvárias de sessenta ratos, que foram divididos em três grupos. Os defeitos foram preenchidos com 0,5g de pó de vidro de fosfato de cálcio misturados a solução salina. No grupo controle deixou-se o defeito vazio. Os animais foram sacrificados na segunda e oitava semanas, e os resultados foram avaliados por desintometria óssea e histologicamente. Os defeitos preenchidos com partículas de 400 μ m foram completamente fechados com osso neoformado em oito semanas. Já quando foram utilizadas partículas de 40 μ m, a formação óssea foi menor que no grupo controle.

Concluiu-se que o preparado de vidro de fosfato de cálcio, em partículas maiores, apresenta bom potencial para ser utilizado para regeneração óssea.

Öztürk et al. (2006) avaliaram a associação de uma mistura de HA com fosfato tricálcico (HA/TCP), que é osseocondutora, com MOD que é osseoindutora. Para isto utilizaram 24 ratos, nos quais foram confeccionados defeitos bilaterais nos ossos rádio. Os animais foram divididos em quatro grupos com 12 defeitos de 5mm em cada: grupo I controle, que não recebeu tratamento; grupo II, que recebeu implante de MOD; grupo III, que recebeu implante da mistura de HA/TCP e grupo IV, que recebeu uma associação de MOD e HA/TCP em partes iguais. Foram feitas análises radiográficas e histológicas que após tratamento estatístico, mostraram que no grupo II se obteve melhor reparação óssea que em todos os outros, e que os grupos III e IV não diferiram do grupo controle. Os autores concluíram então que a associação de MOD à mistura de HA/TCP não melhora a reparação óssea e a mistura de HA/TCP inibe a osseoindução da MOD.

Inoda, Yamamoto e Hattori (2007) compararam histologicamente o uso de osso ectópico induzido por rhBMP-2 (o osso foi produzido enxertando-se esponja de gelatina associada a rhBMP-2 no músculo abdominal dos animais), osso autógeno, e osso alógeno congelado na reparação óssea. Confeccionaram defeitos de 5mm em calvária de 25 ratos que foram divididos em três grupos de acordo como material. Cada grupo consistia de cinco ratos, e foi dividido em três grupos por período de observação (três, seis e nove semanas). Após a análise histológica, concluiu-se que o grupo em que se utilizou rh BMP2 apresentou maior osseoindução e osseocondução que o grupo com osso autógeno e este último foi melhor que o grupo com osso alógeno.

Macmillan et al. (2007) avaliaram a capacidade osseointegradora da MOD em fêmeas de ratos e camundongos submetidas à ovariectomia e a reposição de estrogênio. Para isto utilizaram 24 ratas e 24 fêmeas de camundongos, que receberam implantes de 10mg de MOD bilateralmente em seus gastrocnêmicos, e foram divididas em três grupos: grupo OVX, onde os animais foram submetidos à ovariectomia; grupo SHAM, ou falso operado, onde os animais foram submetidos à cirurgia semelhante à ovariectomia porém sem remoção dos ovários e grupo OVX + E2, onde os animais foram ovariectomizados e receberam reposição de estrogênio. Os animais foram mortos após 35 e 56 dias e foram realizadas análises histológicas. Os resultados mostraram que após 35 dias, em camundongos OVX, havia menor número de áreas de neoformação óssea e menor quantidade total de osso em relação ao grupo SHAM. Já em ratos OVX o número de áreas não foi afetado, porém a quantidade de osso neoformado foi menor em relação ao grupo SHAM. Após 56 dias o número de áreas de neoformação nos animais OVX tanto em ratos quanto em camundongos não diferiu dos do grupo SHAM, porém a quantidade total de osso neoformado foi menor. Os animais, ratos e camundongos, do grupo OVX + E2 apresentaram melhores resultados em relação aos do grupo OVX aos 35 dias e principalmente aos 56 dias, quando mostraram comportamento similar aos do grupo SHAM. Os autores concluíram que o estrogênio é importante na capacidade osseointegradora da MOD.

Schwarz et al. (2007) avaliaram a utilização de DFDBA em ácido hialurônico, em elevações de seio maxilar. Para tanto fizeram comparações com DFDBA associado a três tipos de material: com osso anorgânico Bio-Oss (Geistlich Sons Ltd, Wolhusen, Switzerland); com ácido hialurônico DBX (DFDBA; HY, 32:68, w/w; Musculoskeletal Transplant Foundation, Edison, NJ, USA); DBX com Bio-Oss e DBX

com TCP em grânulos (β -TCP). Foram realizadas 32 elevações de seio maxilar em 26 pacientes. Os pacientes foram submetidos à TC antes e oito meses após as cirurgias, e foram feitas as análises morfométricas. Também foram feitas análises histomorfométricas em tecidos ósseos removidos por trefinas das áreas enxertadas. Nas análises de TC todos os 32 casos obtiveram sucesso, porém quando da análise histomorfométrica, os autores observaram que DFDBA-BioOss, DBX-Bio-Oss, DBX apenas foram superiores à DBX- β -TCP. Concluíram então que a formulação do DFDBA influencia na neoformação ósseas e que DBX pode ser utilizado com sucesso em elevações de seio maxilar.

Wang et al. (2007) compararam o potencial osseoindutor de três diferentes marcas comerciais de MOD. Para isto utilizaram 72 ratas, nas quais foram confeccionados defeitos nos processos transversos das vértebras L4 e L5. Os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com o tipo de material utilizado como enxerto: Grupo I, onde se utilizou Osteofil (Medtronic Sofamor Danek, Memphis, TN), com 18 animais; grupo II, onde se utilizou Grafton (Osteotech Inc., Eatontown, NJ), com 17 animais; grupo III, onde se utilizou Dynagraft (GenSci Regeneration Sciences Inc., Irvine, CA), com 17 animais; e grupo IV, onde se utilizou osso autógeno, com 18 animais. Os animais foram sacrificados em duas, quatro, seis ou oito semanas. Foram feitas análises radiográficas, histológicas e de palpação manual, que mostraram que Osteofil e Grafton apresentaram maior fusão espinal (sem diferença estatística entre eles) do que Dynagraft, que não apresentou fusão espinal, assim como o osso autógeno. Os autores concluíram então, que há diferenças significativas entre o potencial osseoindutor dos materiais estudados.

2.2 SINVASTATINA

Mundy et al. (1999) observaram que as estatinas produziram neoformação óssea *in vitro* e em roedores. Este fato estaria associado ao aumento da proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) nas células ósseas. A sinvastatina e a lovastatina usadas por via subcutânea ou oral aumentaram a formação óssea e o volume de osso trabecular em camundongos e em ratos. Os autores concluíram que o uso de estatinas em doses apropriadas pode ter aplicações terapêuticas no tratamento da osteoporose.

Thylin et al. (2002) estudaram os efeitos do gel de sinvastatina em calvária de camundongos. Para isto os animais foram divididos em cinco grupos de acordo com o tipo de tratamento recebido: G1, recebeu injeção de gel de metilcelulose subcutaneamente (INJ-GEL; n=8); G2, injeção de gel associado à sinvastatina na concentração de 2,2mg/50µl (INJ-SIM; n=16); G3, membrana polilática (PLA) contendo gel somente implantada sobre a calvária (MEM-GEL; n=10); G4, implante de PLA com sinvastatina (MEM-SIM; n=10); e G5, onde não houve tratamento (n=12). Os animais foram sacrificados após 22 e 44 dias e foram feitas análises histomorfométrica e com radiografia digital. Os resultados tratados estatisticamente, mostraram que G2 apresentou aumento da espessura óssea quando comparado aos controles, e G4 apresentou o maior ganho em espessura e em área óssea quando comparado a todos os outros grupos, principalmente aos 22 dias.

Von Stechow et al. (2003) estudaram a ação da sinvastatina na formação óssea *in vivo*. Para tanto utilizaram 72 fêmeas de camundongos, que foram divididas em cinco grupos de animais ovariectomizados (OVX) e três grupos de animais falso

operados (SHAM) com nove animais em cada grupo. Um grupo de cada foi sacrificado em uma semana para servir de controle. Os animais foram deixados sem tratamento por cinco semanas para que houvesse significativa perda óssea nos animais OVX. Neste momento, mais dois grupos, um de cada, foram sacrificados para avaliação da perda óssea. Foi realizado tratamento com sinvastatina por oito semanas em um grupo OVX, e em outro, foi administrado somente veículo (0,5% de metilcelulose em água). Um grupo controle adicional foi tratado com injeções (80µg/kg) de hormônio de paratireóide humana 1-34 (PTH) por dia. Todos os grupos foram sacrificados na 13ª semana. Os resultados mostraram que os animais tratados com sinvastatina não apresentaram diferença em relação ao grupo tratado somente com veículo. Os autores concluíram que apesar de as estatinas mostrarem-se eficazes na formação óssea *in vitro*, requerem maiores estudos para provar sua eficiência *in vivo*.

Wong e Rabie (2003) compararam a neoformação óssea proporcionada por enxertos de colágeno com e sem estatina. Foram confeccionados 15 defeitos ósseos em calvária de coelhos, sendo cinco preenchidos com enxerto de colágeno e sinvastatina diluída em água destilada; cinco, somente com enxerto de colágeno e água destilada, e os restantes foram deixados vazios como controle. Os animais foram sacrificados no 14º dia e foi feita análise histométrica dos tecidos ósseos neoformados. Verificou-se uma formação de 308% a mais de osso novo com uso de enxerto colágeno associado a estatina, quando comparado ao enxerto de colágeno somente, e não houve formação óssea no grupo controle. Concluíram que enxertos de colágeno com estatina são osseointutivos e podem ser utilizados como material para enxertos ósseos.

Ayukawa, Okamura e Koyano (2004) estudaram os efeitos da sinvastatina na osteogênese em torno de implantes de titânio. Utilizaram dez ratos com trinta semanas, os quais receberam implantes em suas tíbias, e foram divididos em dois grupos. Ao grupo experimental foram administrados 10mg/kg de sinvastatina intraperitonealmente, diariamente, e ao grupo controle foi administrada somente solução salina. Os animais foram sacrificados após trinta dias, foram analisados histologicamente a proporção de contato ósseo e a densidade em torno do implante. Os resultados mostraram que em ambos os grupos houve formação óssea ao redor dos implantes, porém tanto a proporção de contato ósseo quanto a densidade óssea foram significativamente maiores no grupo tratado. Concluíram então, que a administração de sinvastatina tem potencial para melhorar a osseointegração de implantes.

Stein et al. (2005) estudaram os efeitos da aplicação local de sinvastatina no crescimento ósseo e na inflamação dos tecidos moles em ratas. Para isto dividiram os animais em seis grupos, de acordo com a dose utilizada de sinvastatina associada à gel de metilcelulose, e ao tempo de sacrifício, totalizando noventa animais. As doses utilizadas foram de 0,1mg, 0,5mg, 1,0mg, 1,5mg e 2,2mg por animal, e um grupo recebeu apenas gel. Os tempos de sacrifício foram de três, sete e 24 dias. Foram confeccionados defeitos bilateralmente, nas mandíbulas das ratas. Os autores utilizaram ainda outros 42 animais nos quais administraram-se sistemicamente inibidores de ciclooxigenase (COX) 1 e 2. Estes animais foram divididos em três grupos: um com 16 ratas que receberam 0,5mg de sinvastatina associada ao gel e foi aplicado intraperitonealmente um inibidor da COX 2 (NS-398) na dose de 1,0 mg/kg por dia durante sete dias; um segundo grupo com 16 animais, que também recebeu 0,5mg de sinvastatina associada ao gel, porém recebeu

1,0mg/kg por dia por sete dias de indometacina (inibidor da COX 1) e um terceiro grupo com dez animais, que recebeu apenas a associação de sinvastatina com gel. Os animais foram sacrificados aos sete e 24 dias. Os resultados das análises histomorfométricas mostraram que houve crescimento ósseo significativo em todas as doses, exceto na de 0,1mg, e que não houve diferença entre as demais doses. Porém as doses menores apresentaram menos reação inflamatória. Os autores observaram também que os inibidores de COX 1 e 2 diminuíram o crescimento ósseo. Eles concluíram então, que uma dose menor de sinvastatina pode promover o mesmo crescimento ósseo com menor inflamação, melhorando o desempenho clínico, porém a reação inflamatória parece ser necessária para a reparação óssea.

