

JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA

**INFLUÊNCIA DA SINVASTATINA NA REPARAÇÃO ÓSSEA
DE MANDÍBULAS DE RATAS OVARIETOMIZADAS E NOS
NÍVEIS DE COLESTEROL SANGÜÍNEO**



Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, Área de Concentração em Biopatologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Rosilene Fernandes da Rocha

São José dos Campos

2001

1042
F292
x1447

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

BELLINI, A.B.; SILVA, E. **Manual para redação de monografias: estrutura do trabalho científico.** São José dos Campos: FOSJC/UNESP, 2000. 81p.

FAYAD, M.V.L. **Reparação óssea sob ação de duas formulações de bifosfonatos:** estudo comparativo radiográfico e histológico. 2001. 102f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, Adriano, pelo apoio, compreensão, amparo nos momentos difíceis e incentivos constantes.

Aos meus pais, Luiz e Graça, pelo exemplo de vida e pelas renúncias e esforços dedicados à minha formação.

À Profa. Dra. Rosilene Fernandes da Rocha, pela convivência
agradável, disposição em aceitar novas idéias e orientação presente,
acrescida de dedicação e competência.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Adj. Antonio Olavo Cardoso Jorge, por ter me recebido como sua orientada no início da minha graduação, pelo exemplo de competência, dignidade e ética e por me estimular sempre de forma amiga e generosa.

À Profa. Adj. Yasmin Rodarte Carvalho, pela atenção, paciência, orientação criteriosa e por estar sempre disposta a ouvir novas sugestões.

À Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão, pelo auxílio e ensinamentos constantes, fundamentais para elaboração desse trabalho.

À Ana Lia Anbinder, amiga sempre presente, pela imensa colaboração durante todos os momentos desta pesquisa, demonstrada através da competência, inteligência e generosidade.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa da Diretora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, **Profa. Tit. Maria Amélia Máximo de Araújo**, pela oportunidade e por toda minha formação científica.

Ao Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, pela oportunidade da realização do curso.

À **Profa. Maria Nadir Gasparoto Mancini**, por me ensinar e auxiliar de forma objetiva, criteriosa e paciente todas as análises bioquímicas necessárias para a realização desse trabalho.

Ao **Prof. Ivan Balducci** por estar sempre disponível a colaborar com a análise estatística, além de discutir e buscar novos conhecimentos.

Ao **Prof. Dr. Nelson Luiz de Macedo** pelo empréstimo de materiais fundamentais para realização deste trabalho e por auxiliar com o seu conhecimento e sugestões.

Ao **Prof. Dr. Luiz Eduardo Blumer Rosa** pela amizade, atenção e colaboração.

À **Profa. Dra. Márcia Carneiro Valera** pela competência, dedicação e incentivo amigo.

Ao amigo de curso **Carlos Eduardo Dias Colombo** pelo estímulo e companheirismo durante a realização desta pesquisa.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, nas pessoas do **Prof. Dr. Francisco Haiter Netto** da disciplina de Radiologia, pela utilização dos equipamentos do laboratório da disciplina e **Profa Dra. Darcy de Oliveira Tosello** e **Prof. Dr. José Merzel** da disciplina de Histologia, pela discussão e sugestões de idéias que colaboraram para a análise histomorfométrica realizada neste trabalho.

Às alunas da graduação **Karine Tenório Landim** e **Talita Massayo Inoue** que colaboraram em várias etapas deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério, **Lourival Jacob** e **Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos**, pela colaboração durante a fase experimental deste trabalho e convivência agradável.

À **Terezinha de Fátima Arantes de Mello** e **Sílvia Scarpel** pela disponibilidade, auxílio e paciência.

Às funcionárias **Ana Lourdes da Silva Machado**, **Mônica Guimarães Figueiredo** e **Maria Salete Faria** pela imensa colaboração no preparo das lâminas.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, **Rosemary de Fátima Salgado** e **Erena Michie Hasegawa** pela atenção e disponibilidade.

À bibliotecária **Angela de Brito Bellini** por sempre me orientar de forma objetiva e competente.

Às funcionárias da biblioteca pela atenção e paciência.

Ao laboratório **Baldacci S. A.** por ter cedido o medicamento Sinvascor para realização desse trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP** por ter concedido a bolsa de estudo.

À **Schrader Bridgeport Brasil Ltda.** pelo relatório de inspeção de amostras fornecido para este trabalho.

Aos demais colegas do Programa de Biopatologia Bucal, aos funcionários da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, e a todos que colaboraram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado com auxílio
da FAPESP, processo nº 00/03437-0.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS.....	20
RESUMO.....	21
1 INTRODUÇÃO.....	22
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 Tecido ósseo.....	24
2.2 Reparação Óssea.....	26
2.3 Osteoporose.....	33
2.4 Colesterol.....	39
2.5 Estatinas.....	42
3 PROPOSIÇÃO.....	50
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1 Animais experimentais.....	51
4.2 Anestesia.....	51
4.3 Ovariectomia.....	52
4.4 Defeito ósseo.....	52
4.5 Tratamento e tempo de sacrifício.....	55
4.6 Forma de análise dos resultados.....	56
4.6.1 Dosagem de colesterol.....	56
4.6.2 Análise da densidade óptica.....	58
4.6.3 Análise histológica.....	62

4.6.4 Análise histomorfométrica.....	62
4.6.5 Análise estatística.....	64
5 RESULTADOS	65
5.1 Dosagem de colesterol.....	65
5.2 Análise da densidade óptica.....	74
5.3 Análise histológica.....	83
5.3.1 Período de 15 dias.....	83
5.3.2 Período de 30 dias.....	88
5.3.3 Período de 60 dias.....	94
5.4 Análise histomorfométrica.....	99
6 DISCUSSÃO.....	112
7 CONCLUSÕES.....	123
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124
ANEXOS.....	142
<i>ABSTRACT</i>	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Valores obtidos na dosagem do colesterol sanguíneo em cada grupo estudado composto por cinco animais e suas respectivas médias.....	65
Tabela 2-	Estatística descritiva referente a dosagem de colesterol das diferentes condições de tratamento.....	66
Tabela 3-	Estatística descritiva da dosagem de colesterol dos vários períodos de sacrifício.....	66
Tabela 4-	Análise de variância dos dados da dosagem do colesterol descritos na Tabela 1.....	67
Tabela 5-	Teste de Tukey para os dados da dosagem do colesterol obtidos nas diferentes condições de tratamento.....	68
Tabela 6-	Estatística descritiva referente à dosagem de colesterol dos grupos tratados com diferentes tempos de tratamento e sacrifício.....	71
Tabela 7-	Estatística descritiva da dosagem do colesterol dos grupos tratados normal e ovariectomizado.....	71
Tabela 8-	Análise de variância dos dados dos resultados da dosagem do colesterol dos grupos tratados.....	72
Tabela 9-	Densidade em espessura de alumínio dos defeitos ósseos de cada grupo estudado composto por cinco animais e suas respectivas médias.....	74

Tabela 10- Estatística descritiva referente as densidades ópticas em espessura de alumínio das diferentes condições de tratamento.....	75
Tabela 11- Estatística descritiva das densidades ópticas em equivalentes de alumínio dos períodos de observação.....	75
Tabela 12- Análise de variância da densidade em equivalente de alumínio dos dados apresentados na Tabela 9.....	76
Tabela 13- Teste de Tukey para as densidades ópticas em equivalentes de alumínio das condições de tratamento	77
Tabela 14- Teste de Tukey para a densidade óptica em equivalente de alumínio dos vários períodos de observação.....	77
Tabela 15- Estatística descritiva referente à densitometria dos grupos tratados com diferentes tempos de tratamento e sacrifício.....	80
Tabela 16- Estatística descritiva da densitometria dos grupos tratados normal e ovariectomizado.....	80
Tabela 17- Análise de variância dos dados da densitometria em equivalente de alumínio dos grupos tratados.....	81
Tabela 18- Resultados da análise histomorfométrica por animal de todos os grupos estudados e suas respectivas médias.....	99
Tabela 19- Estatística descritiva referente a histomorfometria das diferentes condições de tratamento.....	100

Tabela 20- Estatística descritiva da histomorfometria dos vários períodos de observação.....	100
Tabela 21- Análise de variância dos dados da histomorfometria apresentados na Tabela 18.....	101
Tabela 22- Teste de Tukey para os dados da histomorfometria das diferentes condições de tratamento.....	102
Tabela 23- Teste de Tukey para os dados da histomorfometria dos vários períodos de observação.....	102
Tabela 24- Estatística descritiva referente a histomorfometria dos grupos tratados com diferentes tempos de tratamento e sacrifício.....	106
Tabela 25- Estatística descritiva quanto a histomorfometria dos grupos tratados normal e ovariectomizados.....	106
Tabela 26 Análise de variância dos dados da histomorfometria dos grupos tratados apresentados na Tabela 26.....	107
Tabela 27- Teste de Tukey para os diferentes tempos de tratamento e sacrifício.....	108

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- Procedimentos cirúrgicos para confecção do defeito ósseo no ângulo da mandíbula: a) incisão longitudinal da pele; b) afastamento dos tecidos moles e exposição do osso; c) defeito ósseo bicortical; d) inserção da barreira de politetrafluoretileno na superfície lingual; e) barreira posicionada nas superfícies lingual e vestibular; f) sutura da pele..... 54
- FIGURA 2- Radiografia apresentando uma mandíbula do grupo tratado ovariectomizado e sacrificado em 15 dias (5T) na parte superior, uma mandíbula do grupo controle ovariectomizado e sacrificado em 15 dias (4C) na região inferior e uma escala de alumínio ao centro..... 61
- FIGURA 3- Radiografia exibindo uma mandíbula do grupo tratado por 30 dias, ovariectomizado e sacrificado em 30 dias (5T) na parte superior, uma mandíbula do grupo controle ovariectomizado e sacrificado em 30 dias (5C) na região inferior e uma escala de alumínio ao centro..... 61

FIGURA 4-	Gráficos das médias do nível de colesterol referente às condições de tratamento.....	69
FIGURA 5-	Gráfico das médias do nível de colesterol referente às condições de tratamento x períodos de sacrifício	70
FIGURA 6-	Gráficos das médias do nível de colesterol para todos os grupos tratados.....	73
FIGURA 7-	Gráfico das médias da densidade óptica em equivalente de alumínio referente as condições de tratamento.....	78
FIGURA 8-	Gráfico das médias da densidade óptica em equivalente de alumínio referente aos períodos de sacrifício.....	79
FIGURA 9-	Gráfico das densidades ópticas em espessura de alumínio das condições de tratamento x tempos de sacrifício.....	79
FIGURA 10-	Gráficos das médias da densitometria de todos os grupos tratados.....	82
FIGURA 11-	Período de 15 dias, grupo controle normal (1C): defeito ósseo preenchido por tecido de granulação (◆) e neoformação óssea junto às margens (◆→). Aumento original 25X.....	85
FIGURA 12-	Período de 15 dias, grupo controle normal (1C): detalhe da figura anterior demonstrando tecido ósseo neoformado (◆) circundado por tecido osteogênico (◆→). Aumento original 400X.....	85

- FIGURA 13- Período de 15 dias, grupo controle normal (1C):
trabéculas ósseas imaturas (♦) contendo alguns
osteoclastos na superfície (➡) e delimitando
grandes espaços medulares preenchidos por tecido
conjuntivo (▶). Aumento original 400X..... 86
- FIGURA 14- Período de 15 dias, grupo controle normal (1C):
trabéculas ósseas imaturas (♦) contendo osteócitos
volumosos (➡) e osteoclasto em lacuna de
Howship (▶). Aumento original 630X..... 86
- FIGURA 15- Período de 15 dias, grupo tratado normal (1T):
defeito ósseo preenchido por tecido de granulação
(♦), neoformação óssea subperiosteal (➡) e
esquírolas ósseas (▶). Aumento original 100X..... 87
- FIGURA 16- Período de 15 dias, grupo controle ovariectomizado
(4C): trabéculas ósseas imaturas (♦) na borda do
defeito e neoformação óssea subperiosteal (➡).
Aumento original 100X..... 87
- FIGURA 17- Período de 30 dias, grupo controle normal (2C):
uma das margens do defeito (♦) com tecido ósseo
neoformado (➡). Aumento original 100X..... 91
- FIGURA 18- Período de 30 dias, grupo tratado por trinta dias
normal (3T): trabéculas ósseas espessas (♦),
contornando vários espaços medulares preenchidos
por tecido conjuntivo (➡). Aumento original
200X..... 91

- FIGURA 19- Período de 30 dias, controle ovariectomizado (5C): tecido ósseo neoformado (♦) em uma das margens do defeito (➡), neoformação óssea subperiosteal (▸) e tecido de granulação (→). Aumento original 100X..... 92
- FIGURA 20- Período de 30 dias, grupo tratado por 15 dias ovariectomizado (6T): defeito apresentando tecido de granulação na região central (♦) e trabéculas ósseas neoformadas nas margens (➡). Aumento original 25X..... 92
- FIGURA 21- Período de 30 dias, grupo tratado por trinta dias ovariectomizado (7T): lesão apresentando tecido de granulação na região central (♦) e trabéculas ósseas nas margens (➡), provenientes de neoformação subperiosteal (▸). Aumento original 25X..... 93
- FIGURA 22- Período de 30 dias, grupo tratado por trinta dias ovariectomizado (7T): trabéculas ósseas neoformadas (♦) delimitando espaços medulares com várias células osteogênicas (➡). Aumento original 400X..... 93
- FIGURA 23- Período de 60 dias, controle normal (3C): tecido ósseo neoformado (♦) que se estende da margem do defeito (➡) em direção a porção central do mesmo. Aumento original 25X..... 96

FIGURA 24- Período de 60 dias, grupo controle normal (3C): tecido ósseo neoformado maduro (♦) próximo à margem do defeito (➡). Aumento original 200X.....	96
FIGURA 25- Período de 60 dias, controle normal (3C): tecido ósseo neoformado (♦) apresentando remodelação com linhas de aposição (➡). Aumento original 400X.....	97
FIGURA 26- Período de 60 dias, grupo tratado normal (4T): tecido ósseo neoformado maduro (♦) com várias linhas de aposição (➡). Aumento original 400X.....	97
FIGURA 27- Período de 60 dias, controle ovariectomizado (6C): tecido ósseo neoformado maduro (♦) contendo osteócitos pequenos (➡). Aumento original 400X...	98
FIGURA 28- Período de 60 dias, grupo tratado ovariectomizado (8T): defeito apresentando bastante osso neoformado (♦) com tecido medular (➡) e tecido de granulação na região central (▶). Aumento original 25X.....	98
FIGURA 29- Gráfico das médias da histomorfometria referentes as condições de tratamento.....	103
FIGURA 30- Gráfico das médias da histomorfometria referentes aos períodos de sacrifício.....	104
FIGURA 31- Gráfico das médias da histomorfometria referentes as condições de tratamento x períodos de sacrifício	105

FIGURA 32- Gráfico das médias da histomorfometria para todos os tempos de tratamento e sacrifício.....	109
FIGURA 33- Gráfico das médias da histomorfometria para os grupos tratados normal e ovariectomizado x tempos de tratamento e sacrifício.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
BMP	proteína óssea morfogenética
DEXA	<i>dual energy x-ray absorphometry</i>
e-PTFE	barreira de politetrafluoretileno expandido
FGF	fator de crescimento fibroblástico
HDL	lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	3-hidroxi 3 metilglutaril coenzimaA
IGF	fator de crescimento insulínico
TGF- β	fator de crescimento transformante β
IL-1	interleucina-1
LDL	lipoproteína de baixa densidade
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
PTH	hormônio da paratireóide
TNF- α	fator de necrose tumoral
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade
XTM	<i>x-ray tomographic microscopy</i>

JUNQUEIRA, J. C. Influência da sinvastatina na reparação óssea de mandíbulas de ratas ovariectomizadas e nos níveis de colesterol sanguíneo. 2001. 144f. Tese (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da sinvastatina na reparação óssea guiada de mandíbulas de ratas ovariectomizadas e observar o nível de colesterol sanguíneo nesses animais. Foram utilizadas setenta ratas, divididas em quatro grupos: controle normal, controle ovariectomizado, tratado normal e tratado ovariectomizado. Após um mês da ovariectomia foi confeccionado um defeito ósseo bicortical na mandíbula, que foi recoberto por uma membrana de politetrafluoretileno. Imediatamente após a cirurgia os grupos tratados receberam 20mg/Kg/dia de sinvastatina via oral, durante 15 ou trinta dias. As ratas foram sacrificadas 15, trinta e sessenta dias após a cirurgia, tendo o sangue retirado para dosagem do colesterol e a mandíbula removida para análise densitométrica, histológica e morfométrica. Todos os espécimes foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Os grupos ovariectomizados apresentaram nível de colesterol superior ao grupo tratado normal e não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes tempos de tratamento e sacrifício. As análises densitométrica, histológica e morfométrica demonstraram que o grupo tratado ovariectomizado apresentou maior quantidade de tecido ósseo neoformado em relação ao controle ovariectomizado, mas não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os tempos de tratamento. Concluiu-se que a deficiência de estrógeno promoveu um aumento do nível de colesterol sanguíneo e que a sinvastatina favoreceu a reparação óssea guiada nos animais ovariectomizados.

Palavras-chave: Reparação óssea, sinvastatina, ovariectomia, colesterol, densitometria óptica, histomorfometria

1 INTRODUÇÃO

Com o progressivo aumento da vida média da espécie humana, a osteoporose passa a ter uma importância crucial para a qualidade de vida das pessoas idosas, sendo uma das doenças mais estudadas atualmente (Bandeira et al.⁵, 2000). Muito se tem investido em busca de medicamentos que atuem não só evitando a perda óssea relacionada à idade e à menopausa, bem como que aumentem a massa óssea em pessoas com enfermidades já estabelecidas (Modesto Filho et al.⁶⁵, 1996). A incidência da osteoporose é, significativamente, maior nas mulheres do que nos homens devido à insuficiência de estrógeno provocada pela falência ovariana após a menopausa (Tanaka et al.⁹², 1998).

A mandíbula é um dos ossos do esqueleto que mais está exposto à severa diminuição do conteúdo mineral na osteoporose. O osso mandibular, assim como o restante do esqueleto passa por um processo contínuo de redução da densidade óssea após os cinquenta anos de idade (Von Wöern et al.¹⁰², 1988), sendo muito importante para os odontólogos o entendimento das alterações hormonais sistêmicas nas estruturas ósseas orais. Vários estudos têm sido desenvolvidos em humanos e animais ovariectomizados para se observar os efeitos da osteoporose na mandíbula (Tanaka et al.⁹², 1998).

Um outro campo de grande interesse de estudo para a odontologia é a reparação de defeitos ósseos, resultantes de cistos, infecções, tumores ou outros fatores. A regeneração óssea é um processo complexo influenciado pela idade, estrutura óssea, vascularização, envolvimento dos tecidos moles e tamanho do defeito (Dahlin et al.²³, 1994).

O tecido ósseo tem uma extraordinária capacidade de remodelação e reparação que depende da participação de nutrientes, medicamentos, hormônios e fatores de crescimento (Elorriaga et al.²⁶, 1995). As estatinas, incluindo a sinvastatina, são medicamentos usados por um grande número de pessoas para reduzir o nível de colesterol sanguíneo. Estudos recentes têm demonstrado que esses medicamentos, também, são capazes de aumentar a formação óssea em cultura de células e animais experimentais, podendo ser útil no tratamento da osteoporose (Mundy et al.⁷⁰, 1999).

