

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**FELIPE SALES DOS SANTOS**

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DA SINVASTATINA E  
ROSUVASTATINA EM LESÕES ÓSSEAS POR ESCAREAÇÃO INDUZIDAS  
EXPERIMENTALMENTE NA TÍBIA DE RATOS WIST AR (*Rattus norvegicus*)**

UBERLÂNDIA

DEZEMBRO - 2018

**FELIPE SALES DOS SANTOS**

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DA SINVASTATINA E  
ROSUVASTATINA EM LESÕES ÓSSEAS POR ESCAREAÇÃO INDUZIDAS  
EXPERIMENTALMENTE NA TÍBIA DE RATOS WIST AR (*Rattus norvegicus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Anestesiologia e cirurgia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota

UBERLÂNDIA

DEZEMBRO - 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

S237e  
2018 Santos, Felipe Sales dos, 1986  
Estudo comparativo dos efeitos da sinvastatina e rosuvastatina em lesões ósseas por escareação induzidas experimentalmente na tíbia de ratos Wistar (Rattus norvegicus) [recurso eletrônico] / Felipe Sales dos Santos. - 2018.

Orientador: Francisco Cláudio Dantas Mota.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1228>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. 2. Rato. 3. Fraturas em animais. 4. Regeneração óssea. I. Mota, Francisco Cláudio Dantas, 1975, (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

---

CDU: 619

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias  
BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



## ATA

Ata da defesa de Dissertação de **MESTRADO ACADÊMICO** junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de mestrado acadêmico nº **PPGCV/ 023/ 2018**

Data: 19/12/2018

Hora início: 14:00

Discente: **FELIPE SALES DOS SANTOS** - Matrícula – 11612MEV008

Título da Dissertação: ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DA SINVASTATINA E ROSUVASTATINA EM LESÕES ÓSSEAS POR ESCAREAÇÃO INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE NA TÍBIA DE RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus*)

Área de concentração: SAÚDE ANIMAL

Linha de pesquisa: ANESTESIOLOGIA E CIRURGIA

Projeto de Pesquisa de vinculação: MÉTODOS DE REPARAÇÃO DE FALHAS ÓSSEAS

Reuni-se no Anfiteatro do Hospital Veterinário - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores(as) Doutores(as): **Geison Morel Nogueira** – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; **Endrigo Gabellini Leonel Alves** – Universidade de Uberaba e **Francisco Cláudio Dantas Mota** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da comissão **Dr./Dra. Francisco Cláudio Dantas Mota** concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para uma exposição do seu trabalho, contando com o tempo máximo de 50 minutos. A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a argüir o(a) candidato(a), durante o prazo máximo de (30) minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para resposta. Ultimada a argüição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Comissão Julgadora, em sessão secreta, considerou o(a) candidato(a):

( X ) APROVADO

( ) REPROVADO

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato (a) aprovado (a) sugerindo um novo título para o trabalho: \_\_\_\_\_

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme Regulamento do Programa, Legislação e a Regulamentação Interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar o(a) Presidente encerrou os trabalhos às 16 horas e 45 minutos, lavrou esta ata que será assinada por todos os membros da Comissão Examinadora. Uberlândia, 19 de Dezembro de 2018.

Prof. Dr. **Francisco Cláudio Dantas Mota**

Prof. Dr. **Geison Morel Nogueira**

Prof. Dr. **Endrigo Gabellini Leonel Alves**

---



Documento assinado eletronicamente por **Francisco Claudio Dantas Mota, Membro de Comissão**, em 20/12/2018, às 11:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Geison Morel Nogueira, Membro de Comissão**, em 20/12/2018, às 11:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Endrigo Gabellini Leonel Alves, Usuário Externo**, em 27/12/2018, às 10:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0920322** e o código CRC **3F490345**.

---

Referência: Processo nº 23117.089642/2018-75

SEI nº 0920322

**ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DA SINVASTATINA E  
ROSUVASTATINA EM LESÕES ÓSSEAS POR ESCAREAÇÃO INDUZIDAS  
EXPERIMENTALMENTE NA TÍBIA DE RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Uberlândia, 19 de dezembro de 2018

---

Prof. Dr. Francisco Claudio Dantas Mota

---

Prof. Dr. Geison Morel Nogueira

---

Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar, agradeço ao Universo, ou a Deus, por conseguir concluir esta trabalhosa dissertação e sempre ter conspirado à meu favor. Energia positiva sempre atrairá energia positiva.

À minha mãe, Almeriza, pelo hercúleo apoio nos meus momentos mais difíceis, por se dedicar à minha felicidade de forma incondicional. Agradeço de coração, mãe, sem você com certeza eu não teria conseguido.

Aos meus irmãos que, mesmo neste momento estando distantes e vendo-os com menor frequência, sei que torceram muito por mim, rezaram e continuarão até o fim de nossas vidas. É recíproco.

Ao meu pai, Israel, pelas palavras de apoio e incentivo que tanto precisava.

À minha namorada Suyanne pela paciência e fé que deposita em mim, muitas vezes até maior da que eu coloco em mim, mesmo, além da ajuda no tratamento e cirurgia dos animais do experimento, ficando sempre ao meu lado nesses 2 anos. Espero que a gente chegue a desistir de contar o tempo que estamos juntos.

Ao meu orientador, professor Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota, uma pessoa incrível, um veterinário excepcional e um professor que me ensinou muito do que eu sei hoje, e quem, também, lutou muito para que eu tivesse concluído o mestrado.

Ao professor Dr. Marcelo Emílio Beletti pelo profundo conhecimento e serenidade que teve comigo todo o tempo que me auxiliou de forma indispensável na interpretação das lâminas.

À professora Dra. Karen Renata Nakamura Hiraki e professor Dr. Luiz Borges Bispo da Silva, que disponibilizaram os recursos e me ensinaram sobre a execução dos trabalhos histológico e farmacológico utilizados.

Ao Dr. Matheus Matioli Mantovani pelas análises estatísticas feitas de forma criteriosa e impecável.

Aos técnicos Ester Cristina Borges Araújo e Fabrício Faria Araújo pelo auxílio nos momentos que confeccionava as lâminas histológicas.

Ao professor Dr. Marcio de Barros Bandarra por ter cedido o laboratório de patologia para utilização do micrótomo e ao técnico Igor Paula de Castro pelos excelentes cortes histológicos realizados no momento que mais precisei.

À professora Dra. Priscilla Barbosa Ferreira Soares e ao professor Carlos José Soares por ter aberto as portas do CPBio – UFU para que eu pudesse utilizar a máquina de

ensaios biomecânicos aqui utilizada e pelo enorme conhecimento e experiência na área que me passaram, foram fundamentais para um princípio de compreensão desta fascinante área da saúde.

Aos técnicos do CPBio Bruno e Jhon pelas dúvidas solucionadas e cooperação nos procedimentos ali realizados.

Ao Dr. Pedro Henrique Justino Oliveira Limirio pela importante ajuda na compreensão e análise dos resultados do ensaio biomecânico.

À toda equipe do Hospital Veterinário da UFU: Solange, Raquel Sales, Christiane, Raquel de Oliveira, Maria, Antônio,

Aos meus grandes amigos Leandro William Borges e Marcelo Carrijo da Costa, seres humanos fora do comum, com corações enormes e sempre dispostos a ajudar, tiveram papel imprescindível neste trabalho, tanto pela ajuda no desenvolvimento da dissertação, como pela amizade, conversas e desabafos ao longo de todo o mestrado.

Aos graduandos e pós-graduandos do ICBIM-UFU, pessoas fenomenais: pudemos compartilhar nossas angústias e desespero nesta fase tão importante de nossas vidas.

Aos alunos de iniciação científica Isabela, Carolina e Rafael pela ajuda no tratamento e cirurgia dos animais.



## **ANÁLISES HISTOLÓGICAS E BIOMECÂNICOS DE TÍBIAS DE RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus*) OSTEOTOMIZADAS TRATADAS COM SINVASTATINA E ROSUVASTATINA**

**Resumo** – As fraturas são frequentes em clínicas e hospitais veterinários, tendo grande relevância na cirurgia de pequenos animais. Porém seu processo de reparação é complexo e sujeito a diversas complicações, podendo levar a casos de união retardada ou não união. Devido à essas possíveis falhas, há diversos estudos sobre o tratamento dessas patologias, incluindo a utilização de estatinas como indutores de crescimento ósseo. Com isso, objetivou-se com este trabalho comparar os efeitos da sinvastatina e rosuvastatina via gavagem na regeneração óssea após osteotomias por escareação criadas experimentalmente em tíbias de ratos Wistar. Foram utilizados 45 ratos machos divididos igualmente em 3 grupos: controle (CS); rosuvastatina (RS) e sinvastatina (SS), sendo todos os animais tratados diariamente via gavagem do dia da cirurgia até o dia anterior às eutanásias, que ocorreram aos 3, 7 e 14 dias pós-operatório. Foram utilizadas análises histológicas descritivas e histomorfométricas para avaliar proliferação periosteal e endosteal, neoformação óssea na região da ferida e canal medular e atividades osteoblástica e osteoclástica, e ensaio biomecânico para obter a força máxima, energia e rigidez das amostras. Os grupos tratados com as estatinas obtiveram melhores resultados aos 7 e 14 dias nas avaliações histológicas e de ensaio biomecânico, sendo que o grupo tratado com sinvastatina obteve efeitos superiores ao tratado com rosuvastatina. Pode-se concluir que o uso das estatinas via gavagem trouxe efeitos positivos na velocidade e qualidade da reparação óssea de lesões por escareação em tíbias de ratos Wistar, tendo a sinvastatina os melhores efeitos entre os grupos testados.

Palavras-chave: estatitinas, não união, união retardada, fratura, BMP.

**COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECTS OF SINVASTATIN AND  
ROSUVASTATIN IN INJURED BONE BY SCAREAE INDUCED  
EXPERIMENTALLY IN THE TIBIA OF WISTAR (*Rattus norvegicus*)**

Abstract - Fractures are frequent in veterinary clinics and hospitals, having great relevance small animal surgery. However, repair process of the bone is complex and subject to several complications, which can lead to cases of delayed union or non-union. Due to these possible failures, there are many studies on the treatment of these pathologies, including the use of statins as inducers of bone growth. The aim of this study was to compare the effects of simvastatin and rosuvastatin via gavage on bone regeneration after scareae lesions experimentally created in tibiae of Wistar rats. A total of 45 male rats were used divided equally into three groups: control (CS); rosuvastatin (RS) and simvastatin (SS). All animals were treated daily via gavage from the day of surgery until the day before euthanasia, which occurred at 3, 7 and 14 postoperative days. Descriptive and histomorphometric histological analyzes were used to evaluate periosteal and endosteal proliferation, bone neof ormation in the wound and medullary canal, and osteoblastic and osteoclast activities, and biomechanical testing to obtain the maximum strength, energy and rigidity of the samples. Statin-treated groups achieved better results at 7 and 14 days in bone regeneration and in biomechanical assays, however, the use of simvastatin was superior to rosuvastatin, probably by her greater ease in crossing the cell membrane and by rosuvastatin being hepato-specific, with less bioavailability in other tissues, such as bone. However, new studies with a larger sample size are necessary to better understand the mechanisms of action of statins in fracture repair.

Keywords: Statins, non-union, delayed union, fracture, BMP.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BMP	Proteína morfogenética óssea
BMP-2	Proteína morfogenética óssea tipo 2
CEBEA	Centro bioterismo e experimentação animal
CEUA	Comitê de ética na utilização de animais
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
COX-2	Ciclooxigenase tipo 2
CS	Controle sistêmico
D	Deformação
E	Energia
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
FM	Força máxima
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HMG	3-hidroxi-3metil-glutaril
HMG-CoA	3-hidroxi-3metil-glutaril coenzima A
IL-1	Interleucina tipo 1
IL-2	Interleucina tipo 2
Kg	Quilograma
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
mg	Miligrama
mJ	milijoules
mL	Mililitro
MO	Medula óssea
MSC	Células-tronco mesenquimais
OC	Ossos cortical

OPC	Osteoprotegerina
R	Rigidez
RANK	Receptor ativador de fator nuclear kappa $\beta$
RANKL	Ligante de receptor ativador de fator nuclear kappa $\beta$
RS	Rosuvastatina sistêmica
SS	Sinvastatina sistêmica
TGF - $\beta$	Fator de crescimento transformador $\beta$
TNF	Fator de necrose tumoral
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
$\mu\text{m}$	Micrômetro
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Imagem fotográfica ilustrando as principais etapas para a realização da escareação óssea na tíbia de ratos Wistar.....	26
<b>Figura 2 -</b>	Imagens fotográficas da gavagem realizada em ratos Wistar.....	27
<b>Figura 3 -</b>	Imagem tipo “print screen” do programa HLImage 97® ilustrando parte das etapas executadas para a obtenção da porcentagem de área preenchida por neoformação óssea em região da osteotomia.....	29
<b>Figura 4 -</b>	Imagem tipo “print screen” mostrando continuação do procedimento para obtenção da porcentagem de área preenchida por neoformação óssea em região da osteotomia.....	30
<b>Figura 5 -</b>	Imagem tipo “print screen” mostrando última etapa do procedimento para obtenção da porcentagem de área preenchida por neoformação óssea em região da osteotomia.....	31
<b>Figura 6 -</b>	Imagens fotográficas do máquina universal de ensaio DL 2000 (EMIC). A – Imagem fotográfica mostrando o equipamento.....	32
<b>Figura 7 -</b>	Representação gráfica carga x deformação fornecido pela máquina de ensaios de materiais EMIC DL 2000 utilizado para determinação das propriedades mecânicas.....	33
<b>Figura 8 -</b>	Fotomicrografia representativa da porção proximal da tíbia de ratos submetida a osteotomia por escareação do grupo sinvastatina após 7 dias de tratamento.....	35
<b>Figura 9 -</b>	Fotomicrografias representativa dos 3 grupos das estruturas encontrada na região da osteotomia e canal medular aos 3 dias de tratamento.....	36
<b>Figura 10 -</b>	Fotomicrografias do processo de regeneração óssea após osteotomia por escareação com 7 dias de tratamento nos grupos controle (A), rosuvastatina (B) e sinvastatina (C). .....	37
<b>Figura 11 -</b>	Fotomicrografias do processo de regeneração óssea após osteotomia por escareação com 14 dias de tratamento dos grupos controle (A), rosuvastatina (B) e sinvastatina (C). .....	38
<b>Figura 12 -</b>	Fotomicrografia do processo de regeneração óssea em ratos Wistar do grupo sinvastatina aos 14 dias de tratamento. ....	39
<b>Figura 13 -</b>		

<b>Figura 14 -</b>	Representação gráfica mostrando a evolução da atividade osteoblástica nos grupos controle, rosuvastatina e sinvastatina nos períodos de avaliação. ....	40
<b>Figura 15 -</b>		41
<b>Figura 16 -</b>	Representação gráfica mostrando a evolução da atividade osteoclástica nos grupos controle, rosuvastatina e sinvastatina nos diferentes períodos de avaliação.....	42
	Fotomicrografia do processo de regeneração óssea em ratos Wistar do grupo sinvastatina aos 14 dias de tratamento. ....	
<b>Figura 17 -</b>	Representação gráfica mostrando a evolução da neoformação óssea em região cortical nos grupos controle, rosuvastatina e sinvastatina nos períodos de períodos de avaliação obtidos através de análise histomorfométrica. ....	43
<b>Figura 18 -</b>	Representação gráfica mostrando a evolução da neoformação óssea em região medular nos grupos controle, rosuvastatina e sinvastatina nos períodos de períodos de avaliação obtidos através de análise histomorfométrica. ....	44
<b>Figura 19 -</b>		44
<b>Figura 20 -</b>	Representação gráfica mostrando a evolução da força máxima nos grupos controle, rosuvastatina e sinvastatina nos períodos de períodos de avaliação obtidos através de ensaio biomecânico....	45
	Representação gráfica mostrando a evolução da energia nos grupos controle, rosuvastatina e sinvastatina nos períodos de períodos de avaliação obtidos através de ensaio biomecânico....	
	Representação gráfica mostrando a evolução da rigidez nos grupos controle, rosuvastatina e sinvastatina nos períodos de períodos de avaliação obtidos através de ensaio biomecânico....	

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>16</b>
<b>4.1</b>	<b>Sistema e tecido esquelético</b>	<b>16</b>
<b>4.2</b>	<b>Regeneração de fraturas</b>	<b>16</b>
<b>4.3</b>	<b>Enxertos e substitutos ósseos</b>	<b>19</b>
<b>4.4</b>	<b>Estatinas</b>	<b>21</b>
<b>4.5</b>	<b>Ensaio biomecânico</b>	<b>22</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
<b>5.1</b>	<b>Animais</b>	<b>25</b>
<b>5.2</b>	<b>Procedimento cirúrgico</b>	<b>25</b>
<b>5.3</b>	<b>Delineamento experimental</b>	<b>26</b>
<b>5.4</b>	<b>Eutanásia</b>	<b>27</b>
<b>5.5</b>	<b>Análise histológica descritiva</b>	<b>28</b>
<b>5.6</b>	<b>Análise histomorfométrica</b>	<b>28</b>
<b>5.7</b>	<b>Ensaio biomecânico</b>	<b>31</b>
<b>5.8</b>	<b>Análise estatística</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>6.1</b>	<b>Análise histológica descritiva</b>	<b>35</b>
<b>6.2</b>	<b>Análise histomorfométrica</b>	<b>41</b>
<b>6.3</b>	<b>Ensaio biomecânico</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>49</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>50</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>61</b>
	<b>ANEXO I</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Trabalhos de diversas regiões do país relatam que nos atendimentos realizados em clínicas e hospitais veterinários, as afecções ortopédicas possuem casuística elevada, (CRUZ-PINTO, et al., 2015; DREHMER, GAI, 2016; NEGRÃO, et al., 2008), sendo muitas delas casos de fratura, em que há solução de continuidade do osso ou cartilagem (PIERMATTEI; FLO; DECAMP, 2015). Dentre as principais etiologias das fraturas, destacam-se os traumas, como quedas e brigas, e acidentes automobilísticos (PROSBT, 2014), sendo estes, segundo Bentubo e colaboradores (2007), a terceira causa mais relevante de óbito nos animais.