Wong e Rabie (2005) investigaram expressões histoquímicas de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), BMP-2 e fator de união nuclear na reparação óssea, com ou sem uso de sinvastatina. Foram utilizados 15 coelhos, nos quais foram confeccionados trinta defeitos de 10 × 5mm em calvária. Em nove animais, usou-se a sinvastatina misturada à matriz de colágeno e em seis animais, matriz de colágeno com água. Concluiu-se que o uso de estatina local induz e acelera a formação óssea e ativa a expressão precoce dos fatores que regulam a angiogênese, a diferenciação das células ósseas e osteogênese.

Anbinder et al. (2006) avaliaram a influência da sinvastatina no reparo de defeitos ósseos e nos níveis de colesterol sanguíneo de ratos. Para isto utilizaram quarenta ratos, nas tíbias dos quais foram confeccionados defeitos de aproximadamente 2,5mm x 3,0mm. Os animais foram divididos em quatro grupos de acordo com as vias de administração e da utilização ou não da sinvastatina: grupo AT, injeção subcutânea de 7mg/kg de sinvastatina, por cinco dias; grupo AC, injeção subcutânea apenas do veículo da suspensão do medicamento por cinco dias, grupo

BT, 20mg/kg de sinvastatina diariamente por via oral durante o tempo do estudo e grupo BC, apenas água, por via oral durante o tempo do estudo. Os animais foram mortos após 15 ou trinta dias. Os resultados das análises histométricas e dos níveis de colesterol sangüíneo revelaram que só foram observadas diferenças estatísticas em relação a formação óssea na comparação entre os tempos, sendo que os animais mortos aos trinta dias apresentaram maior formação óssea (49,1%) do que aos 15 dias (40,5%), independentemente da via de administração e do uso ou não do medicamento. Os autores concluíram então que a sinvastatina não afeta a reparação óssea e os níveis de colesterol sangüíneo em ratos.

Wong e Rabie (2006) fizeram uma revisão de pesquisas sobre o uso de estatinas para a indução de formação óssea e relataram seu potencial uso em ortodontia. Concluíram que as estatinas têm excelente potencial de uso em enxertos ósseos na região craniofacial.

Nyan et al. (2007) avaliaram a formação óssea em defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos com uma combinação de sinvastatina e sulfato de cálcio. Para tanto os autores utilizaram 45 ratos nos quais foram confeccionados defeitos de 8mm de diâmetro em suas calvárias e então foram divididos em três grupos: sem tratamento, onde os defeitos foram deixados vazios; sulfato de cálcio, onde os defeitos foram preenchidos com discos de 8mm de diâmetro por 1mm de espessura de uma associação de 60mg de sulfato de cálcio e água destilada prensados em um molde; e grupo associação de sinvastatina com sulfato de cálcio, onde os defeitos foram preenchidos com discos de uma associação de 60mg de sulfato de cálcio à 1mg de sinvastatina e água destilada prensados no mesmo molde do grupo sulfato de cálcio. Os animais foram mortos em duas, quatro e oito semanas após as cirurgias e as calvárias foram examinadas sob raio-X (RX), RX de absorção de dupla

energia para pequenos animais e TC. Os resultados após análise estatística mostraram que em oito semanas houve significativa formação óssea apesar de em duas e quatro semanas ter sido observada intensa reação inflamatória e pouca formação óssea no grupo sinvastatina sulfato de cálcio. Os autores concluíram que a associação de sinvastatina e sulfato de cálcio nas concentrações utilizadas estimulou a regeneração óssea.

Özeç et al. (2007) avaliaram o efeito da aplicação local de sinvastatina em defeitos mandibulares. Para isto utilizaram 33 ratos, nos quais foram confeccionados defeitos de 3mm de diâmetro em suas mandíbulas. Os animais foram divididos em três grupos: grupo experimental, com nove ratos, que receberam 0,02g de esponja de gelatina associada à 0,2ml de solução de sinvastatina na concentração de 2,5mg/ml; grupo controle passivo, com seis ratos, onde os defeitos foram deixados vazios e grupo controle ativo, com oito ratos, que recebeu 0,02g de esponja de gelatina associada à 0,2ml de água. Os animais foram mortos 14 dias após as cirurgias. Para avaliar a regeneração óssea os autores utilizaram TC e análise histológica. Tanto na análise histológica quanto na tomográfica, os autores observaram maior quantidade de formação óssea, com significância estatística, no grupo experimental do que nos demais grupos.

Sugiyama et al. (2007) avaliaram os efeitos da sinvastatina na osseoindução ectópica promovida pela rhBMP-2. Para isto utilizaram 64 ratos machos com seis semanas de idade nos quais foram implantados discos contendo 5µg de rhBMP-2 e colágeno tipo I e receberam diferentes estatinas por diferentes vias de administração. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a via de administração (oral ou subcutânea), que foram subdivididos em quatro grupos cada de acordo com o medicamento utilizado (sinvastatina-lactona, sinvastatina-hidroxi-

ácida, cerivastatina e veículo, que serviu como controle). As estatinas foram administradas por vinte dias e os discos foram removidos 21 dias após terem sido implantados. Foram feitas análises bioquímicas, radiográficas e histológicas e os resultados mostraram que o grupo sinvastatina-lactona subcutânea apresentou maior formação óssea que todos os outros e que houve formação óssea nos demais grupos sem diferença significativa entre eles.

Wang, J. W. et al. (2007) estudaram a aplicação local de sinvastatina na consolidação de fraturas em ratas OVX. Para isto utilizaram 130 ratas, das quais 120 foram OVX e as outras dez SHAM. Após 12 semanas foi confirmada a osteopenia, através de densitometrias ósseas de dez ratas OVX e dez ratas SHAM e foram promovidas as fraturas nas tíbias dos animais. As fraturas foram estabilizadas com fios de aço. Todos os animais que sobreviveram foram aleatória e igualmente divididos em dois grupos: grupo OVX + veículo, onde os animais receberam veículo utilizado como solvente da sinvastatina e grupo OVX + sinvastatina, onde os animais receberam 10mg/kg/dia por cinco dias de sinvastatina subcutânea. As ratas foram mortas após uma, duas e quatro semanas. Um dia antes das mortes, os animais foram anestesiados e a área das fraturas, radiografada. Após as mortes, as tíbias passaram por análises histomorfométricas e biomecânicas, esta última por meio do teste de flexão em três pontos. Os animais tratados com sinvastatina apresentaram um calo ósseo substancialmente maior após uma e duas semanas, e após quatro semanas, o osso se apresentava mais remodelado. Houve também um aumento significativo na carga máxima suportada pelo osso após duas e quatro semanas. Histomorfometricamente houve aumento da mineralização. Os autores concluíram que a sinvastatina utilizada localmente pode estimular a consolidação de fraturas em ratas ovariectomizadas.

2.3 ESTATINA ASSOCIADA À MATRIZ ÓSSEA DESMINERALIZADA

Galus, Wlodarski e Wlodarski (2006) avaliaram a influência da fluvastatina na formação óssea heterotópica induzida por MOD de ratos em camundongos. Para tanto utilizaram cinquenta camundongos machos, que foram divididos em três grupos: F (camundongos que receberam implantes de MOD e fluvastatina), P (camundongos que receberam implantes de MOD e placebo) e C (camundongos que não receberam nada). Os implantes de MOD foram realizados nas coxas dos camundongos e a fluvastatina foi administrada sob a forma de injeções subcutâneas na concentração de 3,6mg/kg uma vez ao dia por 25 dias um dia após a iniciação da indução heterotópica de osso. Ao final do estudo os autores mediram o colesterol total, os triglicerídeos, a lipoproteína de baixa densidade colesterol e a fosfatase alcalina em amostras de sangue dos camundongos. A deposição de mineral no osso heterotópico induzido, foi determinada após hidrólise dos tecidos moles que envolviam este osso. Os resultados mostraram que a deposição mineral e a concentração de fosfatase aumentaram significativamente, enquanto as concentração de triglicerídeos e de colesterol total diminuíram nos camundongos que receberam fluvastatina em comparação com os outros dois grupos. Os autores concluíram portanto que a administração de estatinas atua sobre a ossificação heterotópica, aumentando o risco de sua ocorrência em pacientes com predisposição.

3 PROPOSIÇÃO

O propósito deste trabalho foi avaliar os efeitos da associação da sinvastatina à MODB no reparo de defeitos em calvárias de ratos.

4 MÉTODO

4.1 ANIMAIS

Para este trabalho foram utilizados 48 ratos adultos, machos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Wistar*) com aproximadamente noventa dias de idade, que foram mantidos em gaiolas em temperatura ambiente e alimentados com ração e água *ad libitum*, fornecidos pelo Biotério do Instituto Básico de Biociências da Universidade de Taubaté – UNITAU. O estudo foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Taubaté Protocolo nº16/07 (Anexo A).

4.2 REALIZAÇÃO DOS DEFEITOS ÓSSEOS

Em todos os animais, foram confeccionados dois defeitos com 5mm de diâmetro, um em cada parietal de cada animal. Para a confecção dos defeitos ósseos, os animais foram anestesiados com uma mistura de 13mg/Kg de cloridrato xilasina 2% (Anasedan, Vetbrands, Sespo, Jacareí, SP, Brasil) com 33mg/Kg de ketamina base (Dopalen, Vetbrands, Sespo, Jacareí, SP, Brasil), por via intramuscular. Após a anestesia, foi feita a depilação da área sobre a calvária e

antisepsia com álcool iodado (Figuras 1A e 1B), e logo em seguida, uma incisão linear na pele até atingir o periósteo, no sentido pósterio-anterior da região occipital até a região entre os olhos, com auxílio de lâmina nº 15 montada em cabo de bisturi nº 3. Posteriormente os tecidos foram afastados com destaca periósteo deixando o osso totalmente exposto (Figura 1C). Defeitos ósseos bicorticais (Figura 1D) foram executados com brocas trefinas de 5mm de diâmetro (Neodent, Curitiba, PR, Brasil), montados em motor elétrico Driller BLM 600 PLUS (VK Driller Equipamentos Elétricos Ltda, Jaguaré, São Paulo, SP) na rotação de 1814 RPM e 16 N, sob abundante irrigação com soro fisiológico (cloreto de sódio 0,9%) durante o procedimento.

4.3 PREPARAÇÃO DO MEDICAMENTO

A solução de sinvastatina foi preparada pela farmácia de manipulação Manipulário (Taubaté, SP, Brasil) um dia antes dos procedimentos cirúrgicos. Esta solução foi obtida pela mistura de sinvastatina (lote n.0707071512, Galena, China) em água destilada por meio de centrifugação durante uma hora, na proporção de 2,2mg/50µl. O medicamento foi mantido em refrigeração à 13°C até o momento do uso.