Assim, o presente trabalho tem por objetivo estudar os efeitos da sinvastatina na reparação de defeitos ósseos em mandíbulas de ratas ovariectomizadas, além de observar os níveis sanguíneos de colesterol.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tecido de natureza conjuntiva, altamente dinâmico, com capacidade contínua de remodelação. Possui três funções importantes no organismo, como, suporte mecânico e apoio para as contrações dos músculos esqueléticos, proteção para a medula óssea e órgãos vitais e como reservatório de cálcio, fosfato e outros íons (Meghji⁶³, 1992). É composto por células, como osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e matriz intercelular, formada por colágeno e depósitos de cálcio e fósforo na forma de hidroxiapatita. Além disso, o tecido ósseo é revestido em suas superfícies externas e internas por membranas conjuntivas que possuem células osteogênicas, o periósteo e o endósteo, respectivamente (Junqueira & Carneiro⁴¹, 1999; Manolagas & Jilka⁵⁹, 1995; Katchburian & Arana⁴³, 1999).

O processo pelo qual o tecido ósseo se desenvolve é denominado ossificação ou osteogênese. Os ossos podem se originar por ossificação intramembranosa, no seio de uma membrana de natureza conjuntiva ou por ossificação endocondral, quando o tecido ósseo se forma substituindo gradualmente um modelo cartilaginoso pré-existente. Através da ossificação intramembranosa são formados os ossos da calota craniana, partes escamosas e timpânicas do

temporal, maxila e mandíbula, com exceção do côndilo e outros pequenos ossos como o nasal, o vômer, o palatino e parte do esfenóide. A ossificação endocondral é a principal responsável pela formação dos ossos longos, vértebras e costelas (Katchburian & Arana⁴³, 1999).

Seja qual for o processo de ossificação, o tecido ósseo resultante é sempre o mesmo. O primeiro tecido ósseo formado é o primário ou imaturo, sendo, gradativamente, substituído por osso secundário ou lamelar. O osso secundário apresenta menos osteócitos e fibras colágenas na matriz dispostas de modo mais organizado em relação ao seu predecessor (Junqueira & Carneiro⁴¹, 1999; Manolagas & Jilka⁵⁹, 1995; Katchburian & Arana⁴³, 1999).

No esqueleto adulto há osso cortical e trabecular, sendo o cortical denso e compacto, responsável pela composição de cerca de 80% do esqueleto. Constitui a parte externa de todas as estruturas esqueléticas e sua principal função é fornecer força mecânica e proteção, embora também possa participar de respostas metabólicas quando ocorre um déficit mineral severo e/ou prolongado. O osso trabecular é encontrado na porção interna dos ossos longos, corpos vertebrais e pelve, sendo mais ativo e fornecendo suprimento inicial nos estados de deficiência mineral (Bandeira et al.⁵, 2000).

A remodelação óssea é um processo de aposição, no qual há reabsorção localizada de osso velho e sua substituição por osso recentemente formado. Os osteoblastos são responsáveis pela formação do tecido ósseo e se originam a partir da medula óssea, perióstio, endóstio e membrana periodontal. Essas células revestem

as superfícies do osso, sintetizam os constituintes orgânicos da matriz óssea e são aprisionados por seus produtos de secreção, originando os osteócitos. Os osteoclastos são células gigantes e multinucleadas, originadas da fusão dos monócitos presentes no sangue circulante, sendo responsáveis pela reabsorção do osso e residem em depressões na superfície óssea denominadas de lacunas de Howship (Hill & Orth³⁶, 1998; Junqueira & Carneiro⁴¹, 1999; Katchburian & Arana⁴³, 1999).

A remodelação óssea é controlada por hormônios calciotróficos, como PTH (hormônio da paratireóide) e calcitonina, além dos hormônios tiroideanos, sexuais e glicocorticóides, fatores de crescimento e citocinas. O processo de remodelação é fundamental na manutenção da forma do osso, transformação de um tecido ósseo primário em secundário e adaptação desse tecido diante das novas condições fisiológicas ou patológicas (Junqueira & Carneiro⁴¹, 1999; Katchburian & Arana⁴³, 1999).

2.2 Reparação óssea

O osso é um dos poucos tecidos do organismo humano adulto com capacidade de regeneração, restaurando, completamente, a sua estrutura e função original quando lesados (Schenk⁸³, 1994; Szachowicz⁹⁰, 1995; Hollinger & Wong³⁸, 1996). O processo de reparação óssea é similar ao desenvolvimento ósseo embriogênico normal, incluindo migração de células mesenquimais, proliferação e diferenciação em células osteogênicas. Essa resposta ocorre como uma

seqüência contínua de eventos celulares e da matriz óssea, que se inicia pelo dano das células, vasos sangüíneos e matriz, terminando com uma completa remodelação sem deixar cicatriz. Esse processo é semelhante à ossificação intramembranosa ou endocondral (Bostrom¹¹, 1998).

Esta habilidade do tecido ósseo de remodelação e regeneração ao longo da vida tem sido atribuída tanto à indução da proliferação das células osteoprogenitoras pré-formadas, como à indução da proliferação e diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas (Manolagas & Jilka⁵⁹, 1995).

A regeneração óssea é regulada por fatores locais e sistêmicos, como citocinas, fatores de crescimento e hormônios (Bostrom¹¹, 1998). O tecido ósseo é muito rico em fatores de crescimento e citocinas, sendo alguns produzidos pelas células ósseas, como fator de crescimento insulínico (IGF), fator de crescimento transformante β (TGF- β), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e outros sintetizados por tecidos relacionados ao osso, como a interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (Schenk⁸³, 1994; Manolagas & Jilka⁵⁹, 1995).

Um outro importante fator de indução óssea é a proteína óssea morfogenética (BMP), pertencente à superfamília dos fatores de crescimento transformante β (Hollinger & Wong³⁸, 1996; King et al.⁴⁴, 1997). Até o momento, foram descritos nove tipos de BMPs, através do uso da tecnologia de genes recombinantes (Hollinger & Wong³⁸, 1996). A proteína óssea morfogenética foi

originalmente identificada como proteína da matriz óssea com capacidade de induzir formação óssea heterotópica quando implantados em músculo de ratos (Urist⁹⁷, 1965). Foi a partir desse estudo que surgiu a idéia de que fatores indutores de formação óssea residem dentro do tecido ósseo (Brownell¹⁴, 1990).

Atualmente, está bem esclarecido que a BMP é um componente da matriz óssea desmineralizada capaz de induzir formação óssea em locais extra-ósseos e em defeitos ósseos de animais experimentais (Brownell¹⁴, 1990). Entretanto, pouco se conhece sobre o papel da BMP na reparação das fraturas (Bostrom¹¹, 1998).

Jin & Yang⁴⁰, 1990 foram os primeiros autores a descrever a presença da proteína morfogenética durante a reparação das fraturas. Usando um anticorpo contra essa proteína, os autores revelaram a presença de BMP nas células mesenquimais em fraturas de mandíbula de coelhos após três dias da realização das mesmas. No 7º dia, um grande número de células mesenquimais ao redor do periósteo e dentro da medula óssea expressavam BMP.

Ishidou et al.³⁹, 1995 também verificaram a presença de BMP na reparação das fraturas em ratos. Técnicas imunohistoquímicas mostraram que a expressão de BMP-2, BMP-4 e BMP-7 aumentou, consideravelmente, nas células osteogênicas do periósteo próximo as extremidades da fratura durante os estágios iniciais da reparação.

Os defeitos ósseos constituem um bom modelo para se estudar a regeneração óssea. Ao contrário das fraturas, os defeitos são

menos sujeitos aos fatores mecânicos e obstruções de suprimento sanguíneo. Portanto, os defeitos ósseos têm sido, amplamente, usados em estudos com animais experimentais, buscando uma melhor regeneração óssea através do uso de diferentes materiais de enxerto, técnicas cirúrgicas ou medicamentos (Schenk⁸³, 1994).

A qualidade e a quantidade da reparação óssea sob condições experimentais é influenciada por diversos fatores, como a espécie do animal, idade, localização anatômica, presença do periósteo, estabilidade mecânica e envolvimento dos tecidos moles (Aaboe et al.¹, 1995). A quantidade de reparação que pode ocorrer em um defeito ósseo é influenciada, em grande parte ao tamanho do defeito. Uma ferida óssea experimental usada para avaliar a reparação deve ser grande o suficiente para impedir uma cicatrização espontânea (Shimitz & Hollinger⁸⁴, 1986).

O defeito de tamanho crítico é definido como o menor tamanho da lesão de um determinado osso e espécie animal que não cicatriza espontaneamente durante a vida do animal. A tentativa de reparação de um defeito crítico resulta em formação de tecido conjuntivo fibroso, ao invés de tecido ósseo (Shimitz & Hollinger⁸⁴, 1986). Entretanto, como todos os estudos possuem um tempo limitado e não se estendem por toda vida do animal, o defeito de tamanho crítico refere-se ao tamanho de um defeito que não cicatriza durante o tempo do estudo (Gosain et al.³², 2000).

Kaban & Glowacki⁴², 1981, foram os primeiros a observarem os defeitos de tamanho crítico na mandíbula de ratos. Os autores avaliaram o efeito do enxerto ósseo desmineralizado na

reparação de defeitos mandibulares, através de análise histológica. Para isso foram criados defeitos ósseos bicorticais de 4mm de diâmetro no ramo mandibular. Durante um período de observação de seis meses foi constatado que houve reparação óssea apenas nos animais que receberam o enxerto e que o defeito ósseo dos grupos controle foi preenchido por tecido conjuntivo fibroso. Como neste modelo experimental, o tamanho do defeito foi conveniente para impedir uma cicatrização espontânea, pode-se concluir que a reparação óssea ocorrida nos grupos experimentais foi atribuída ao enxerto.

O tamanho do defeito crítico em mandíbula de rato tem sido demonstrado em vários trabalhos. Bell & Beirne⁶ (1988) verificaram que após 12 semanas, uma loja cirúrgica de 3mm de diâmetro foi preenchida por tecido conjuntivo fibroso. Dahlin et al.²¹ (1988) revelaram que um defeito medindo 5mm de diâmetro não sofreu reparação óssea após um período de 22 semanas de observação.

Gosain et al.³², 2000, reavaliaram o conceito de defeito de tamanho crítico, criando defeitos de 3 e 5mm de diâmetro na calvária de cobaias e fizeram análise histomorfométrica da extensão linear e da espessura do defeito. Após 12 semanas, verificaram que houve reparação na extensão linear para os defeitos de 3 e 5mm, entretanto apenas o defeito de 3mm foi capaz de reparar em toda a espessura do defeito. Esses dados sugerem que o tamanho dos defeitos críticos no esqueleto não deve ser baseado apenas na medida de extensão linear.

O processo de regeneração óssea, também, é influenciado em grande parte pelo envolvimento dos tecidos moles. Normalmente, as lesões ósseas cicatrizam por união óssea, mas essa reparação é incompleta devido ao rápido crescimento do tecido conjuntivo dentro do defeito ósseo (Dahlin et al.²³, 1994).

O princípio da osteopromoção indica o uso de meios físicos (membranas ou barreiras) para vedar um local anatômico de modo a prevenir que outros tecidos, principalmente, o tecido conjuntivo, interfiram com a osteogênese bem como com a formação óssea direta (Dahlin et al.²¹, 1988).

O uso de barreiras mecânicas para isolar um sítio anatômico, no intuito de selecionar determinado tecido e excluir outros, direcionando a regeneração da área, foi relatado primeiramente por Murray et al.⁷¹ (1957). Os autores removeram fragmento do ilíaco de cães e recobriram com material plástico, rígido o suficiente para manter um espaço entre o tecido ósseo e a face interna do material quando os retalhos fossem suturados em posição. Após dez semanas verificaram crescimento de tecido ósseo com as mesmas características histológicas.

Posteriormente, outros autores empregaram o mesmo princípio para a reconstrução dos defeitos de ossos longos (Melcher & Dreyer⁶⁴, 1962) e mandibulares (Boyne¹², 1964). Na década de 1980, essa técnica foi testada em vários estudos experimentais para a regeneração de defeitos periodontais, onde foi criado o conceito de regeneração tecidual guiada (Nyman et al.⁷², 1982). A aplicação dessa técnica para correção de defeitos ósseos não periodontais foi o passo

seguinte, criando-se o conceito de regeneração óssea guiada (Dahlin²², 1989).

Dahlin et al.²¹, (1988) estudaram a reparação de defeitos ósseos de tamanhos críticos revestidos por uma barreira de politetrafluoretileno expandida (e-PTFE), criando defeitos bicorticais de 5mm de diâmetro em cada ângulo mandibular de ratos. Em um dos lados da mandíbula o defeito foi coberto pela barreira nas superfícies vestibular e lingual, sendo que o outro lado foi utilizado como controle. A análise histológica dos defeitos cobertos por barreiras revelou que, após três semanas, metade do número desses defeitos apresentavam um crescimento ósseo visível, sem a invasão de tecido conjuntivo e após seis semanas todos esses defeitos exibiam completa cicatrização. Pouco ou nenhum sinal de reparação foi evidente no lado controle, depois da observação por um período de 22 semanas.

A barreira de politetrafluoretileno (e-PTFE), que consiste em um polímero quimicamente estável e biologicamente inerte, capaz de resistir ao ataque enzimático e microbiológico, tem sido muito utilizada. Em recentes estudos, a barreira de PTFE tem sido testada cobrindo defeitos de mandíbulas de ratos, coelhos e macacos e quase todos os estudos relataram uma completa cicatrização (Aaboe et al.¹, 1995).

A utilização de barreira entre o tecido conjuntivo gengival do retalho e o osso cria um espaço que é preenchido por um coágulo sangüíneo, propiciando a multiplicação das células em local estável e isolado, dificultando, também, movimentos durante a fase inicial da reparação, para que as células mesenquimais diferenciem-se

em osteoblastos, ao invés de fibroblastos (Todescan & Imbronito⁹³, 1998).

Hoje, a regeneração óssea guiada apresenta uma vasta indicação e tem sido também testada no tratamento de fratura óssea contínua, em defeitos de ossos longos, na correção de rebordos edêntulos ou defeitos residuais, em alvéolos após exodontia, em defeitos do tipo deiscência, produzidos no ato da instalação de implantes dentais, em implantes imediatos e na recuperação de implantes afetados por periimplantite (Marcantonio et al.⁶⁰, 1999).

2.3 Osteoporose

A osteoporose é atualmente uma das doenças mais conhecidas e estudadas em todo o mundo. Sua incidência atinge uma em cada quatro mulheres na menopausa e uma em cada três após os 65 anos de idade (Modesto Filho et al.⁶⁵, 1996). Osteoporose é o nome utilizado para as doenças de etiologias diversas que causam redução da massa óssea por unidade de volume (Krane & Holick⁴⁸, 1998). Várias partes do corpo, incluindo a mandíbula, têm demonstrado suscetibilidade para diminuição da densidade óssea (Watson et al.¹⁰⁷, 1995).

As perdas cumulativas de massa óssea variam de 20 a 30% nos homens e até 40 a 50% em algumas mulheres. Histologicamente, a osteoporose é um distúrbio caracterizado por reduções na espessura cortical e no número e tamanho das trabéculas do osso esponjoso. As placas trabeculares individuais estão

anormalmente perfuradas e podem sofrer fraturas, com conectividade trabecular reduzida (Krane & Holick⁴⁸, 1998).

A osteoporose pode ser classificada em Tipo I ou pós-menopausa e Tipo II ou senil (Castro et al.¹⁶, 1999). Após a menopausa, a perda óssea é maior no osso trabecular como consequência da queda brusca da concentração de estrógenos. Nos indivíduos mais idosos, no entanto, outros fatores afetam de modo progressivo e menos intenso, durante várias décadas, ocasionando perdas ósseas que ocorrem mais lentamente e afetando tanto o osso cortical como o trabecular (Borelli¹⁰, 1994).

O fato de que a perda óssea acelerada acompanha a menopausa em algumas mulheres e que a osteoporose prematura ocorre depois da menopausa cirúrgica precoce, sugere que os estrogênios desempenham um papel importante na prevenção dessa perda óssea. A menopausa é consequência da exaustão dos folículos ovarianos, assim como, na ovariectomia, a parada no desenvolvimento folicular resulta em déficit de estrogênio, levando os níveis deste hormônio a praticamente zero (Krane & Holick⁴⁸, 1998).

Com a supressão ovariana ambas as etapas da remodelação óssea são exacerbadas, sendo a reabsorção de forma mais proeminente que a formação, gerando assim perda óssea. Os mecanismos pelos quais a perda de função ovariana e a consequente depleção estrogênica afetam a densidade óssea ainda não foram completamente estabelecidos. A deficiência de estrogênio parece estar associada à produção de interleucina-6, que age estimulando a formação, desenvolvimento e maturação dos osteoclastos. Entretanto,

esse efeito da interleucina-6 não explica o aumento na atividade osteoblástica que se verifica após a menopausa (Modesto Filho et al.⁶⁵, 1996).

Um dos primeiros autores a observar as alterações do esqueleto após a ovariectomia em ratas foi Saville⁸² (1969). Nesse estudo, machos e fêmeas foram castrados aos 21 dias de idade e grupos de seis animais foram sacrificados em intervalos de duas semanas. Após a medida da densidade dos fêmures pelo princípio de Archimedes, observou-se que machos e fêmeas castrados apresentavam menor densidade óssea em relação ao grupo controle.

Blythe & Buchsbaum⁸, 1976 para avaliarem o efeito do estrógeno na reparação das fraturas, dividiram noventa ratas fêmeas com 6 semanas de idade em três grupos: ratas ovariectomizadas (Grupo A), animais tratados com estrógeno (Grupo B) e controle (Grupo C). Na primeira semana do experimento o grupo A foi castrado, durante a segunda semana todos os animais foram submetidos à uma fratura na fíbula esquerda e na sexta semana foram sacrificados. A análise de resistência à tensão no local da fratura revelou que não houve diferença significativa entre os grupos A, B e C, indicando que a reparação das fraturas não foi alterada pela presença ou ausência de estrógeno.

Para observarem os efeitos da deficiência de estrógeno sobre o tecido ósseo, Wronski et al.¹⁰⁹ (1988) submeteram ratas com noventa dias de idade à ovariectomia. Esses animais foram sacrificados em diferentes momentos compreendidos no intervalo de tempo entre 14 e 180 dias após a cirurgia. A análise histomorfométrica

da porção proximal da tíbia e testes bioquímicos revelaram que a ovariectomia promoveu, no 14^o dia, uma redução no volume de osso trabecular e um aumento no número de osteoblastos e osteoclastos. Esses efeitos tornaram-se mais pronunciados até o centésimo dia, apresentando um declínio menos acentuado nos períodos posteriores. Os autores concluíram que a fase inicial de rápida perda óssea em ratas ovariectomizadas foi coincidente com o aumento do *turnover* ósseo.

Kribbs⁵⁰, 1990 desenvolveram um estudo para comprovar que a osteoporose, também, afeta o osso mandibular. Participaram desse estudo mulheres com evidências radiográficas de osteoporose em várias regiões do esqueleto e mulheres normais, todas com idade entre cinquenta e 85 anos. Através de exame intra-oral e radiografias periapical, oclusal e panorâmica, os autores observaram que os indivíduos com osteoporose apresentavam menor densidade mandibular e osso cortical do Gônio mais fino. Além disso, a maior porcentagem de sujeitos edêntulos foi encontrada no grupo de pessoas com osteoporose.

Walsh et al.¹⁰⁴, 1997 observaram o efeito da osteopenia na reparação das fraturas em ratas. Após seis semanas da cirurgia para ovariectomia, os autores induziram uma fratura transversal no fêmur, que foi imobilizada para promover adequada cicatrização. Os dados dos testes biomecânicos e da análise histológica demonstraram que a ovariectomia prejudicou a reparação após duas semanas da realização da fratura.

Hildebolt³⁵, 1997 em revisão de literatura sobre a associação entre osteoporose e perda óssea oral, cita que estudos histomorfométricos e microradiográficos demonstram aumento acentuado na porosidade cortical da mandíbula depois dos 50 anos de idade, sendo esse aumento maior no osso alveolar do que no corpo mandibular. Além disso, existe um decréscimo, concomitante, da massa óssea, que parece ser mais acentuado nas mulheres em relação aos homens, com a perda do conteúdo mineral ósseo estimada em 1,5% por ano nas mulheres e 0,9% nos homens.