Após a fratura, o processo reparação segue uma série eventos celulares e bioquímicos divididos didaticamente em três fases: inflamatória, reparadora e remodelatória (GRIFFON, 2014). Este processo é influenciado por diversos fatores, como a idade e condição clínica do paciente, localização e tipo de fratura, estabilidade e nutrição local (PIERMATTEI; FLO; DECAMP, 2006).

Diante de tantas variáveis, pode haver a ocorrência de falhas neste processo influenciado por fatores extrínsecos ou intrínsecos, resultando em atraso ou interrupção no mesmo, levando a graves complicações, como osteomielites, união retardada e não união, podendo levar a necessidade de amputação do membro afetado (PALMER, 2007).

Diante disto, pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de estimular a consolidação dos segmentos fraturados, principalmente em casos de união retardada e não união, e reduzir a ocorrência dessas complicações. Dessas pesquisas, surgiram tratamentos que são classificados quanto ao seu mecanismo de ação em osteocondução, osteogênese e osteoindução (AUTEFAGE; DEJARDIN, 2014).

Quando se baseia em osteocondução, cria-se um arcaço tridimensional para substituir o osso, porém é dependente do processo fisiológico do paciente. Através da osteogênese ocorre a transferência de células tronco mesenquimais, osteoblastos maduros ou em fase de maturação para a área afetada. Já coma osteoindução, promove-se aumento da regeneração, inibição da absorção ou



proliferação de células progenitoras através de citocinas e moduladores da inflamação (AUTEFAGE; DEJARDIN, 2014).

As estatinas, classicamente utilizadas como redutores dos níveis séricos de colesterol em hipercolesterolemia (MARCHESI et al., 2011), têm se mostrado efetiva nos processos de consolidação de fraturas, principalmente pela estimulação da expressão da proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2), glicoproteínas com capacidade de osteoindução (SYKARAS; OPPERMAN, 2003), resultando em melhora significativa da densidade óssea e redução do tempo para a consolidação das fraturas (EDWARDS; HART; SPECTOR, 2000).

Entre as estatinas, a sinvastatina tem sido a mais utilizada por possuir comprovada ação na consolidação óssea em ambientes saudáveis ou patológicos (CAMPO; CARVALHO, 2007), como também em casos de infecção e osteoporose ou até mesmo em dietas hiperlipídicas (MULDER et al., 2015).

A nova geração de estatinas sintéticas é representada pela atorvastatina e rosuvastatina (CAMPO; CARVALHO, 2007), fármacos que apresentam os mesmo benefícios das demais estatitinas, inclusive no tecido ósseo (GARG; PRADEEP, 2016; KIRZIOGLU et al. 2017), porém com redução dos efeitos adversos quando comparados às gerações anteriores (FONSECA, 2005; MAZZEI et al., 2012; KAHVECI et al., 2014; ERLANDSON et al., 2015).

Apesar disso, não se tem um estudo comparando os efeitos da sinvastatina e rosuvastatina na regeneração óssea, o que, frente a importância do problema, poderia servir como referência para os ortopedistas veterinários obterem uma maior taxa de sucesso no tratamento de não união e união retardada.

## 2 JUSTIFICATIVA

Falhas ou atrasos na regeneração óssea são distúrbios comuns na rotina ortopédica veterinária, podendo causar complicações de difícil solução, como união retardada e não-união, sendo indicado desde reintervenções cirúrgicas até a amputação do membro em casos mais graves, aumentando os custos para o tutor e riscos para o paciente. Neste sentido, há diversas técnicas no intuito de impedir e tratar este problema, desde enxertos biológicos do próprio paciente até biomateriais, porém ainda havendo a necessidade de submeter o paciente a manipulação aberta da fratura.

Neste cenário a utilização de estatitinas têm ganhado destaque nas pesquisas com regeneração óssea em diversas situações, como em periodontites, que ainda possui atividade anti-inflamatória, e osteoporoses, já sendo utilizada por possuir, além disso, grande vantagem tanto para o cirurgião, quanto para o tutor e paciente por poder ser administrada pela via oral.

Com isso, ao se encontrar o representante desta classe que possui maior eficácia no tratamento de lesões ósseas, aumenta a probabilidade de sucesso no tratamento destas complicações

### **3 OBJETIVO**

Objetivou-se com este estudo comparar os efeitos da sinvastatina e rosuvastatina via gavagem na regeneração óssea após osteotomias por escareação criadas experimentalmente em tíbias de ratos Wistar.

## **4 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **4.1 Sistema e tecido esquelético**

O sistema esquelético é vital e tem diversas funções para o organismo, servindo como suporte para tecidos moles, proteção de órgãos vitais, base mecânica para movimentos, armazenamento de minerais e hematopoiese (TAICHMAN, 2005).

Para exercer tais funções, os ossos sofrem modificações buscando o equilíbrio entre absorção e formação, podendo chegar a renovar 10% do seu volume por ano. Muito desse controle se deve a informações mecânicas que reorganizam o crescimento e densidade da células ósseas, processo chamado de remodelamento ósseo (GRIFFON, 2014).

As células responsáveis por esse processo são os osteoblastos e osteoclastos, responsáveis respectivamente por produção e reabsorção óssea, trabalhando em perfeito equilíbrio em animais saudáveis. Uma terceira célula envolvida neste processo é o osteócito são osteoblastos maduros, presos na sua própria produção matricial (LERNER, 2012).

Estas células estão imersas em matriz orgânica e inorgânica que compõe o osso. A matriz orgânica é composta por fibras colágeno e substâncias primárias, como proteoglicanos e glicoproteínas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012). Ela é responsável pela resistência óssea à impactos, pois gera relativa flexibilidade, aumentando a sua resistência à fraturas, compressão e tração (DALMOLIN et al., 2013).

Já a matriz inorgânica possui como principal componente o fosfato de cálcio, que ao se ligar ao hidróxido de cálcio forma hidroxiapatita, um composto que dá rigidez ao osso, dando suporte ao corpo (DALMOLIN et al., 2013).

### **4.2 Regeneração de fraturas**

Quando ocorre uma solução de continuidade no tecido ósseo, a resposta é mediada por osteoblastos e osteoclastos a fim de regenerar a fratura, que se

desenvolve em 3 fases didaticamente separadas: inflamação, reparação e remodelação. A primeira fase ocorre imediatamente após fratura óssea e lesão aos tecidos adjacentes, sendo caracterizada por formação de um hematoma, necrose isquêmica e formação de rede de fibrina na linha de fratura (GRIFFON, 2014). O coágulo formado ao redor da fratura e dentro da medula se tornará a referência para formação do calo ósseo (BARNES et al., 2003).

É nessa fase que há a maior concentração de mediadores pró-inflamatórios e de crescimento essenciais para a regeneração e reabsorção óssea, produzidos principalmente por plaquetas e macrófagos, que têm como finalidade tanto atrair mais células inflamatórias, estimular a neovascularização e produção de matriz extracelular, quanto induzir a proliferação e ativação de osteoclastos para a sua absorção. (CHO; GERSTENFELD; EINHORN et al., 2002)

Um fator de crescimento de grande relevância na consolidação de fraturas são as proteínas morfogenética óssea (*BMP*), especialmente a do tipo 2 (*BMP-2*), pois segundo pesquisa feita por Edgar e colaboradores (2007), sem essa proteína não há diferenciação osteoblástica à partir de células tronco mesenquimais (CTM) *in vitro*, tendo sua concentração máxima 24 horas pós-lesão no perióstio das zonas terminais de fraturas em murinos (TSUJI et al., 2006; XIONG et al., 2006).

As *BMP-2* possuem a propriedade de induzir diferenciação da CTM em condroblastos e osteoblasto, promovendo e acelerando tanto o processo de formação, quanto o de mineralização do calo fibroso por essas células (SYKARAS; OPPERMAN, 2003). Em estudos sobre regeneração óssea foi comprovada sua influência na formação do calo fibroso, também por aumentar incorporação de sulfato pelas proteoglicanas ( CHENG et al., 2003)

Já em relação a reabsorção óssea, as citocinas mais importantes são osteoprotegerina (OPG), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ), receptor ativador do fator nuclear *kappa* B (*RANK*) e *RANK* ligante (*RANKL*) (STEEVE et al., 2004), sendo as duas primeiras as mais importantes na diferenciação e ativação de osteoclasto (LACEY, 1998; SIMONET et al., 1997), tendo importância na remodelação das extremidades da fratura e, mais tardiamente, da cartilagem mineralizada (BARNES et al., 2003).

Além delas, as citocinas IL-1 e 6 também possuem ação na diferenciação e ativação de osteoclastos, inclusive tendo papel fundamental na formação das lacunas de Howship, criptas criada pelos osteoclastos na sua superfície em contato com o osso, criando um microambiente propício para as reações necessárias para a reabsorção óssea (KOBAYASHI et al, 2000).

Em seguida, ocorre a fase reparatória caracterizada pelo crescimento de vasos capilares e presença de células mononucleares e fibroblastos, que auxiliarão a transformação do hematoma em tecido de granulação e, em seguida, tecido conjuntivo fibrocartilaginoso (RAHN, 2002).

Concomitantemente a esse processo, células-tronco mesenquimais do periósteo, endósteo, da medula óssea e dos tecidos moles adjacentes vão, em ambiente com baixa tensão de oxigênio, se diferenciar em condrócitos. Essa diferenciação é desencadeada por vários fatores de crescimento, entre eles as proteínas morfogenéticas ósseas (*BMP*) e o fator de crescimento transformador  $\beta$  (*TGF- $\beta$* ) têm papéis de destaque (GRIFFON, 2014).

No início desta fase ainda não há vascularização eficiente, gerando uma baixa pressão parcial de oxigênio local, levando a diferenciação das CTM em condrócitos, ao invés de osteoblastos, iniciando a síntese e liberação de fibras colágenas no coágulo formando o “calo fibrocartilaginoso”, “calo fibroso” ou “calo mole”, processo que perdura durante as três primeiras semanas após a lesão (DIMITRIOU, 2005).

A partir deste momento, em um ambiente com menor mobilidade graças a estabilidade gerada pela formação do calo mole, o processo de neovascularização se intensifica, mediado principalmente pelo Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (*VEGF*) (CONNOLLY, 1989). A sua produção, assim como a eritropoietina, é estimulada principalmente por baixas tensões de oxigênio (GOLDBERG, 1994), além de outras citocinas, especialmente a *TGF- $\beta$*  (PERTOVAARA et al., 1994, SAADEH et al., 1999).

Após a intensificação da vascularização no calo fibrocartilaginoso, conseqüentemente aumentando a oferta de oxigênio, as CTM passam a se transformar principalmente em osteoblastos, dando início ao processo de mineralização local, onde os condrócitos concentram grânulos de cálcio, que serão liberados na matriz extracelular, onde são convertidos em micro cristais de apatita. De

forma simultânea, os compartimentos não mineralizados da matriz serão degradados por macrófagos, à medida que o tecido fibrocartilaginoso se torna vascularizado (GRIFFON, 2014).

Por último, a fase de remodelação é um processo lento que pode durar de meses a anos, em que o calo ósseo terá o seu contorno restaurado e será substituído por osso lamelar orientado de forma longitudinal (GRIFFON, 2014). Essa remodelação buscar voltar o mais próximo possível da sua conformação original, para isso ela segue um mecanismo definido como Lei de Wolff, que é dada de acordo com as cargas fisiológicas que são aplicadas a ele, adaptando-se a essas cargas por meio da estrutura e quantidade óssea (RAHN, 2002).

### **4.3 Enxertos e substitutos ósseos**

Os enxertos e substitutos ósseos estão sendo cada vez mais utilizados na medicina veterinária por possuírem propriedades osteogênicas, osteocondutivas e osteoindutivas (AUTEFAGE; DEJARDIN, 2014).

A osteogênese consiste na neoformação óssea através de células que consigam sobreviver após a transferência do tecido doador para o receptor. Já a osteoindução é o recrutamento e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos. Essa diferenciação será regulada por fatores de crescimento como *BMPs*, *TGF- $\beta$* , prostaglandinas, fatores de crescimento derivados de plaquetas, dentre outros. (MILLIS; MARTINEZ, 2007). E a osteocondução é um processo tridimensional de crescimento tecidual no interior do enxerto, servindo como um arcabouço para as células de crescimento (AUTEFAGE; DEJARDIN, 2014).

Os auto enxertos de osso esponjoso, embora sejam bastante efetivos e fáceis de se fazer, apresentam algumas desvantagens, como passar o paciente por um procedimento cirúrgico e anestésico e morbidade do sítio doador, além de não ser recomendado para tratamentos de grandes defeitos ósseos segmentares (acima de três centímetros em cães) por sofrerem reabsorção no centro do enxerto e da necessidade de coleta em vários locais para obtenção de um volume suficiente de material (SCHMAEDECKE et al., 2003, AUTEFAGE; DEJARDIN, 2014).

Há também o uso de transplante de osso vascularizado, contudo, segundo Autefage e Dejardin (2014), requer infraestrutura sofisticada e procedimento microcirúrgico importante, sendo raramente utilizada na veterinária. Já os aloenxertos corticais, ainda que muito utilizados, possuem disponibilidade limitada e alto custo pela necessidade de se ter um banco de ossos, e ainda existe o risco de rejeição, tornando a busca por substitutos ósseos uma necessidade na medicina veterinária e, por isso, o objetivo de muitas pesquisas.

O uso de substitutos ósseos são classificados de acordo com seu mecanismo de ação: abordagens com base na matriz, baseadas em células e baseada nos fatores de crescimento. A primeira consiste na utilização de uma estrutura de suporte para substituir o osso ausente, essa estrutura deve ser porosa para facilitar o crescimento interno de osso, mas pode ser limitado por falta de atividade biológica, pois depende da osteogênese do próprio organismo. Alguns exemplos são: cerâmicas de fosfato de cálcio, hidroxapatita coralina, vidros bioativos, matriz óssea desmineralizada e compostos de polímeros (FOSSUM, 2014, AUTEFAGE; DEJARDIN, 2014).

A abordagem com base em células fundamenta-se na transferência de células com potencial osteogênico, reduzindo a dependência de células osteoprogenitoras locais. Um exemplo é a utilização de células-tronco mesenquimais purificadas e expandidas por cultura, osteoblastos indiferenciados ou ainda medula óssea autóloga fresca, sendo esta a mais facilmente disponível (AUTEFAGE; DEJARDIN, 2014; FOSSUM, 2012).

Por fim, a abordagem baseada em fatores fornece de forma direta fatores de crescimento e diferenciação no defeito ósseo (AUTEFAGE; DEJARDIN, 2014). Entre outros fatores de crescimento que têm sido alvo de pesquisas, as proteínas morfogenéticas ósseas (*BMP*), que fazem parte da família dos fatores de crescimento transformador beta (*TGF-β*), parecem ter o maior potencial de osteoindução (SANTOS et al., 2005).

Ferrigno et al. (2007) relataram o uso de *BMP* em 33 cães com fraturas distais de rádio e ulna, sendo 17 destes alocados no grupo controle, onde a osteossíntese foi promovida por colocação de placa e parafuso, e os 16 restantes no grupo tratado com *BMP* em associação a placa e parafuso. Eles concluíram que houve uma redução



significativa no tempo de consolidação óssea no grupo tratado com *BMP* em associação ao tratamento convencional.

Porém, até os dias atuais, ainda não está totalmente esclarecida a melhor estratégia para reparação óssea utilizando os fatores de crescimento devido a questionamentos sobre a dose, o melhor veículo de distribuição para permitir o crescimento vascular, a proliferação de células osteoprogenitoras e invasão no arcabouço (PALMER, 2007).

#### 4.4 Estatinas

As estatinas são moléculas utilizadas para a redução da hipercolesterolemia impedindo a conversão de 3-hidroxi 3-metilglutaril (*HMG*) em mevalonato, uma molécula precursora e fundamental na produção de colesterol. Este efeito se dá através da inibição da enzima responsável por esta conversão, a *HMG* coenzima A (*HMG-CoA*), reduzindo a concentração sérica de lipoproteínas principalmente os de baixa densidade (*LDL*). (HAMELIN; TURGEON, 1998).

Porém há estudos recentes demonstrando diversos efeitos deste medicamento no organismo, além dos utilizados na prevenção de aterosclerose e doenças coronarianas, principalmente em tecido ósseo. Mundy e colaboradores (1999), foram os primeiros a provar a ação das estatinas na formação óssea através da estimulação da expressão da proteína morfogenética óssea 2 (*BMP-2*) em roedores, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*.