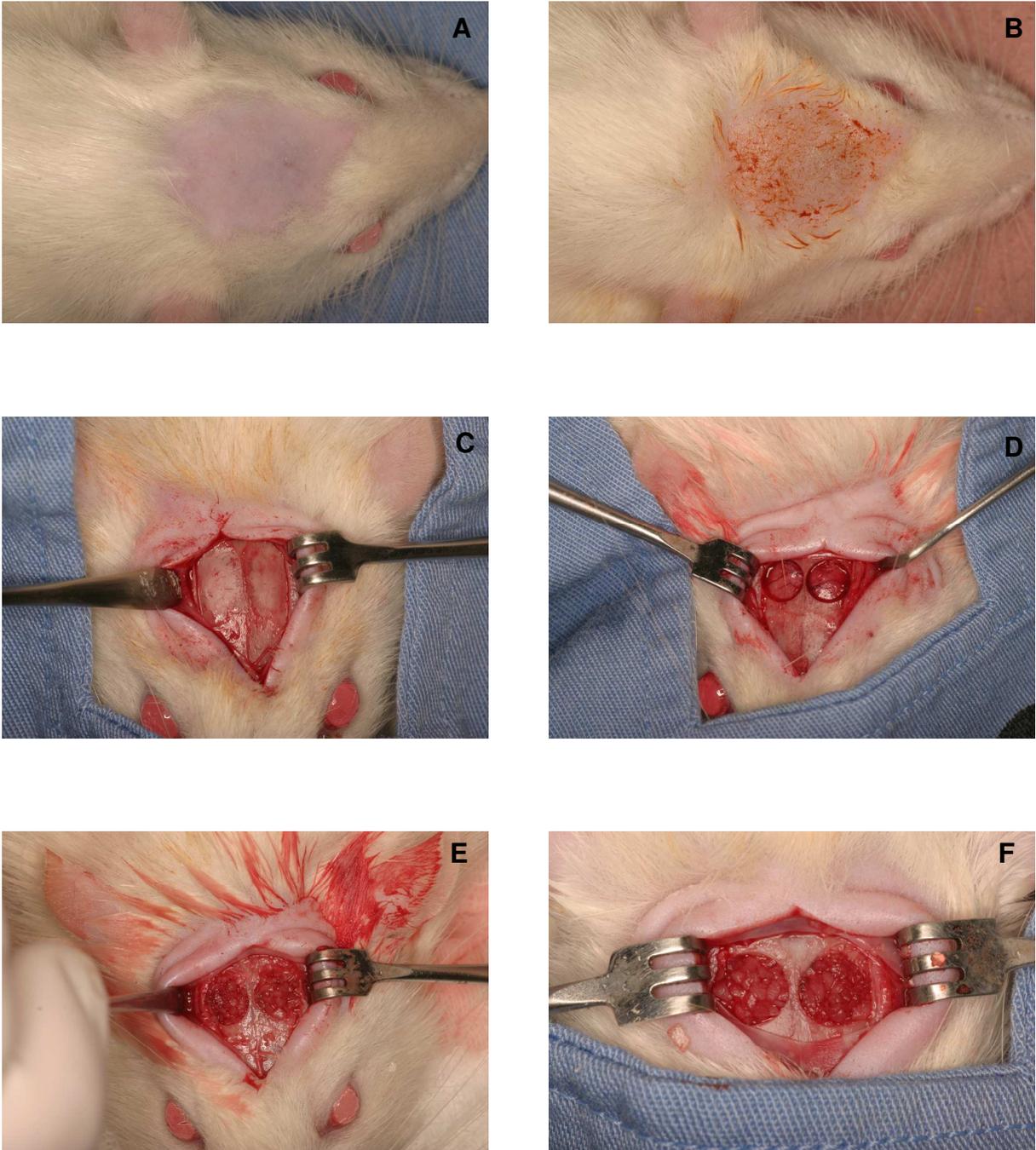
4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em três grupos: sinvastatina-matriz desmineralizada de osso bovino (MODB-SIN), matriz desmineralizada de osso bovino (MODB) e Controle. No grupo MODB-SIN, os animais receberam enxerto de 10 mg de matriz orgânica desmineralizada de osso bovino (GenOx Org-Genius-Baumer S.A.- Mogi Mirim, São Paulo, Brasil), associada a 56µl de solução de sinvastatina na concentração de 2,2mg/50µl (THYLIN et al., 2002) (Figura 1E). No grupo MODB, os defeitos foram totalmente preenchidos com matriz desmineralizada de osso bovino, associada a 56µl de água destilada (Figura 1F). O grupo controle não recebeu nenhum tipo de enxerto, permanecendo os defeitos vazios.

Cada um dos grupos foi subdividido em dois, de acordo com o período de observação antes do sacrifício (trinta ou sessenta dias). A Figura 2 ilustra a divisão dos grupos experimentais.

4.5 SACRIFÍCIO

Para o sacrifício, os animais foram novamente anestesiados e decapitados em guilhotina. As calvárias foram removidas e fixadas em formol a 10% para posterior análise radiográfica, histológica descritiva e histométrica.



Figuras 1 – Procedimento cirúrgico. A) Área depilada sobre a calota. B) Antissepsia da região. C) Afastamento dos tecidos e exposição do tecido ósseo. D) Defeitos confeccionados. E) Defeitos preenchidos com associação MODB-SIN. F) Defeitos preenchidos com MODB e água destilada

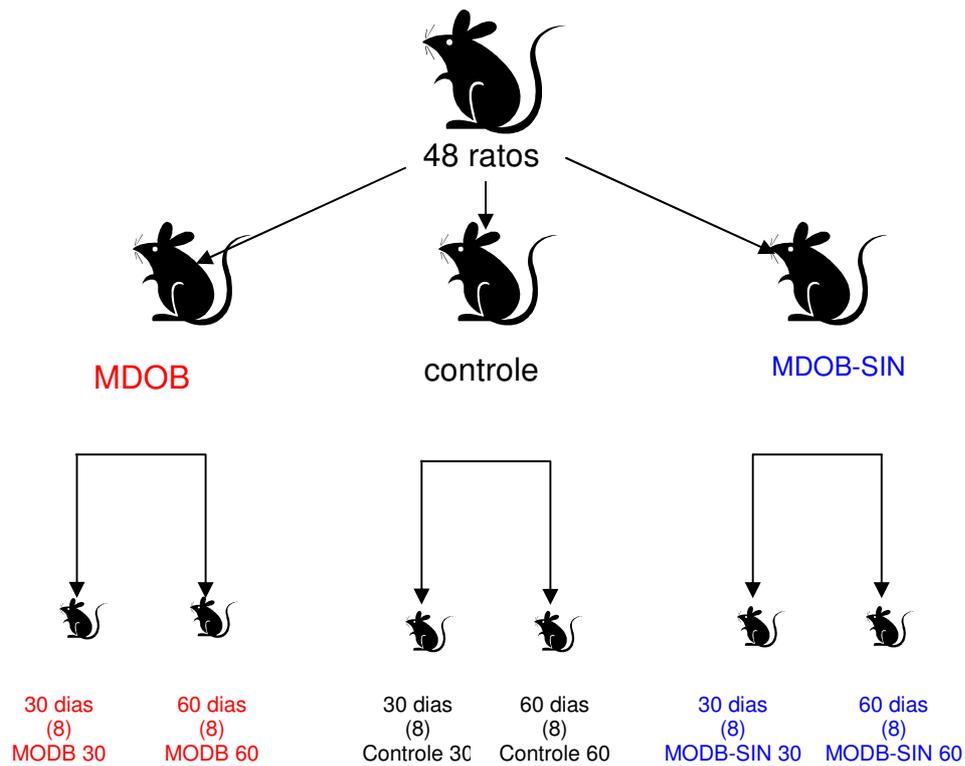


Figura 2 - Divisão dos grupos experimentais

4.6 DENSITOMETRIA RADIOGRÁFICA

As peças foram radiografadas (Figura 3) em aparelhos de RX odontológico (DabiAtlante Spectro 70X, Dabi Atlante, São Paulo, SP, Brasil), com sensor digital (Trophy RVG, França) sob os parâmetros de 8mA e 70KVp, com distância foco-objeto de 30cm, tempo de exposição de 0,1s e incidência do feixe pela superfície externa. Utilizando-se o programa computacional Image J 1.31p (National Institute of Health, USA, http://rsb.info.nih.gov/ij/java1.31_03) foi calculada a densidade radiográfica em tons de cinza da região correspondente a um círculo de área de 15.380 pixels (Figura 4). As medidas foram tomadas por um único examinador calibrado, que desconhecia o grupo ao qual as amostras pertenciam. Na análise

estatística foi utilizada a média dos valores obtidos das imagens de cada um dos dois defeitos confeccionados em cada animal.

4.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMÉTRICA

Os defeitos esquerdos foram submetidos à descalcificação em solução de ácido tricloroacético a 5% por aproximadamente vinte dias, após o quê foram cortados na região central do defeito ósseo, no sentido ântero-posterior e cada um foi incluído em um bloco de parafina. Seguiu-se técnica histológica de rotina, coloração com hematoxilina e eosina e análise em microscopia de luz. Para a análise histométrica, a imagem histológica (HE) de quatro cortes semi-seriados, preferencialmente dois de cada bloco, foi digitalizada em 25X. Com o auxílio do programa de computador Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, USA) foi feita a seleção das áreas de neoformação óssea, com a utilização da ferramenta varinha mágica (Figura 5). As áreas selecionadas foram salvas, e o novo arquivo foi transferido para o programa de computador Image J 1.31p (National Institute of Health – USA), o qual calculou a área de matriz óssea neoformada no defeito, após a binarização da imagem. A análise foi feita por um único examinador calibrado, que desconhecia o grupo ao qual as amostras pertenciam.

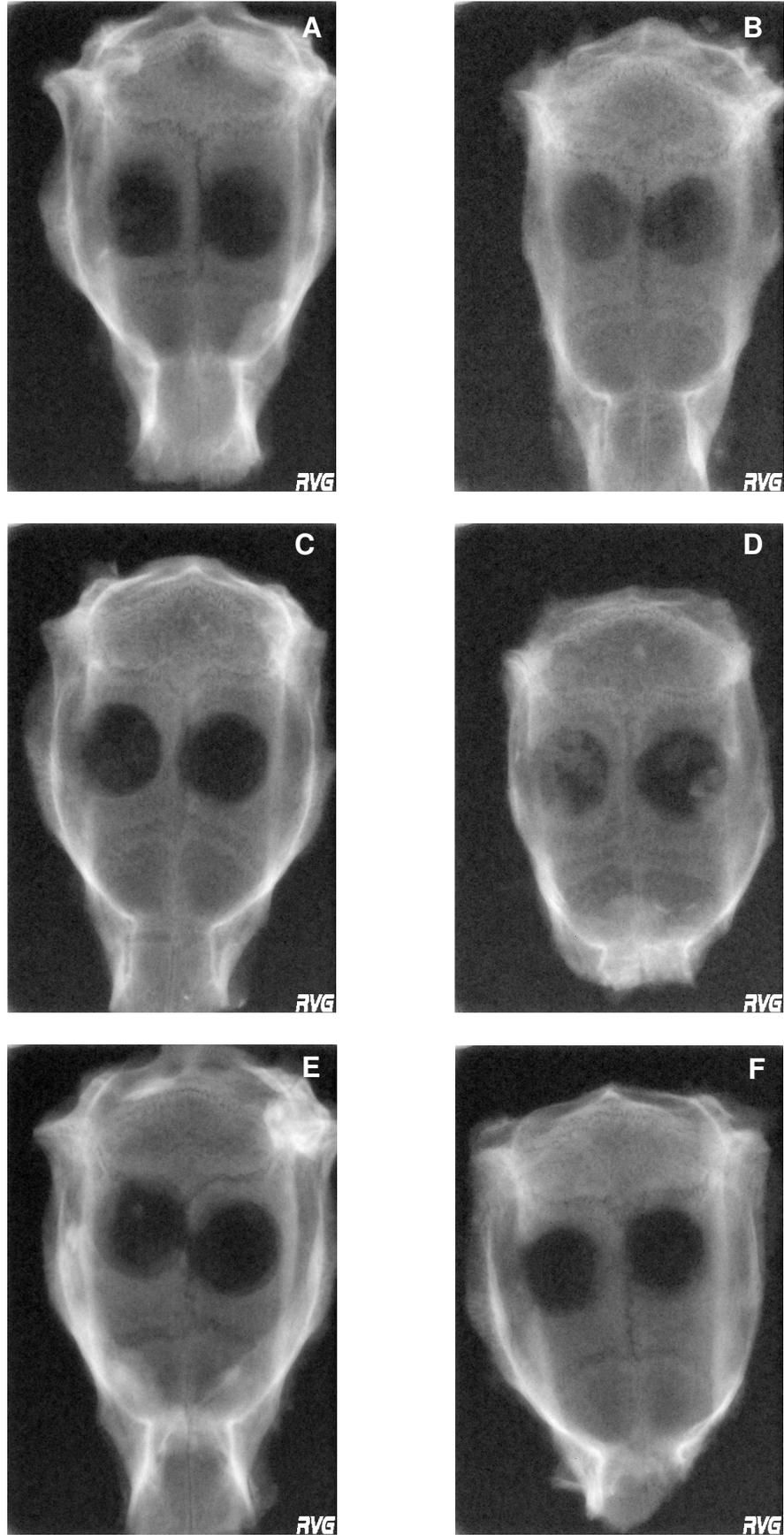


Figura 3 – A) Grupo controle 30 dias. B) Grupo controle 60 dias. C) Grupo MODB 30 dias. D) Grupo MODB 60 dias. E) Grupo MODB-SIN 30 dias. F) Grupo MODB-SIN 60 dias