Lane et al.⁵², 1998 realizaram um estudo com o objetivo de determinar o tempo necessário para ocorrer deteriorização da estrutura do osso trabecular e alterações no *turnover* ósseo após a ovariectomia em ratas. No início do experimento, todos os animais tiveram suas tíbias direitas analisadas por um *x-Ray tomographic microscopy* (XTM) e a seguir foram submetidos à cirurgia para excisão dos ovários. O XTM foi repetido várias vezes entre cinco e cinquenta dias pós-ovariectomia. Então, as ratas foram sacrificadas e suas tíbias removidas para análise histomorfométrica. Os resultados revelaram que o volume de osso trabecular e a conectividade das trabéculas diminuíram, respectivamente, 25% e 27% nos dias cinco e oito pós-ovariectomia, sendo essa redução progressivamente aumentada durante o tempo do experimento. Nos cinquenta dias pós-ovariectomia as ratas apresentaram aumento do *turnover* ósseo, sendo o número de osteoclastos quase o dobro dos animais controle.

Moriya et al.⁶⁷, 1998 estudaram a perda óssea alveolar em ratas com osteoporose experimental por meio de radiografias e

inspeção visual. Ratas com um mês de idade foram divididas em quatro grupos: ovariectomizadas e com dieta sólida (Grupo A), ovariectomizadas e dieta deficiente em cálcio (Grupo B), não-ovariectomizadas e dieta sólida (Grupo C) e não ovariectomizadas e dieta deficiente em cálcio (Grupo D). Após quatro semanas, a densidade óssea mineral da maxila, mandíbula e tíbias do grupo C foram significativamente maiores do que os grupos B e D, mas não foram maiores do que o Grupo A. Entretanto, em relação a perda óssea não foram observadas diferenças significantes entre os grupos.

Shimizu et al.⁸⁵, 1998 estudaram a cicatrização dos alvéolos após a extração dos molares superiores de ratas ovariectomizadas, através de microscopia eletrônica de varredura. Os alvéolos do grupo submetido à ovariectomia apresentaram formação óssea aumentada nas fases iniciais, seguida por uma grande diminuição, enquanto que a reabsorção óssea foi muito estimulada e teve longa duração.

Tanaka et al.⁹², 1998 avaliaram os efeitos da ovariectomia no côndilo mandibular em animais experimentais pela medida de densidade óssea mineral com *dual-energy x-ray absorptiometry* (DEXA) e área óssea medular com *soft x-ray photographs*. Ratas fêmeas com 120 dias de idade foram submetidas à ovariectomia bilateral e foram sacrificadas em 7, 14, 30 e 60 dias após a cirurgia. Não houve diferença, significativa, na densidade óssea mineral entre ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas, os autores acreditam que o osso cortical espesso da mandíbula pode ter escondido possíveis alterações no osso trabecular. A análise por *soft x-*

ray photographs revelou que os animais ovariectomizados apresentaram área medular maior do que os animais normais a partir do 14^o dia após a cirurgia.

Para obter um modelo de animal experimental com osteoporose, Kubo et al.⁵¹ (1999), realizaram ovariectomia bilateral em ratas com trinta semanas de idade. Medindo a densidade óssea mineral por quatro, oito e 12 semanas depois da cirurgia através do *dual-energy x-Ray absorptiometry* (DEXA), os autores verificaram que após 8 e 12 semanas a densidade óssea das ratas ovariectomizadas foi, significativamente, menor em relação ao grupo sem ovariectomia. Kubo et al.⁵⁰, (1999) estudaram ainda a cicatrização das fraturas em fêmur de ratas ovariectomizadas e mantidas com baixa dieta de cálcio. Observações radiográficas, histológicas e biomecânicas revelaram que seis semanas após as fraturas, a reparação do grupo das ratas ovariectomizadas foi idêntica ao grupo controle. Entretanto, após 12 semanas as ratas com osteoporose apresentaram menor densidade mineral nas áreas de fratura, mostrando que a deficiência de estrógeno e cálcio afetam o processo de cicatrização em fase mais posterior.

2.4 Colesterol

O colesterol é um constituinte vital das membranas celulares e um precursor dos hormônios esteróides e dos ácidos biliares. Apesar de ser essencial à vida, sua deposição nas artérias está associada à doenças cardiovasculares, principal causa de mortalidade de seres humanos. Em um organismo saudável, um equilíbrio é

mantido entre a biossíntese, a utilização e o transporte de colesterol (Voet et al.¹⁰⁰, 2000).

O colesterol presente no organismo é derivado da dieta ou da biossíntese que ocorre em vários tecidos, principalmente no fígado, intestino, córtex adrenal e nos tecidos reprodutores, incluindo ovário, testículos e placenta (Glew³¹, 1998). A síntese desse lipídeo ocorre a partir da condensação de duas moléculas de acetil CoA, produzindo acetoacetil CoA. Uma terceira molécula de acetil CoA é introduzida, formando a 3-hidroxi 3 metilglutaril coenzimaA (HMG-CoA). A enzima HMG-CoA redutase catalisa a conversão da HMG-CoA ao ácido mevalônico (mevalonato), o precursor do colesterol, constituindo a etapa limitante da biossíntese do mesmo (Glew³¹, 1998; Hamelin & Turgeon³⁴, 1998; Bellosta et al.⁷, 2000; Voet et al.¹⁰¹, 2000).

O mevalonato passa por uma série de reações até formar o farnesil pirofosfato, durante essas reações são formados vários compostos intermediários, como o isopentenil pirofosfato e geranil pirofosfato. As últimas etapas da biossíntese do colesterol envolvem a fusão de duas moléculas de farnesil pirofosfato para formar o esqualeno e, finalmente, a ciclização do esqualeno para gerar colesterol (Glew³¹, 1998; Bellosta et al.⁷, 2000; Voet et al.¹⁰¹, 2000; Russel et al.⁷⁸, 1999).

O colesterol sintetizado no fígado é convertido em ácidos biliares ou transportado pela corrente sanguínea até os tecidos nos quais vai ser consumido ou armazenado. Para aumentar sua solubilidade no plasma, o colesterol é transportado na forma de

lipoproteínas. Várias combinações de lipídeos e proteínas produzem partículas de diferentes densidades: LDL (lipoproteína de baixa densidade), VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade), HDL (lipoproteína de alta densidade). As proteínas LDL e VLDL apresentam elevado conteúdo triglicérido e portanto baixa densidade, enquanto que o HDL possui reduzido teor lipídico e alta densidade (Witztum¹⁰⁸, 1996).

O mecanismo de supressão da biossíntese do colesterol está associado com receptores de LDL específicos, que se projetam na superfície das células humanas. A primeira etapa do mecanismo regulatório envolve a ligação da lipoproteína LDL a esses receptores, extraíndo assim, as partículas de LDL do sangue. A lipoproteína carregada de colesterol é endocitada para o citoplasma da célula e inibe a atividade da HMG-CoA redutase. O acúmulo de colesterol intracelular, eventualmente, inibe o reabastecimento de receptores de LDL na superfície celular, bloqueando assim, a futura captação e o acúmulo de colesterol (Glew et al.³¹, 1998; Vance & Bosh⁹⁸, 2000).

As hiperlipidemias são comuns em muitos países e as condições mais comumente encontradas compreendem as elevações de LDL, VLDL ou de ambas as lipoproteínas produzidas por uma combinação de tendências familiares e excessos alimentares (Page et al.⁷³, 1999). A hipercolesterolemia é comum em mulheres pós-menopausa, sendo demonstrado em vários estudos que a ovariectomia aumenta a concentração de colesterol plasmático em animais e em humanos (Kishida & Ebihara⁴⁵, 2000).

O exato mecanismo pelo qual a ovariectomia causa hipercolesterolemia não está bem esclarecido. Acredita-se que esteja relacionado com a redução do *clearance* de LDL, devido a remoção dos ovários e atrofia do útero. Os ovários de animais pequenos, como os hamsters, são relatados como o segundo local, depois do fígado, com capacidade de *clearance* de LDL. A hipercolesterolemia após ovariectomia, também, está associada com a redução da conversão do colesterol em ácidos biliares, pois a deficiência de estrógeno causa diminuição da atividade da enzima 7 α -hidrolase, responsável pela síntese dos ácidos biliares. Provavelmente, esses e outros mecanismos, trabalhando de modo independente ou combinado, contribuem para a elevação do colesterol sanguíneo na deficiência de hormônio ovariano (Sohn et al.⁸⁷, 1999; Lucas et al.⁵⁶, 2000).

2.5 Estatinas

As estatinas, ou inibidores de 3-hidroxi 3 metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, são muito eficazes na redução do nível de colesterol plasmático, amplamente, utilizadas no tratamento de hipercolesterolemia. Hoje são encontrados no mercado vários tipos de estatinas, incluindo a lovastatina, sinvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina e cerivastatina (Bellosta et al.⁷, 2000).

O primeiro inibidor de HMG CoA redutase descrito foi a mevastatina, originalmente chamada compactina, isolada de culturas de espécies de *Penicillium* por Endo et al.²⁷, (1976). Os autores observaram que esses metabólitos fúngicos apresentavam uma porção

da estrutura química muito similar a HMG-CoA, portanto eram capazes de inibir a enzima HMG-CoA redutase por um mecanismo competitivo.

Brown et al.¹³, 1978 verificaram que a síntese do colesterol foi reduzida em cultura de fibroblastos tratados com compactina, através da inibição reversível da HMG CoA redutase. Além disso, os autores observaram que quando a atividade da HMG CoA redutase era fortemente inibida, as células respondiam com um aumento compensatório no número dessas moléculas.

Alberts et al.², 1980 descreveram um análogo da mevastatina que diferia apenas na presença de um grupamento metila, a lovastatina, inicialmente chamada mevinolina, que foi isolada de cultura de *Aspergillus*. A seguir, duas formas quimicamente modificadas da lovastatina, a sinvastatina e a pravastatina, foram desenvolvidas, respectivamente, por Hoffman et al.³⁷ (1986) e Tsujita et al.⁹⁶ (1986). Mais recentemente, estatinas totalmente sintéticas foram elaboradas, como a fluvastatina, atorvastatina e cerivastatina (Maron et al.⁶¹, 2000).

Embora as estatinas possam inibir a biossíntese do colesterol, sua capacidade de reduzir o colesterol no plasma é mais complexa e envolve mecanismos regulatórios de receptores LDL nos hepatócitos (Rogers⁷⁷, 2000). A inibição da enzima HMG-CoA redutase produz respostas celulares compensatórias, como o aumento do número de HMG CoA redutase e da expressão de receptores LDL na superfície celular. Em razão do aumento de HMG CoA redutase, a síntese do colesterol celular é, ligeiramente, reduzida, mas a

eliminação do colesterol pelo mecanismo de receptor LDL é marcadamente potencializada levando a reduções do colesterol sérico. O efeito mais pronunciado consiste na redução do colesterol LDL, mas, também, há uma redução no conteúdo de colesterol das partículas VLDL, enquanto há aumento do colesterol HDL (Page et al.⁷³, 1999).

O fígado é o órgão alvo das estatinas, pois é o local principal da biossíntese do colesterol, da produção de lipoproteínas e catabolismo do LDL. Entretanto, a biossíntese do colesterol em outros tecidos é necessária para as funções celulares normais. Os efeitos adversos dos inibidores de HMG CoA redutase durante longo tempo de tratamento dependem do seu potencial de ação nos tecidos extra-hepáticos (Lennernäs & Fager⁵³, 1997). Uma análise de históricos médicos de 4.444 indivíduos em um período de cinco anos revelou que o uso da sinvastatina não promoveu efeitos adversos, tendo portanto uma boa aceitação pelos pacientes (Pedersen et al.⁷⁵, 1996).

Todas as estatinas são bem eficazes na redução dos níveis de LDL. Como uma classe, estas substâncias diminuem os níveis de LDL colesterol de 25 a 45% de modo dependente da dose. Existem diferenças na potência hipolipidêmica entre os vários agentes disponíveis. A sinvastatina parece ser duas vezes mais eficaz que a lovastatina, a pravastatina é tão eficaz como a lovastatina em doses menores (10 a 20mg/dia), mas não em doses altas. Entretanto, a fluvastatina parece ter, clinicamente, metade da potência da lovastatina (Witztum¹⁰⁸, 1996).

Vários trabalhos têm demonstrado que as estatinas, também, diminuem o risco de doenças coronárias e apresentam efeitos sobre a função endotelial, arquitetura e estabilidade plaquetária, trombose e inflamação (Maron et al.⁶¹, 2000). Além disso, estudos recentes *in vitro* e *in vivo* revelaram que as estatinas possuem efeitos farmacológicos sobre o tecido ósseo, podendo ser úteis no tratamento da osteoporose (Mundy et al.⁷⁰, 1999). Mecanismos independentes da redução do colesterol LDL podem ter um papel importante nesses benefícios clínicos dos inibidores de HMG-CoA redutase (Maron et al.⁶¹, 2000).

O colesterol não é o único produto do mevalonato. Este produz uma série de compostos isoprenóides, como o farnesil e geranil. Os isoprenóides são necessários para a proliferação celular e outras funções importantes. Provavelmente, a redução destes compostos pode explicar alguns dos efeitos benéficos dos inibidores de HMG-CoA redutase que não são atribuídos à diminuição do colesterol (Massy et al.⁶², 1996).

Wang et al.¹⁰⁵, 1995 avaliaram a ação da lovastatina em fêmur de coelhos com osteoporose provocada por esteróide, através de análise histológica. Após seis a oito semanas de tratamento não houve diferença entre o grupo que só recebeu esteróide e o grupo tratado com esteróide e lovastatina, entretanto após 13 a 15 semanas a área óssea do grupo que só tomou esteróide apresentou-se bem menor em relação ao grupo tratado, também, com lovastatina. Os autores também observaram que o tratamento com esteróide por 13 a 15 semanas promoveu um aumento no nível de colesterol sanguíneo.

Cui et al.²⁰, 1997 estudaram os efeitos da lovastatina na preservação da osteonecrose induzida por esteróides em fêmur de galinhas. Esses animais foram divididos em Grupo A (tratado apenas com esteróide), Grupo B (tratado com esteróide e lovastatina), Grupo C (tratado somente com lovastatina) e Grupo D (controle). As galinhas foram sacrificadas em seis ou 12 semanas e tratadas até o momento do sacrifício. Análises histológicas e morfométricas revelaram que o grupo tratado apenas com esteróide, por 12 semanas, demonstrou uma redução significativa da massa óssea e evidências de osteonecrose, enquanto que os animais tratados, concomitantemente, com esteróide e lovastatina apresentaram preservação da massa óssea. Além disso, os Grupos A e B apresentaram um aumento no nível de colesterol em 6 semanas, sendo que o Grupo B sofreu uma redução e alcançou níveis normais em 12 semanas. Entretanto, os Grupos C e D não mostraram alterações em relação a dosagem de colesterol.

Sato et al.⁸¹, 1998 examinaram os efeitos da diminuição das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e dos inibidores de HMG CoA redutase nos eventos de fusão celular para formação dos osteoclastos em cultura de células de camundongos. A redução do LDL suprimiu a formação dessas células após o 3º dia. A sinvastatina, também, apresentou efeito inibitório sobre a fusão das células que foi dependente da dose e do tempo de tratamento.

Luckman et al.⁵⁷, 1998 realizaram um estudo com o objetivo de investigar se a mevastatina apresenta o mesmo efeito dos bifosfonatos na inibição da reabsorção óssea e indução de apoptose de osteoclasto, em cultura de células da calvária de camundongos. Os

autores observaram que a mevastatina apresentou maior potencial na indução da apoptose de osteoclasto do que o alendronato ou risendronato. Além disso, a mevastatina provocou inibição da reabsorção óssea estimulada pelo paratormônio e redução do número de osteoclastos, sendo esses efeitos dose-dependentes. Os autores ainda verificaram que os efeitos da mevastatina e bifosfonatos foram inibidos pela adição de mevalonato na cultura de células. Assim, os autores atribuíram os efeitos da mevastatina e do bifosfonato sobre o tecido ósseo à inibição dos compostos isoprenóides produzidos no metabolismo do mevalonato.

Mundy et al.⁷⁰, 1999 testaram diferentes compostos naturais em cultura de células ósseas de camundongos com o objetivo de encontrarem uma substância que fosse capaz de aumentar a produção da proteína morfogenética (BMP-2), que estimula o crescimento ósseo e mostraram que apenas a lovastatina apresentava essa característica. Para avaliar o efeito da lovastatina na produção de BMP-2, os autores a administraram sobre a calvária de camundongos jovens, com três injeções diárias de 5 ou 10mg/kg por cinco dias e verificaram que o osso tratado apresentava-se 50% mais espesso do que o grupo controle. Os autores estudaram ainda os efeitos da sinvastatina em ratas normais e ovariectomizadas, que receberam doses orais de 5 a 50mg/kg/dia por 35 dias. Os resultados revelaram que as tíbias, fêmures e vértebras do grupo tratado apresentaram-se duas vezes mais densos que o grupo controle, além de produzirem aumento no volume do osso trabecular entre 39 e 94% e, também, concomitante diminuição no número de osteoclastos. Os autores não

excluem a possibilidade das estatinas inibirem o processo de reabsorção, embora esse efeito seja menor que o observado quanto ao aumento da formação e maturação dos osteoblastos.

Sugiyama et al.⁸⁹, 2000 demonstraram que a compactina e a sinvastatina induzem a produção da proteína morfogenética BMP-2 em cultura de células de osteossarcoma humano, sendo esse efeito mais pronunciado pela sinvastatina. Observaram, ainda, que nem todas as estatinas possuem capacidade de aumentar BMP-2, pois a pravastatina não alterou a atividade desta proteína. Além disso, os autores trataram algumas dessas células com estatina e mevalonato e verificaram que o tratamento com mevalonato suprimiu os efeitos da estatina, sugerindo que a indução de BMP-2 pela compactina e sinvastatina foi resultado da inibição da HMG-CoA redutase e que essa enzima é um importante regulador da expressão da proteína BMP-2 em células de osteossarcoma humano.

Para determinar se o uso da estatina em humanos está associado com uma redução do risco de fraturas de quadril, Wang et al.¹⁰⁶ (2000) investigaram 6.110 residentes de New Jersey com idade de 65 anos ou mais. Essa pesquisa demonstrou que qualquer uso da estatina nos seis meses ou três anos anteriores foi associado com uma diminuição de 50% e 43%, respectivamente, no risco de fraturas de quadril. O grau de redução de fratura foi proporcional ao tempo de tratamento, pois os pacientes que usaram esse medicamento durante três anos consecutivos apresentaram uma diminuição de 71% no risco de fratura de quadril.

Chung et al.¹⁹, 2000 analisaram os efeitos dos inibidores da HMG-CoA redutase na densidade óssea mineral de 69 indivíduos com diabetes melito tipo 2, através de uma revisão de registros médicos. Os pacientes com hipercolesterolemia e tratados com lovastatina, pravastatina ou sinvastatina apresentaram um aumento, significativo, na densidade óssea do cólo do fêmur depois de 15 meses do término do tratamento. Enquanto que as pessoas que não receberam estatina tiveram uma redução da densidade óssea mineral da espinha dorsal. Os autores observaram, também, que os efeitos da estatina foram mais proeminentes nos homens do que nas mulheres.

Chan et al.¹⁸, 2000 verificaram que as estatinas podem conferir proteção contra fraturas por osteoporose. Analisando os históricos médicos de várias mulheres com mais de sessenta anos, de diferentes regiões dos Estados Unidos, os autores constataram que as pessoas expostas à estatina por um período superior a um ano apresentaram menor risco de fratura em relação aos pacientes que não receberam inibidores de HMG-CoA redutase. O uso constante da estatina por dois anos foi associado com mais de 50% na redução do risco de fratura

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da sinvastatina na reparação óssea guiada de defeitos mandibulares de ratas normais e ovariectomizadas, além de correlacionar estes achados com os níveis de colesterol sanguíneo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos-UNESP, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob protocolo nº 003/2000 (Anexo A).