Monteiro e colaboradores (2016) comprovaram os mesmos efeitos ao utilizá-la em 90 ratas com osteoporose induzida por ovariectomia, as quais sofreram experimentalmente fraturas nos fêmures com posterior estabilização e tratamento com sinvastatina, nas doses de 5 e 20 mg/kg. Após realizadas as eutanásias em momentos distintos (7, 14 e 28 dias), avaliou-se que ambas as doses foram efetivas no auxílio da consolidação óssea, concluindo ainda que, para reduzir a dose oral, é necessário prolongar o tempo de tratamento.

Porém, estudos recentes têm demonstrado que a rosuvastatina, uma representante da nova geração de estatinas sintéticas, possui efeitos adversos

reduzidos quando comparada às gerações anteriores, também possuindo efeitos benéficos no metabolismo ósseo (ERLANDSON et al., 2015).

Como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) tem sido associado à deterioração da composição óssea (BARBOSA, 2013), este estudo realizado por Erlandson e colaboradores (2015) compararam o uso de rosuvastatina em 72 pacientes contra 75 placebo por 96 semanas. Ao final do estudo ficou comprovado o aumento da densidade mineral óssea tanto de trocânter maior do fêmur, quanto de todo o quadril, sem efeitos colaterais no grupo tratado pela rosuvastatina.

Garg e Pradeep (2016) realizaram um estudo onde 90 pacientes com defeitos de furca dentária grau 2 (consequência da periodontite, caracterizado por reabsorção óssea e perda da inserção da raiz dentária) foram alocados aleatoriamente em grupos tratados com placebo, atorvastatina e rosuvastatina. Após 6 e 9 meses concluíram que os dois últimos apresentaram melhora em todos os parâmetros clínicos, sendo a rosuvastatina mais eficaz na redução da profundidade do defeito ósseo.

#### **4.5 Ensaio biomecânico**

Os ensaios biomecânicos são realizados afim de se obter as propriedades mecânicas do osso, estas podendo ser definidas como resposta do osso a determinadas forças, denominadas como cargas e variam conforme a composição do tecido ósseo e sua anatomia, como tamanho e formato (SHAHAR; BANKS-SILLS; ELIASY, 2003).

As forças fisiológicas são aquelas originadas pelo peso, pela contração muscular e esforço físico, sendo conduzidas aos ossos através das superfícies articulares e contração muscular. As forças fisiológicas são de tensão e compressão, chamadas de axiais, mas podem gerar ações de flexão e torção e geralmente não ultrapassam a capacidade máxima do osso de resistir a fraturas ósseas (HULSE; HYMAN, 2007).

O tecido ósseo apresenta maior resistência quando submetido à cargas compressivas, resistência intermediária quando submetido a cargas de cisalhamento

e menor resistência quando submetidos a cargas de tração. Por apresentar essas diferenças em suas propriedades mecânicas conforme o sentido da carga aplicada, o tecido ósseo é conhecido como material anisotrópico (EIHORN, 1996)

O osso possui na estrutura componentes orgânicos e inorgânicos que conferem características físicas como flexibilidade e rigidez, respectivamente. A matriz orgânica é composta principalmente por fibras colágeno tipo I e proteoglicanos, conferindo flexibilidade e capacidade de absorver impactos, enquanto que a matriz inorgânica é formada basicamente por hidroxiapatita a base de cálcio e fosfato, dando dureza e rigidez à estrutura, reduzindo a sua elasticidade (DEMPSTER, 2006).

A deposição dos cristais da matriz inorgânica é feita no espaço formado no interior da rede de moléculas que formam o colágeno e na sua superfície, dando origem a uma rede de fibrilas colágenas mineralizadas. Portanto, a proporção entre as duas ultraestruturas dá resistência à fratura, com mais ou menos resistência à flexão e capacidade de absorver impactos (CURREY, 2006)

Visando analisar as propriedades mecânicas em um experimento, existem diversos tipos de ensaio, que sob condições controladas, envolve a aplicação de forças conhecidas e medida de deformação produzida. No ensaio de flexão a carga é aplicada no eixo longitudinal do osso, gerando compressão no lado do contato e tensão no lado oposto. Quando a força aplicada a um objeto gera uma deformação, que retorna ao seu ponto original após a sua retirada, é chamada de deformação elástica, e quando a carga exercida gera uma deformação permanente, recebe o nome de deformação plástica. Continuando o aumento da força, chega-se ao ponto de fratura, neste momento é obtido a força e deformação máximas (SCHWARZ, 1996).

Durante o ensaio com aparelhos específicos, a cada incremento de carga aplicada no material é dada a deformação correspondente, que posteriormente irá gerar o gráfico força x deformação. A partir desta curva é obtida as propriedades mecânicas do osso analisado (EINHORN, 1996).

Três importantes parâmetros utilizados para se avaliar propriedades mecânicas do osso são a força máxima, deformação máxima e a energia absorvida antes da fratura. A força máxima é a carga máxima que o osso suporta sem se partir e varia, assim como a deformação máxima antes da fratura, com a velocidade e o tipo de força aplicada (tensão, compressão, flexão, torção e cisalhamento). Já a energia absorvida

é calculada pela área formada no gráfico força x deformação e, portanto, depende destas duas variáveis (DALMOLIN, 2013).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU), processo 106/16.

### 5.1 Animais

Foram utilizados 45 ratos da linhagem Wistar machos, não castrados, acondicionados em gaiolas apropriadas, forradas com maravalha e alojados no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CEBEA - UFU) recebendo água e ração *ad libidum*. Cada gaiola continha 5 animais, onde os mesmos passaram por um período de ambientação até a cirurgia experimental.

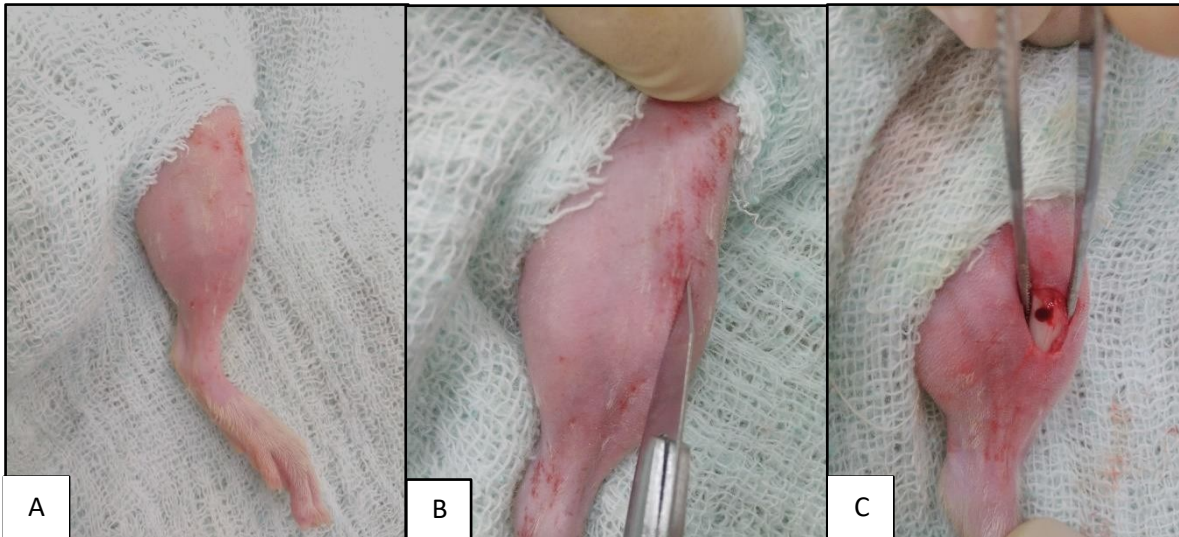
### 5.2 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina 10% (120 mg/kg), cloridrato de xilazina 2% (10 mg/kg) e cloridrato de tramadol 5% (10mg/kg) em uma única aplicação por via intramuscular.

Após 10 minutos da aplicação da anestesia, foram tricotomizados os membros pélvicos dos animais (Figura 1A). Com o animal em decúbito dorsal, foi feita anti-sepsia com polivinilpirrolidona 2% seguido de álcool-iodado 0,1%.

Verificado a presença de analgesia, foi feita uma incisão longitudinal de pele, na face medial da perna sob a região proximal da tíbia (Figura 1B). O tecido subcutâneo nesta região foi afastado com o auxílio de pinças anatômicas, de modo a expor a porção proximal da tíbia. Em seguida uma falha óssea de 1,5 mm de diâmetro monocortical (Figura 1C), foi criada aproximadamente 8mm distal a articulação do joelho, em ambos os membros pélvicos, com o auxílio de uma broca de 1,5 mm

acoplada a uma mini retífica de baixa rotação marca Dremer®, sobe irrigação constante de solução fisiológica para evitar termonecrose do tecido ósseo.



**Figura 1** - . Imagem fotográfica ilustrando as principais etapas para a realização da escareação óssea na tíbia de ratos Wistar. A- Membro após tricotomia e antissepsia. B- Bisturi sobre o local de incisão em terço proximal da tíbia. C- Osteotomia circular de 1,5mm de diâmetro monocortical realizada na região proximal da tíbia

Após a inspeção da região osteotomizada e das partes moles adjacentes, promoveu-se a limpeza da área com solução fisiológica para remoção dos fragmentos ósseos. A sutura de subcutâneo e pele foi realizada em um único padrão de sutura tipo Wolff usando-se fio de *nylon* 3-0. Nos três dias seguintes às cirurgias, todos os animais receberam tramadol por via intramuscular para analgesia pós-operatória

### 5.3 Delineamento experimental

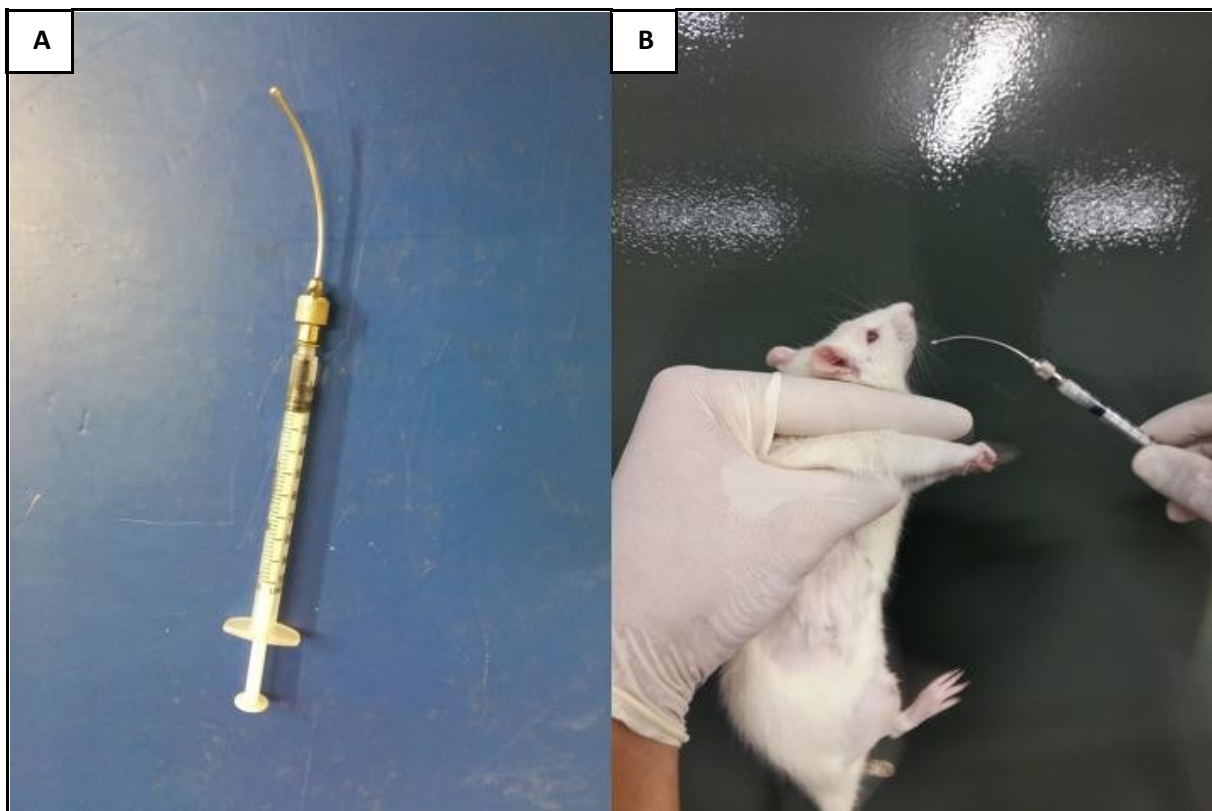
Os animais foram aleatoriamente e igualmente divididos em três grupos:

- Controle sistêmico (CS), submetido a administração apenas do veículo, composto por carboximetilcelulose a 5% no volume total de 1ml/kg.

- Rosuvastatina sistêmica (RS), submetido a administração de rosuvastatina na dose de 5mg/kg (TÜRER, 2016) diluído em carboximetilcelulose a 5%, até obter um volume final de 1 mL/kg.

- Sinvastatina sistêmica (SS), submetido a administração de sinvastatina na dose de 20mg/kg (ANBINDER, 2006) diluído em carboximetilcelulose a 5%, até obter um volume final de 1 mL/kg.

Todos os grupos foram tratados diariamente por gavagem através de uma seringa de 1 ml e agulha de gavagem para ratos (Figura 2), iniciando o tratamento no mesmo dia da cirurgia, após a total recuperação anestésica dos animais, até um dia antes eutanásia.



**Figura 2** - Imagens fotográficas da gavagem realizada em ratos Wistar. **A**- Seringa de 1ml acoplada a agulha de gavagem para ratos. **B**- Contenção física realizada em rato Wistar e posição para da serinda e agulha de gavagem para realização da gavagem.

#### 5.4 Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia nos dias 3, 7 e 14 de pós-operatório, utilizando-se sobredose de tiopental sódico por via intraperitoneal (100mg/kg), conforme recomendado pela Resolução 1000 de 11 de maio de 2012 do CFMV, que dispõe sobre os métodos de eutanásia para animais.

Após a eutanásia, ambas as tíbias foram desarticuladas e os tecidos moles adjacentes removidos. As tíbias esquerdas foram fixadas em formol a 10% tamponado, por um período mínimo de 48 horas, a temperatura ambiente, para posterior análise histológica.

As tíbias direitas foram enroladas em gaze embebidas em solução fisiológica e mantidas congeladas até a data dos ensaios biomecânicos.

### **5.5 Análise histológica descritiva**

Após período de fixação, as tíbias destinadas à avaliação histológica foram descalcificadas em EDTA com pH 7.4, sendo este trocado a cada 2 dias durante 30 dias. Após a descalcificação, as amostras foram enxaguadas em água destilada, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina, segundo técnicas de rotina.

Foram confeccionadas 5 lâminas para cada peça, com cortes seriados longitudinais a osteotomia de cinco micrômetros de espessura, com 60 micrômetros entre si. As lâminas foram coradas por hematoxilina e eosina (HE) para posterior análise descritiva e quantitativa.

Para análise histológica descritiva, as lâminas histológicas foram submetidas a avaliação em sistema duplo cego para identificar as estruturas na área de osteotomia e canal medular e determinar a proliferação periosteal, atividade osteoblástica e atividade osteoclástica através da utilização de escores.