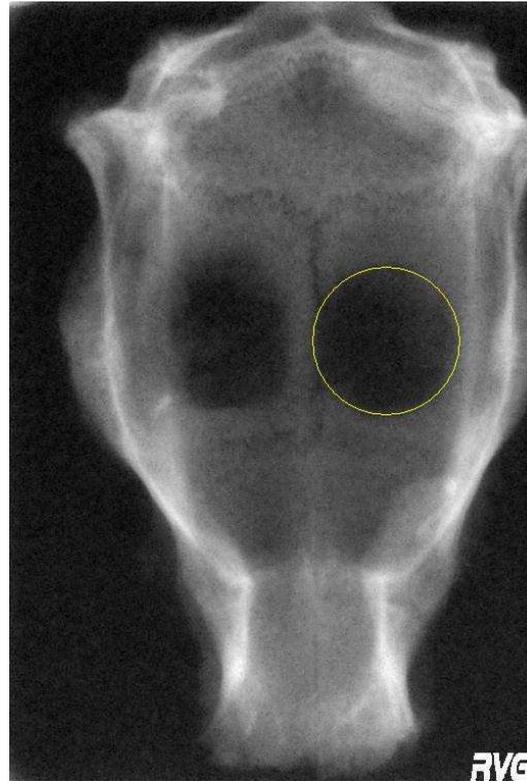


Figura 4 - Radiografia com seleção da área utilizada para cálculo da densidade radiográfica no programa Image J

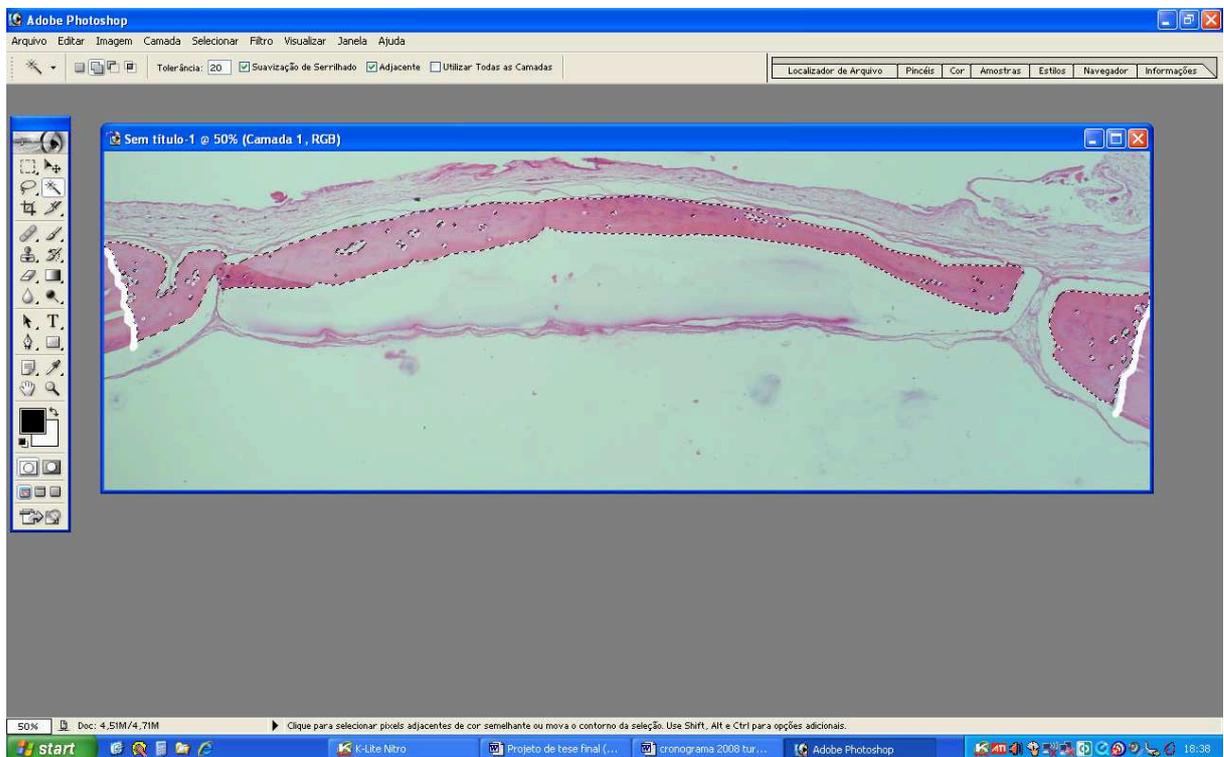


Figura 5 - Área de neoformação óssea selecionada com a ferramenta varinha mágica no programa Adobe Photoshop

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos por meio da densitometria radiográfica e da análise histométrica, foram submetidos à análise de variância a 5% (ANOVA), para comparação da ação do medicamento aos trinta e sessenta dias. Após o teste ANOVA, quando necessário, aplicou-se o teste de Tukey. Para a análise das diferenças entre os tempos, utilizou-se o teste t de Student. Todas as análises foram realizadas no programa de computador GraphPad Prism 4.0 for Windows (GraphPad software Inc., CA, USA).

5 RESULTADOS

Durante os procedimentos cirúrgicos dois ratos morreram, devido a complicações com a anestesia, e foram repostos. Por volta do décimo dia de pós-operatório, seis ratos do grupo MODB-SIN apresentaram necrose com posterior formação de crosta, na região da incisão, que persistiu até os trinta dias. Nenhum dos animais apresentou comportamento atípico no período de observação.

5.1 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

Os resultados da avaliação da estatística descritiva dos valores de densidade radiográfica em tons de cinza da média dos dois defeitos de cada animal podem ser observados na Tabela 1. Foram analisados os tempos de trinta e sessenta dias separadamente.

Tabela 1- Medidas de tendência central e dispersão dos dados de densidade radiográfica em cada grupo nos tempos trinta e sessenta dias (em tons de cinza)

Grupo	N	Média	Erro padrão	Desvio padrão	mediana	Valor máximo	Valor mínimo
Controle 30	8	43,11	3,25	9,19	40,85	64,86	33,55
MODB-SIN 30	8	41,27	2,87	8,11	40,06	57,84	30,08
MODB 30	8	40,23	1,85	5,23	39,79	50,72	32,98
Controle 60	8	63,48	3,37	9,53	65,56	78,45	49,75
MODB-SIN 60	8	47,73	2,46	6,97	46,07	61,66	40,22
MODB 60	8	69,28	5,11	14,45	70,79	85,28	54,05

5.1.1 Tempo de Trinta Dias

Para definir o melhor parâmetro de testagem procedeu-se ao teste de normalidade Kolmogorov- Smirnov (K-S), que identificou distribuição normal dos dados e por isso assumiu-se a média e o desvio padrão como estimadores para a comparação entre os grupos. Testou-se então a diferença entre os grupos a partir da ANOVA, que não identificou diferença estatística significativa na comparação entre eles ($p=0,753$), como destacado na Tabela 2 e Figura 6.

Tabela 2 - Resultados da ANOVA dos dados de densidade radiográfica na comparação entre os grupos, no tempo trinta dias

Origem	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Mínimos quadrados	F	p-valor
Grupos	2	34,10	17,0	0,29	0,753
Erro padrão	21	1244,10	59,20		
Total	23	1278,20			

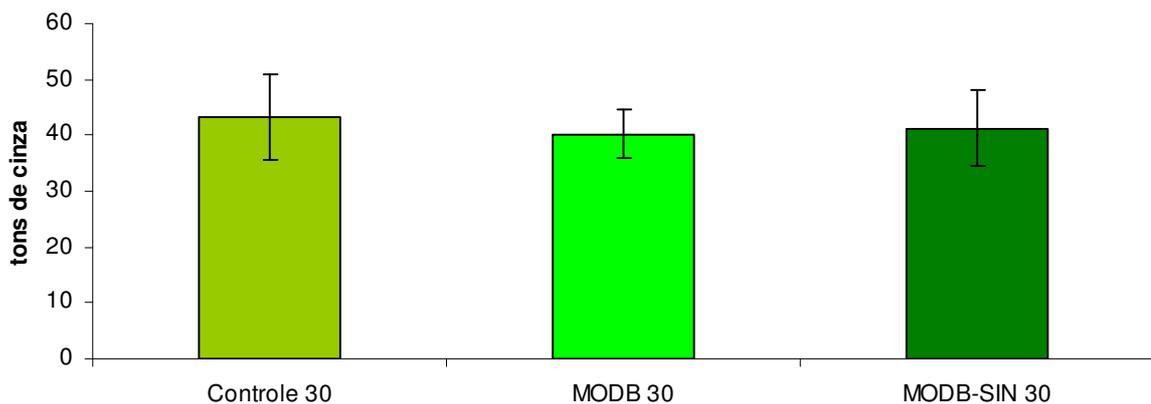


Figura 6 - Médias e desvios-padrão dos dados de densidade radiográfica em tons de cinza aos trinta dias. Após a ANOVA não foi encontrada diferença estatística significativa ($p>0,05$)

5.1.2 Tempo de Sessenta Dias

Para este tempo também foi observada distribuição normal dos dados. Procedeu-se então a ANOVA (5%) e verificou-se diferença estatística significativa ($p=0,002$) entre os grupos. Utilizou-se então o teste de Tukey e verificou-se que o grupo MODB-SIN apresentou menor densidade radiográfica que os grupos Controle e MODB (Tabela 3 e Figura 7).

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

Origem	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Mínimos quadrados	F	p-valor
Grupos	2	1990	995	8,58	0,002
Erro padrão	21	2436	116		
Total	23	4426			

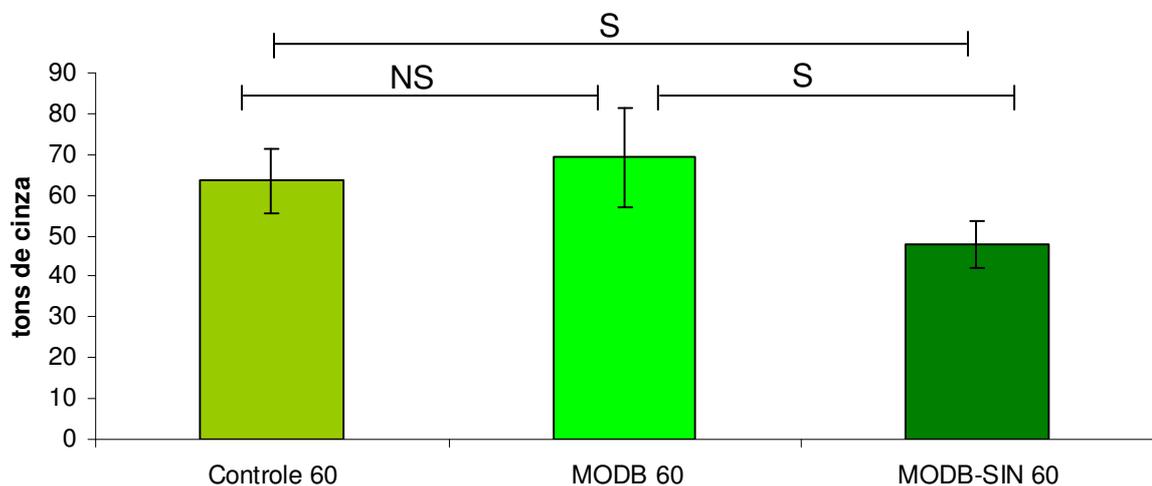


Figura 7 - Médias e desvios-padrão dos dados de densidade radiográfica em tons de cinza aos sessenta dias. S indica diferença estatisticamente significativa ($p=0,002$). NS indica diferença estatisticamente não significativa

5.1.3 Tempos de Trinta e Sessenta Dias

Para comparação da densidade radiográfica dos grupos entre trinta e sessenta dias foi utilizado o teste t de Student, que identificou diferença significativa nos grupos Controle ($p=0,001$) e MODB ($p=0,001$), porém o grupo MODB-SIN não apresentou diferença significativa ($p=0,15$) (Figura 8).