Para realização deste trabalho foram utilizadas setenta ratas adultas (*Rattus norvegicus*, var. albinus, Wistar), peso de aproximadamente 250g e mantidas em gaiolas individuais com água e ração Purina, fornecidas pelo Biotério da Faculdade. A metade desses animais foram ovariectomizados aos dois meses de idade e os outros 35 não. Todas as ratas foram submetidas à cirurgia para confecção de um defeito ósseo na mandíbula aos três meses de idade

4.2 Anestesia

As ratas foram anestesiadas com solução de Rompun (Bayer do Brasil) e Francotar (Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.) na proporção de 1: 0,5mL, na dose de 0,1mL/100g, via intramuscular. O Rompun (cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina) é

um sedativo analgésico e relaxante muscular e o Francotar (ketamina base) um anestésico geral.

4.3 Ovariectomia

Após anestesia, depilação da região abdominal lateral e assepsia com álcool iodado, a pele e musculatura foram incisadas longitudinalmente, na linha média próxima ao nível dos rins e abaixo da última costela. O ovário foi identificado e exposto, foi realizada a hemostasia, através da ligação da parte superior da trompa com fio de seda nº4 (Ethicon/ Johnson & Johnson). O ovário juntamente com a gordura circundante, o oviduto e uma pequena porção do útero foram excisados. As camadas musculares foram suturadas com fio de sutura absorvível Catgut nº4 (Cirumédica) e a pele com fio de seda nº4 (Ethicon/ Johnson & Johnson), sendo esse procedimento realizado bilateralmente.

4.4 Defeito ósseo

Após um mês da ovariectomia, as ratas foram anestesiadas, foi realizada depilação da região mandibular direita e desinfecção com álcool iodado. Foi feita uma incisão longitudinal da pele (Figura 1a) e uma incisão transversal da musculatura com lâmina de bisturi nº15 e os tecidos moles foram afastados com instrumentos de ponta romba para exposição da superfície óssea (Figura 1b). Um defeito ósseo bicortical foi realizado na região do ângulo da

mandíbula (Figura 1c) através de motor elétrico (AEV-707) de baixa rotação, na velocidade de 1500 rotações por minuto (rpm), utilizando-se, primeiramente, uma broca em forma de lança com 2,5mm de diâmetro e a seguir uma broca helicoidal com 3,7mm de diâmetro. A confecção do defeito foi realizada sob irrigação constante de soro fisiológico esterilizado (NaCl 0,9%).

A lesão foi recoberta por uma barreira de politetrafluoretileno puro não reabsorvível, medindo 20mm de comprimento e 8mm de largura, previamente esterilizada em autoclave e colocada por vestibular e lingual, excedendo 2mm das margens do defeito (Figura 1d, e). A seguir foram suturadas a camada muscular com fio de sutura absorvível Catgut nº 4 (Cirumédica) e a pele com fio de seda nº 4 (Ethicon/ Johnson & Johnson) (Figura 1f).

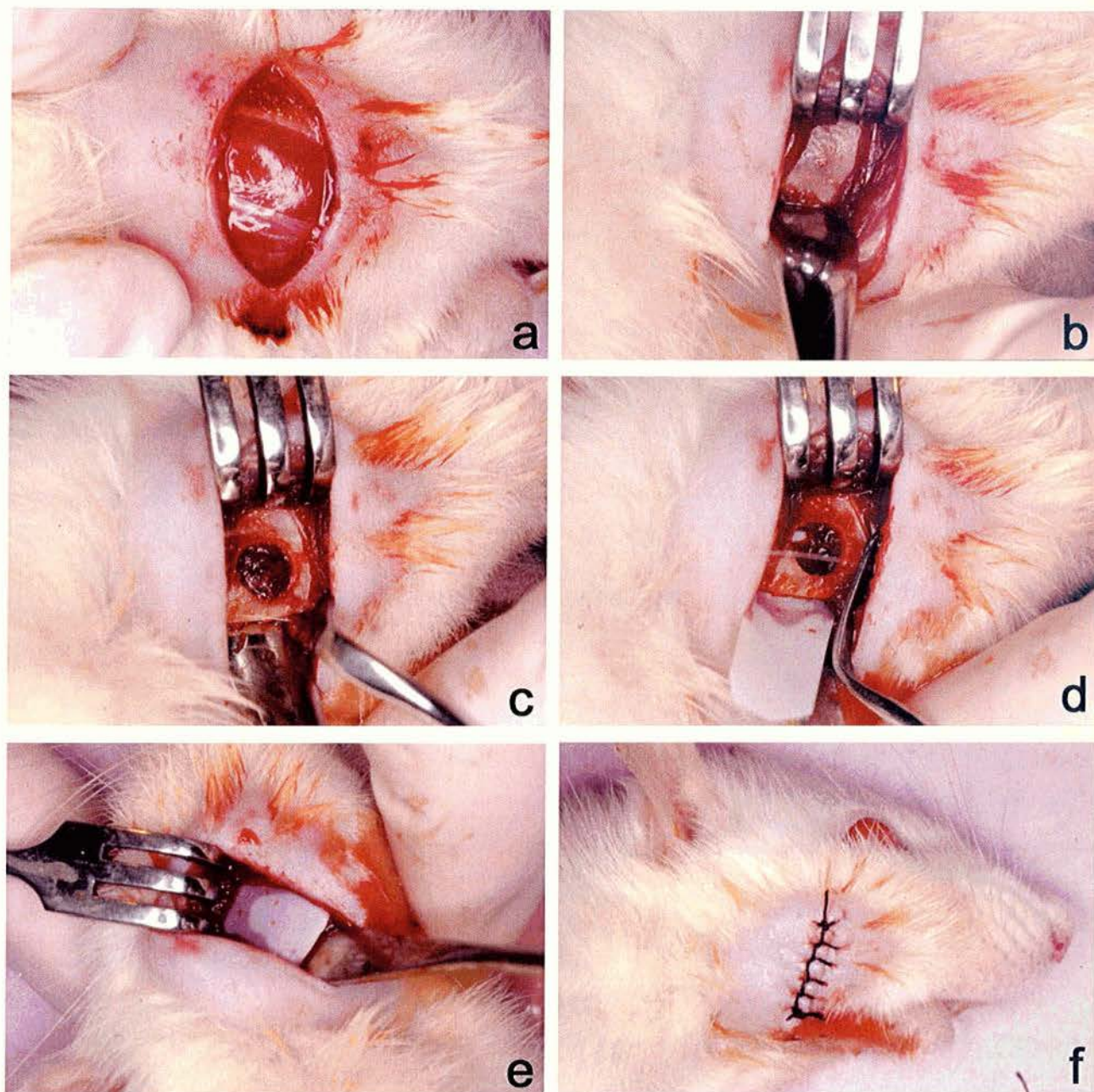


FIGURA 1 - Procedimentos cirúrgicos para confecção do defeito ósseo no ângulo da mandíbula: a) incisão longitudinal da pele; b) afastamento dos tecidos moles e exposição do osso; c) defeito ósseo bicortical; d) inserção da barreira de politetrafluoretileno na superfície lingual; e) barreira posicionada nas superfícies lingual e vestibular; f) sutura da pele

4.5 Tratamento e tempo de sacrifício

Logo após a cirurgia, os animais foram divididos em oito grupos tratados (Quadro 1) e seis grupos controles (Quadro 2), cada grupo composto por cinco ratas. Os grupos tratados receberam 20 mg/kg/dia de sinvastatina (Sinvascor-Baldacci) via oral. As ratas foram sacrificadas 15, trinta ou sessenta dias após a lesão óssea.

Quadro 1- Distribuição dos animais tratados com sinvastatina nos diferentes grupos

Grupos tratados	Tratamento por 15 dias		Tratamento por 30 dias	
	S=15 dias	S=30 dias	S=30 dias	S=60 dias
normais	1T*	2T	3T	4T
ovariectomizados	5T	6T	7T	8T

* representa a denominação do grupo, cada um composto por 5 animais

S: sacrifício

Quadro 2- Distribuição dos animais controle nos diferentes grupos

Grupos controle	S=15 dias	S=30 dias	S=60 dias
normais	1C*	2C	3C
ovariectomizados	4C	5C	6C

* representa a denominação do grupo, cada um composto por 5 animais

S: sacrifício

Para o sacrifício, as ratas foram anestesiadas, colocadas em placa de cortiça em decúbito dorsal, foi feita incisão no abdômen, a artéria aorta exposta e com auxílio de uma seringa contendo heparina (Liquemine-Rocha), foi retirado sangue no volume de 2mL para dosagem do colesterol. A seguir os animais foram decaptados em

uma guilhotina, suas mandíbulas foram removidas e mantidas em formol a 10%.

4.6 Forma de análise dos resultados

4.6.1 Dosagem de colesterol

As amostras de sangue coletadas foram centrifugadas (centrífuga Excelsa 2 Fanem) em 4000 rotações por minuto durante 10min. A dosagem do colesterol total do plasma heparinizado foi realizada pelo método de Huang modificado (Moura et al.⁶⁸, 1994) baseado na reação de Liebermann-Burchard, na qual o colesterol livre e esterificado do plasma reage com o reativo cromogênico, formando-se um complexo de cor verde, cuja intensidade é medida espectrofotometricamente.

O reativo cromogênico foi preparado utilizando-se um béquer de 2L em banho de gelo, no qual adicionou-se 300mL de anidrido acético (Merck) e 150mL de ácido acético glacial (Merck), previamente refrigerados. Após mistura vigorosa desses reagentes foi adicionado 55mL de ácido sulfúrico (Cinética química) gelado sob agitação constante. A solução resultante foi mantida em banho de gelo por 30min e então transferida para um frasco de armazenamento âmbar, onde adicionou-se 10g de sulfato de sódio anidro (QEEL Indústrias Químicas) sob agitação até dissolução total. O reativo foi mantido em geladeira e usado 12 horas após o preparo.

Para avaliação das concentrações de colesterol nas amostras de plasma foi registrada uma curva padrão de referência utilizando-se soluções de colesterol p.a. (Sigma Chemical) nas concentrações de 80, 120, 200, 240 e 300mg/dL aquecidos a 37°C até completa dissolução. Em cada tubo de ensaio foram colocados 0,05mL da amostra do plasma ou da solução padrão e 2,5mL do reativo cromogênico gelado, a seguir foram colocados em banho-maria a 37°C durante 15min, sob proteção da luz.

As leituras das absorbâncias foram registradas, em duplicata, a 625nm em um espectrofotômetro (Spectrophotometer Shimadzu modelo UV-1203) ajustando a zero do equipamento com o reagente cromogênico.

O conteúdo de colesterol das amostras expresso em mg/dL, foi determinado utilizando-se fator de calibração médio correspondente a 1271.35, obtido através da curva de referência padrão e através dos seguintes cálculos:

Fator de calibração $\times$ Absorbância da amostra = mg de colesterol/dL

Onde:

Fator de calibração (mg/dL) = $\frac{\text{Concentração do padrão (mg/dL)}}{\text{Absorbância do padrão}}$

4.6.2 Análise da densidade óptica

Foram realizadas 35 tomadas radiográficas com filme oclusal (Kodak Ektaspeed Plus EO-41P, size 4), sendo sobre cada filme posicionado duas hemi-mandíbulas direitas, com a face vestibular voltada para o RX. No centro do filme, em sentido transversal e entre as mandíbulas, foi colocado uma escala padrão de alumínio (*step wedge*) e na porção inferior esquerda números e letras para identificação dos mesmos (Figuras 2 e 3).

A escala padrão de alumínio utilizada nesse estudo apresentava oito degraus, que foram mensurados na Schrader Bridgeport Brasil (Anexo B), apresentando os seguintes valores (Quadro 3):

Quadro 3- Valores da espessura dos degraus da escala de alumínio

Degraus da escala	Espessura em alumínio (mm)
1	0,498
2	1,004
3	1,569
4	2,127
5	2,675
6	3,212
7	3,755
8	4,288

As mandíbulas foram submetidas à análise radiográfica com emprego de aparelho de RX Odontológico (General Eletric - GE

1000 - modelo 11A5A7), utilizando-se 65KV, 10mA e 0,25segundos de exposição e distância foco-objeto de 40cm. A película radiográfica foi revelada em processadora automática (Gendex GXP), sob temperatura constante de 27°C e tempo de processamento 6 min. As soluções para revelação (Kodak do Brasil SA) foram trocadas no dia anterior para assegurar processamento apropriado.

A mensuração das densidades ópticas das radiografias foi efetuada com o uso de um fotodensitômetro (M.R.A.), com abertura de 1mm para todas as leituras e calibrado conforme as especificações do fabricante. O registro de cada densidade óptica foi fornecido em valores numéricos em um visor digital e quanto menor for o valor da densidade óptica de uma determinada área medida no fotodensitômetro, maior a radiopacidade da mesma.

Foram realizadas leituras da densidade óptica do centro dos defeitos ósseos e dos degraus da escala de alumínio de cada radiografia. A densidade óptica de cada uma dessas estruturas foi medida dez vezes, sendo cinco realizadas logo após o processamento das radiografias e as outras medidas após um período de 15 dias, obtendo-se uma média das mesmas. Todas as leituras foram executadas por um mesmo observador.

A seguir encontrou-se um valor equivalente em espessura de alumínio para cada defeito ósseo, obtido através de um modelo de regressão linear (Louzada et al.⁵⁵, 1989; Kolbeck et al.⁴⁶, 1999) estruturado com os valores da densidade óptica dos oito degraus do *step-wedge* e suas respectivas espessuras de alumínio, obtendo para cada radiografia uma equação correspondente. Os valores da

densidade óptica transformados em equivalente de alumínio foram submetidos à análise estatística.

As radiografias e a leitura das densidades ópticas foram realizadas na disciplina de Radiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP.

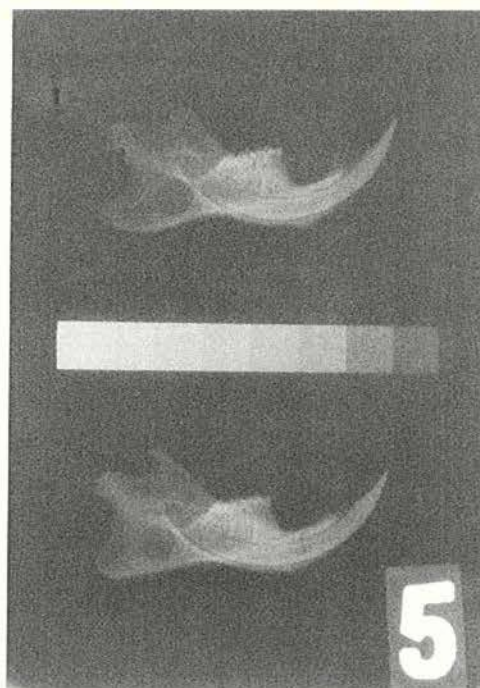


FIGURA 2 - Radiografia apresentando uma mandíbula do grupo tratado ovariectomizado e sacrificado em 15 dias (5T) na parte superior, uma mandíbula do grupo controle ovariectomizado e sacrificado em 15 dias (4C) na região inferior e uma escala de alumínio ao centro

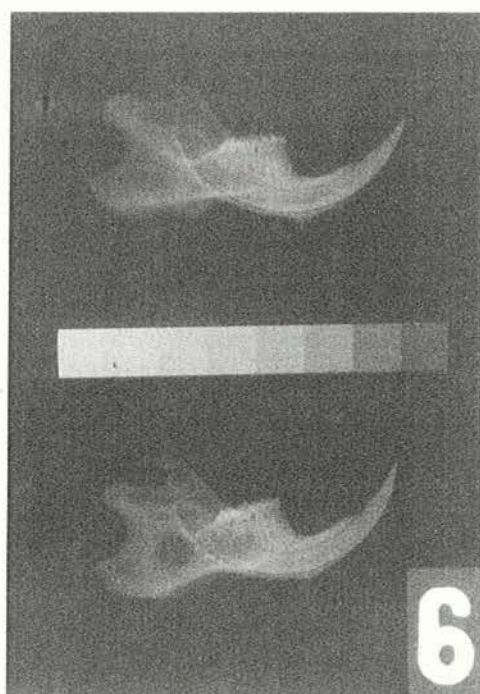


FIGURA 3 - Radiografia exibindo uma mandíbula do grupo tratado por 30 dias, ovariectomizado e sacrificado em 30 dias (7T) na parte superior, uma mandíbula do grupo controle ovariectomizado e sacrificado em 30 dias (5C) na região inferior e uma escala de alumínio ao centro

4.6.3 Análise histológica

Após a realização das tomadas radiográficas, as hemimandíbulas direitas foram descalcificadas em solução aquosa de ácido fórmico a 20% por quarenta dias. A seguir, as mesmas foram analisadas em lupa e hemisseccionadas na região do defeito ósseo, no sentido ântero-posterior. Os fragmentos foram incluídos em parafina, perpendicularmente à superfície seccionada, para obtenção de quatro cortes seriados com aproximadamente 5µm de espessura, corados pelo método de hematoxilina-eosina. A análise dos cortes histológicos em microscópio de luz foi realizada através da observação da neoformação óssea, presença de trabéculas ósseas imaturas, remodelação das mesmas e existência de tecido de granulação.

4.6.4 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada utilizando-se método estereológico, baseando-se no proposto por Taga & Stipp⁹¹ (1994). A avaliação da densidade de volume (V_{vi}) foi expressa em porcentagem, utilizando-se retículo, quadriculado e objetiva de 20X, sendo considerados os pontos de intersecção entre os quadrados (81 pontos). A imagem do retículo foi superposta em um campo histológico, considerando-se os pontos do retículo que se sobrepuseram sobre uma determinada estrutura em estudo (Pi) e o número total de pontos sobre o defeito ósseo (P). A fração de

densidade de volume do defeito ósseo ocupada por essa estrutura foi calculada pela fórmula descrita abaixo (Taga & Stipp⁹¹, 1994).

$$V_{vi} = \frac{\text{nº de pontos sobre a estrutura } (Pi)}{\text{nº total de pontos sobre o defeito ósseo } (P)}.$$

As variações histológicas consideradas para quantificação (Pi) foram as formações de tecido ósseo, como matriz óssea, lacunas do osteócito, osteoblastos e osteoclastos.

Para realização das contagens, foram utilizadas duas lâminas para cada hemi-mandíbula e em cada lâmina foram superpostas duas imagens dos retículos, assim foram contados 324 pontos em cada animal. As imagens do retículo foram colocadas uma ao lado da outra, a partir da borda anterior do defeito ósseo. Os valores da densidade de volume obtidos em porcentagem foram submetidos aos testes estatísticos.

4.6.5 Análise Estatística

Os resultados da dosagem de colesterol, densitometria óptica e histomorfometria foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA) e teste de Tukey (Vieira¹⁰⁰, 1986), sendo utilizado como nível de significância a margem de erro de 5%.

A estatística dos resultados obtidos nas várias análises realizadas foi feita em duas partes. Na primeira foram analisados todos os grupos estudados, independente do tempo de tratamento (Quadro 4)

e na segunda apenas os grupos tratados, com relação aos diferentes tempos de tratamento (Quadro 5).