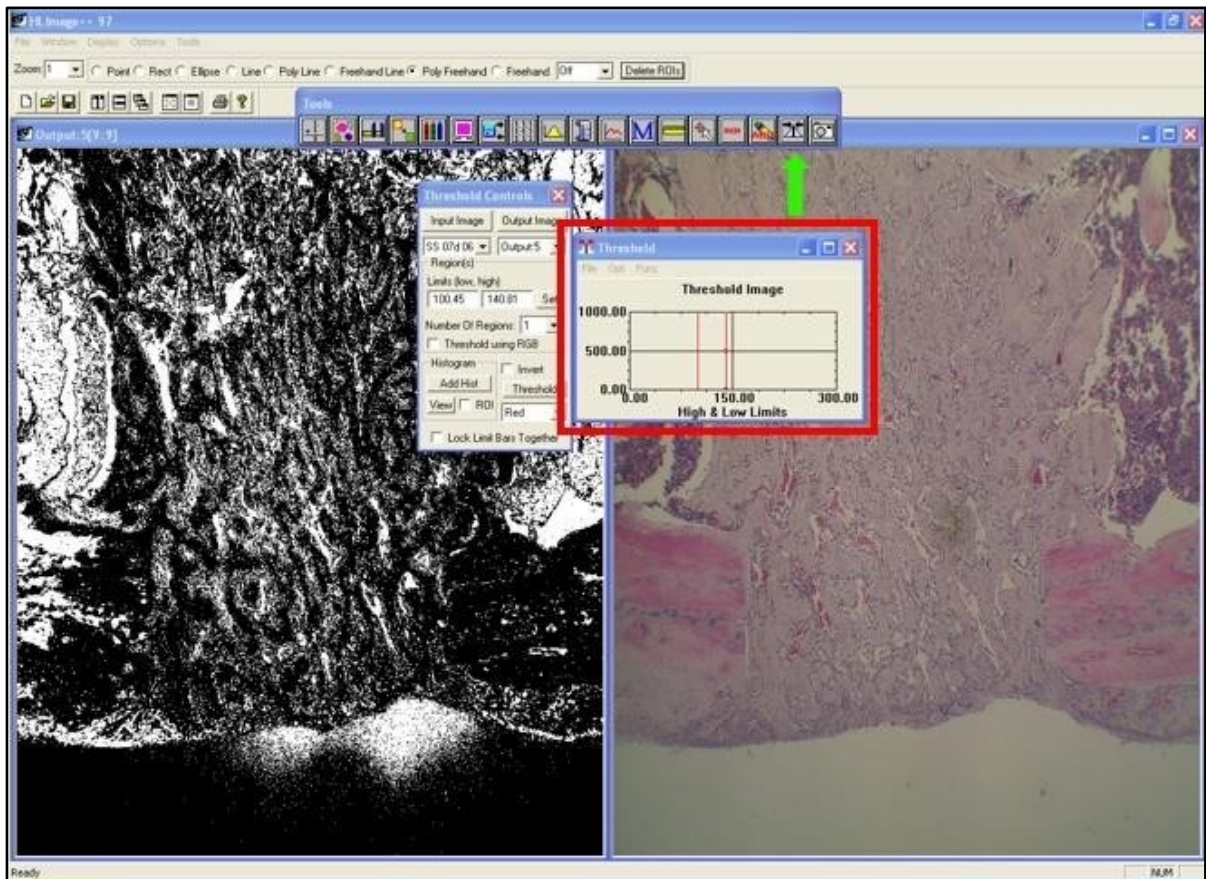
Para a proliferação periosteal foi dado escores de 1 a 5, em que 1 indicava - muito fraca, 2- fraca, 3- moderada, 4- intensa e 5- muito intensa, enquanto que as atividades osteoblásticas e osteoclásticas foram divididas também escores de 1 a 5, porém consideradas: 1- muito baixa, 2- baixa, 3- moderada, 4- alta e 5- muito alta.

### **5.6 Análise histomorfométrica**

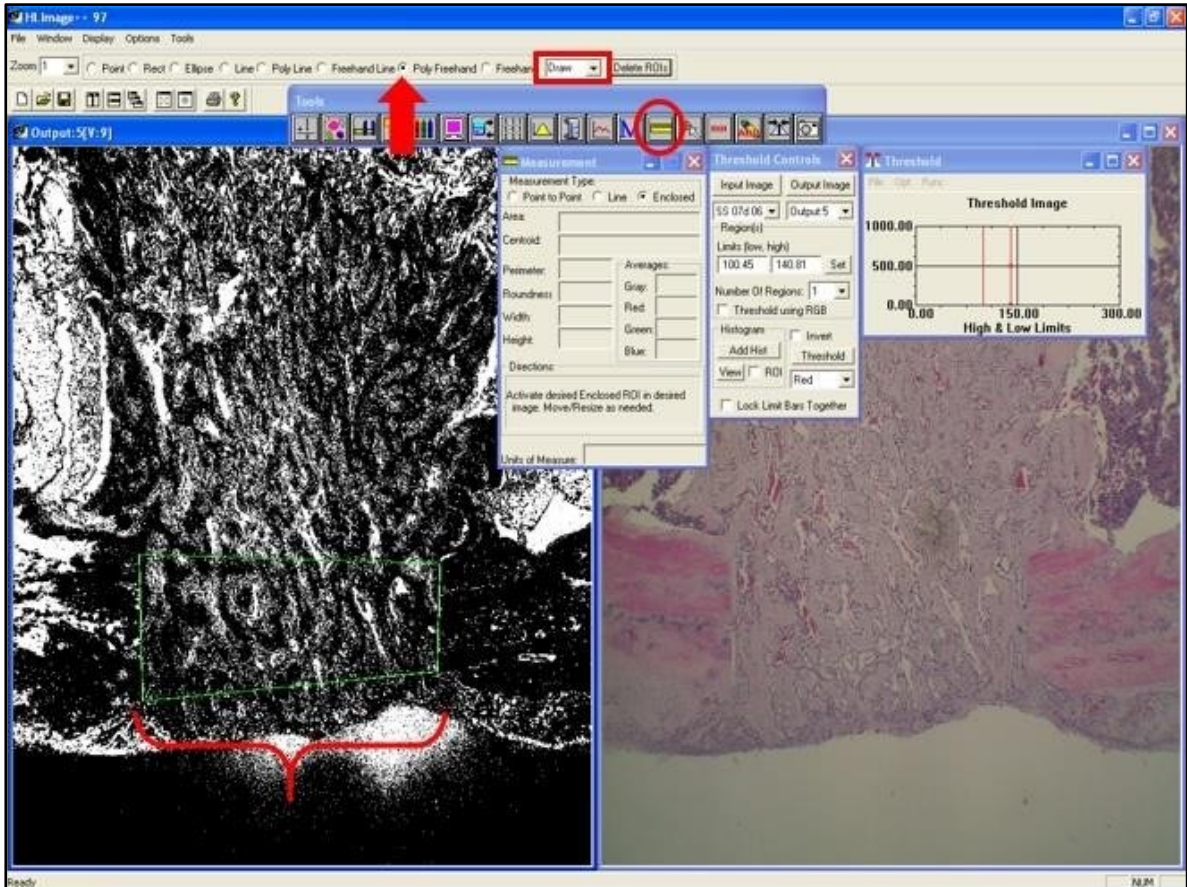
Após a análise descritiva, as lâminas foram levadas ao microscópio de luz Leica DM500 acoplada a câmera Leica IC50 (Leica Microsystems Inc., Buffalo Grove, IL, EUA), onde as imagens foram obtidas com objetiva de 4x. Em seguida, estas imagens foram submetidas à análise pelo programa HL Image 97<sup>®</sup>, onde era mensurada a



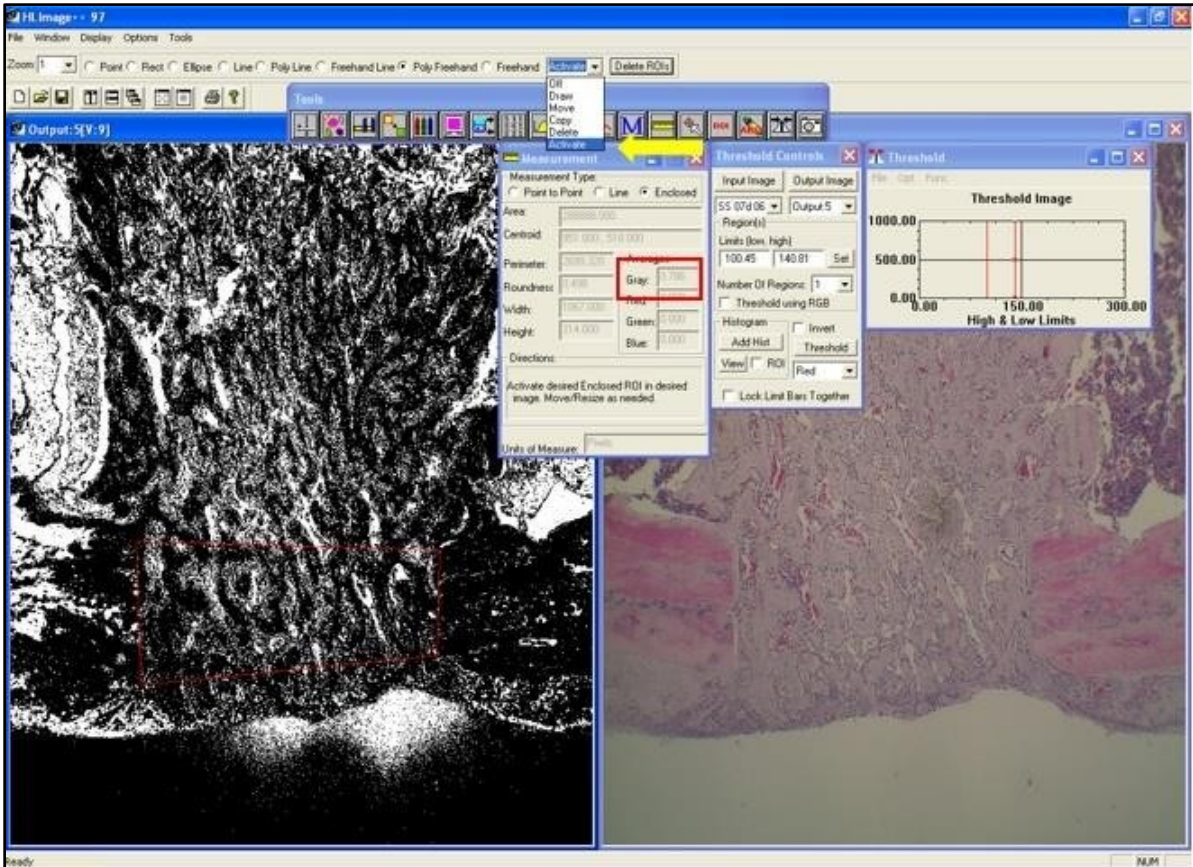
neoformação óssea na região da cortical e do canal medular sobre a área lesionada, utilizando ferramenta “*threshold*” (limiar), segmentado as imagens para escala de cinza, evidenciando o tecido ósseo nessas tonalidades e mantendo demais tecidos na cor branca. Após esse procedimento, com a ferramenta “Draw” no modo “Poly Freehand” era demarcada a área a ser analisada pelo dispositivo “Measurement”, selecionando a área previamente demarcada com a ferramenta “Activate” (Figuras 3, 4 e 5).



**Figura 3** – Imagem tipo “*print screen*” do programa HLImage 97® ilustrando parte das etapas executadas para a obtenção da porcentagem de área preenchida por neoformação óssea em região da osteotomia. À partir da ferramenta “*Treshold*” (**seta verde**), obtinha-se o gráfico (**quadrado vermelho**) onde era possível transformar a imagem colorida original, à direita, para uma imagem em em que as áreas preenchidas por osso ficassem em escala de cinza.



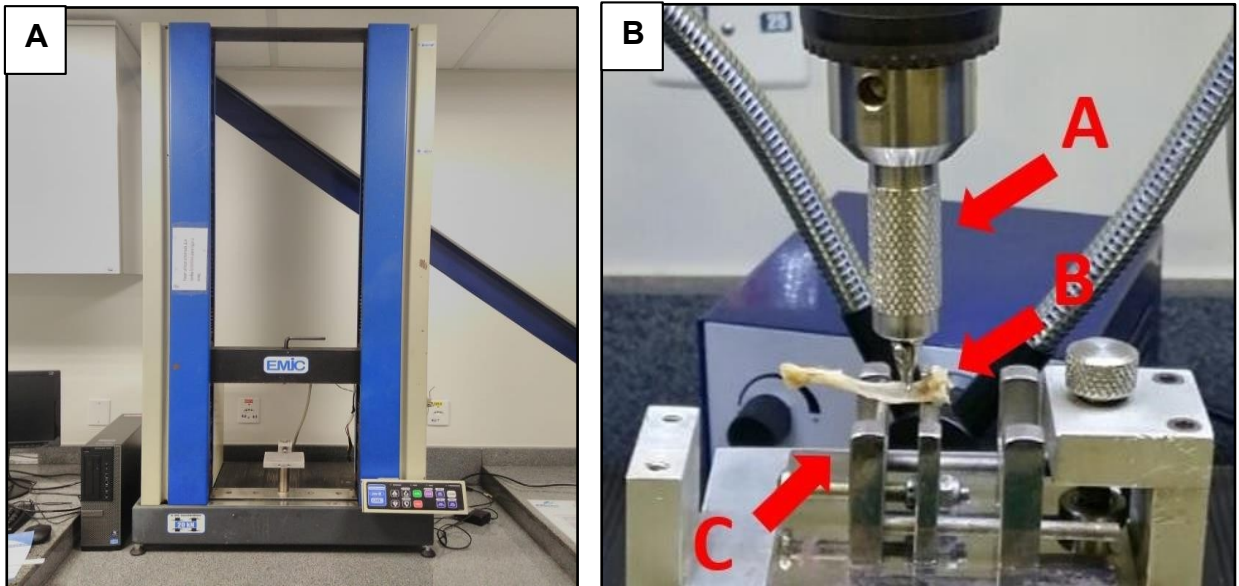
**Figura 4** – Imagem tipo “print screen” mostrando continuação do procedimento para obtenção da porcentagem de área preenchida por neoformação óssea em região da osteotomia. Após a transformação da imagem original para uma imagem em escala de cinza, selecionava-se a ferramenta “Draw” (quadrado vermelho) no modo “Poly Freehand” (seta vermelha) para selecionar a área a ser analisada (chave vermelha) e, em seguida, era selecionada a ferramenta “Measurement” (círculo vermelho).



**Figura 5** - Imagem tipo “print screen” mostrando última etapa do procedimento para obtenção da porcentagem de área preenchida por neoformação óssea em região da osteotomia. Para obtenção da porcentagem de preenchimento por osso na região da osteotomia, era ativada a ferramenta “Activate” (seta amarela) e, posteriormente, selecionada a área previamente definida. A área preenchida por osso era demonstrada na caixa de texto “Gray” da janela “Measurement” (quadrado vermelho), sendo o valor aferido multiplicado por 100 para se obter o valor em porcentagem.

## 5.7 Análise biomecânica

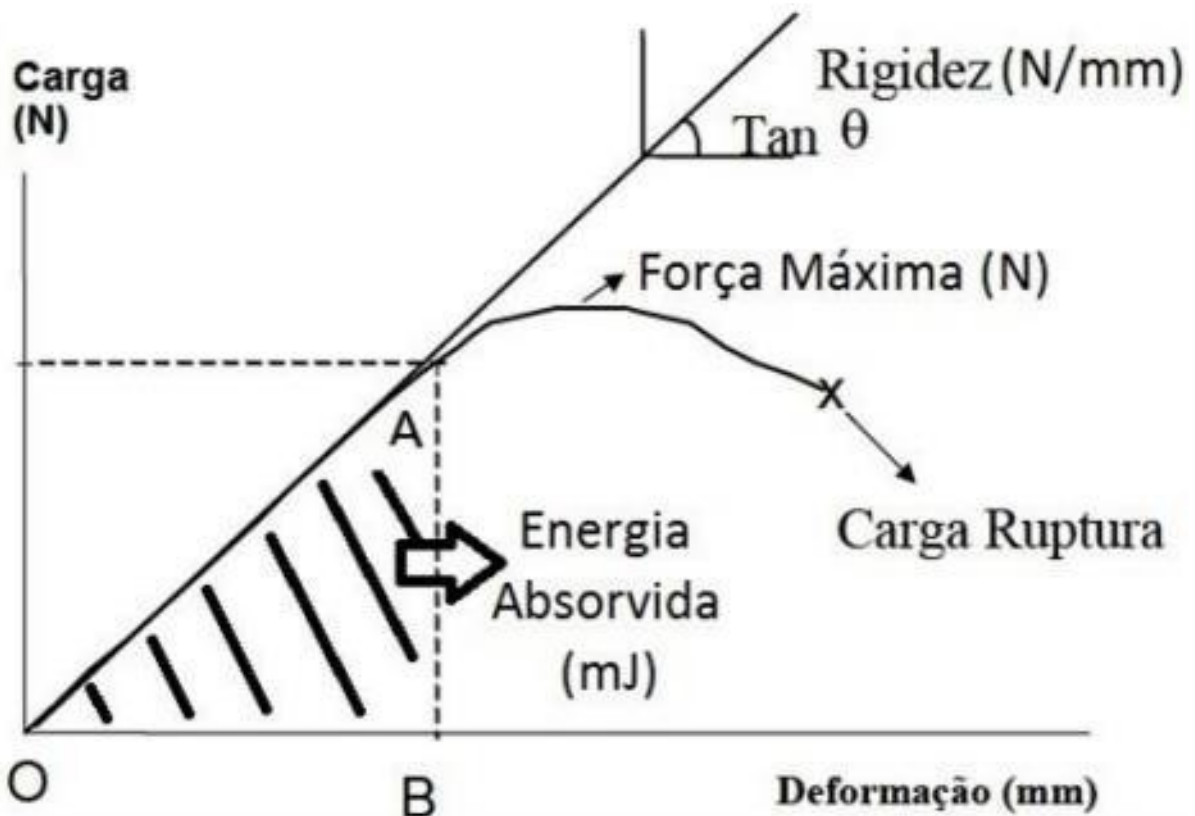
As tíbias utilizadas no ensaio biomecânico foram armazenadas em gaze embebidas em solução fisiológica e mantidas congeladas até a data dos ensaios biomecânicos, que foram realizados utilizando máquina de ensaios de materiais (EMIC DL 2000, EMIC Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais, Brasil). O modelo de experimentação utilizado foi o de compressão em três pontos, com a carga teste aplicada transversalmente à face oposta a da osteotomia, por meio de um pino superior sobre dois apoios do dispositivo a uma distância de 10 mm (Figura 6).



**Figura 6** – Imagens fotográficas do máquina universal de ensaio DL 2000 (EMIC). **A** – Imagem fotográfica mostrando o equipamento. **B** – Imagem fotográfica ampliada ilustrando o posicionamento da tíbia na máquina universal de ensaio: ponta aplicadora de carga (A); tíbia posicionada (B); suporte com dispositivo de assentamento da amostra (C).