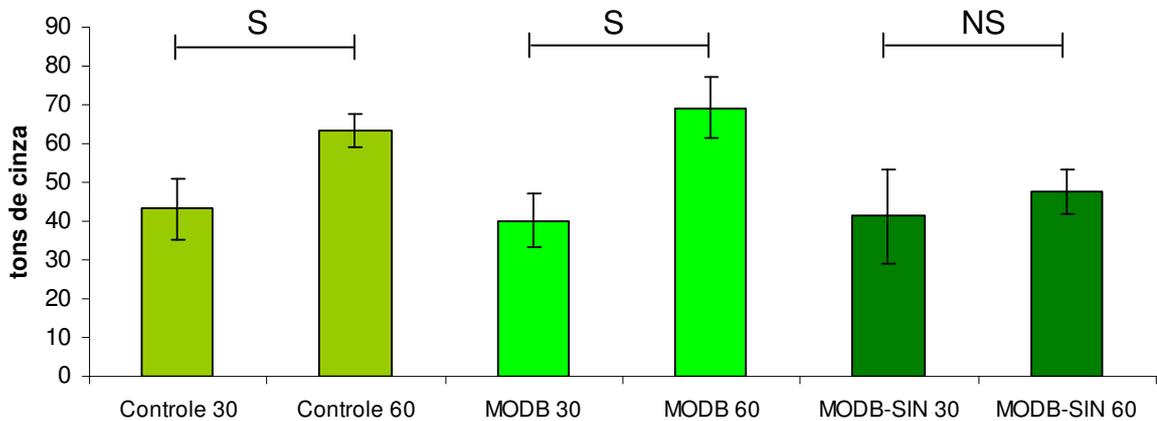


Figura 8 - Médias e desvios-padrão dos dados de densidade radiográfica em tons de cinza na comparação entre os tempos de trinta e sessenta dias. S indica diferença estatisticamente significativa. NS indica diferença estatisticamente não significativa

5.2 ANÁLISE HISTOMÉTRICA

As médias das áreas de neoformação óssea obtidas na contagem de quatro campos dos defeitos de cada animal foram utilizadas para a análise histomorfométrica. Um espécime do grupo Controle 60, um do grupo MODB 30 e dois do grupo Controle 30 apresentaram problemas técnicos durante a confecção das lâminas, que não puderam ser lidas. Os resultados da análise descritiva estão

demonstrados na Tabela 4. Foram analisados os tempos de trinta e sessenta dias separadamente.

Tabela 4 - Medidas de tendência central e dispersão dos dados de área de neoformação óssea em cada grupo nos tempos trinta e sessenta dias (n diferente de 8 em alguns grupos devido a problemas com as lâminas)

Grupo	n	Média	Erro padrão	Desvio padrão	mediana	Valor mínimo	Valor máximo
Controle 30	6	0,47	0,05	0,13	0,48	0,29	0,65
MODB-SIN 30	8	0,15	0,03	0,10	0,14	0,02	0,28
MODB 30	7	0,29	0,06	0,17	0,24	0,12	0,61
Controle 60	7	0,97	0,079	0,21	0,94	0,73	1,21
MODB-SIN 60	8	0,27	0,05	0,15	0,24	0,06	0,49
MODB 60	8	0,89	0,17	0,48	0,89	0,25	1,58

5.2.1 Tempo de Trinta Dias

Após a verificação da normalidade dos dados e realização da ANOVA (5%), foi verificada diferença significativa ($p=0,002$) entre os grupos. Após teste de Tukey, observou-se que os grupo MODB-SIN apresentou menor formação óssea em relação ao grupo Controle. (Tabela 5 e Figura 9).

Tabela 5 - Resultados da ANOVA na comparação dos dados de área de neoformação óssea entre os grupos, no tempo 30 dias

Origem	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Mínimos quadrados	F	p-valor
Grupos	2	0,315	0,157	8,353	0,002
Erro padrão	18	0,339	0,018		
Total	20	0,654			

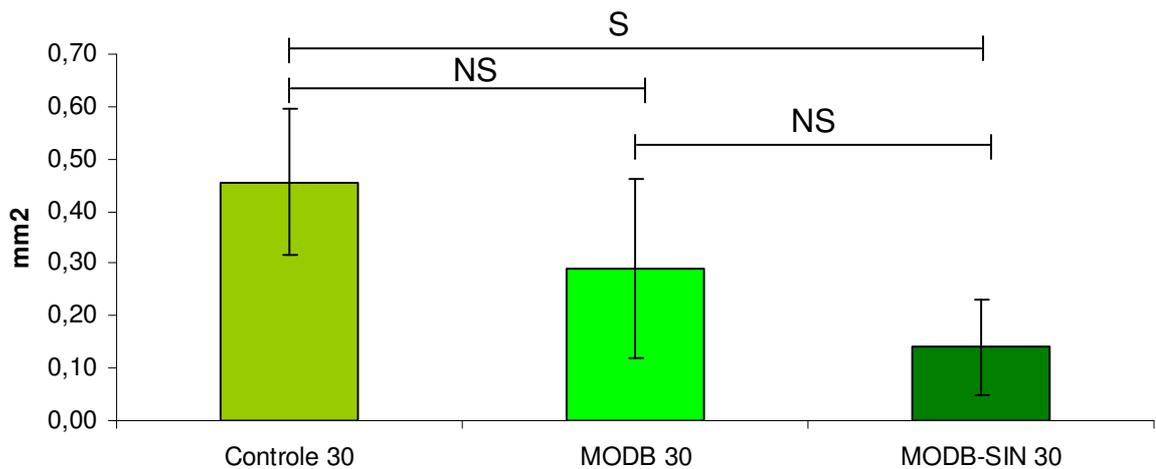


Figura 9 - Médias e desvios-padrão dos valores de área de neoformação óssea de cada grupo aos trinta dias. NS indica diferença estatisticamente não significativa. S indica diferença estatisticamente significativa ($p=0,002$)

5.2.2 Tempo de Sessenta Dias

Após a verificação da normalidade dos dados e realização da ANOVA (5%), foi verificada diferença significativa ($p=0,001$) (Tabela 7). Aplicou-se teste de Tukey e observou-se que o grupo MODB-SIN apresentou menor formação óssea que os demais grupos (Figura 10).

Tabela 6 - Resultados da ANOVA na comparação dos dados de área de neoformação óssea entre os grupos, no tempo sessenta dias

Origem	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Mínimos quadrados	F	p-valor
Grupos	2	2,626	1,313	14,75	0,001
Erro padrão	23	2,047	0,08899		
Total	25	4,673			

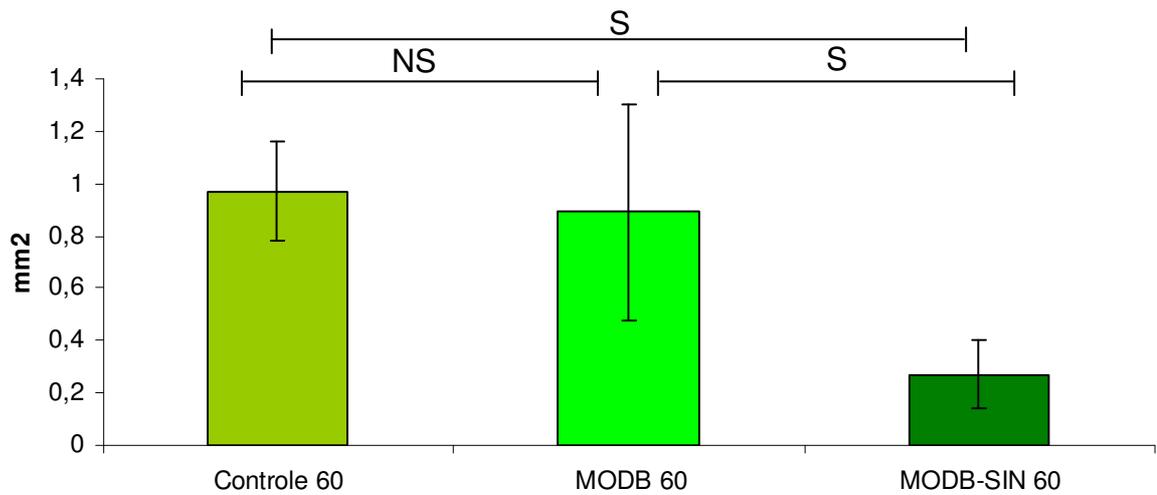


Figura 10 - Médias e desvios-padrão dos valores de área de neoformação óssea de cada grupo aos sessenta dias. Grupo MODB-SIN apresentou diferença estatística em relação ao Controle e ao MODB

5.2.3 Tempos de Trinta e Sessenta Dias

Para a avaliação da variação das áreas de neoformação óssea em cada grupo, entre os trinta e sessenta dias foi utilizado o teste t de Student, que identificou diferença significativa nos grupos Controle ($p=0,001$) e MODB ($p=0,01$), porém o grupo MODB-SIN não apresentou diferença significativa ($p=0,101$) (Figura 11).

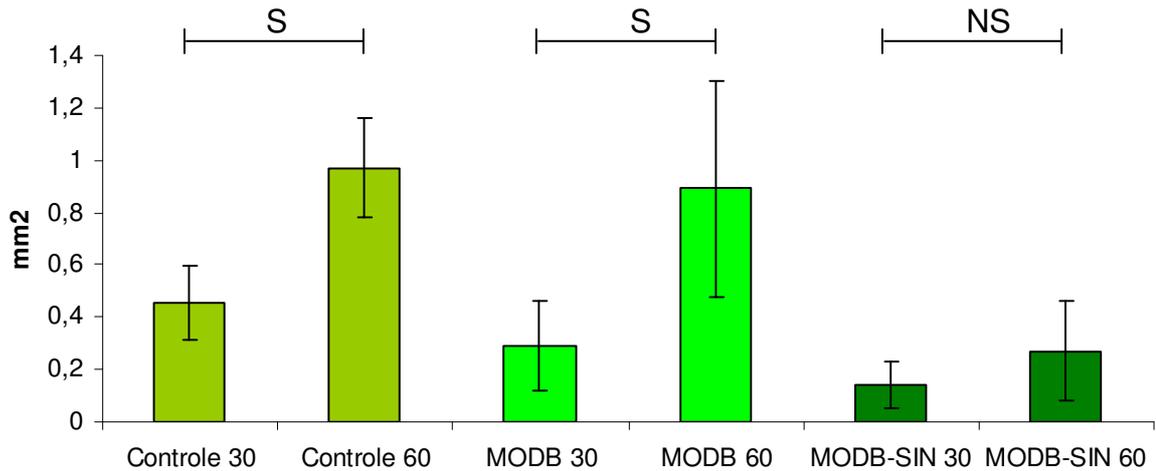


Figura 11 - Médias e desvios-padrão dos valores de área de neoformação óssea de cada grupo nos tempos de trinta e sessenta dias. NS indica diferença estatisticamente não significativa. S indica diferença estatisticamente significativa

5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA

Aos 30 dias, o grupo controle (Figura 12A) apresentou osso neoformado nas bordas com muitos espaços medulares e contorno irregular (Figura 12B), além de pequenas ilhas ósseas no centro do defeito (Figura 12A) com alguns espaços medulares, porém menores em tamanho e número do que no osso das bordas, em meio a tecido conjuntivo frouxo com discreto infiltrado inflamatório mononuclear. Notou-se também a presença de osteoblastos achatados ao redor do osso neoformado, que continha osteócitos e osteoplastos volumosos. No osso antigo adjacente ao defeito puderam-se notar linhas reversas basófilas, indicativas de remodelação óssea, e neoformação óssea, provavelmente devido ao afastamento do periósteo. No interior do defeito foram observados também pêlos em processo de reabsorção por células gigantes multinucleadas, por vezes formando pequenos granulomas (Figura 12C).

O grupo MODB (Figura 13A) apresentou aspecto semelhante ao grupo controle, porém com menores quantidades de osso neoformado, tanto nas bordas (Figura 13B) quanto no centro do defeito (Figura 13A). O tecido conjuntivo apresentava-se mais espesso em alguns espécimes, e com moderado infiltrado inflamatório crônico, composto por linfócitos e plasmócitos. A matriz óssea desmineralizada já havia sido totalmente reabsorvida à exceção de um animal onde foram observadas algumas poucas partículas.