Quadro 4- Distribuição dos grupos tratados (T) e controle (C) estudados na análise estatística

Condições de tratamento	Sacrifício 15 dias	Sacrifício 30 dias	Sacrifício 60 dias
Controle normal	1C	2C	3C
Controle ovariectomizado	4C	5C	6C
Tratado normal	1T	2T; 3T	4T
Tratado ovariectomizado	5T	6T; 7T	8T

Quadro 5- Distribuição dos grupos tratados (T) estudados na análise estatística

Grupos tratados	Tratamento por 15 dias		Tratamento por 30 dias	
	S=15 dias	S=30 dias	S=30 dias	S=60 dias
normal	1T	2T	3T	4T
ovariectomizado	5T	6T	7T	8T

S: sacrifício

5 RESULTADOS

5.1 Dosagem de colesterol

Os resultados da dosagem do colesterol dos 14 grupos estudados estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1- Valores obtidos na dosagem do colesterol sanguíneo em cada grupo estudado composto por cinco animais e suas respectivas médias

Grupos	Colesterol sanguíneo (mg/dL)					Médias
1T	78,19	55,30	95,99	80,09	64,20	74,75
2T	85,18	85,82	70,56	67,38	83,91	78,57
3T	91,54	68,02	59,12	65,47	71,04	71,04
4T	96,62	48,31	59,75	81,37	71,51	71,51
5T	89,63	115,06	84,54	99,16	97,10	97,10
6T	81,37	100,44	112,51	95,99	106,16	99,29
7T	66,74	87,72	78,19	96,62	64,84	78,82
8T	72,47	106,16	75,01	67,38	103,61	84,93
1C	99,80	99,80	97,71	61,02	82,64	88,19
2C	72,47	62,30	82,64	80,09	55,93	70,69
3C	127,13	118,87	65,47	82,64	98,53	98,50
4C	115,06	85,82	70,56	76,92	87,08	87,09
5C	106,79	82,00	71,19	102,98	75,01	87,59
6C	99,16	117,60	94,08	86,45	99,32	99,32

A estatística descritiva e análise de variância (ANOVA) referente a esses dados encontram-se nas Tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2- Estatística descritiva referente a dosagem de colesterol das diferentes condições de tratamento

Grupos	média	mediana	mínimo	máximo	DP
Controle normal	85,80	82,64	55,93	127,13	21,06
Controle OV	91,33	87,08	70,56	117,60	15,19
Tratado normal	73,97	71,28	48,31	96,62	13,54
Tratado OV	90,03	92,81	64,84	115,06	15,61

OV: ovariectomizado

DP: desvio padrão

Tabela 3- Estatística descritiva da dosagem de colesterol dos vários períodos de sacrificio

Sacrificio	média	mediana	mínimo	máximo	DP
15 dias	86,78	86,45	55,30	115,06	16,35
30 dias	81,00	80,73	55,93	112,51	15,28
60 dias	88,57	90,27	48,31	127,13	21,11

DP: desvio padrão

Tabela 4- Análise de variância dos dados da dosagem do colesterol descritos na Tabela 1

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Razão F	p
1	3	3431,335	1143,778	4,523	0,006*
2	2	848,175	424,693	1,677	0,196
1 x 2	6	2308,159	384,693	1,521	0,187
Resíduo	58	146667,14	252,882		
Total	69	21106,940	305,898		

1: indica as condições de tratamento: controle normal, controle ovariectomizado, tratado normal, tratado ovariectomizado

2: representa os períodos de 15, 30 e 60 dias de observação

*diferença estatisticamente significativa

A análise de variância (ANOVA) observada na Tabela 4, revela que só houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com diferentes condições de tratamento (variável 1). Os períodos de 15, trinta e sessenta dias (variável 2) apresentam nível de colesterol sanguíneo semelhantes. Além disso, quando consideramos a interação entre as variáveis 1 e 2 não existem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Os resultados das diferentes condições de tratamento foram submetidos ao teste de Tukey (Tabela 5).

Tabela 5- Teste de Tukey para os dados da dosagem do colesterol obtidos nas diferentes condições de tratamento

	Controle normal	Controle OV	Tratado normal	Tratado OV
médias	85,80	91,33	73,97	90,03
Controle normal		0,776	0,127	0,835
Controle OV			0,010*	0,0997
Tratado normal				0,008*
Tratado OV				

OV: ovariectomizado

* diferença estatisticamente significativa

Na Tabela 5 observamos que entre as diferentes condições de tratamento, o grupo tratado normal apresenta diferença estatisticamente significativa em relação aos dois grupos ovariectomizados.

As representações gráficas das médias das condições de tratamento e da interação dessa variável com os tempos de sacrifício estão representadas respectivamente nas Figuras 4 e 5.

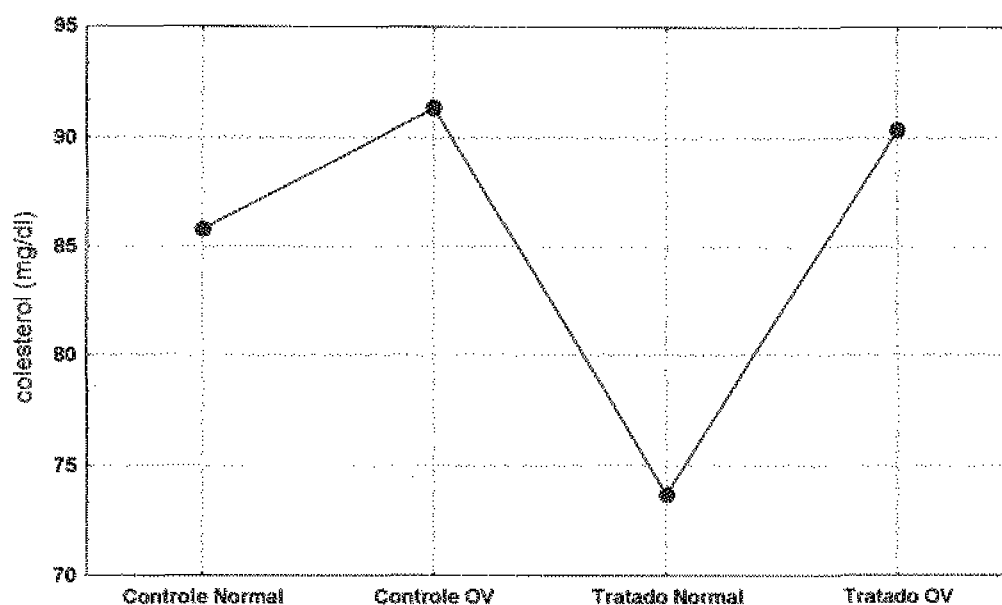


FIGURA 4- Gráfico das médias do nível de colesterol referente às condições de tratamento

Na Figura 4 observamos que as médias do nível de colesterol sanguíneo foram mais elevadas nos grupos ovariectomizados, sendo revelado pela análise estatística que o grupo tratado normal apresentou média, significativamente, menor do que os dois grupos ovariectomizados. Além disso não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos normais e entre os grupos ovariectomizados, indicando que a sinvastatina não apresentou efeito hipolipidêmico.

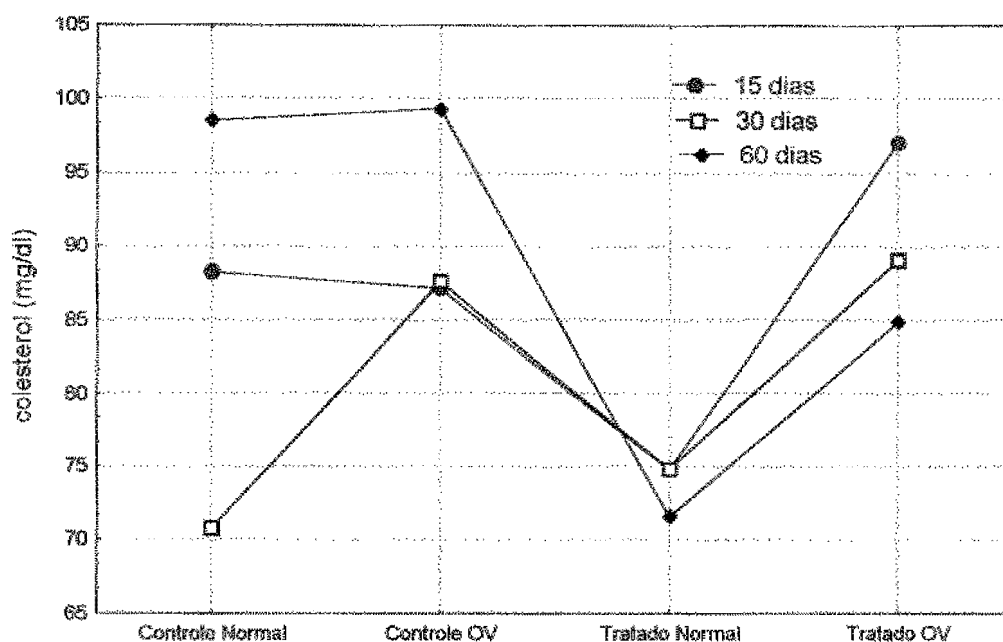


FIGURA 5- Gráfico das médias do nível de colesterol referente às condições de tratamento x períodos de sacrifício

Verifica-se na Figura 5 que os grupos tratados apresentaram nível de colesterol sanguíneo semelhantes nos três períodos estudados, enquanto que os grupos controle mostraram maior variação no nível de colesterol nos diferentes tempos de sacrifício. A análise estatística revelou que não há diferença significativa entre esses 12 grupos.

Na análise dos resultados da dosagem do colesterol dos grupos tratados em relação aos tempos de tratamento foi realizado a estatística descritiva e análise de variância (ANOVA), cujos valores se encontram nas Tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6- Estatística descritiva referente à dosagem de colesterol dos grupos tratados com diferentes tempos de tratamento e sacrifício

Grupos	média	mediana	mínimo	máximo	DP
T=15 e S=15	85,93	87,09	55,30	115,06	17,54
T=15 e S=30	88,93	85,50	67,38	112,51	14,69
T=30 e S=30	74,93	69,53	59,12	96,62	12,87
T=30 e S=60	78,22	73,74	48,31	106,16	18,90

T: tempo de tratamento

S: tempo de sacrifício

DP: desvio padrão

Tabela 7- Estatística descritiva da dosagem do colesterol dos grupos tratados normal e ovariectomizado

Grupos	média	mediana	mínimo	máximo	DP
Normal	73,97	71,28	48,31	96,62	13,54
OV	90,03	92,81	64,84	115,06	15,61

OV: ovariectomizado

DP: desvio padrão

Tabela 8- Análise de variância dos dados dos resultados da dosagem do colesterol dos grupos tratados

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Razão F	p
1	3	1277,469	425,823	2,097	0,120
2	1	2581,324	2581,324	12,714	0,001*
1 x 2	3	341,837	113,946	0,561	0,644
Resíduo	32	6496,782	203,024		
Total	39	10697,413	274,293		

1: indica os diferentes tempos de tratamento e sacrifício

2: representa os grupos tratados normal e ovariectomizado

*diferença estatisticamente significativa

Através da análise de variância demonstrada na Tabela 8, observamos que os dados da dosagem do colesterol foram semelhantes entre os vários tempos de tratamento e sacrifício. A única diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os grupos tratados normal e ovariectomizado. Além disso, os dados da interação entre essas duas variáveis mostraram-se semelhantes.

A análise dos dados obtidos na dosagem do colesterol para todos os grupos tratados pode ser melhor entendida através da Figura 6.

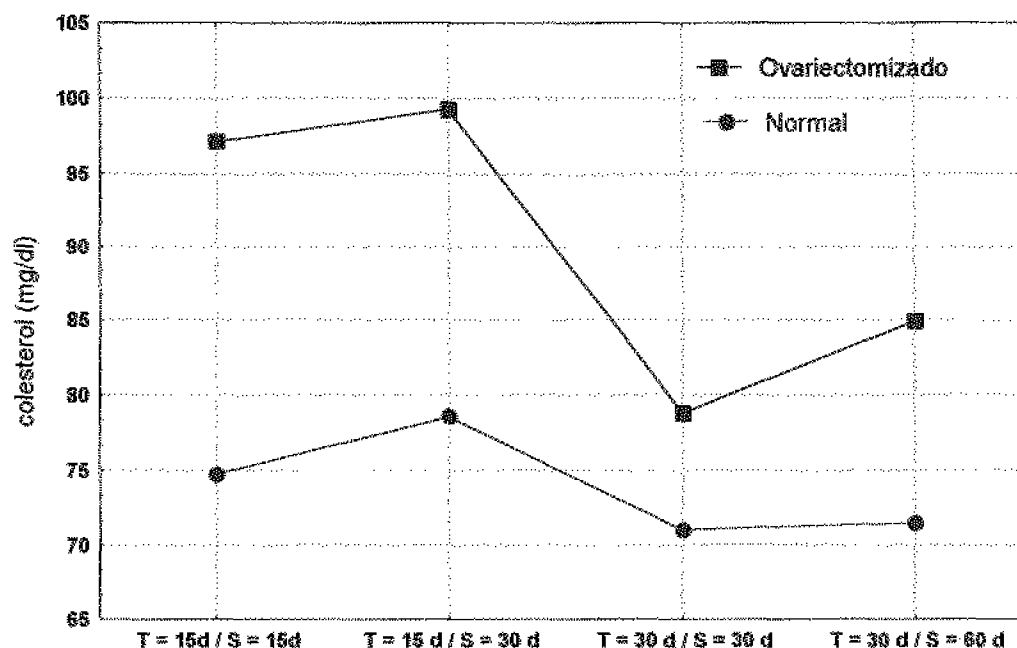


FIGURA 6- Gráficos das médias do nível de colesterol para todos os grupos tratados

A Figura 6 demonstra que o nível de colesterol sanguíneo dos grupos ovariectomizados foi maior do que os grupos normais em todos os tempos de tratamento e sacrifício. A análise estatística revelou que não há diferenças significantes entre esses oito grupos estudados.

Com os resultados descritos anteriormente, podemos afirmar com 95% de certeza que:

- a) os grupos ovariectomizados apresentaram nível de colesterol superior ao grupo tratado normal;
- b) a sinvastatina não teve efeito hipolipidêmico sobre os animais normais e ovariectomizados;
- c) não houve diferença no colesterol sanguíneo entre os tempos de tratamento e períodos de sacrifício.

5.2 Análise da densidade óptica

Os dados da densidade óptica dos defeitos ósseos, transformados em equivalentes de espessura de alumínio estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9- Densidade em espessura de alumínio dos defeitos ósseos de cada grupo estudado composto por cinco animais e suas respectivas médias

Grupos	Densidade óptica (mmAl)					Médias
1T	0,390	0,256	0,310	0,391	0,435	0,356
2T	0,320	0,475	0,596	0,281	0,524	0,439
3T	0,267	0,292	0,343	0,292	0,348	0,308
4T	0,396	0,475	0,423	0,467	0,440	0,440
5T	0,393	0,453	0,651	0,444	0,278	0,444
6T	0,603	0,356	0,498	0,339	0,435	0,446
7T	0,685	0,498	0,412	0,409	0,568	0,514
8T	0,630	0,631	0,562	0,443	0,566	0,566
1C	0,348	0,256	0,219	0,307	0,328	0,292
2C	0,342	0,286	0,336	0,319	0,343	0,325
3C	0,396	0,518	0,353	0,467	0,433	0,433
4C	0,312	0,326	0,479	0,175	0,233	0,305
5C	0,397	0,425	0,307	0,339	0,415	0,377
6C	0,426	0,334	0,443	0,401	0,401	0,401

A média da densidade óptica em milímetros de alumínio apresentou-se mais elevada no grupo tratado ovariectomizado, seguidas pelas médias dos grupos tratado normal, controle ovariectomizado e controle normal (Tabela 10). Constatou-se, também, que a densidade em equivalentes de alumínio dos defeitos ósseos foram maiores, respectivamente, nos grupos de sessenta, trinta e 15 dias de observação (Tabela 11).

Tabela 10- Estatística descritiva referente as densidades ópticas em espessura de alumínio das diferentes condições de tratamento

Grupos	média	mediana	mínimo	máximo	DP
Controle normal	0,34	0,33	0,21	0,51	0,07
Controle OV	0,35	0,33	0,17	0,47	0,07
Tratado normal	0,38	0,39	0,25	0,59	0,09
Tratado OV	0,74	0,44	0,27	0,65	0,11

OV: ovariectomizado

DP: desvio padrão

Tabela 11- Estatística descritiva das densidades ópticas em equivalentes de alumínio dos períodos de observação

Sacrifício	média	mediana	mínimo	máximo	DP
15 dias	0,34	0,32	0,17	0,65	0,10
30 dias	0,39	0,34	0,26	0,60	0,09
60 dias	0,46	0,44	0,33	0,63	0,08

DP: desvio padrão

De posse desses valores foi aplicado a análise estatística de variância (ANOVA), cujos resultados se encontram na Tabela 12.

Tabela 12- Análise de variância da densidade em equivalente de alumínio dos dados apresentados na Tabela 9

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Razão F	p
1	3	0,174	0,058	7,074	0,001*
2	2	0,109	0,054	6,615	0,003*
1 x 2	6	0,016	0,002	0,337	0,914
Resíduo	53	0,436	0,008		
Total	64	0,737	0,015		

1: indica as condições de tratamento: controle normal, controle ovariectomizado, tratado normal, tratado ovariectomizado

2: representa os períodos de 15, 30 e 60 dias de sacrifício

*diferença estatisticamente significativa

Através da análise de variância (Tabela 12), pôde-se observar diferenças estatisticamente significantes entre as condições de tratamento (variável 1) e entre os diferentes períodos de sacrifício (variável 2). Quando consideramos a interação entre as condições de tratamento (variável 1) e os períodos de sacrifício (variável 2) não existem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Para se estabelecer diferenças e igualdades entre os grupos das várias condições de tratamento e entre os grupos dos três períodos de observação, aplicou-se o teste de Tukey, representado nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 13- Teste de Tukey para as densidades ópticas em equivalentes de alumínio das condições de tratamento

	Controle normal	Controle OV	Tratado normal	Tratado OV
médias	0,34	0,35	0,38	0,74
Controle normal		0,990	0,648	0,001*
Controle OV			0,843	0,005*
Tratado normal				0,010*
Tratado OV				

OV: ovariectomizado

*diferença estatisticamente significativa

Tabela 14- Teste de Tukey para a densidade óptica em equivalente de alumínio dos vários períodos de observação

Sacrifício	15 dias	30 dias	60 dias
médias	0,34	0,39	0,46
15 dias		0,524	0,004*
30 dias			0,049*
60 dias			

*diferença estatisticamente significativa

Na Tabela 13 podemos observar que o grupo tratado ovariectomizado apresentou densidade óptica em equivalente de alumínio do defeito, estatisticamente significativa, maior do que os grupos tratado normal, controle ovariectomizado e controle normal. Na tabela 14 notamos que o grupo de sessenta dias apresentou reparação óssea, estatisticamente significativa, melhor do que os grupos de 15 e trinta dias.

Nas Figuras 7, 8 e 9 estão representados os resultados da densitometria óptica em equivalentes de alumínio dos defeitos ósseos das diferentes condições de tratamento, tempos de sacrifício e da interação entre eles.