Esta configuração foi padronizado para criar maior estabilidade da tíbia e para que a força de aplicação ficasse exatamente sobre o orifício realizado. Para todas as amostras foram usadas células de carga de 50 kgf e velocidade de 1 mm/min, com pré-carga de 5 N e tempo de acomodação de 30 segundos.

Os dados fornecidos pela máquina de ensaio foram força aplicada (F), em Newtons (N), e a deformação sofrida pelo osso (D) em milímetros (mm), em relação ao tempo até o momento da fratura. Esses dados foram inseridos em uma planilha do Excel e foi gerado um gráfico FxD (Figura 7).



**Figura 7** – Representação gráfica carga x deformação fornecido pela máquina de ensaios de materiais EMIC DL 2000 utilizado para determinação das propriedades mecânicas. Está ilustrado as formas de se obter a força máxima e calcular a rigidez à partir do cálculo da inclinação da curva ( $\tan \theta$ ) e energia à partir da área da área AOB correspondente a fase elástica do ensaio.

Em seguida, foram calculados a Energia (E) em milijoules (mJ), e a Rigidez (R), em N/mm, em cada momento “n”, seguindo os mesmos cálculos desenvolvidos por Limirio e colaboradores (2018), através das fórmulas:

$$E_n = (D_{n+1} - D_n) \times ((F_{n+1} + F_n)/2)$$

$$R_n = F_n / D_n$$

Onde n é o momento calculado e n + 1 é o momento seguinte ao calculado.

Enfim, para calcular a Energia absorvida foi feita a soma da “E” em todo o período até o momento da fratura, que equivale a área criada abaixo do gráfico, e a rigidez total da amostra foi realizada a média de R do início da maior inclinação da curva do gráfico até a força máxima.

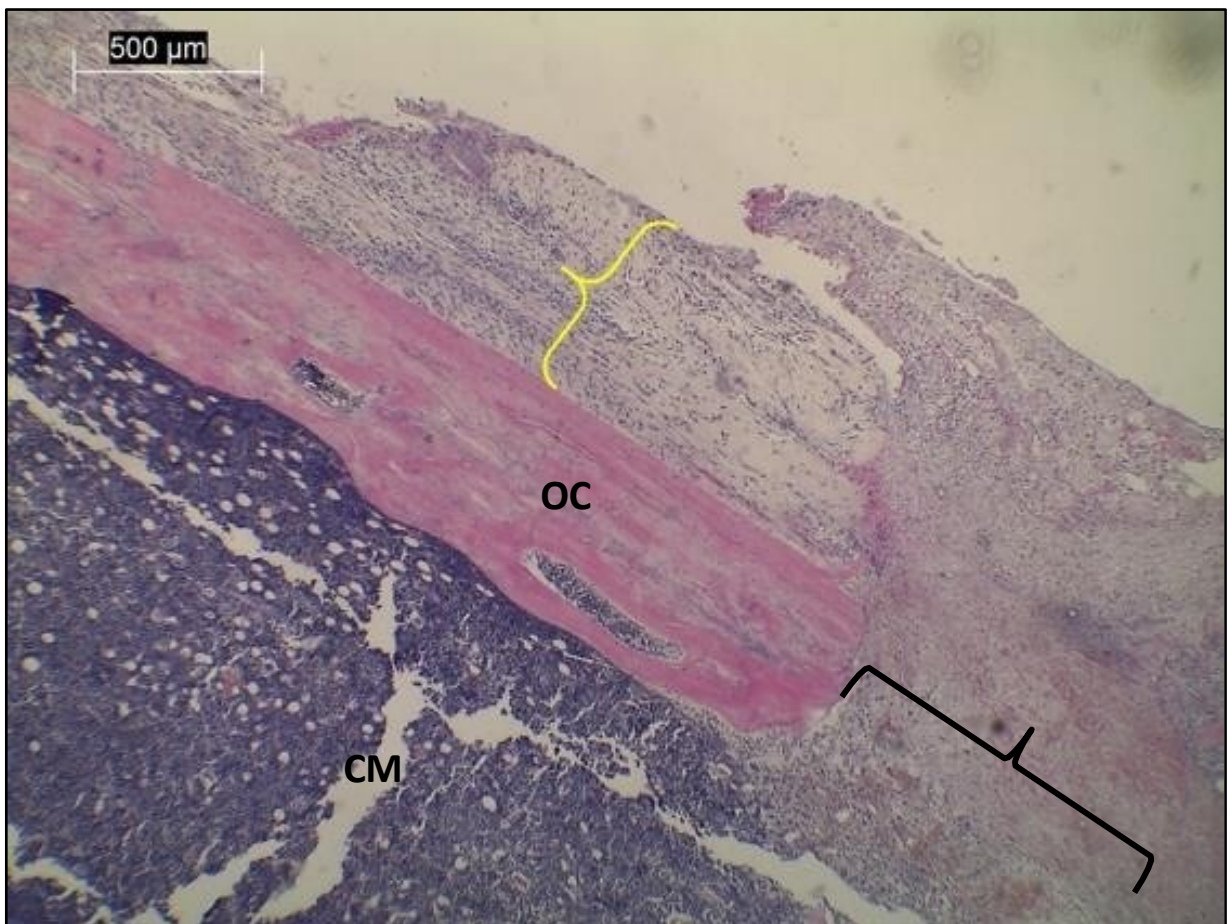
## 5.8 Análise estatística

Todas as variáveis foram submetidas ao teste de Shapiro-Wilk para verificar se os dados apresentavam ou não distribuição paramétrica. As variáveis com distribuição paramétrica foram expressas em média e desvio padrão, enquanto que as que apresentavam distribuição não paramétrica foram apresentadas suas medianas e valores mínimo e máximo. A comparação entre as médias de cada grupo foi feita por meio do teste de ANOVA com pós-teste de Tukey, ao passo que a comparação entre as medianas de cada grupo foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. A comparação entre os dias dentro do mesmo grupo foi feita por meio do teste T pareado (dados paramétricos) ou teste de Wilcoxon (dados não paramétricos). O nível de significância adotado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 6 RESULTADOS

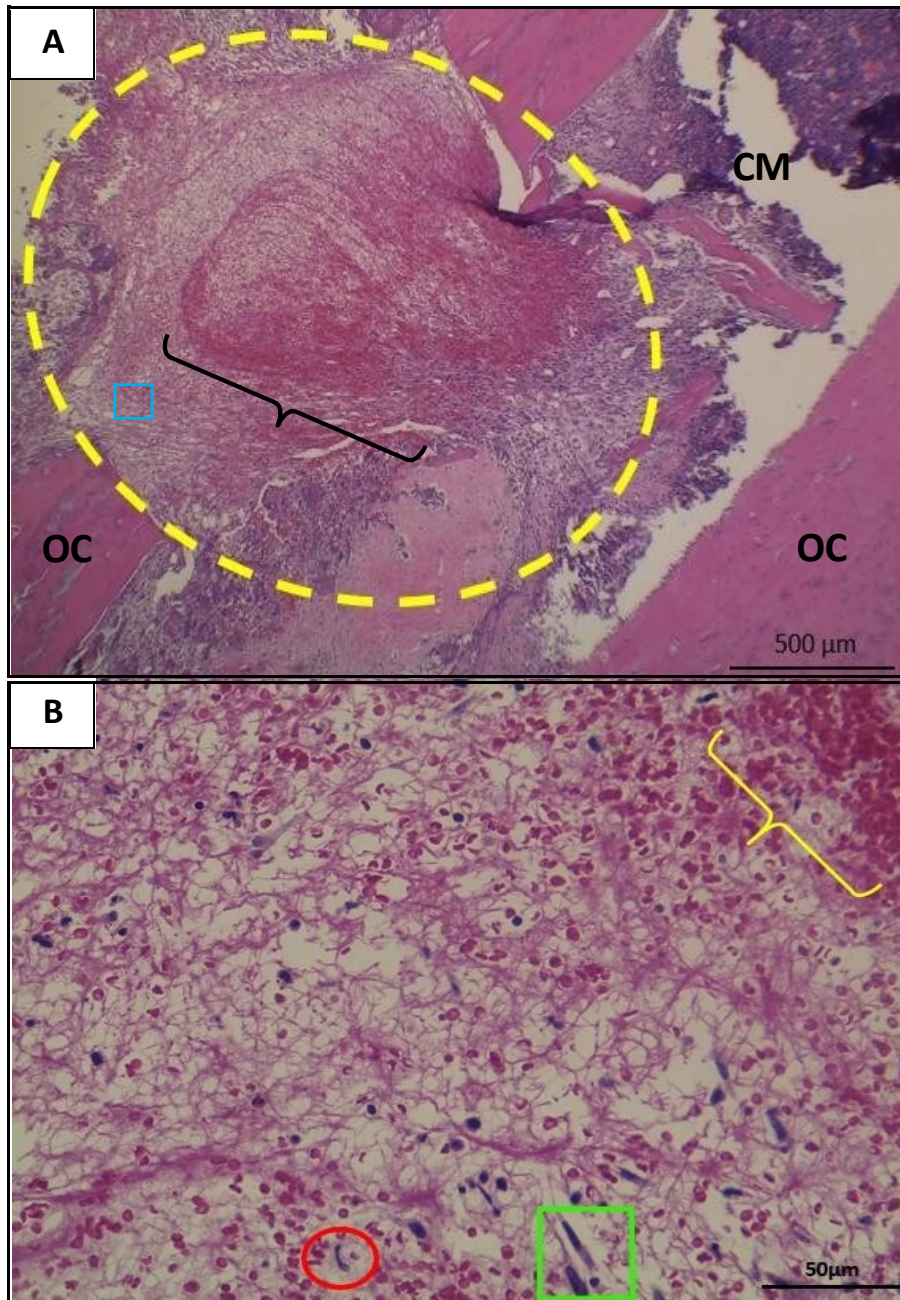
### 6.1 Análise histológica descritiva

Em relação à proliferação endosteal e periosteal, não houve diferença estatística entre os grupos em todas as datas avaliadas. Inicialmente houve menor atividade nos três grupos, já aos 7 dias ocorreu um aumento da proliferação periosteal e endosteal (Figura 8), que continuou aumentando apenas no grupo rosuvastatina, os demais decresceram nas avaliações (Figura 8).



**Figura 8** – Fotomicrografia representativa da porção proximal da tíbia de ratos submetida a osteotomia por escareação do grupo sinvastatina após 7 dias de tratamento. Observar a intensa proliferação periosteal mostrada pelo aumento da espessura e das camadas celulares do periósteo avançando sobre a osteotomia (**chave amarela**), osso cortical (**OC**), canal medular (**CM**), região cortical submetida a osteotomia (**chave preta**).

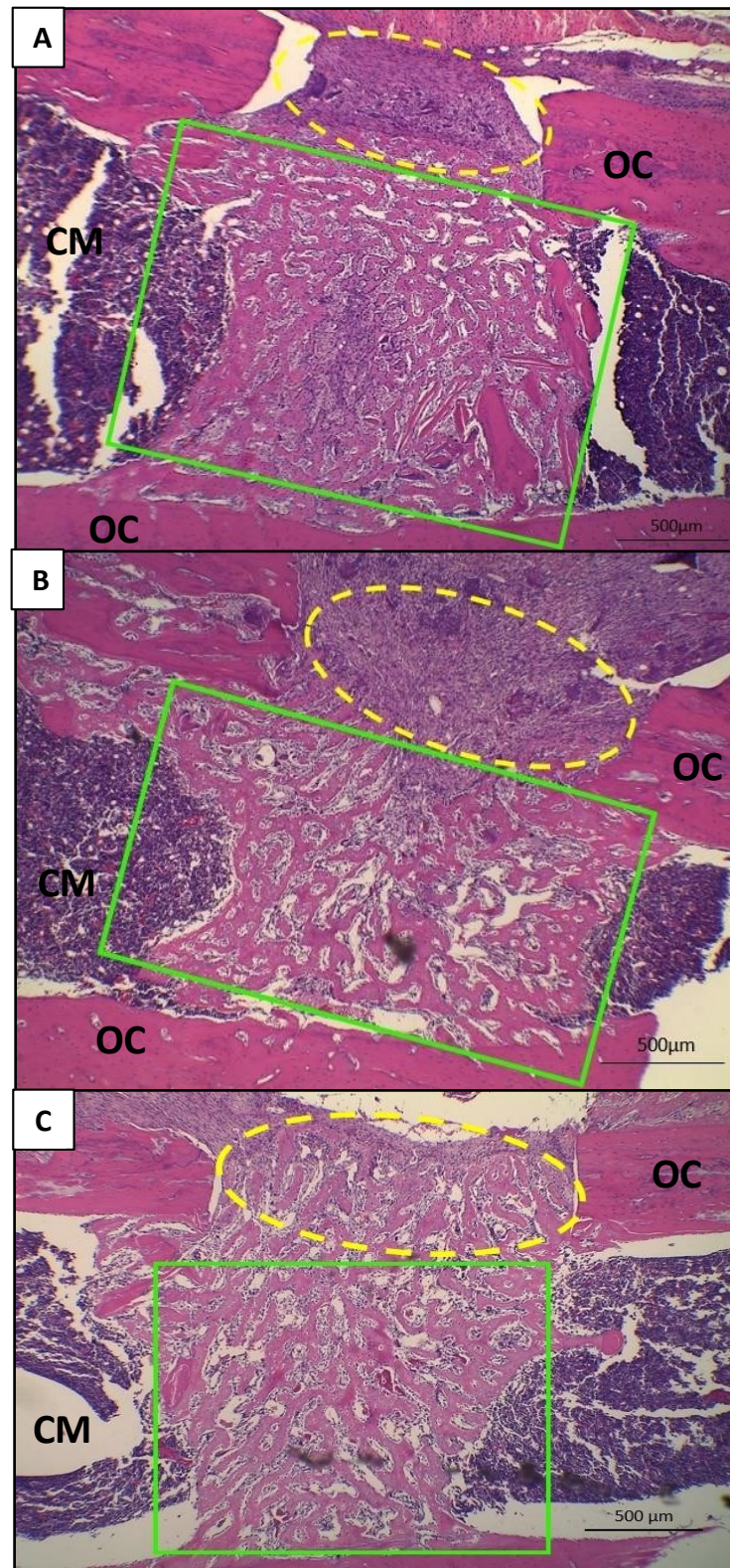
Quanto ao preenchimento da falha óssea e canal medular aos 3 dias, todos os grupos apresentaram conteúdo inflamatório e hemorragia, com grande quantidade de fibrina, hemácias e fibroblastos, porém com baixa quantidade de polimorfonucleados (Figura 9).



**Figura 9** – Fotomicrografias representativa dos 3 grupos das estruturas encontrada na região da osteotomia e canal medular aos 3 dias de tratamento. **A** – conteúdo inflamatório com grande concentração de fibrinas e hemorragia (**círculo descontinuo amarelo**), principalmente na região de transição entre região da osteotomia óssea e canal medular (**chave preta**), osso cortical (**OC**), canal medular (**CM**). **B** – mostra seleção do quadro azul em A, em que é possível observar hemácias (**chave amarela**), fibroblastos (**quadrado verde**) e polimorfonucleado (**círculo vermelho**) entremeados a rede de fibrina.

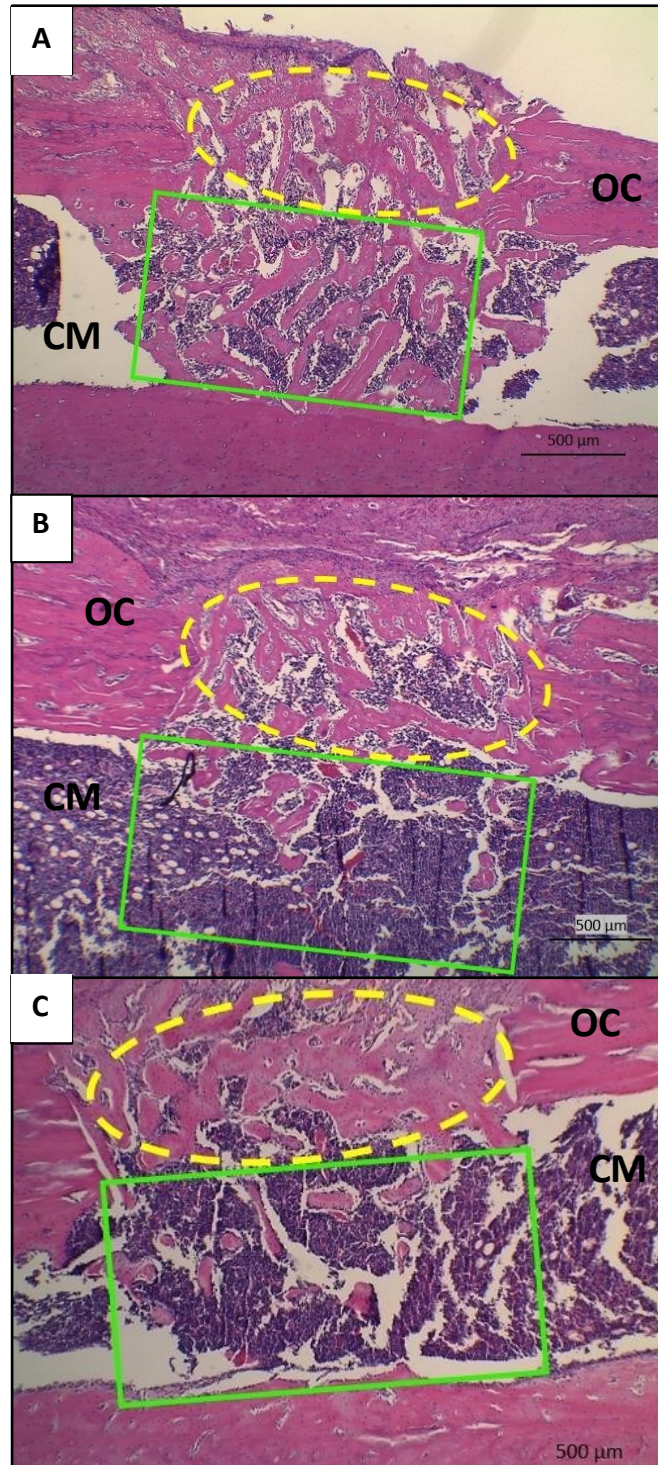
Já aos 7 dias, o grupo tratado com sinvastatina foi o único a apresentar total preenchimento por osso esponjoso da região de falha óssea e canal medular, enquanto nos demais havia presença de tecido conjuntivo intercalado com osso esponjoso rarefeito na área da osteotomia e osso esponjoso no canal medular (Figura 10).