O grupo MODB-SIN (Figura 14A) apresentou as menores porções de neoformação óssea além de algumas áreas de reabsorção do osso antigo nas bordas do defeito (Figura 14B) onde não foram observadas linhas reversas e neoformação óssea. O tecido conjuntivo, bastante vascularizado, apresentava-se mais espesso e com infiltrado inflamatório crônico de moderado a intenso. Não foram observadas ilhas centrais de neoformação óssea no defeito. O tecido ósseo recém-formado apresentava-se bastante imaturo, contendo osteócitos volumosos, dispostos irregularmente, e envolto por osteoblastos volumosos. Em quatro animais, encontraram-se restos de MODB em meio ao tecido conjuntivo (Figura 14C) que preenchia o defeito, onde também em um animal verificou-se área de necrose de coagulação. Tecido cerebral com áreas de necrose pôde ser observado em quatro animais.

Aos sessenta dias o grupo controle apresentou formação óssea bastante significativa a partir das bordas, afilando-se em direção ao centro do defeito, com poucos espaços medulares e fechamento linear quase total em alguns animais (Figura 15A). O osso novo apresentava-se mais espesso e maduro (Figura 15B), contendo osteócitos menores e dispostos mais regularmente, com menos espaços medulares e presença de linhas reversas basófilas. Em grande parte dos espécimes,

verificou-se presença de ilhas de osso novo no centro do defeito, delgadas, mais maduras, com poucos espaços medulares e com algumas linhas reversas. Osteoblastos achatados envolviam o tecido ósseo. Não foram encontradas áreas de necrose, granulomas e nem pêlos, no entanto permanecia inflamação discreta. O osso antigo apresentava linhas reversas basófilas e áreas de neoformação.

O grupo MODB (Figuras 16A e B) apresentou aspecto semelhante ao grupo controle com quantidade discretamente menor de osso neoformado, a exceção de um animal que apresentou pouca formação óssea e moderado infiltrado inflamatório.

O grupo MODB-SIN, apresentou pouca formação óssea em comparação com os demais grupos e a região do defeito apresentava tecido conjuntivo levemente mais espesso e vascularizado (Figura 17A), contendo por vezes vasos congestos (Figura 17C) e com inflamação de discreta a moderada, Não houve formação de osso no centro do defeito em nenhum animal. Osteoblastos e osteócitos eram mais volumosos (Figura 17B) que nos demais grupos do mesmo período, e em três animais puderam ser encontrados restos de MODB. Em apenas dois espécimes não foram notadas áreas de tecido cerebral com necrose.

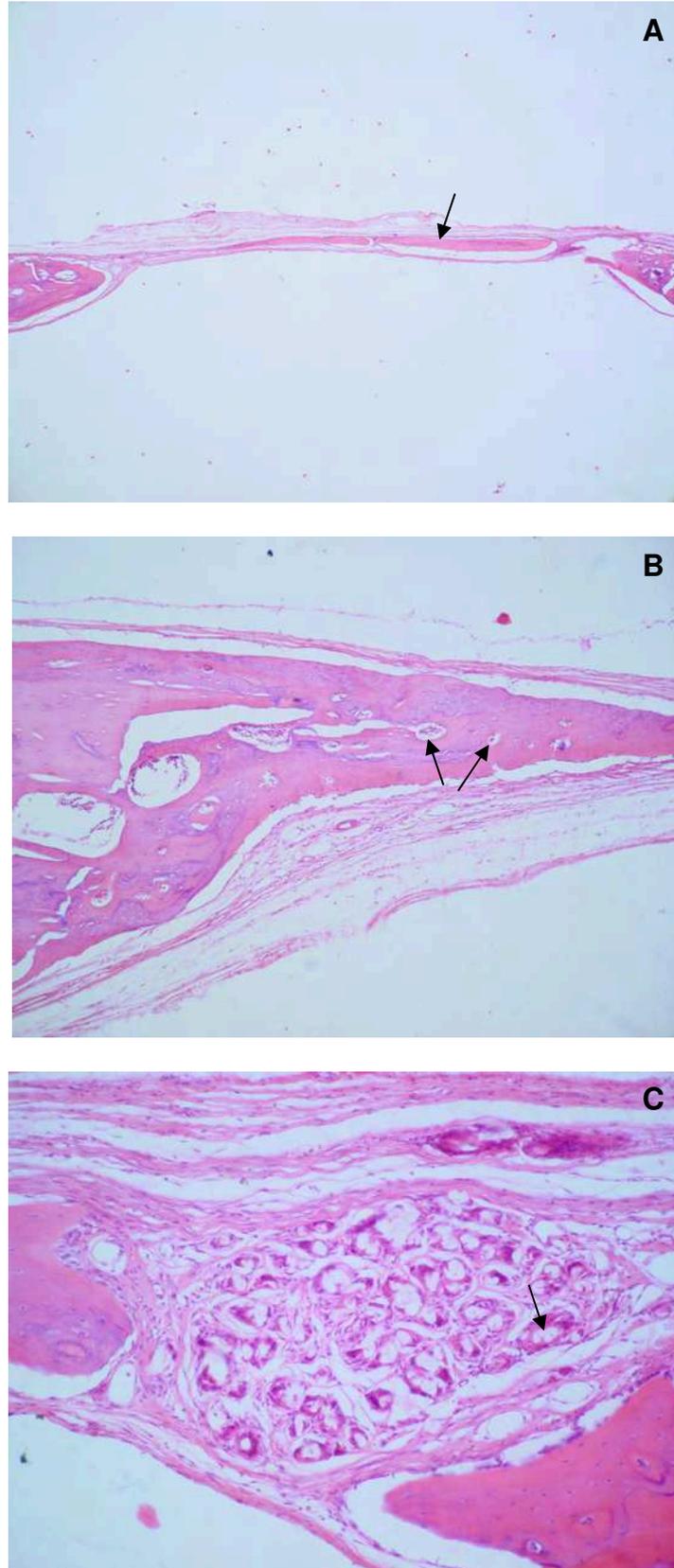


Figura 12 - Aspecto microscópico do grupo Controle 30. A) Área total do defeito, evidenciando formação óssea nas bordas e no centro (→). Aumento original de 25X. HE. B) Formação óssea nas bordas com alguns espaços medulares (→). Aumento original de 100X. HE. C) Pêlos, que permaneceram no campo cirúrgico, envolvidos por células gigantes multinucleares (→) Aumento original de 200X. HE



Figura 13 - Aspecto microscópico do grupo MODB 30. A) Área total do defeito, evidenciando formação óssea nas bordas e no centro, além do tecido conjuntivo mais espesso que no grupo Controle. Aumento original de 25X. HE. B) Formação óssea nas bordas, com alguns espaços medulares. Aumento original de 100X. HE

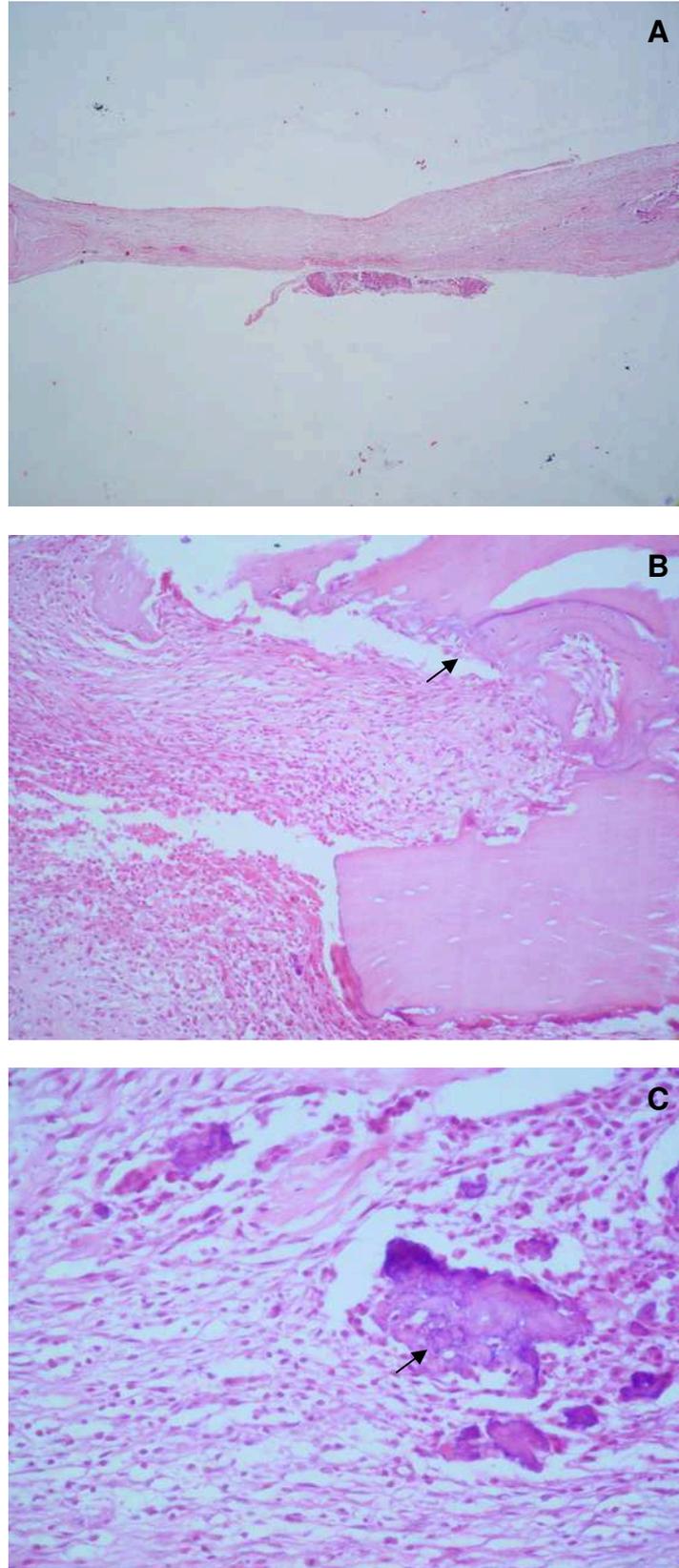


Figura 14 - Aspecto microscópico do grupo MODB-SIN 30. A) Área total do defeito, evidenciando pouca formação óssea e tecido conjuntivo inflamado e espesso. Aumento original de 25X. HE. B) Reabsorção óssea nas bordas do defeito (→) e infiltrado inflamatório intenso no tecido conjuntivo. Aumento original 200X. HE. C) Material eosinófilo (→) interpretado como resto de MODB em meio ao tecido conjuntivo inflamado. Aumento original 400X. HE