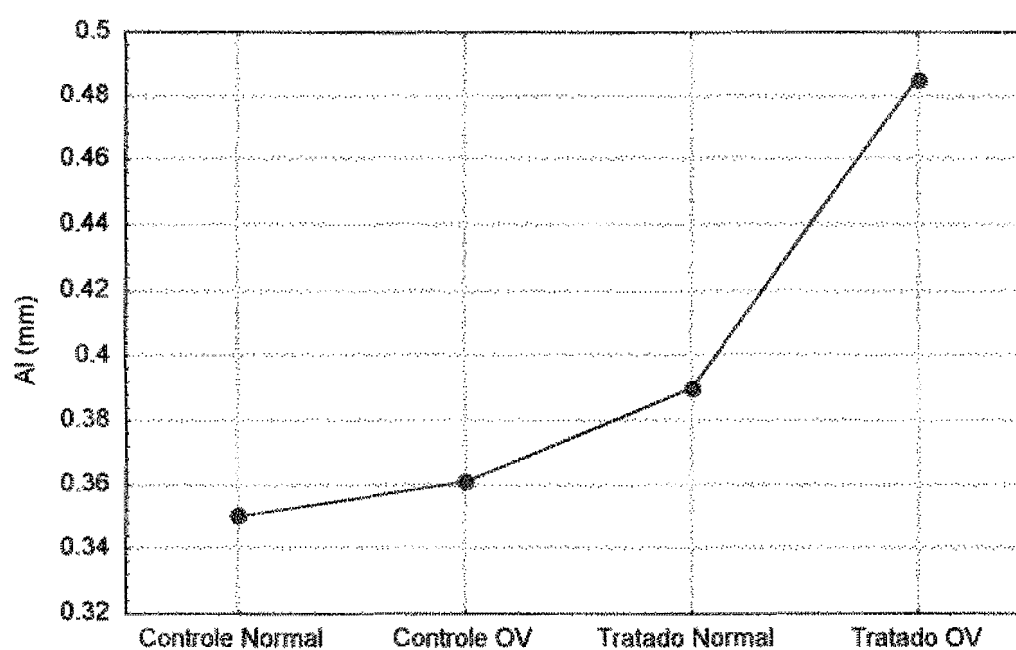


FIGURA 7- Gráfico das médias da densidade óptica em equivalente de alumínio referente as condições de tratamento

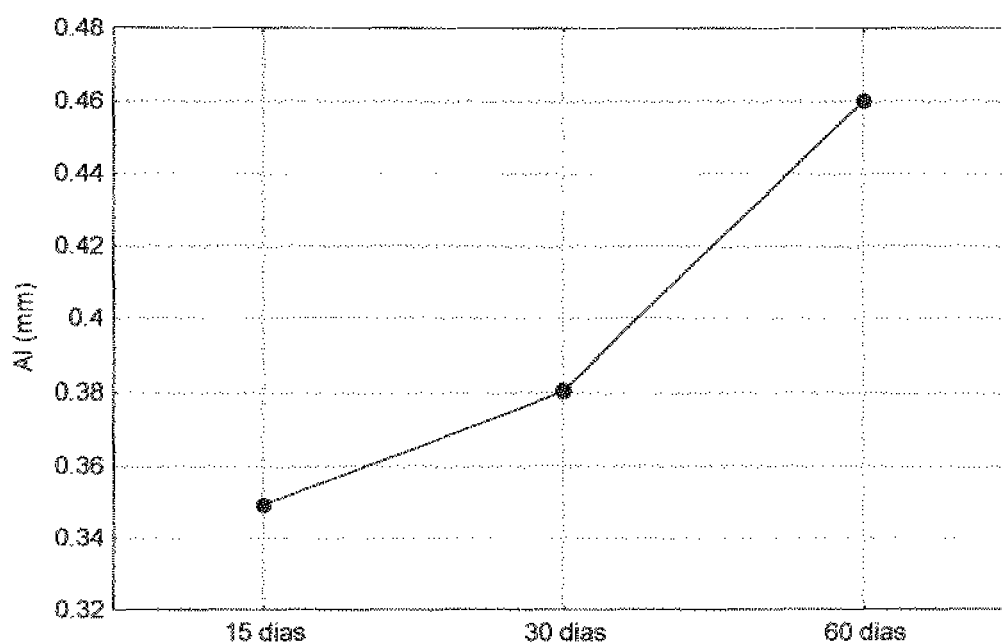


FIGURA 8- Gráfico das médias da densidade óptica em equivalente de alumínio referente aos períodos de sacrifício

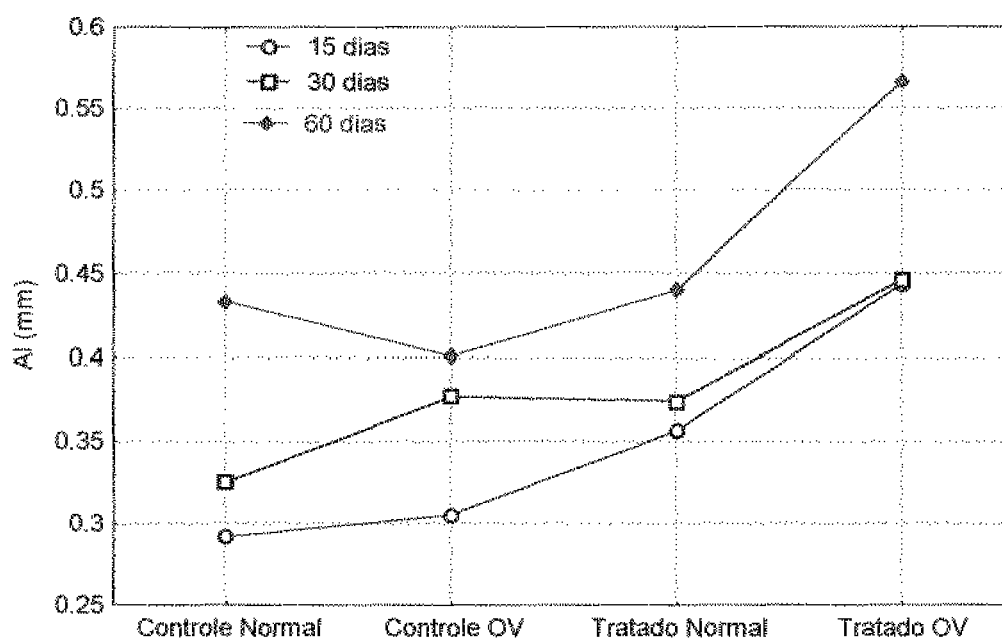


FIGURA 9- Gráfico das densidades ópticas em espessura de alumínio das condições de tratamento x tempos de sacrifício

A análise dos resultados onde foram comparados apenas os grupos tratados em relação aos tempos de tratamento mostra que a maior média foi encontrada no grupo tratado por trinta dias e sacrificado em sessenta dias (Tabela 15) e que as ratas ovariectomizadas apresentaram maior densidade óptica em equivalentes de alumínio do que as ratas normais (Tabela 16).

Tabela 15- Estatística descritiva referente à densitometria dos grupos tratados com diferentes tempos de tratamento e sacrifício

Grupos	média	mediana	mínimo	máximo	DP
T=15 e S=15	0,400	0,392	0,256	0,651	0,112
T=15 e S=30	0,442	0,455	0,281	0,603	0,115
T=30 e S=30	0,411	0,378	0,267	0,685	0,135
T=30 e S=60	0,503	0,471	0,396	0,631	0,092

T: tempo de tratamento

S: tempo de sacrifício

DP: desvio padrão

Tabela 16- Estatística descritiva da densitometria dos grupos tratados normal e ovariectomizado

Grupos	média	mediana	mínimo	máximo	DP
Normal	0,383	0,390	0,256	0,596	0,095
OV	0,488	0,453	0,278	0,685	0,116

OV: ovariectomizado

DP: desvio padrão

Os resultados obtidos na densitometria óptica dos grupos tratados foram submetidos à análise de variância, cujos valores estão indicados na Tabela 17.

Tabela 17- Análise de variância dos dados da densitometria em equivalente de alumínio dos grupos tratados

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Razão F	p
1	3	0,055	0,018	1,859	0,158
2	1	0,107	0,107	10,720	0,003*
1 x 2	3	0,051	0,107	1,708	0,186
Resíduo	30	0,300	0,009		
Total	37	0,513	0,013		

1: indica os diferentes tempos de tratamento e sacrifício

2: representa os grupos tratados normal e ovariectomizado

*diferença estatisticamente significativa

Analisando as Tabelas 16 e 17 podemos afirmar que o grupo ovariectomizado apresentou densidade óptica em equivalente de alumínio significativamente maior do que o grupo normal.

Os resultados obtidos na densitometria dos grupos tratados estão ilustrados na Figura 10.

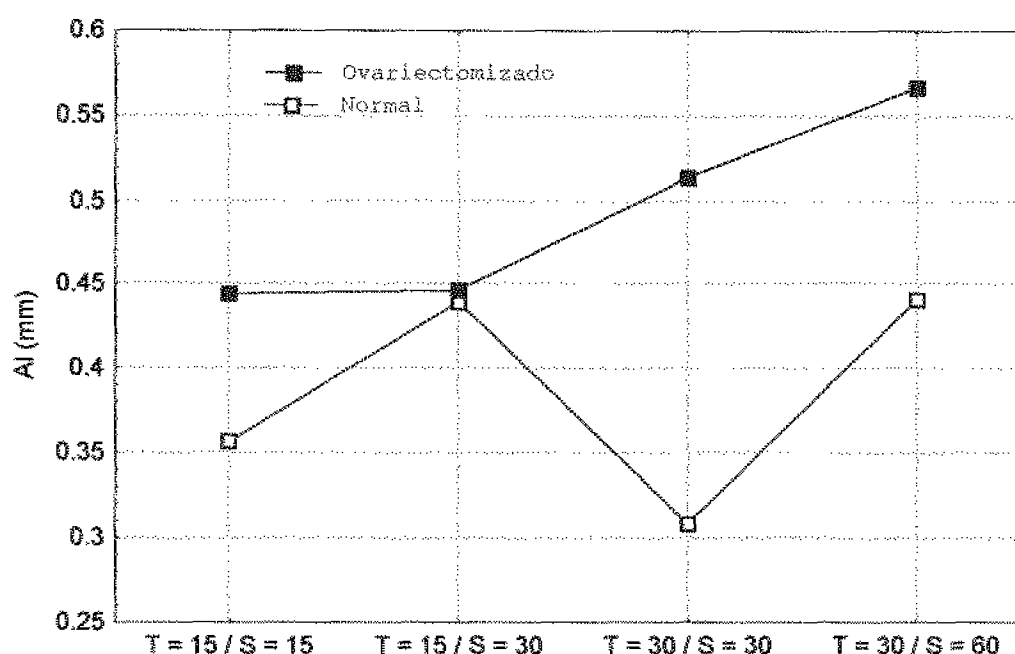


FIGURA 10- Gráficos das médias da densitometria de todos os grupos tratados

Diante das análises observadas anteriormente, podemos afirmar com 95% de certeza que:

- o grupo tratado ovariectomizado apresentou média superior da densitometria em relação aos grupos controle normal, controle ovariectomizado e tratado normal;
- os grupos de sessenta dias apresentaram médias da densidade óptica em equivalente de alumínio mais elevadas do que os grupos de 15 e trinta dias;
- entre os grupos tratados, os ovariectomizados demonstraram densidade óptica em espessura de alumínio maior do que o grupo normal;
- não houve diferença densitométrica entre os grupos estudados quanto ao tempo de tratamento.

5.3 Análise histológica

5.3.1 Período de sacrifício de 15 dias

O defeito ósseo do grupo controle normal (1C) encontrava-se preenchido por tecido de granulação bem celularizado e vascularizado. Nas margens da lesão notava-se a presença de tecido osteogênico e algumas trabéculas ósseas imaturas contornadas por osteoblastos, contendo grande número de osteócitos volumosos inclusos e alguns osteoclastos. Essas trabéculas delimitavam espaços medulares amplos, preenchidos por tecido conjuntivo frouxo (Figuras 11, 12, 13 e 14). Na superfície do osso mandibular, adjacente a lesão, observava-se tecido ósseo neoformado subperiosteal que exibia continuidade com as trabéculas formadas dentro do defeito. Em alguns cortes, encontrava-se também a presença de restos de coágulo e algumas esquirolas ósseas parcialmente reabsorvidas.

A loja cirúrgica do grupo tratado normal (1T) apresentava-se preenchida por tecido de granulação. Nas bordas do defeito observava-se trabéculas ósseas imaturas delicadas, irregulares e as vezes circundadas por tecido osteogênico (Figura 15). Essas trabéculas continham vários espaços medulares, osteócitos volumosos inclusos e alguns osteoclastos na superfície. Notava-se, ainda, tecido ósseo neoformado a partir do periósteo e esquirolas ósseas, ora contornadas por osteoclastos, ora por tecido osteogênico.

O defeito ósseo do grupo controle ovariectomizado (4C) exibiu grande quantidade de tecido de granulação na região central, tecido osteogênico e trabéculas ósseas neoformadas nas extremidades da lesão (Figura 16). Essas trabéculas se apresentavam imaturas, delicadas, irregulares, delimitando grandes espaços medulares, contendo osteócitos numerosos e osteoclastos. Em alguns cortes, notava-se também a presença de esquirolas ósseas e restos de coágulo.

No grupo de animais tratados e ovariectomizados (5T) observava-se maior quantidade de tecido osteogênico e osso neoformado em relação aos outros grupos, também, pertencentes ao período de 15 dias. Em alguns cortes notava-se que as trabéculas ósseas imaturas originárias da extremidade do defeito estendiam-se em direção a região central do mesmo. Essas trabéculas eram circundadas por osteoblastos volumosos e alguns osteoclastos, apresentando grandes espaços inter-trabeculares preenchidos ora por tecido conjuntivo frouxo, ora por tecido medular hematopoiético. O restante da loja cirúrgica apresentava tecido de granulação e algumas esquirolas ósseas.

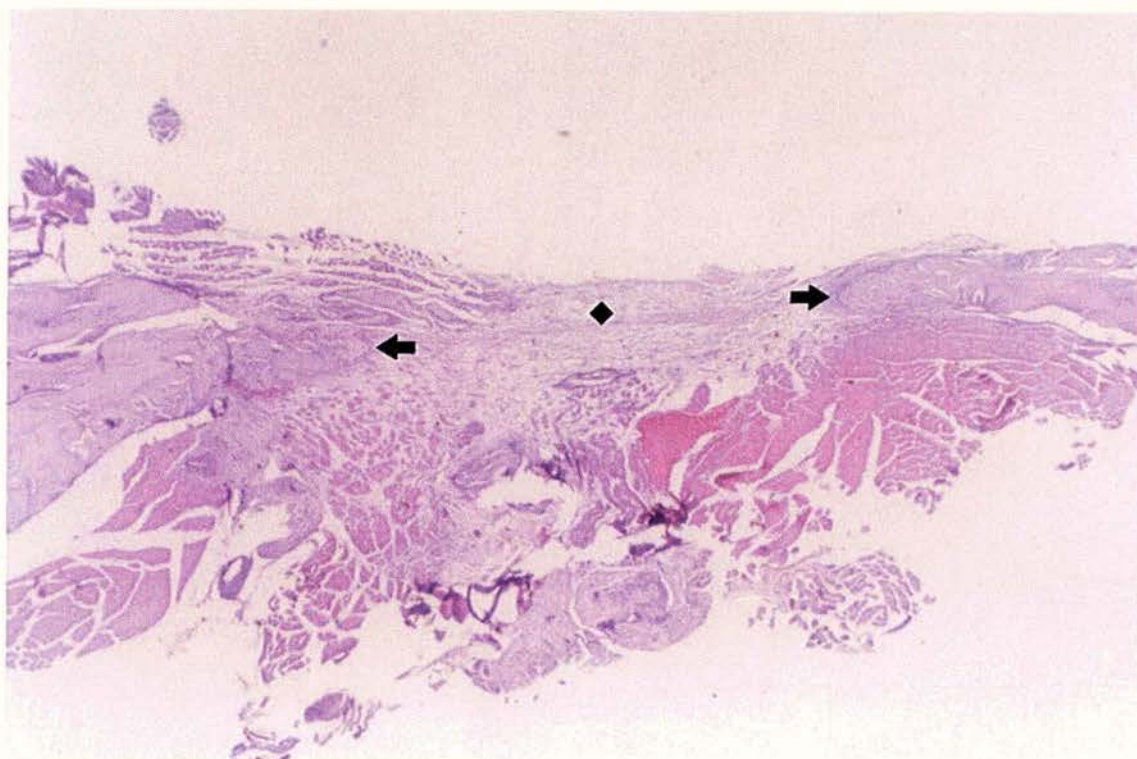


FIGURA 11 - Período de 15 dias, grupo controle normal (1C): defeito ósseo preenchido por tecido de granulação (◆) e neoformação óssea junto às margens (➡). Aumento original 25X

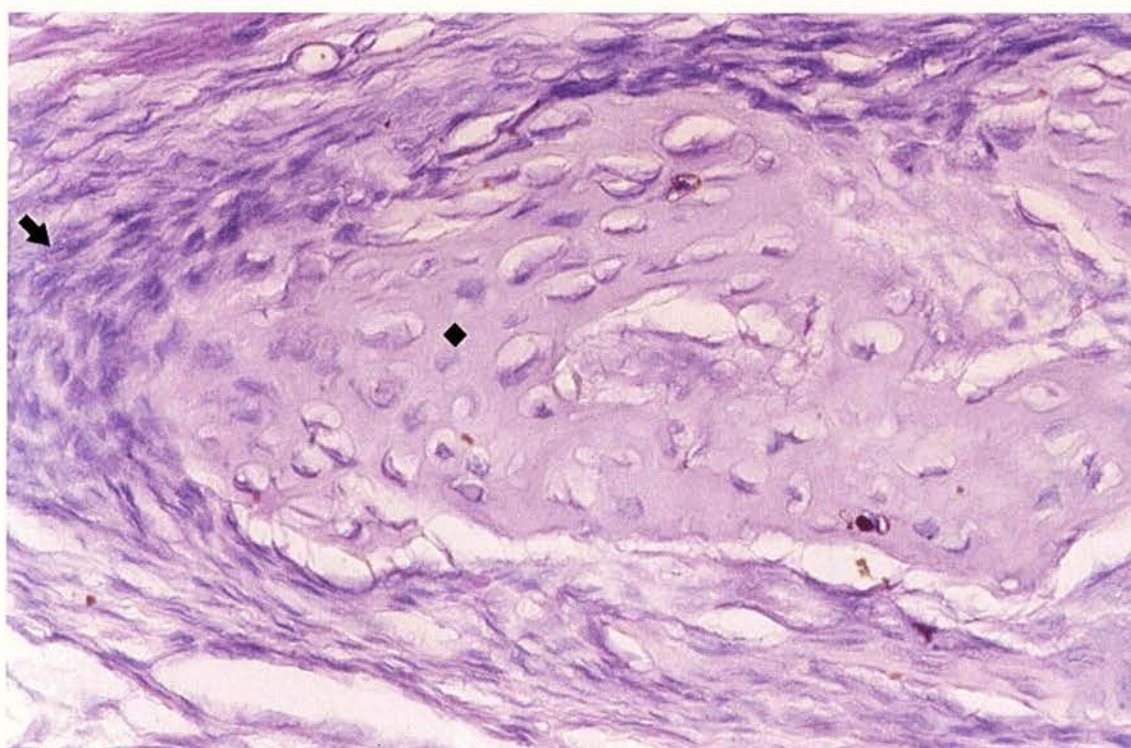


FIGURA 12 - Período de 15 dias, grupo controle normal (1C): detalhe da figura anterior demonstrando tecido ósseo neoformado (◆) circundado por tecido osteogênico (➡). Aumento original 400X