**Figura 10** - Fotomicrografias do processo de regeneração óssea após osteotomia por escareação com 7 dias de tratamento nos grupos controle (**A**), rosuvastatina (**B**) e sinvastatina (**C**). Observar que todos os grupos apresentaram preenchimento por osso esponjoso no canal medular (**retângulos verdes**), porém apenas o grupo sinvastatina teve o mesmo preenchimento na região da osteotomia óssea, enquanto os demais apresentavam tecido conjuntivo (**círculos descontínuos amarelos**), osso cortical (**OC**) e canal medular (**CM**).

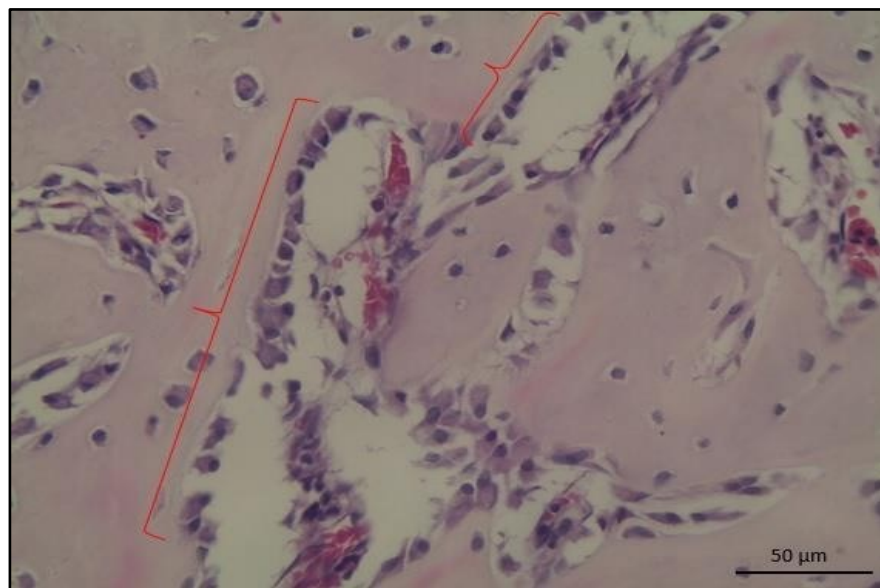
E aos 14 dias, o grupo controle foi o único a apresentar canal medular preenchido por osso esponjoso, os tratados com estatitinas estavam em fase de reabsorção dessa região. Na região da ferida, todos apresentaram osso esponjoso (Figura 11).



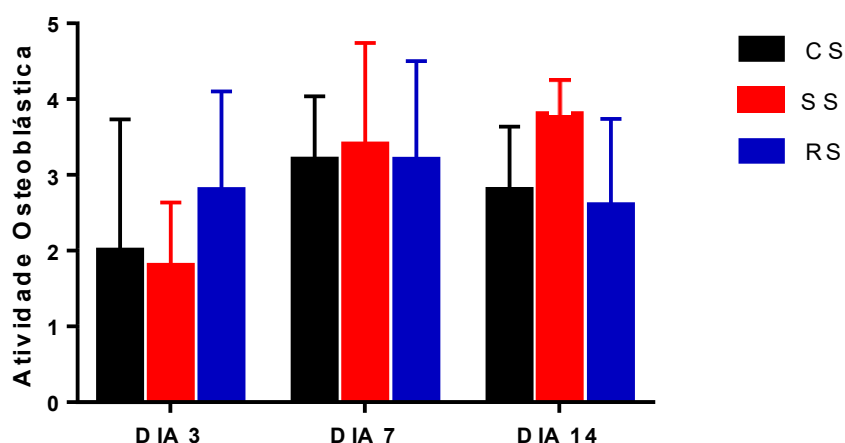
**Figura 11** - Fotomicrografias do processo de regeneração óssea após osteotomia por escareação com 14 dias de tratamento dos grupos controle (A), rosuvastatina (B) e simvastatina (C). Observar que todos os grupos apresentam preenchimento por osso esponjoso na região da ferida (retângulos verdes), porém apenas o grupo controle no canal medular (círculos descontinuos amarelos), osso cortical (OC) e canal medular (CM).

Quanto à atividade osteoblástica, aos 3 dias o grupo controle e sinvastatina apresentaram fraca atividade destas células em comparação ao grupo rosuvastatina. Aos 07 dias, notou-se moderada reação em CS e RS e intensa atividade no SS, apesar de não haver diferença estatística estas avaliações.

Já aos 14 dias, o grupo tratado com sinvastatina manteve intensa atividade osteoblástica (Figura 12), enquanto nos grupos controle e tratado com rosuvastatina observou-se redução, porém sem significância estatística (Figura 13).



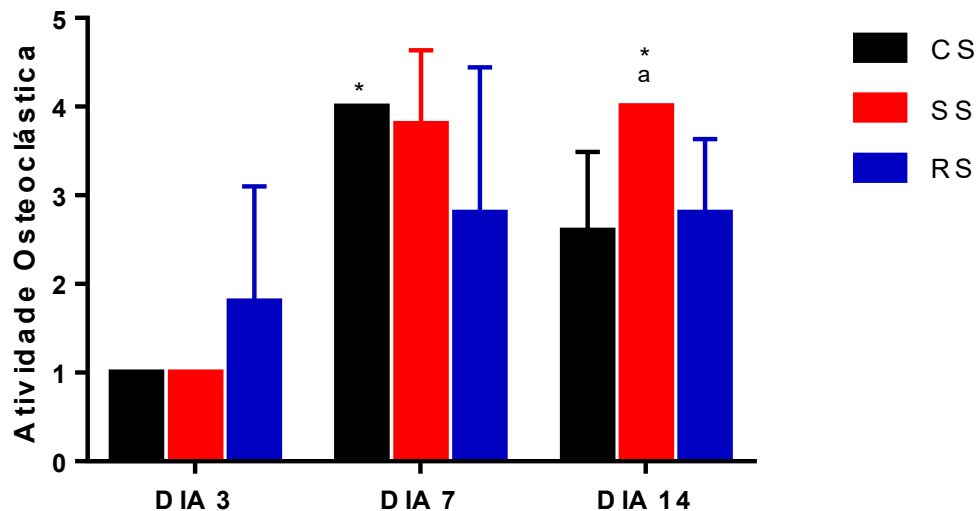
**Figura 12** – Fotomicrografia do processo de regeneração óssea em ratos Wistar do grupo sinvastatina aos 14 dias de tratamento. Observar grande número e atividade osteoblástica próxima ao tecido ósseo evidenciada por seu formato cúbico (**chaves vermelhas**).



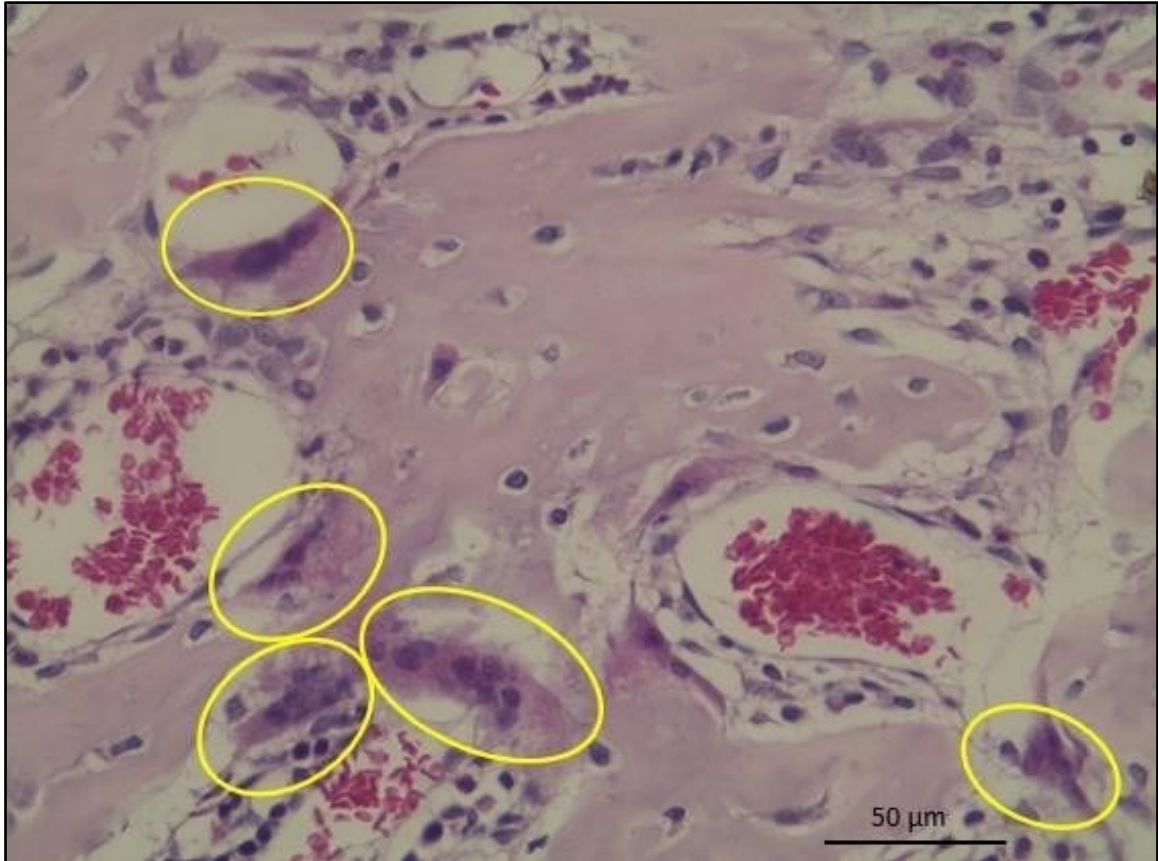
**Figura 13** - Representação gráfica mostrando a mediana da atividade osteoblástica nos grupos controle, rosuvastatina e sinvastatina nos períodos de avaliação.

Na avaliação da atividade osteoclástica, o grupo controle apresentava fraca atividade aos 03 dias, alta aos 07 dias e aos 14 dias observou-se uma redução da mesma. Já o grupo rosuvastatina foi o único a apresentar moderada atividade osteoclástica aos 03 dias, que se manteve aos 07 e reduziu ao 14, onde apenas uma lâmina revelou-se com intensa atividade.

Na avaliação do grupo tratado com sinvastatina, houve quase ou nenhuma atividade osteoclástica aos 03 dias, que evoluiu para atividade moderada ao 07 dias, tendo uma amostra nesta fase com atividade dos osteoclastos muito intensa em 2 lâminas. E aos 14 dias, a atividade osteoclástica diferiu estatisticamente do grupo controle (Figura 14), em que todas as amostras apresentou intensa atividade destas células (Figuras 15).



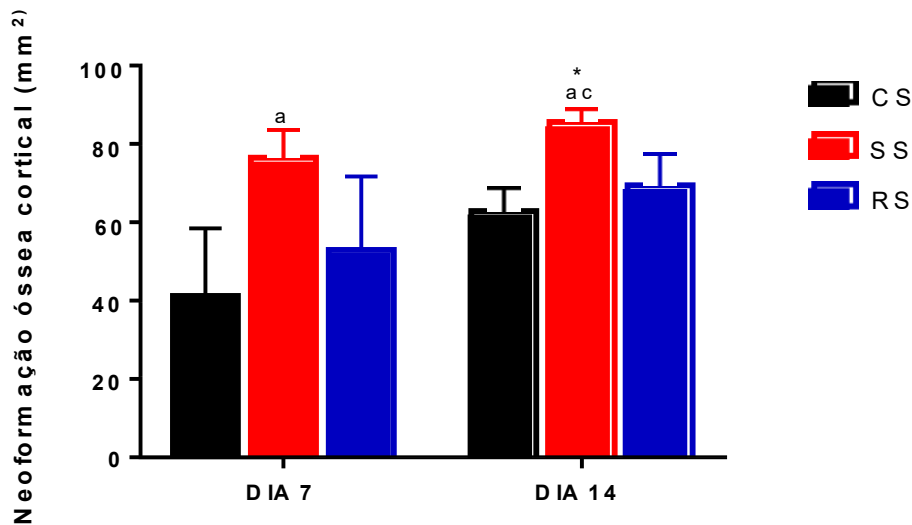
**Figura 14** – Representação gráfica mostrando a mediana da atividade osteoclástica nos grupos controle, rosuvastatina e sinvastatina nos diferentes períodos de avaliação. a Difere estatisticamente do grupo controle (CS) pelo teste de Dunn ( $p < 0,05$ ). \* Difere estatisticamente do grupo controle (CS) pelo teste de Dunn ( $p < 0,05$ )



**Figura 15** - Fotomicrografia do processo de regeneração óssea em ratos Wistar do grupo simvastatina aos 14 dias de tratamento. Observar grande quantidade de osteoclastos neste campo evidenciando sua alta atividade neste período (**elipses amarelas**).

## 6.2 Análise histomorfométrica

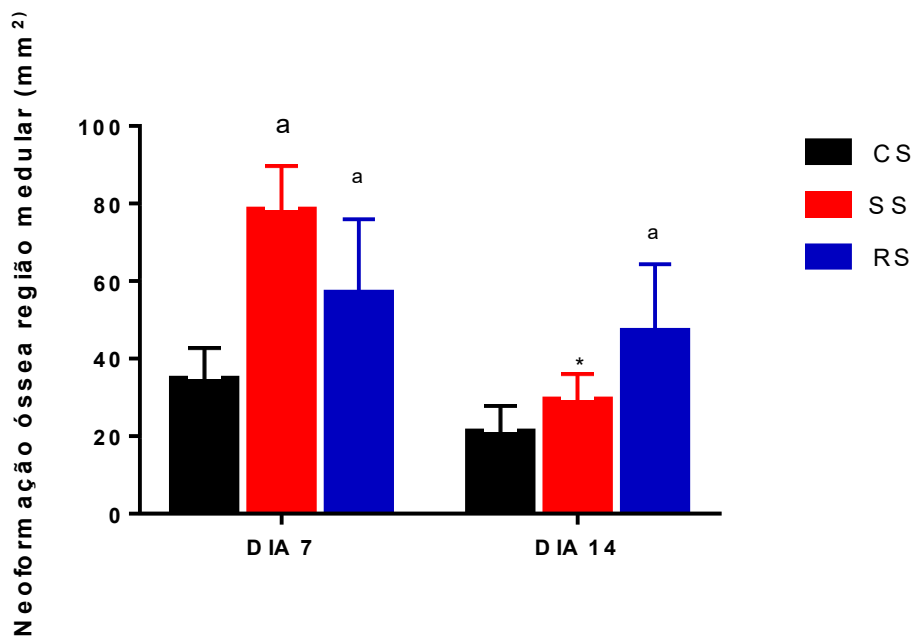
A análise histomorfométrica da neoformação óssea cortical apresentou diferença estatística do grupo tratado com simvastatina entre o dia 7 e o dia 14, além deste grupo diferir estatisticamente do grupo controle aos 7 dias e do grupo controle e rosuvastatina aos 14 dias. O grupo rosuvastatina teve maiores áreas preenchidas por osso, quando comparadas ao grupo controle, porém sem diferença estatística (Figura 16).



**Figura 16** - Representação gráfica mostrando a mediana da neoformação óssea em região cortical nos grupos controle, rosuvastatina e simvastatina nos períodos de avaliação obtidos através de análise histomorfométrica. a: Difere estatisticamente do grupo controle (CS) pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); c: Difere estatisticamente do grupo rosuvastatina (RS) pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); \* Há diferença entre dia 7 e dia 14 pelo teste T pareado ( $p < 0,05$ ).

Em relação ao preenchimento do canal medular sob a osteotomia criada, a simvastatina teve os maiores resultados aos 7 dias, em relação dois períodos avaliados, aos 7 dias havendo inclusive diferença estatística em relação ao grupo controle.