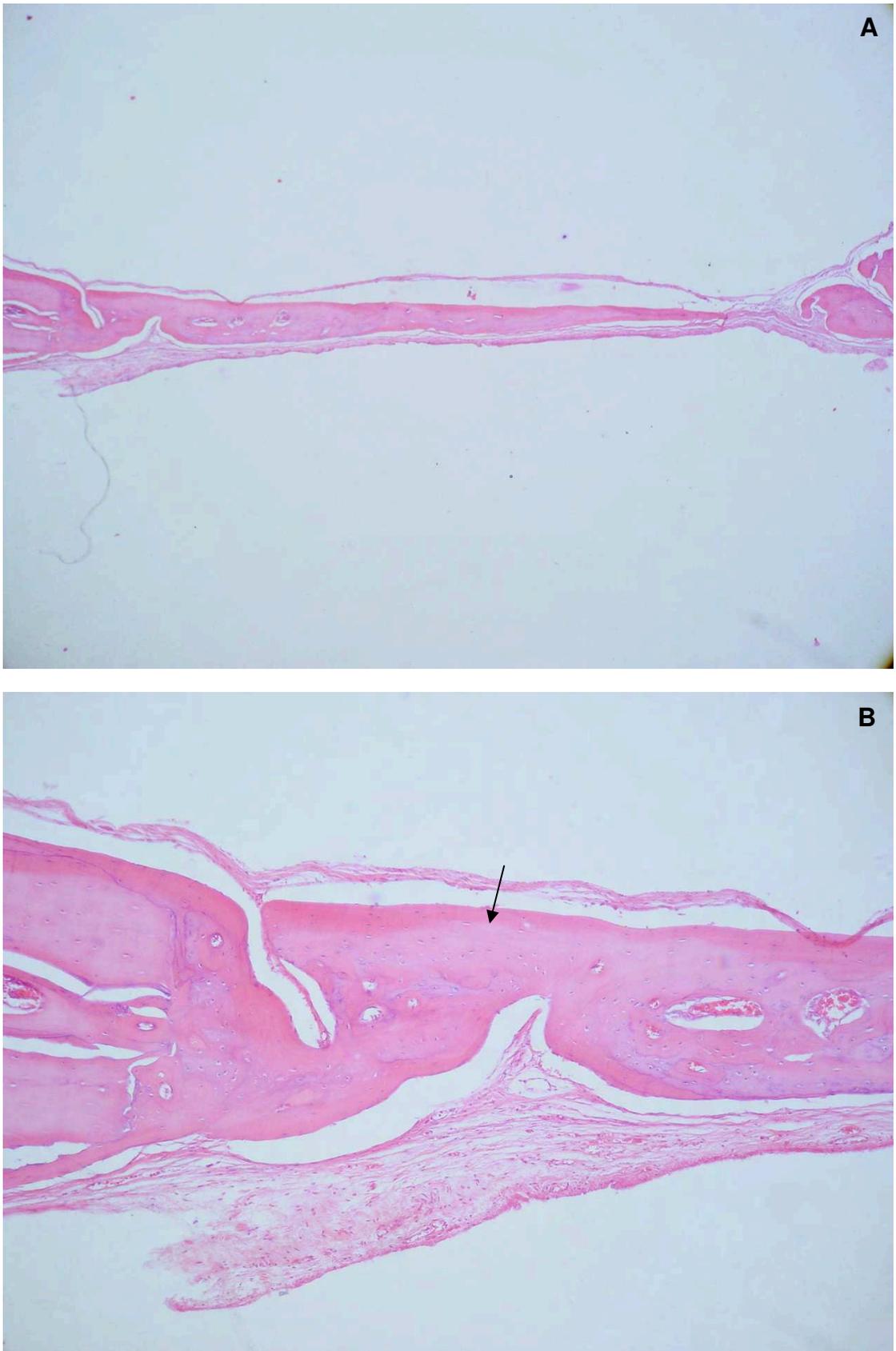


Figura 15 - Aspecto microscópico do grupo Controle 60. A) Área total do defeito evidenciando fechamento linear quase total. Aumento original de 25X. HE. B) Osso novo partindo das bordas com poucos espaços medulares (osso mais maduro) (→). Aumento original de 100X. HE

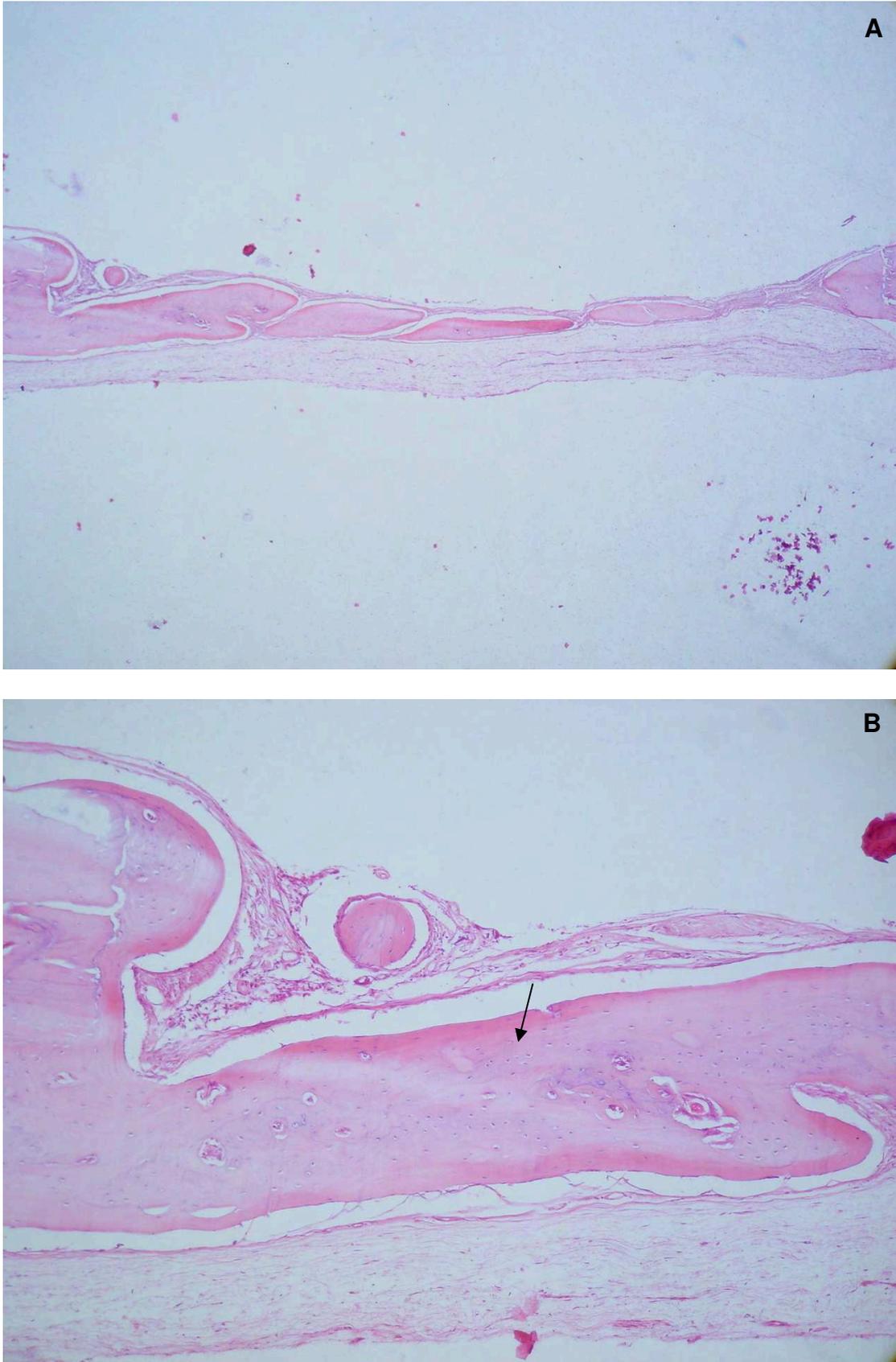


Figura 16 - Aspecto microscópico do grupo MODB 60. A) área total do defeito evidenciando fechamento linear quase total. Aumento original 25X. HE. B) Osso novo partindo das bordas com poucos espaços medulares (osso mais maduro) (→). Aumento original de 100X. HE

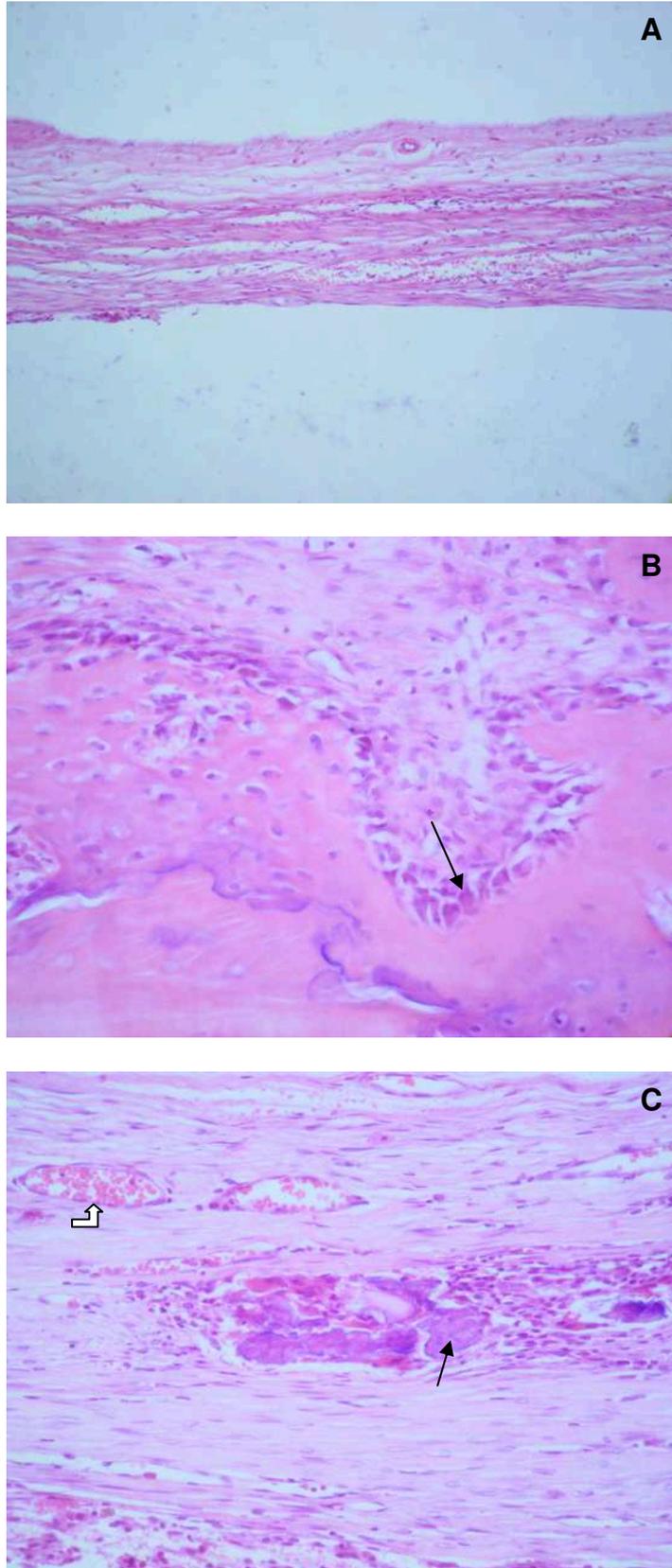


Figura 17 - Aspecto microscópico do grupo MODB-SIN 60. A) Área total do defeito evidenciando a presença apenas de tecido conjuntivo levemente mais espesso. Aumento original de 25X. HE. B) Presença de osteoblastos volumosos (→). Aumento original de 200X. HE. C) Material interpretado com resto de MODB (→), vaso congesto (↵). Aumento original 200X. HE

6 DISCUSSÃO

A utilização de um modelo animal para avaliar materiais para reparação óssea é bastante freqüente e a reprodutibilidade e acurácia são de extrema importância para o método científico (HOLLINGER; KLEINSCHIMDT, 1990).

A caracterização de defeito ósseo de tamanho crítico como aquele que não é reparado durante toda a vida do animal foi feita por Hollinger e Kleinschmidt (1990) e Schimtz et al. (1990), porém, devido ao período de estudo normalmente não ter duração tão longa, outros autores como Gosain et al. (2000), Develioğlu et al. (2006) consideraram que defeitos que não são reparados durante o tempo do estudo poderiam ser considerados críticos, proporcionando desta forma a confecção de defeitos de menor tamanho. Desta forma optou-se por utilizar neste estudo defeitos de 5mm que são considerados críticos de acordo com o conceito de Gosain et al. (2000), porém não o são por Hollinger e Kleinschmidt (1990). Outros autores também utilizaram defeitos de 5mm, com períodos de observação de até seis meses, em seus estudos e os consideraram críticos (DEVELIOĞLU et al., 2006; INODA; YAMAMOTO; HATTORI, 2007). No presente estudo foi observado o fechamento linear quase total dos defeitos não preenchidos (grupo Controle) aos sessenta dias o que nos permite sugerir que defeitos 5mm não devem ser utilizados por períodos maiores do que este.

A localização do defeito também é de suma importância e apesar de na odontologia o foco ser a área facial, Hollinger e Kleinschmidt (1990) não aconselham o uso de mandíbulas de pequenos animais como ratos, camundongos e coelhos, devido à dificuldade na realização das cirurgias. Os mesmos autores afirmam que a

utilização de calvárias é bastante interessante devido à ausência de incidência de forças musculares nesta região, o que poderia provocar o desalojamento do enxerto. Por estas razões decidiu-se pela utilização das calvárias de ratos no presente estudo, o que se mostrou bastante pertinente devido à facilidade de confecção dos defeitos.