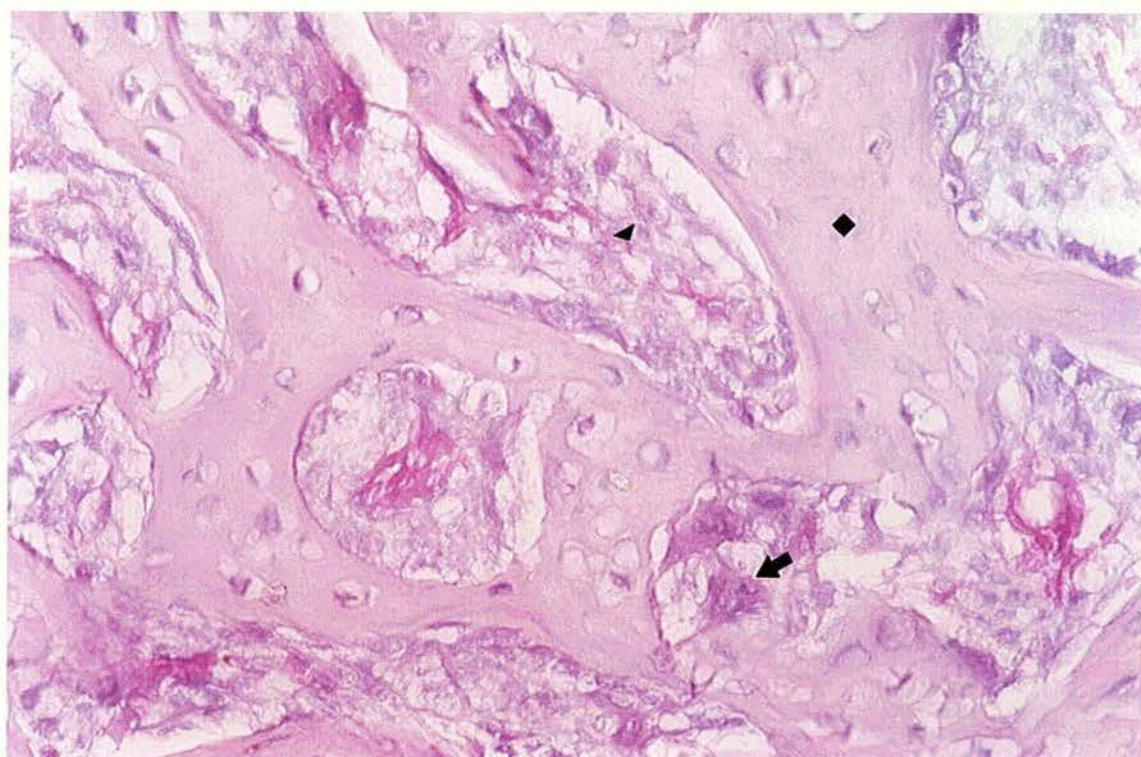


FIGURA 13 - Período de 15 dias, grupo controle normal (1C): trabéculas ósseas imaturas (◆) contendo alguns osteoclastos na superfície (▶) e delimitando grandes espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo (▴). Aumento original 400X

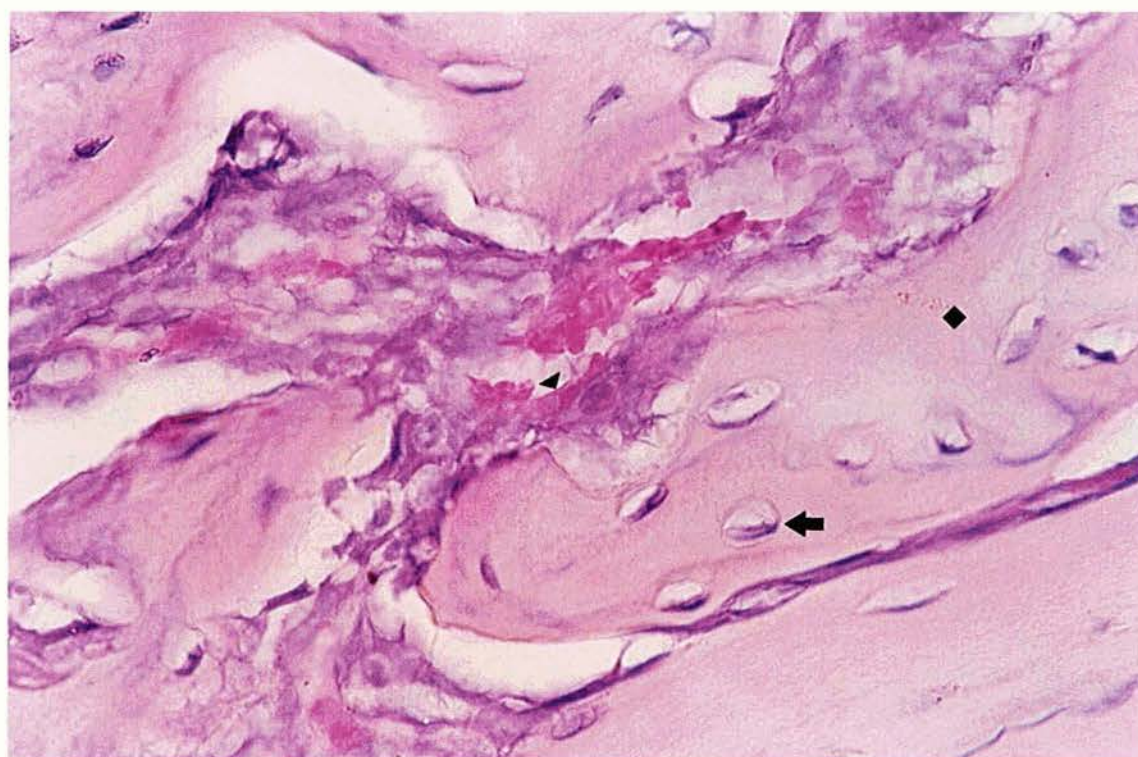


FIGURA 14 - Período de 15 dias, grupo controle normal (1C): trabéculas ósseas imaturas (◆) contendo osteócitos volumosos (▶) e osteoclasto em lacuna de Howship (▴). Aumento original 630X

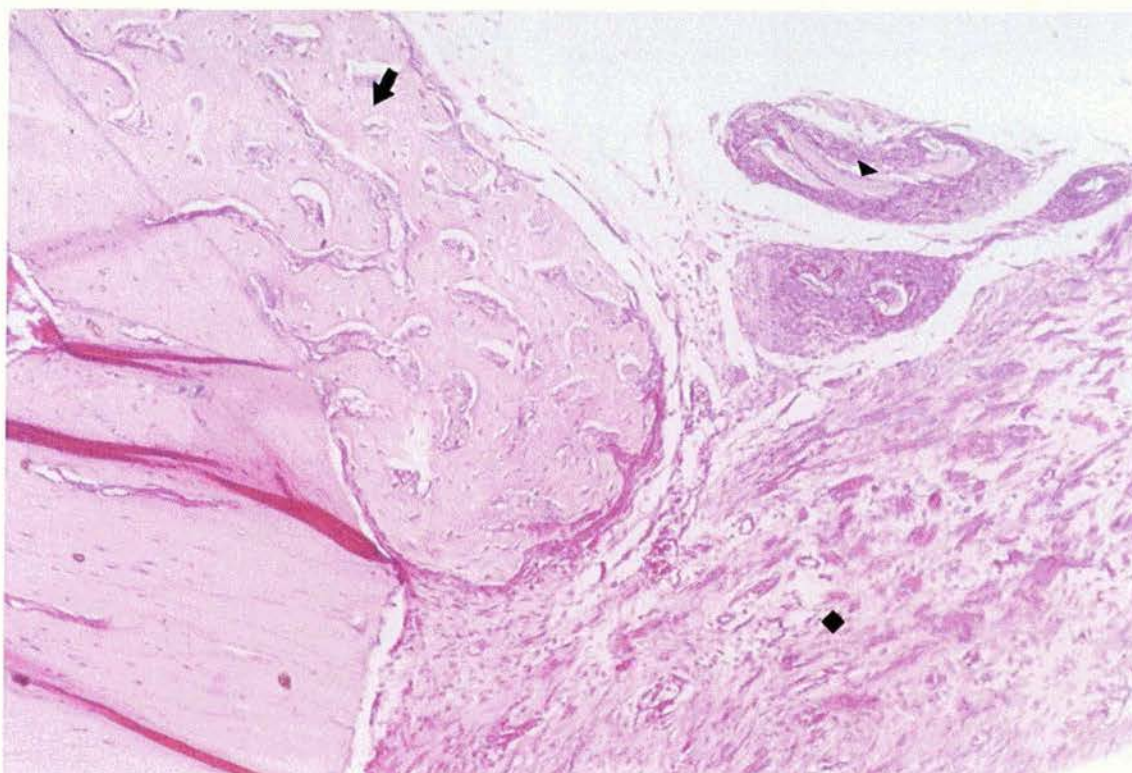


FIGURA 15 -Período de 15 dias, grupo tratado normal (1T): defeito ósseo preenchido por tecido de granulação (◆), neoformação óssea subperiosteal (➤) e esquirolas ósseas (➤). Aumento original 100X

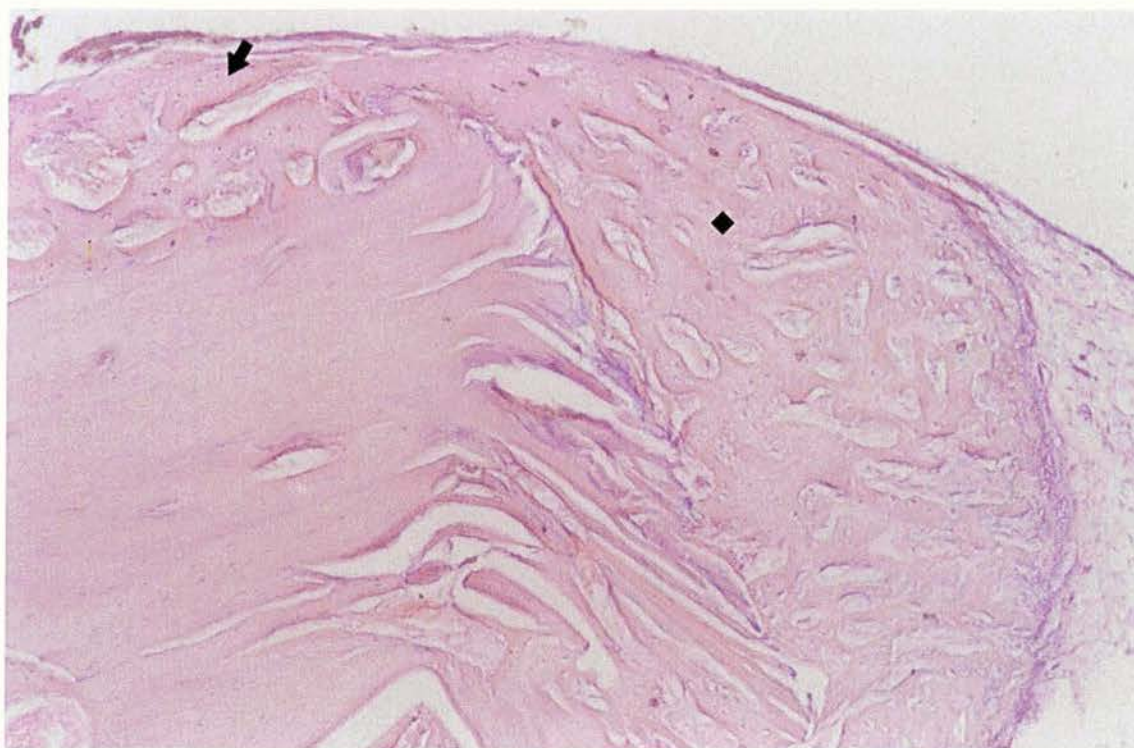


FIGURA 16 -Período de 15 dias, grupo controle ovariectomizado (4C): trabéculas ósseas imaturas (◆) na borda do defeito e neoformação óssea subperiosteal (➤). Aumento original 100X

5.3.2 Período de sacrifício de trinta dias

As extremidades do defeito ósseo do grupo controle normal (2C) apresentavam trabéculas ósseas neoformadas mais maduras (Figura 17), que se estendiam em direção ao centro da lesão. Nessas trabéculas notava-se a presença de numerosos osteócitos menores, que por vezes se dispunham em padrão lamelar, e espaços medulares de tamanhos variados contendo tecido conjuntivo frouxo ou tecido medular hematopoiético. A área central do defeito estava preenchida por tecido de granulação denso. Observava-se também algumas esquirolas ósseas circundadas por tecido conjuntivo osteogênico.

A loja cirúrgica do grupo tratado por 15 dias normal (2T) encontrava-se preenchida por tecido de granulação na área central e por trabéculas ósseas neoformadas nas margens da lesão. Essas trabéculas apresentavam-se mais maduras, contendo osteócitos menores e dispostos irregularmente, delimitando grandes espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo frouxo ou tecido hematopoiético.

O defeito ósseo do grupo tratado por trinta dias normal (3T) apresentava-se preenchido por tecido de granulação e tecido ósseo neoformado que se estendia dos limites da lesão para a porção central. As trabéculas ósseas encontravam-se mais maduras (Figura 18) com várias linhas de aposição. Em alguns cortes essas trabéculas

eram mais organizadas e formavam pequenos espaços medulares, em outros se dispunham de forma irregular e delimitavam grandes espaços inter-trabeculares.

No grupo de animais controle ovariectomizados (5C) notava-se menos tecido ósseo neoformado em relação aos grupos de trinta dias, não ovariectomizados, estudados anteriormente. Nas bordas da lesão encontrava-se trabéculas ósseas imaturas (Figura 19), volumosas e desorganizadas, contendo osteócitos grandes e espaços medulares largos preenchidos por tecido conjuntivo frouxo. No centro da lesão observava-se tecido de granulação denso.

No grupo de ratas tratadas por 15 dias e ovariectomizadas (6T) encontrava-se maior quantidade de trabéculas ósseas neoformadas do que o grupo de ratas controle ovariectomizadas. Em alguns cortes, as trabéculas originadas do perióstio das margens do defeito se estendiam até a porção central (Figura 20). Essas trabéculas apresentavam-se mais maduras, com linhas de aposição e grandes espaços medulares, na maioria das vezes, preenchidos por tecido hematopoiético. Notava-se, também, a presença de tecido de granulação no centro do defeito.

No grupo de ratas tratadas por trinta dias e ovariectomizadas (7T), as trabéculas ósseas neoformadas, também, eram mais numerosas e apresentavam maior extensão em direção ao centro do defeito (Figura 21) em relação ao grupo de ratas controle

ovariectomizadas. As trabéculas ósseas apresentavam-se maduras, contendo osteócitos pequenos e muitos espaços medulares de tamanhos variados preenchidos por tecido conjuntivo com várias células osteogênicas (Figura 22). No centro do defeito ósseo encontrava-se tecido de granulação.

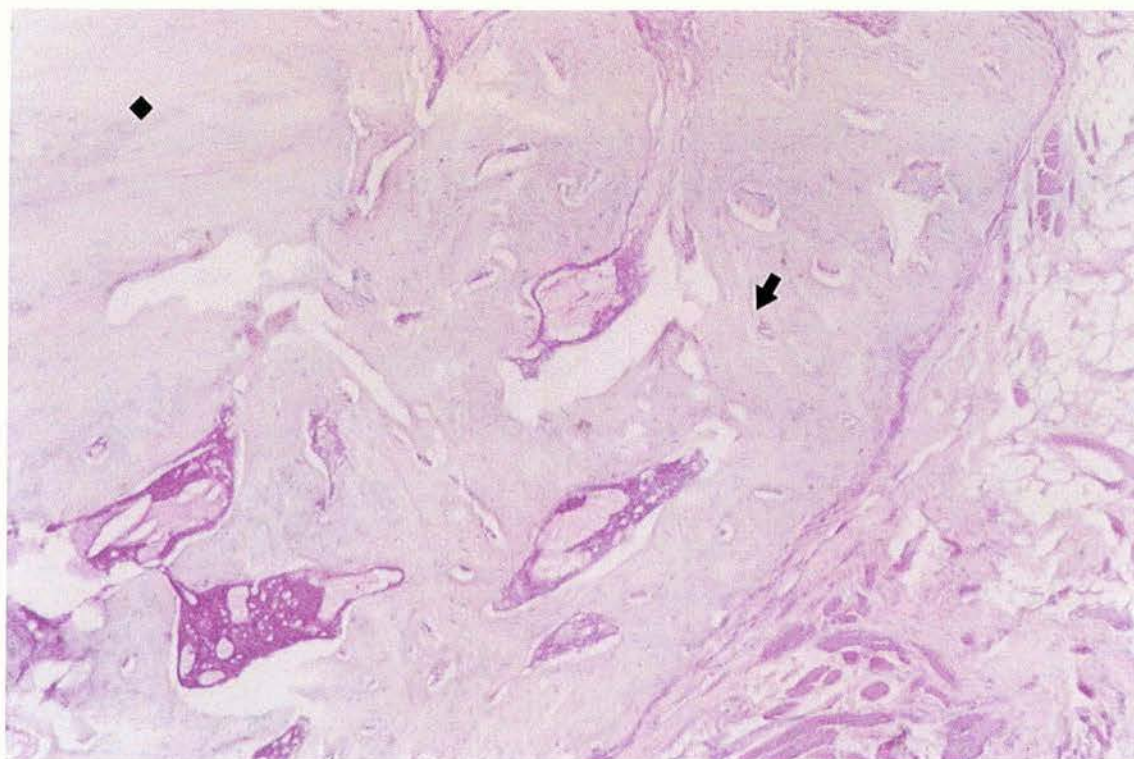


FIGURA 17 -Período de 30 dias, grupo controle normal (2C): uma das margens do defeito (◆) com tecido ósseo neoformado (➔). Aumento original 100X

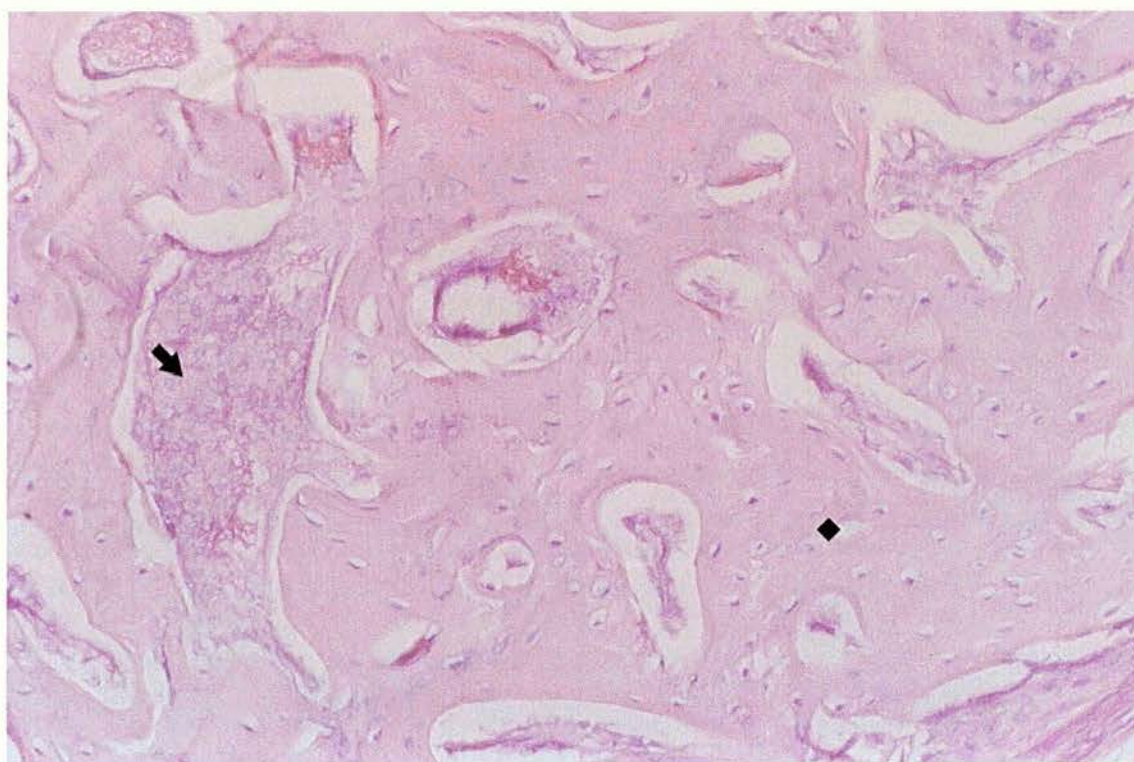


FIGURA 18 -Período de 30 dias, grupo tratado por trinta dias normal (3T): trabéculas ósseas espessas (◆), contornando vários espaços medulares preenchidos por tecido conjuntivo (➔). Aumento original 200X