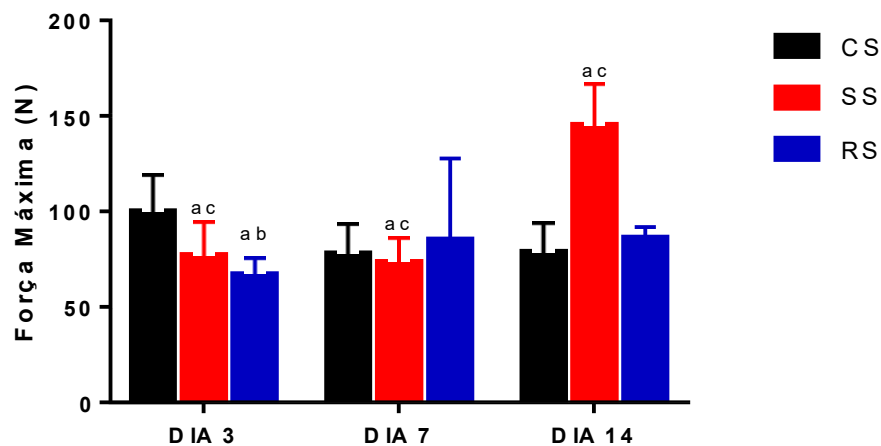
Já aos 14 dias, a rosuvastatina diferiu estatisticamente do grupo controle, mas não do grupo simvastatina (Figura 17).



**Figura 17** - Representação gráfica mostrando a evolução da neoformação óssea em região medular nos grupos controle, rosuvastatina e simvastatina nos períodos de avaliação obtidos através de análise histomorfométrica. a: Difere estatisticamente do grupo controle (CS) pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); \* Há diferença entre dia 7 e dia 14 pelo teste T pareado ( $p < 0,05$ ).

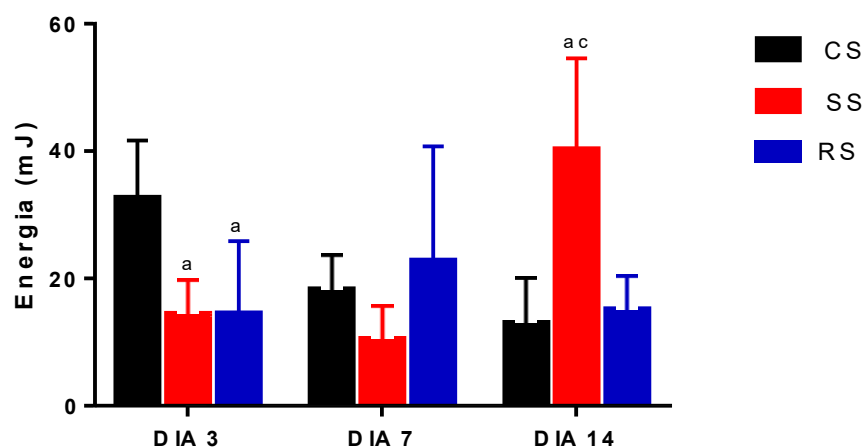
### 6.3 Ensaio biomecânico

Os resultados encontrados de força máxima no ensaio biomecânico foram favoráveis aos grupos tratados com as estatinas, quando comparados ao grupo controle. Aos 14 dias, o grupo controle apresentou mediana de força máxima de  $78,75 \pm 14,98$  N, enquanto o grupo rosuvastatina obteve  $86,23 \pm 5,45$  N e o grupo simvastatina  $145,30 \pm 21,32$  N, tendo este valor diferença estatística em relação aos outros dois grupos (Figura 18).



**Figura 18** - Representação gráfica mostrando a mediana da força máxima nos grupos controle, rosuvastatina e simvastatina nos períodos de períodos de avaliação obtidos através de ensaio biomecânico. a: Difere estatisticamente do grupo controle (CS) pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); b: Difere estatisticamente do grupo simvastatina (SS) pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); c: Difere estatisticamente do grupo rosuvastatina (RS) pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Em relação a propriedade mecânica energia, o SS aos 14 dias apresentou valores superiores aos demais grupos (CS  $13,04 \pm 6,96$  mJ; RS  $15,12 \pm 5,19$  mJ e o SS  $40,26 \pm 14,27$  mJ), sendo esta diferença significativa (Figura 19).

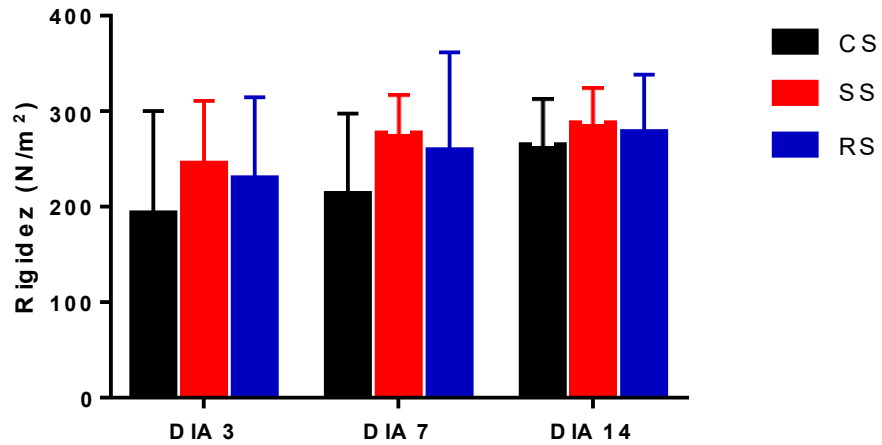


**Figura 19** - Representação gráfica mostrando a mediana da energia nos grupos controle, rosuvastatina e simvastatina nos períodos de períodos de avaliação obtidos através de ensaio biomecânico. a: Difere estatisticamente do grupo controle (CS) pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); c: Difere estatisticamente do grupo rosuvastatina (RS) pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Em relação aos resultados da rigidez, apesar de não haver diferença estatística, o grupo tratado com simvastatina mostrou-se com os melhores resultados



do início ao fim de todas as avaliações. Seu valor foi de  $287,53 \pm 36 \text{ N/mm}$  e os do grupo rosuvastatina  $278,19 \pm 60 \text{ N/mm}$  e controle  $264,40 \pm 47 \text{ N/mm}$  (Figura 20).



**Figura 20** - Representação gráfica mostrando a mediana da rigidez nos grupos controle, rosuvastatina e simvastatina nos períodos de períodos de avaliação obtidos através de ensaio biomecânico.

## 7 DISCUSSÃO

No presente estudo, as amostras do grupo rosuvastatina e sinvastatina apresentaram melhores resultados tanto nas análises histológicas, quanto no ensaio biomecânico, quando comparados ao grupo controle, sendo a sinvastatina sempre em destaque em relação aos demais grupos.

Apesar de não haver diferença estatística, a proliferação periosteal analisada neste trabalho foi maior nos grupos tratados com estatitinas nos períodos de 7 e 14 dias, o que pode ser explicado por sua capacidade de modular a inflamação, reduzindo assim a degeneração celular (FERREIRA et al., 2014; MAHESHWARI et al., 2015), visto que em nenhum momento foi administrado antiinflamatórios nos animais desta pesquisa.

Já aos 3 dias, é provável que pelo curto período de tratamento não houve tempo para este efeito ter influenciado o resultado, pois os 3 grupos tiveram resultados próximos entre si.

Ambas as estatitinas reduzem as concentrações de óxido nítrico sintetase (ONS), uma espécie reativa de oxigênio, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e cicloxigenase tipo 2 (COX-2), modulando a inflamação aguda que compreende as primeiras 72 horas, reduzindo a degeneração de células que surgem à partir deste período (BAHAMMAM; ATTIA, 2018; SOLIMAN et al, 2018; KIRZIOGLU et al., 2017a; KIRZIOGLU et al., 2017b).

Porém, este efeito anti-inflamatório não influenciou a atividade osteoblástica avaliada descritivamente nos três períodos, uma vez que os valores encontrados ficaram próximos entre si em todos os grupos, sem diferença estatística. Entretanto, os grupos tratados com estatinas obtiveram as maiores porcentagens de preenchimento por osso esponjoso, tanto na região de osteotomia, quanto no canal medular nos períodos analisados, o que indicaria maior ação desta células.

A maior neoformação óssea nos animais tratado com estatitinas aos 7 e 14 dias provavelmente ocorreu pela capacidade desta classe induzir da produção de *BMP-2*, um dos principais indutores da neoformação óssea no reparo de fraturas pela estimulação de osteoblastos (MUNDY et al., 1999, MONJO et al., 2010).

Apesar de estudos demonstrarem que as estatinas são capazes de reduzir a ação de osteoclastos em processos inflamatórios agudos e em patologias que causam reabsorção óssea, como osteoporose (HUGHES et al, 2007, KIRZIOGLU et al., 2017a, BAHAMMAM; ATTIA, 2018), não houve diferença estatística entre os grupos aos 3 e 7 dias de tratamento, além do grupo sinvastatina apresentar atividade osteoclástica significativamente superior aos demais aos 14 dias.

Acredita-se que este efeito foi devido a este período não haver mais processo inflamatório agudo associado a um possível estágio mais avançado na reparação de fratura, em que há maior atividade osteoclástica para remodelação da neoformação óssea. A maior atividade de osteoclastos corrobora, ainda, com a redução estatisticamente significativa da medula óssea preenchida por osso esponjoso entre os dias 7 e 14 no grupo sinvastatina.

Estudos comprovam que as estatinas também aumentam a concentração de *VEGF*, responsável pela indução da neovascularização (XU et al. 2009, ROSSELLI et al. 2014, CHANTZICHRISTOS et al., 2016), bem como de *TGF-β* responsável pela diferenciação das células tronco em osteoblastos (NYAN et al., 2010, MESSORA et al., 2017), aumentando a síntese de matriz orgânica e inorgânica no local da fratura por esta célula (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

Contudo é provável que com 7 dias de tratamento a rosuvastatina tenha estimulado maior produção de matriz orgânica, enquanto que a sinvastatina, de matriz inorgânica, uma vez que o SS apresentou menores valores de FM e E e maior de R, ao passo que o RS apresentou resultados opostos, o que pode indicar maior capacidade da sinvastatina em estimular a produção de *VEGF* ao aumentar a tensão de oxigênio na região (GRIFFON, 2014).

Já aos 14 dias, o grupo sinvastatina apresentou valores estatisticamente significantes ( $p < 0,05$ ) nos resultados de FM e E, além de maior valor de rigidez sem diferença estatística entre os demais grupos. Provavelmente, o SS alcançou esses resultados por haver deposição de colágeno na matriz inorgânica, aumentando sua resistência a forças antes da fratura.

Porém, quando comparamos os efeitos de ambas na regeneração óssea, a sinvastatina apresentou melhores resultados neste trabalho, tanto nas análises histológicas descritivas e histomorfométricas, quanto no ensaio biomecânico. Este

efeito pode ser explicado por dois fatores principais relacionados a rosuvastatina: ser hepato-específica (NEZASA et al., 2002) e hidrossolúvel (MCKENNEY, 2003).

Hepatoespecificidade significa que a concentração hepática é superior em relação aos demais tecidos. Nezasa e colaboradores, 2002, compararam sinvastatina e rosuvastatina na distribuição tecidual e descobriu que, apesar do *clearance* hepático da sinvastatina ter sido maior, sua concentração extra-hepática também foi mais alta, diminuindo a biodisponibilidade da rosuvastatina no tecido ósseo.

Essa característica da rosuvastatina é positiva se a intenção terapêutica for a redução do colesterol, já que a formação de colesterol se dá majoritariamente em hepatócitos (TULENKO; SUMNER, 2002), podendo ter seu efeito em hipercolesterolemia mais eficaz, por isso é a estatina com a melhor relação entre efeitos esperados e adversos (SORAN; DURRINGTON, 2008).

Outro motivo para a diferença entre as estatinas são suas características de solubilidade, pois a sinvastatina é considerada lipossolúvel, enquanto a rosuvastatina é hidrossolúvel, conferindo maior facilidade da sinvastatina em atravessar a bicamada lipídica da membrana celular, permitindo maiores efeitos intracelulares em diferentes tecidos, incluindo MSC, osteoblastos e osteoclastos (MCKENNEY, 2003, XU et al., 2018).

Com esta característica de lipossolubilidade, a sinvastatina ultrapassa para o meio intracelular de forma passiva, enquanto a rosuvastatina só ultrapassa por transporte ativo através de um carreador (HAMELIN; TURGEON, 1998). Essa passagem é fundamental para a ação das estatinas, pois sua ação se dá no meio intracelular (HUGHES et al., 2007).

Essa necessidade de um carreador torna a concentração destas moléculas no tecido ósseo um fator limitante do seu efeito, ao invés da quantidade de fármaco administrada. Hughes e colaboradores, 2007, demonstraram que diferentes doses de rosuvastatina (2 e 20mg/kg) produziram o mesmo efeito no controle da osteoporose em coelhas castradas.

## 8 CONCLUSÃO

O uso das estatinas traz efeitos positivos na reparação de osteotomia por escareação em tíbias de ratos Wistar possivelmente por sua ação indutora de fatores de crescimentos e ação moduladora da inflamação. Porém o uso da sinvastatina foi superior ao da rosuvastatina, provavelmente pela maior facilidade em atravessar a membrana celular e pela rosuvastatina ser hepato-específica, tendo menor biodisponibilidade em outros tecidos, como o osso.

## REFERÊNCIAS

ANBINDER, A. L.; JUNQUEIRA, J. C.; MANCINI, M. N. G.; BADUCCI, I.; ROCHA, R. F.; CARVALHO, Y. R. Influence os simvastatin on boné regeneration of tíbial defects and blood cholesterol level in rats. **Brazilian Dental Journal**, v. 17, n. 4, p. 267-273, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402006000400001>

AUTEFAGE, A.; DEJARDIN, L. M. Substitutos ósseos. In: BOJRAB, **Mecanismos de doenças em cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: ROCA, 2014, 3.ed., cap 86, p. 701.

BAHAMMAM, M. A.; ATTIA, M. S. Effects of systemic simvastatin on the concentrations of visfatin, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and interleukin-6 in gingival crevicular fluid in patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. 1–7, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8481735>

BARBOSA, E. G. M. M. **Perfil metabólico de cálcio e ósseo de pacientes soropositivos para HIV em uso ou não da terapia antirretroviral**. 115f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2013.

BARNES, G. L.; KOSTENUIK, P. J.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Growth factor regulation of fracture repair. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 11, p. 1805–1815, 1999. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.11.1805>

BENTUBO, H. D. L.; TOMAZ, M. A.; BONDAN, E. F.; LALLO, M. A. Expectativa de vida e causas de morte em cães na área metropolitana de São Paulo (Brasil). **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1021-1026, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782007000400016>

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 425-430, ago. 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200033>

CHANTZICHRISTOS, V. G.; AGOURIDI, A. P.; MOUTZOURI, E.; KONSTANTINOS S.; ELISAF, M. S.; TSELEPIS, A. D. Plasma VEGF and IL-8 levels in patients with mixed dyslipidaemia. Effect of rosuvastatin monotherapy or its combination at a lower dose with omega-3 fatty acids: A pilot study. **Current Vascular Pharmacology**, v. 14, n. 5, p. 474–480, 2016. <https://doi.org/10.2174/1570161114666160404125341>

CHENG, H.; JIANG, W.; PHILIPS, F. M.; HAYDON, R. C.; PENG, Y.; ZHOU, L.; LUU, H. H.; AN, N.; BREYER, B.; VANICHAKAM, P.; SZATKOWSKI, J. P.; PARK, J. Y.; HE, T. C. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). **The Journal of Bone and Joint Surgery**. American volume. Boston, v.85-A, n,8, p.1544- 1552, 2003. <https://doi.org/10.2106/00004623-200308000-00017>

CHO, T. J.; GERSTENFELD, L. C.; EINHORN, T. A. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v.17, n.3, p.513-520, 2002. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2002.17.3.513>

CONNOLLY, D. T.; HEUVELMAN, D. M.; NELSON, R.; OLANDER, J. V.; EPPLEY, B. L.; DELFINO, J. J.; SIEGEL, N. R.; LEIMGRUBER, R. M.; FEDER, J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 84, n. 5, p. 1470–1478, 1989. <https://doi.org/10.1172/JCI114322>

CRUZ-PINTO, C. E.; STOPIGLIA, A. J.; MATERA, J. M.; ARNONI, F. I. Análise da casuística das afecções cirúrgicas observadas na Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais da FMVZ-USP no período de 1988 a 2007. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 52, p. 40-47, jan. 2015. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v52i1p41-47>

CURREY, J. D. The structure of bone tissue. Princeton University Press, Princeton, Nova Jersey, 2006.

DALMOLIN, F.; PINTO FILHO, S. T. L.; CORTES, A. M.; BRUN, M. V.; CAUDURO, C.R.; SCHOSSLER, J. E. W. Biomecânica óssea e ensaios biomecânicos – fundamentos teóricos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 43, n. 9, p. 1675-1682, set. 2013. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782013000900022>

DEMPSTER, D. W. Anatomy and functions of the adult skeleton. In: FAVUS, M. J. **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism**, 6 ed. Washington, DC, 2006, p. 7-11.

DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, Bristol, v.36, p.1392-1404, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2005.07.019>

DREHMER, C. L.; GAI, V. F. Dados dos procedimentos realizados no Hospital Veterinário FAG Cascavel – PR, em convênio com Organizações Não Governamentais. **Revista Cultivando o saber**, Cascavel, v. 9, n. 1, p. 24-31, jan./mar. 2016.

EDWARDS, C. J.; HART, D. J.; SPECTOR, T. D. Oral statins and increased bone-mineral density in postmenopausal women. **The Lancet**, v. 355, p. 2218, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02408-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02408-9)



EINHORN, T. A. Biomechanics of bone. In: BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. **Principles of bone biology**. San Diego: Academic Press, 1996.

ERLANDSON, K. M.; JIANG, Y.; DEBANNE, S. M.; McCOMSEY, G. A. Effects of randomized rosuvastatin compared to placebo on bone and body composition among HIV infected adults. **AIDS**, v.29, p. 175-182, 2015. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000526>

FERREIRA, T. S.; LANZETTI, M.; BARROSO, M. V.; RUEFF-BARROSO, C. R.; BENJAMIN, C. F.; DE BRITO-GITIRANA, L.; PORTO, L. C.; VALENÇA, S. S. Oxidative stress and inflammation are differentially affected by atorvastatin, pravastatin, rosuvastatin, and simvastatin on lungs from mice exposed to cigarette smoke. **Inflammation**, v. 37, n. 5, p. 1355–1365, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9860-y>

FERRIGNO, C. R. A.; NINA, M. I. D.; FANTONI, D. T. Estudo comparativo entre as osteossínteses com placas e osteossínteses com placas associadas a enxertos de proteína morfogenética óssea (Gen-Tech) em fraturas distais de rádio-ulna em cães com menos de 6 quilos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 65-69, Fev., 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2007000200002>

FONSECA, F. A. H. Pharmacokinetics of statins. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 85 (5) p. 10-13. 2005. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2005002400003>

FOSSUM, T. W. Fundamentals of orthopedic surgery and fracture management, In: **Small animal surgery**. 4 ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2012, Cap.32, p.1033-1044.

GARG, S.; PRADEEP, A. R. 1.2% Rosuvastatin and 1.2% Atorvastatin Gel Local Drug Delivery and Redelivery in the Treatment of class II furcation defects: a randomized controlled clinical trial. **Journal of periodontology**, Bangalore, p. 10, 2016. <https://doi.org/10.1902/jop.2016.150706>

GOLDBERG, M. A.; SCHNEIDER, T. J. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 6, p. 4355–4359, 1994. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)41787-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)41787-X)

GRIFFON, D.J. Cicatrização óssea secundária (indireta). In: BOJRAB, J.M. **Mecanismos das doenças em cirurgias de pequenos animais**. 3 ed, São Paulo: Roca, 2014, cap. 86, p.670-680.

HAMELIN, B. A.; TURGEON, J. Hydrophilicity/Lipophilicity: Relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 1, p. 26–37, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(97\)01147-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(97)01147-4)

HUGHES, A.; ROGERS, M. J.; IDRIS, A. I.; CROCKETT, J. C. A Comparison between the effects of hydrophobic and hydrophilic statins on osteoclast function in vitro and ovariectomy-induced bone loss in vivo. **Calcified Tissue International**, v. 81, p. 403–413, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00223-007-9078-1>

HULSE, D.; HYMAN, B. Biomecânica e Biologia das Fraturas. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3 ed. p Barueri, SP: Manole, 2007, Cap. 126, p.1785-1972.

KAHVECI, R.; GÖKÇE, E. C.; GÜRER, B.; GÖKÇE, A.; KISA, U.; CEMIL, D. B.; SARGON, M. F.; KAHVECI, F. O.; AKSOY, N.; ERGOGAN, B. Neuroprotective effects of rosuvastatin against traumatic spinal cord injury in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 741, p. 45–54, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.042>

KIRZIOĞLU, F. Y.; OZMEN, O; DOGAN, B; BULUT, M. T.; FENTOGLU, O.; OZDEM, M. Effects of rosuvastatin on inducible nitric oxide synthase in rats with hyperlipidaemia and periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, p. 1–9, 2017a.

KIRZIOGLU, F. Y.; BULUT, M. T.; DOGAN, B.; FENTOGLU, Ö, ÖZMEN, O.; ÇARSANCAKLI, S. A.; ERGÜN, A. G.; ÖZDEM, M., ORHAN, H. Anti-inflammatory effect of rosuvastatin decreases alveolar bone loss in experimental periodontitis.

**Journal of Oral Science**, v. 59, n. 2, p. 247–255, 2017b.  
<https://doi.org/10.2334/josnusd.16-0398>

KOBAYASHI, K.; TAKAHASHI, N.; JIMI, E.; UDAGAWA, N.; TAKAMI, M.; KOTAKE, S.; NAKAGAWA, N.; KINOSAKI, M.; YAMAGUCHI, K.; SHIMA, N.; YASUDA, H.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K.; MARTIN, T. J.; SUDA, T. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the Odf/Rankl-Rank interaction. **Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 2, p. 275–286, 2000.  
<https://doi.org/10.1084/jem.191.2.275>

LERNER, U. H. Osteoblasts, Osteoclasts, and Osteocytes: Unveiling Their Intimate-Associated Responses to Applied Orthodontic Forces. **Seminars in Orthodontics**, v. 18, n. 4, p. 237–248, 2012. <https://doi.org/10.1053/j.sodo.2012.06.002>

LIMIRIO, P. H. J. O.; ROCHA JUNIOR, H. A.; MORAIS, R. B.; HIRAKI, K. R. N; BALBI, A. P. C.; SOARES, P. B. F.; DECHICHI, P. Influence of hyperbaric oxygen on biomechanics and structural bone matrix in type 1 diabetes mellitus rats. **Plos One**, v. 13, n. 2, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191694>

MAHESHWARI, R. A.; BALARAMN, R.; SAILOR, G. U.; SEN, D. S. Protective effect of simvastatin and rosuvastatin on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats.

**Indian Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 17–22, 2015.  
<https://doi.org/10.4103/0253-7613.150311>

MARCHESI, M.; PAROLINI, C.; CALIGARI, S.; GILIO, D.; MANZINI, S.; BUSNELLI, M.; CINQUANTA, P.; CAMERA, M.; BRAMBILLA, M.; SISTORI, C. R.; CHIESA, G. Rosuvastatin does not affect human apolipoprotein A-I expression in genetically modified mice: a clue to the disputed effect of statins on HDL. **British Journal of Pharmacology**, Milão, p. 1460–1468, mar. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01429.x>

MAZZEI, L. J.; GARCÍA, I. M.; ALTAMIRANO, L.; DOCHERTY, N. G.; MANUCHA, W. Rosuvastatin preserves renal structure following unilateral ureteric obstruction in the neonatal rat. **American journal of nephrology**, v. 35, p. 103-113, 2012.

<https://doi.org/10.1159/000334935>

MCKENNEY, J. M. Pharmacologic Characteristics of Statins. **Clinical Cardiology**, v. 26, n. III, p. 32–38, 2003. <https://doi.org/10.1002/clc.4960261507>

MESSORA, M. R.; VIEIRA, A.; VANDERLEI, J. M. T. M. M.; MARIGUELA, V. C.; FERNANDES, P. G.; PALIOTO, D. B.; SOUZA, S. L. S.; NOVAES JR.; A. B.; FURNALETO, F.; TABA JR., M. Rosuvastatin promotes benefits on induced periodontitis in hypertensive rats. **Journal of Periodontology Research**, v. 52, n. 4, p. 734–744, 2017. <https://doi.org/10.1111/jre.12442>

MILLIS, D.L.; MARTINEZ, S.A. Enxertos ósseos, In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3 ed. Barueri: Manole, v.2, Cap.133, p.1875-1891, 2007.

MONJO, M.; RUBERT, M.; WOHLFAHRT, J. C, RONOLD, H. J.; ELLINGSEN, J. E.; LYNGSTADAAS, S. P. In vivo performance of absorbable collagen sponges with rosuvastatin in critical-size cortical bone defects. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 4, p. 1405–1412, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.09.027>

MONTEIRO, L. O.; MACEDO, A. P.; SHIMANO, R. C.; SHIMANO, A. C.; YANAGIHARA, G. R.; RAMOS, J.; PAULINI, M. R.; FGUEIREDO, F. A. T. de; GONZAGA, M. G.; ISSA, J. P. M. Effect of treatment with simvastatin on bone microarchitecture of the femoral head in an osteoporosis animal model. **Microscopy research and technique**, Ribeirão Preto, v.79, p. 684-690, 2016. <https://doi.org/10.1002/jemt.22682>

MUNDY, G.; HARRIS, R. G.; CHAN, J.; CHEN, D.; ROSSINI, G.; BOYCE, B.; SHAO, M.; GUTIERREZ, G. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents. **Science**, v. 286, p. 1946–1949, 1999. <https://doi.org/10.1126/science.286.5446.1946>

NEGRÃO, S. C. R. da S.; PRAZERES, M. H. A. dos; FERREIRA, G. N.; BRITO, L. T. de; SOUZA, J. H. de; OLIVEIRA, N. M. C. de; SILVA FILHO, A. T. da; FREITAS, A. A. **Frequência de traumatismos em cães atendidos no hospital veterinário da universidade federal rural de pernambuco em 2008**. Pernambuco, 2008.

NEZASA, K.; HIGAKI, K.; MATSUMURA, T.; INAZAWA, K.; HASEGAWA, H.; NAKANO, M.; KOIKE, M. Liver-specific distribution of rosuvastatin in rats: Comparison with pravastatin and simvastatin. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 11, p. 1158–1163, 2002. <https://doi.org/10.1124/dmd.30.11.1158>

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. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 93, n. 1, p. 65–73, 2010. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31559>

PALMER, R.H. Não união, união retardada e má união, In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 3 ed. Barueri: Manole, 2007, v.2, Cap.133, p.1875-1891.

PERTOVAARA, L.; KAIPAINEN, A.; MUSTONEN, T.; ORPANA, A.; FERRARA, N.; SAKSELA, O.; ALITALO, K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor- $\beta$  in fibroblastic and epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 9, p. 6271–6274, 1994. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)37365-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)37365-9)

PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L.; DECAMP, C. E. Fractures: classification, diagnosis, and treatment. In: **Brinker, Piermattei, and Flo's handbook of small animal orthopedics and fracture repair**. St. Louis, Missouri: Elsevier. 2006, Cap. 2, p. 25-159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7216-9214-2.50005-8>

PROSBT, C. W. Estabilização de fraturas em rádio e ulna. In: BOJRAB, M. J. **Mecanismos das doenças em cirurgias de pequenos animais**. 3 ed, São Paulo: Roca, 2014, cap. 86, p.670-680.

RAHN, B. A. Bone healing: histological and physiologic concepts. In: FACKELMAN, G. E. **Bone in clinical orthopedics**. Stuttgart, p.287-326, 2002.

ROSSELLI, J. E. G. C.; MARTINS, D. M. F. S.; MARTINS, J. L.; OLIVEIRA, C. R. G. C. M.; FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. The effect of simvastatin on the regeneration of surgical cavities in the femurs of rabbits. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 87–92, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502014000200003>

SAADEH, P. B.; MEHRARA, B. L.; STEINBRECH, D. S.; DUDZIAK, M. E.; GREENWALD, J. A.; LUCHS, J. S.; SPECTO, J. A.; UENO, H.; GITTES, G. K.; LONGNAKER, M. T. Transforming growth factor-beta1 modulates the expression of vascular endothelial growth factor by osteoblasts. **American Journal Physiology**, v. 277, n. 4, p. C628–C637, 1999. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.277.4.C628>

SANTOS, A. A. S.; MIRANDA, C. D. O.; ALVES, M. T. de S.; FALOPPA, F. O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo. **Acta Ortopédica Brasileira**, São Paulo, v. 13, n. 4, p. 194-195, jun. 2005. <https://doi.org/10.1590/S1413-78522005000400009>

SCHMAEDECKE, A.; ACETO, M. L.; QUEIRÓZ, G. F. de; TATARUNAS, A. C.; ZERWES, M. B. C.; MASTROCINQUE, S.; FERRIGNO, C. R. A. Tratamento cirúrgico de união retardada e não união em cães: revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo. v. 6. n. 1/3. p. 74-82. 2003. <https://doi.org/10.36440/recmvz.v6i1/3.3260>

SCHWARZ, P.D. Biomecânica das fraturas do esqueleto apendicular: causas e avaliação. In: BOJRAB, M.J. **Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1996. Cap.136, p.1161-1181.

SHAHAR, R.; BANKS-SILLS, L.; ELIASY, R. Mechanics of the canine femur with two types of hip replacement stems: finite element analysis. *Veterinary and **Comparative Orthopaedics and Traumatology***, v. 16, n. 3, p. 145–152, 2003. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1632770>

SIMONET, W. S.; LACEY, D. L.; DUNSTAN, C. R.; KELLEY, M.; CHANG, M. S.; LÜTHY, R.; NGUYEN, H. Q.; WOODEN, S.; BENNETT, L.; BOONE, T.; SHIMAMOTO, G.; DeROSE, M.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; TAN, H. L.; TRALL, G.; SULLIVAN, J.; DAVY, E.; BUCAY, N.; RENSHAW-GEGG, L.; HUGHES, T. M.; HILL, D.; PATTISON, W.; CAMPBELL, P.; SANDER, S.; VAN, G.; TARPLEY, J.; DERBY, P.; LEE, R.; BOYLE, W. J. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell**, v. 89, n. 2, p. 309–319, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80209-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80209-3)

SOLIMAN, N. A.; KESHK, W. A.; RISK, F. H.; IBRAHIM, M. A. The possible ameliorative effect of simvastatin versus sulfasalazine on acetic acid induced ulcerative colitis in adult rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 298, p. 57–65, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.11.002>

STEEVE, K. T.; MARC, P.; SANDRINE, T.; DOMINIQUE, H.; YANNICK, F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: Interrelations in bone resorption pathophysiology. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 15, n. 1, p. 49–60, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2003.10.005>

SYKARAS, N.; OPPERMAN, L.A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? **Journal of oral Science**, Texas. V.45. n. 2. p. 57-73. 2003. <https://doi.org/10.2334/josnusd.45.57>

TSUJI, K.; BANDYOPADHYAY, A.; HARFE, B. D.; COX, K.; KAKAR, S.; GERSTENFELD, L.; EINHORN, T.; TABIN, C. J.; ROSEN, V. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. **Nature Genetics**, Nova Iorque v.38, n.12, p.1424-1429, 2006. <https://doi.org/10.1038/ng1916>

TÜRER, A.; COSKUM, T. C.; DURMUSLAR, M. C.; BALLI, U.; ONGER, M. E. The influence of oral administration of rosuvastatin on calvarial bone healing in rats. **Journal of Craniomaxillofacial Surgery**, Filadelfia, v. 44, n.9, p. 1327-1332, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2016.04.021>

XIONG, D. H.; SHEN, H.; ZHAO, L. J.; XIAO, P.; YANG, T. L. GUO, Y. F.; LIU, Y. J.; RECKER, R. R.; DENG, H. W. Robust and comprehensive analysis of 20 osteoporosis candidate genes by very high-density single nucleotide polymorphism screen among 405 white nuclear families identified significant association and gene-gene interaction. **Journal of Bone and Mineral Research**, Washington, v.21, n.11, p.1678-1695, 2006. <https://doi.org/10.1359/jbmr.060808>

XU, J.; LIU, X.; CHEN, J.; ZACHAREK, A.; CUI, X.; SAVANT-BHONSALE, S.; LIU, Z.; CHOPP, M. Simvastatin enhances bone marrow stromal cell differentiation into endothelial cells via notch signaling pathway. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 296, n. 3, p. C535-C543, 2009. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00310.2008>

XU, R.; SHI, G.; XU, L.; GU, Q.; FU, Y.; ZHANG, P.; CHENG, J.; JIANG, H. Simvastatin improves oral implant osseointegration via enhanced autophagy and osteogenesis of BMSCs and inhibited osteoclast activity Rongyao Xu. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 12, n. 15, p. 1209-1219, 2018. <https://doi.org/10.1002/term.2652>



## ANEXOS

## ANEXO I - Autorização da Comissão de Ética na Utilização de Animais – CEUA



Universidade Federal de Uberlândia  
 – Comissão de Ética na Utilização de Animais –



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo comparativo entre a Sinvastatina e a Rosuvastatina no tratamento de Lesões Ósseas Criadas Experimentalmente na Tibia De Ratos Wistar", protocolo nº 106/16, sob a responsabilidade de **Francisco Cláudio Dantas Mota** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **09 de dezembro de 2016**.

*(We certify that the project entitled "Estudo comparativo entre a Sinvastatina e a Rosuvastatina no tratamento de Lesões Ósseas Criadas Experimentalmente na Tibia De Ratos Wistar", protocol 106/16, under the responsibility of Francisco Cláudio Dantas Mota - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved by ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of December 09th, 2016).*

Vigência do Projeto	Início: 03/01/2017 Término: 03/10/2017
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Ratos Wistar
Número de animais	45
Peso / Idade	250g / 12 – 15 semanas
Sexo	Machos
Origem / Local	CBEA-UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 02 de janeiro de 2017.

**Prof. Dr. César Augusto Garcia**  
 Coordenador da CEUAUFU