Com relação às substâncias utilizadas no estudo, a MODB foi escolhida por ser de amplo uso como material substituto de osso autógeno (ACARTURK; HOLLINGER, 2006; COLNOT et al., 2005; HERCULIANI et al., 2000; MARDAS et al., 2003; ÖZTÜRK et al., 2006; WANG; GLIMCHER, 1999) e possuir características osseocondutoras (MARINS et al., 2004), e osseoindutoras, apesar da capacidade de osseoindução variar de acordo com a marca comercial (WANG J.C. et al., 2007). Optou-se pela utilização deste tipo de material de uma marca comercial nacional devido à facilidade de compra e de seu custo acessível. No presente estudo não puderam ser comprovadas as capacidades osseoindutora e osseocondutora da MODB, pois esta não apresentou melhores resultados do que o grupo controle, resultado semelhante ao obtido por Mardas et al. (2003), porém diferente do de autores que utilizaram material da mesma marca comercial (HERCULIANI et al., 2000; MARINS et al., 2004). Marins et al.(2004) observaram que em alguns animais de seu estudo houve reação granulomatosa, que impediu a neoformação óssea, o que eles atribuíram à deficiências no processamento do material. Neste estudo acreditamos que o mesmo pode ter acontecido.

Em relação à sinvastatina, esta foi utilizada devido a sua potencial capacidade osseoindutora através do aumento da expressão do VEGF e da BMP (MUNDY et al., 1999; WONG; RABIE, 2005). A dose escolhida, 2,2mg/56µl foi baseada em estudos anteriores de outros autores (ÖZEÇ et al., 2007; THYLIN et al., 2002), devido a falta

de consenso quanto a dose ideal e de alguns estudos mostrarem que a utilização de doses altas estimulam a neoformação e doses baixas não produziram o mesmo efeito (MARITZ et al., 2001; STEIN et al., 2005).

Autores como Von Stechow et al. (2003) e Anbinder et al. (2006) não observaram efetividade na estimulação de formação óssea pela sinvastatina, apesar de diversos outros autores (MUNDY et al., 1999; THYLIN et al., 2002; WONG; RABIE, 2005) terem observado o contrário. No estudo em questão a utilização da sinvastatina, influenciou negativamente na estimulação de neoformação óssea, resultado compartilhado por Ma et al. (2008), que afirmam ainda que há falta de estudos consistentes sobre os efeitos anabólicos e a biodisponibilidade da sinvastatina, fato que leva a resultados tão díspares entre os diversos estudos.

No presente estudo a utilização de altas doses locais de sinvastatina, causou intensa reação inflamatória, com necrose tecidual e formação de crosta, resultado compartilhado por Thylin et al. (2002), porém este tipo de reação também foi observado quando utilizadas doses menores como no estudo de Nyan et al. (2007) que utilizaram 1mg e Stein et al. (2005) que utilizaram doses de 0,5, 1,0, 1,5 e 2,2mg. Em nosso estudo observou-se também reabsorção no osso das bordas dos defeitos. Acreditamos que a sinvastatina atuou como irritante dos tecidos, visto que estas reações teciduais não foram observadas nos demais grupos. A associação da MODB às estatinas foi muito pouco estudada, podendo ser observada em apenas um trabalho (GALUS; WLODARSKI; WLODARSKI, 2006), que apesar de apresentar resultados positivos, não utilizou sinvastatina localmente. No presente estudo a associação direta da sinvastatina à MODB parece ter tornado a reabsorção desta mais lenta, o que pode ter influenciado negativamente a formação óssea nos animais que receberam tal tratamento.

As análises realizadas, radiográfica e histométrica, são muito difundidas no meio científico para a avaliação de reparos ósseos. Apesar de as avaliações radiográficas não serem consideradas de grande eficácia por alguns autores (PRYOR; SUSIN; WIKESJÖ, 2006), estas apresentam algumas vantagens como baixo custo e maior agilidade, porém seus resultados necessitam de confirmação por avaliações histomorfométricas. No presente estudo pôde-se confirmar a diferença de resultados entre as análises radiográficas e histomorfométricas, mostrando que a utilização de radiografias não demonstra confiabilidade suficiente para ser utilizada isoladamente. Além disso, na análise radiográfica avalia-se tecido calcificado, enquanto na análise histológica utilizada avaliou-se tecido ósseo descalcificado. Dessa maneira, as duas análises seriam complementares.

Novos estudos com doses e vias de administração diferentes de sinvastatina precisam ser desenvolvidos para melhor avaliar a utilização desta no auxílio da reparação de defeitos ósseos.

7 CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia utilizada neste estudo foi possível concluir que a associação MODB-SIN influenciou negativamente o reparo de defeitos ósseos em calvárias de ratos.

REFERÊNCIAS

- ACARTURK, T. O.; HOLLINGER, J. O. Commercially available demineralized bone matrix compositions to regenerate calvarial critical-sized bone defects. **Plastic and Reconstructive Surgery Journal**, v. 118, n. 4, p. 862-873, Set. 2006.
- ANBINDER, A. L. et al. Influence of simvastatin on bone regeneration of tibial defects and blood cholesterol level in rats. **Brazilian Dental Journal**, v. 17, n. 4, p. 267-273, 2006.
- AYUKAWA, Y.; OKAMURA A.; KOYANO K. Simvastatin promotes osteogenesis around titanium implants. A histological and histometrical study in rats. **Clinical Oral Implant Research**, v. 404, p. 343-52, Nov. 2004.
- BRAZ, F. et al. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 19-24, 2003.
- COLNOT, C. et al. Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 435, p. 69-78, June. 2005.
- DEVELIOĞLU, H. et al. Assessment of the effect of a biphasic ceramic on bone response in a rat defect model. **Journal of Biomedical Material Research**, v. 77A, p. 627-631, 2006.
- FROUM, S. J. et al. Sinus floor elevation using bovine bone matrix (OsteoGraf/N) with and without a clinical histological, radiographic and histomorphometric analysis- part 2 of an ongoing prospective study. **The International Journal of Periodontics**, v. 18, n. 6, p. 528-43, Dec. 1998.
- GALUS, R.; WLODARSKI, P.; WLODARSKI, K. H. Influence of fluvastatin on bone formation induced by demineralized bone matrix in mice. **Pharmacological Reports**, v. 58, p. 443-447, 2006.
- GOSAIN, A. K. et al. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-(beta) isoforms **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 106, n. 2, p. 360-371, 2000.

HERCULIANI, P. P. et al. Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. **Revista Brasileira de Implantodontia**, abr./jun., 2000.

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

INODA, H.; YAMAMOTO; G.; HATTORI, T., Rh-BMP2-induced ectopic bone for grafting critical size defects: a preliminary histological evaluation in rats calvarae. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 36, n. 1, p. 39-44, 2007

JAZAYERI, M. A. et al. Comparison of various delivery systems for demineralized bone matrix in a rat cranial defect model. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 5, n. 3, p. 172-179, 1994.

KARABUDA, C. et al. Histological and clinical evaluation of 3 grafting materials for sinus lifting procedure based on 8 cases. **Journal of Periodontology**, v. 72, n. 10, p. 1436-42, Oct. 2001.

KNESSER, U. et al. Evaluation of processed bovine cancellous bone matrix seeded with syngenic osteoblasts in a critical size defect rat model. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 3, p. 695-707, 2006.

MA, B. et al. The effect of simvastatin on bone formation and ceramic resorption in a peri-implant defect model. **Acta Biomaterialia**, v. 4, p. 149-155, 2008.

MANNAL, C. Early implant loading in severely resorbed maxilla using xenograft, autograft, and platelet rich plasma in 97 patients. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 64, n. 9, p. 1420-1426, Set. 2006.

MARDAS, N. et al. Osteogenesis by guided tissue regeneration and demineralized bone matrix. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, p. 176-183, 2003.

MARINS, L. V., et al. Radiographic and histological study of perennial bone defect repair in rat calvaria after treatment with blocks of porous bovine organic graft material. **Journal of Applied Oral Science**, v. 11, n. 1 p. 62-69, 2004.

MARITZ, F. J. et al. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 21, p. 1636-1641, Oct. 2001.

MATSUSHITA, N. et al. Accelerate repair of a bone defect with a sintetic biodegradable bone-inducing implant. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 11, p. 505-511, 2006.

McMILLAN, J. et al. Osteoinductivity of demineralized bone matrix in immunocompromized mice and rats is decreased by ovariectomy and restored by estrogen replacement. **Bone**, v. 40, p. 111-121, 2007.

MOGHADAM, H .G. et al. Histomorphometric evaluation of bone regeneration using allogeneic and alloplastic bone substitutes. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 62, p. 202-213, 2004.

MOON, H. J. et al. Effect of calcium phosphate glass on bone formation in calvarial defects of Sprague-Dawley rats. **Journal of Material Science Med**, v. 17, n. 9, p. 807-813, 2006.

MUNDY, G. et al. Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by statins. **Science**, v. 286, n. 5446, p. 1946-49, Dec.1999.

NYAN, M. et al., Bone formation with the combination of simvastatin and calcium sulfate in critical sized rat calvarial defect. **Journal of Pharmacologic Science**, v. 104, p. 384-386, 2007.

ÖZEÇ, I. et al. Effect of local simvastatin application on mandibular defects. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 18, n. 3, p. 546-550, May 2007.

ÖZTÜRK, A. et al. Demineralized bone matrix and hydroxyapatite/tri-calcium phosphate mixture for bone healing in rats. **International Orthopaedics**, v. 30, p. 147-152, 2006.

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

RICHARDSON, C. R. et al. Clinical Evaluation of Bio-Oss: a bovine-derived xenograft for treatment of periodontal osseous defects in human. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 26, n. 7, p. 1946-49, Dec. 1999.

SCHMITZ, J. P. et al. Characterization of calvarial nonunion defects. **Acta Anat**, v. 138, p. 185-192, 1990.

SCHWARTZ, Z. et al. Clinical evaluation of demineralized bone allograft in a hyaluronic acid carrier for sinus lift augmentation in humans: a computed tomography and histomorphometric study. **Clinical Oral Implant Research**, v. 18, p. 204-211, 2007.

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

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

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

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

WANG, J.; GLIMCHER, J. M. Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: Differences in the cellular response to demineralized bone matrix implanted in calvarial defects and in subcutaneous sites. **Calcified Tissue International**, v. 65, p. 156-165, 1999.

WANG, J. C. et al. A comparison of commercially available demineralized bone matrix for spinal fusion. **European Spine Journal**, v. 16, n. 8, p. 1233-1240, Aug. 2007.

WANG, J. W. et al. Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat. **Osteoporosis International**, v. 18, p. 1641-1650, 2007.

WONG, R. W. K.; RABIE, A. B. M. Statin collagen grafts used to repair defects in the parietal bone of rabbits. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 41, n. 4, p. 244-248, 2003.

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

WONG, R. W. K.; RABIE, A. B. M. Statin-induced osteogenesis uses in orthodontics: a scientific review. **World Journal of Orthodontics**, v. 7, n. 1, p. 35-40, Spring 2006.

ANEXO**Anexo A – Declaração do Comitê de Ética para Experimentação Animal**

Instituto Básico de Biociências
Avenida Tiradentes, nº 500 – centro
Cep: 12030-180 - Taubaté/SP
Tel/Fax: 3629-7909 - tel: 3629-2319
ibb@unitau.br e institutobio@unitau.br

DECLARAÇÃO

Dec. nº 016/07

Registro CEEA/UNITAU nº 0016/07 (esse nº de registro deverá ser citado pelo pesquisador nas correspondências referentes a este projeto).

Projeto de Pesquisa: Influência da associação da sinvastatina à matriz de osso bovino na reparação de defeitos ósseos em calvária de ratos.

Pesquisadora Responsável: Ana Lia Anbinder

Apresentar relatório final ao término da pesquisa: **maio/2008**

O Comitê de Ética para Experimentação Animal, em reunião de 30/03/2007 e no uso das competências definidas na Deliberação CONSEP Nº 362/2003, considerou o Projeto acima aprovado.

Taubaté, 27 de abril de 2007.


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

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

Carlos Eugenio Villaboim de Castro Lima

Taubaté, julho de 2008