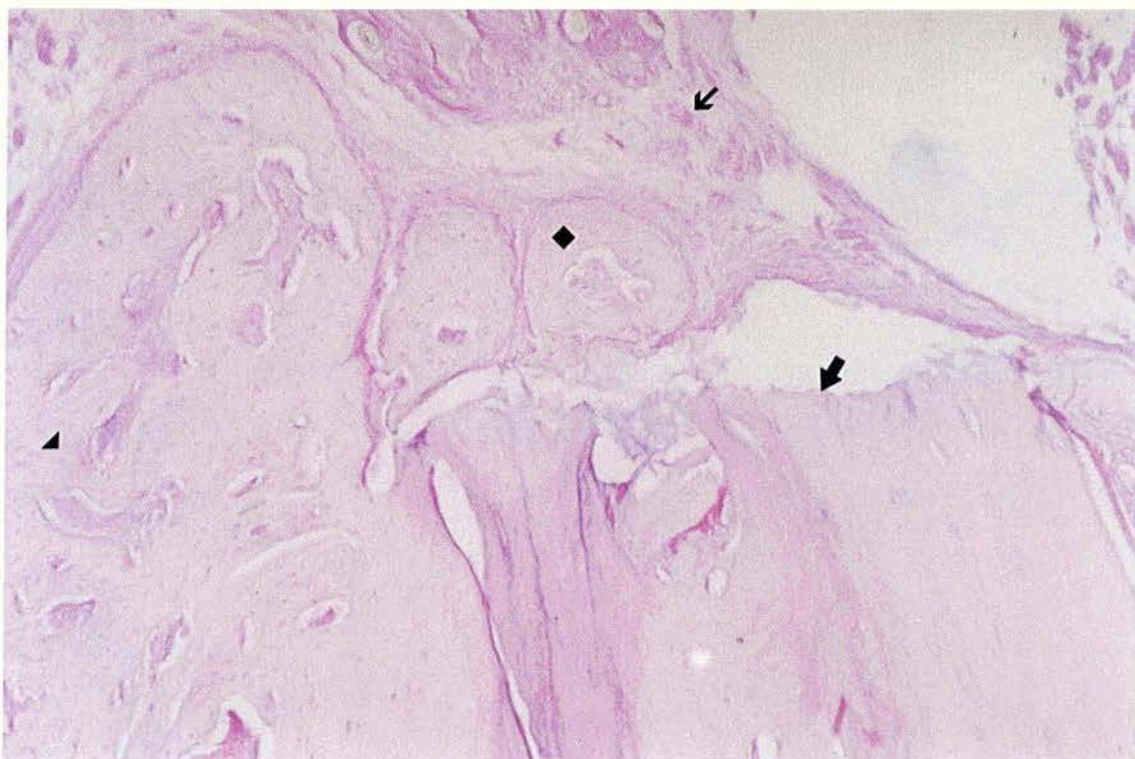


FIGURA 19 - Período de 30 dias, controle ovariectomizado (5C): tecido ósseo neoformado (◆) em uma das margens do defeito (➤), neoformação óssea subperiosteal (➤) e tecido de granulação (→). Aumento original 100X

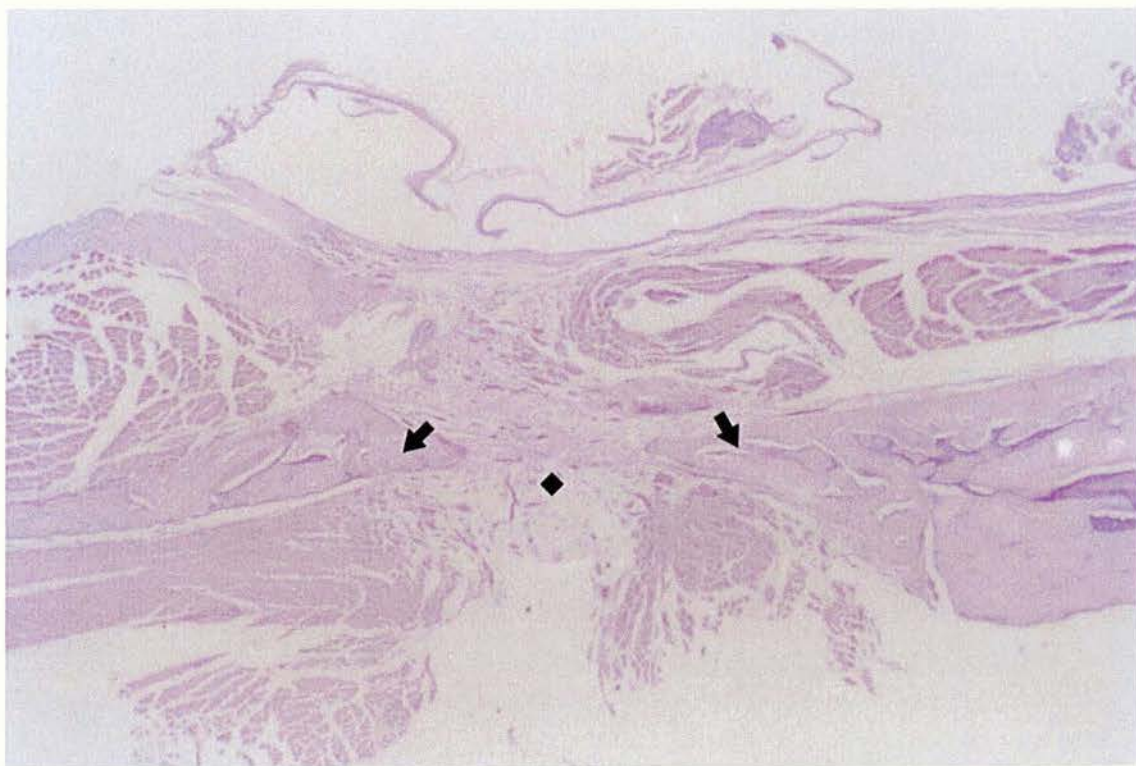


FIGURA 20 - Período de 30 dias, grupo tratado por 15 dias ovariectomizado (6T): defeito apresentando tecido de granulação na região central (◆) e trabéculas ósseas neoformadas nas margens (➤). Aumento original 25X

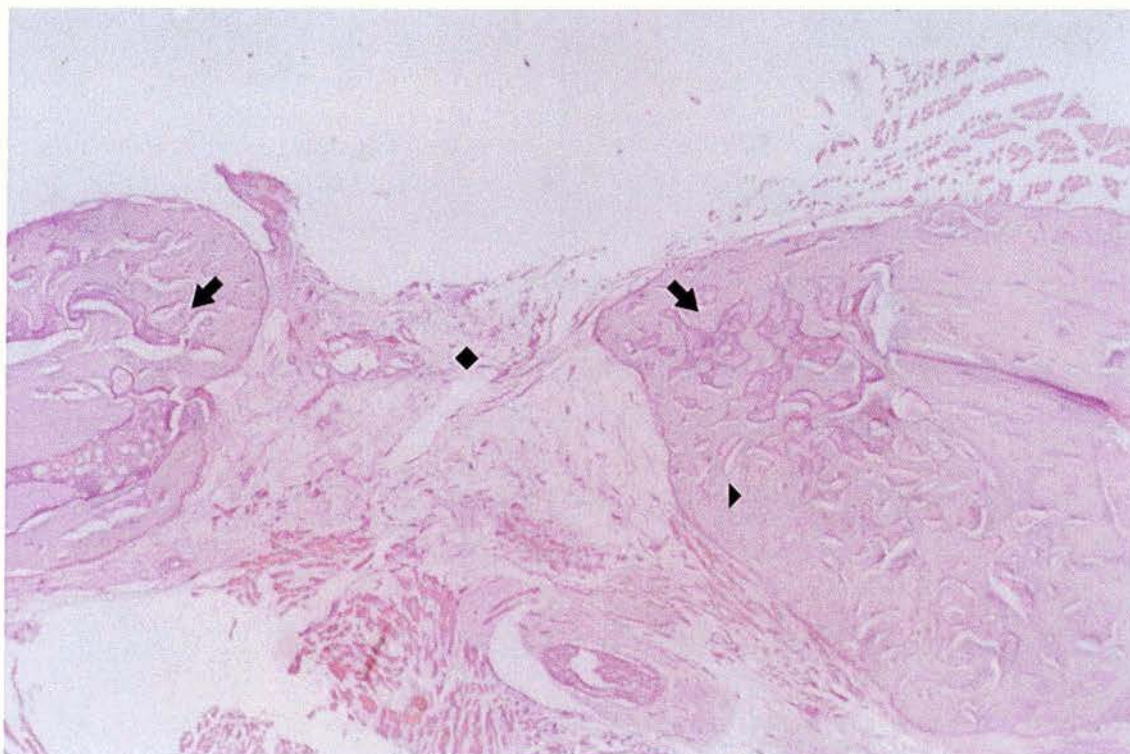


FIGURA 21 - Período de 30 dias, grupo tratado por trinta dias ovariectomizado (7T): lesão apresentando tecido de granulação na região central (◆) e trabéculas ósseas nas margens (➤), provenientes de neoformação subperiosteal (➡). Aumento original 25X

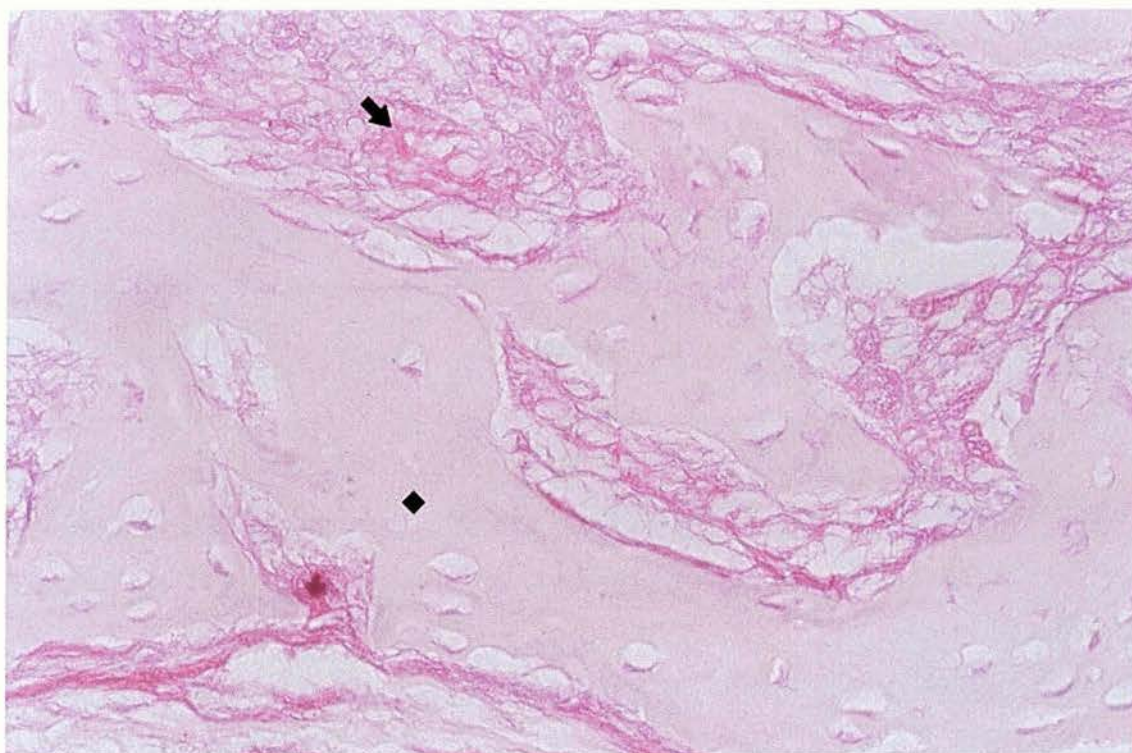


FIGURA 22 - Período de 30 dias, grupo tratado por trinta dias ovariectomizado (7T): trabéculas ósseas neoformadas (◆) delimitando espaços medulares com várias células osteogênicas (➡). Aumento original 400X

5.3.3 Período de sacrifício de sessenta dias

A loja cirúrgica do grupo controle normal (3C) estava preenchida por bastante tecido ósseo neoformado, exceto na área central, onde ainda permanecia o tecido de granulação (Figura 23). As trabéculas ósseas apresentavam-se maduras (Figura 24) com osteócitos pequenos dispostos de forma lamelar. Observava-se ainda linhas de aposição (Figura 25) e pequenos espaços medulares com tecido hematopoiético. Na extremidade posterior do defeito não era possível determinar o limite entre osso antigo e neoformado.

O defeito ósseo do grupo tratado normal (4T) encontrava-se preenchido por menor quantidade de tecido ósseo neoformado em relação ao grupo anterior. As trabéculas ósseas apresentavam-se maduras, com numerosos osteócitos, linhas de aposição e pequenos espaços medulares (Figura 26). Na região posterior, essas trabéculas se misturavam com o tecido ósseo antigo, tornando os limites do defeito imprecisos. Na área central encontrava-se tecido de granulação e, em alguns cortes, invasão de fibras musculares.

A quantidade de trabéculas ósseas neoformadas no grupo controle ovariectomizado (6C) apresentava-se inferior ao grupo controle normal. Essas trabéculas encontravam-se maduras (Figura 27), sendo que em alguns cortes dispunham-se de forma regular, formando pequenos espaços medulares e em outros de modo

desorganizado, delimitando grandes áreas medulares. O centro da lesão estava preenchido por tecido de granulação. Os limites posteriores do defeito apresentavam-se imprecisos devido a remodelação das trabéculas neoformadas.

O grupo de animais tratados e ovariectomizados (8T) apresentava maior quantidade de trabéculas ósseas neoformadas do que o grupo controle e ovariectomizado. As trabéculas ósseas eram maduras e se estendiam, intensamente, para a porção central do defeito (Figura 28). Observava-se grandes espaços medulares contendo tecido hematopoiético entre as trabéculas e no centro da lesão notava-se a presença de tecido de granulação. Alguns cortes continham invasão de fibras musculares.



FIGURA 23 - Período de 60 dias, controle normal (3C): tecido ósseo neoformado (◆) que se estende da margem do defeito (➡) em direção a porção central do mesmo. Aumento original 25X

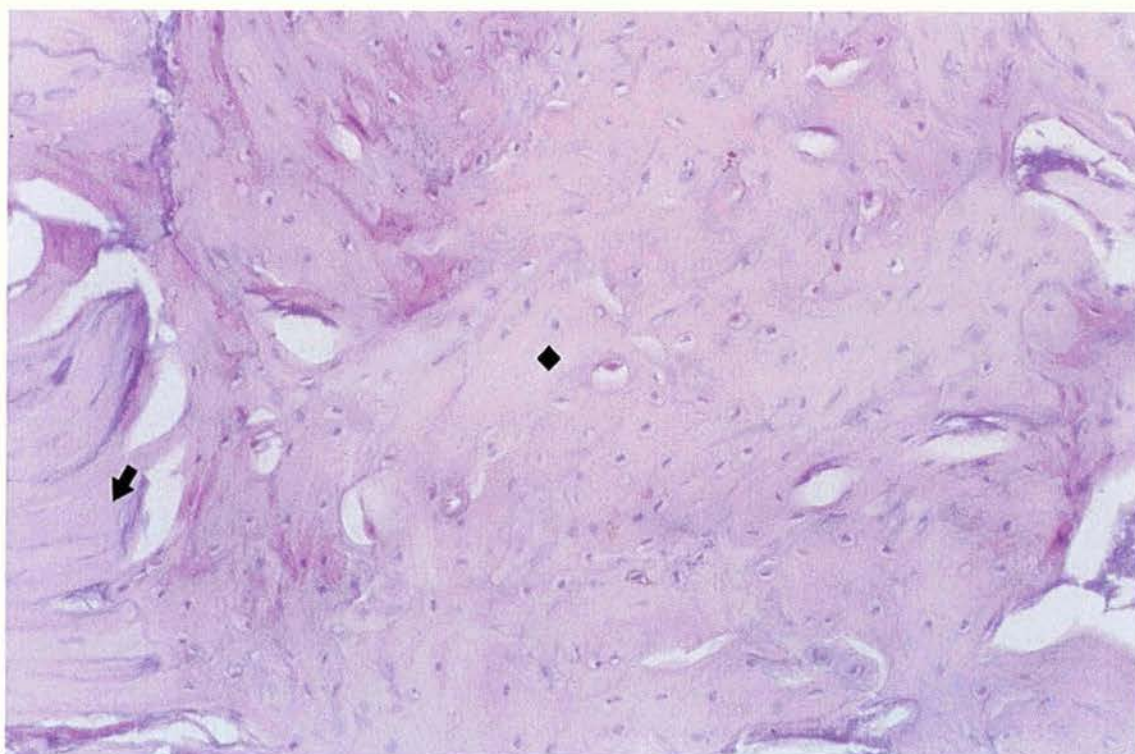


FIGURA 24 - Período de 60 dias, grupo controle normal (3C): tecido ósseo neoformado maduro (◆) próximo à margem do defeito (➡). Aumento original 200X



FIGURA 25 - Período de 60 dias, controle normal (3C): tecido ósseo neoformado (◆) apresentando remodelação com linhas de aposição (➡). Aumento original 400X

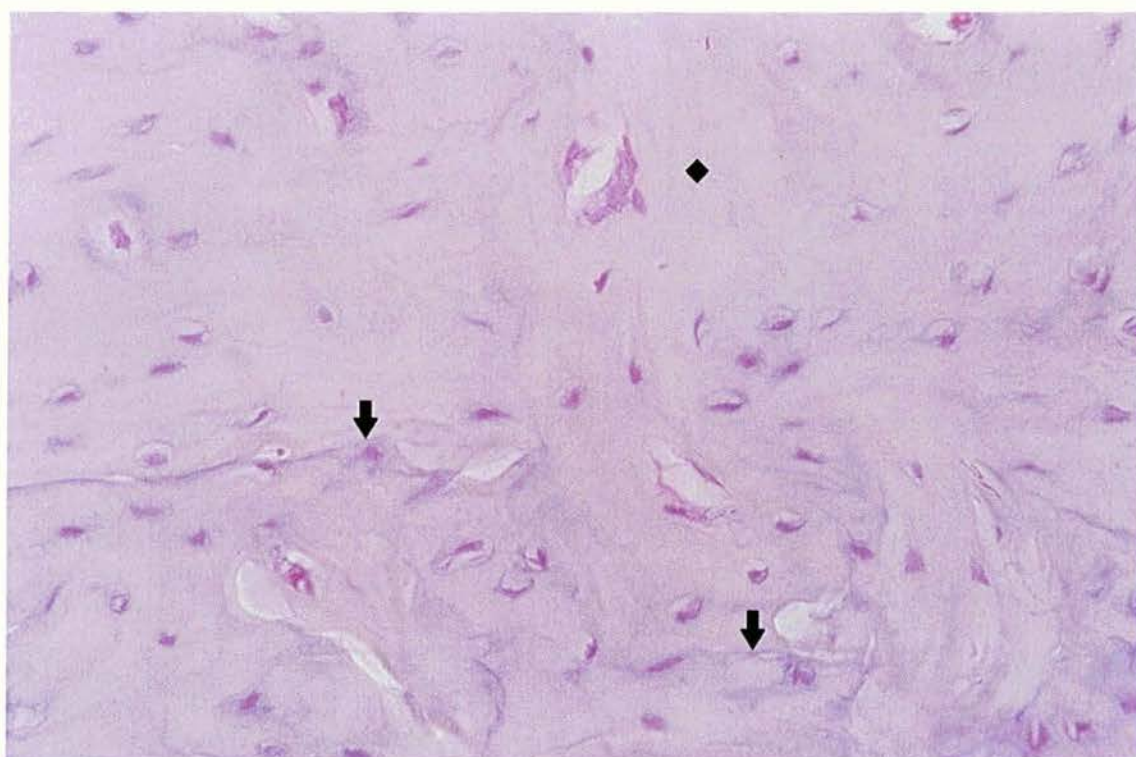


FIGURA 26 - Período de 60 dias, grupo tratado normal (4T): tecido ósseo neoformado maduro (◆) com várias linhas de aposição (➡). Aumento original 400X

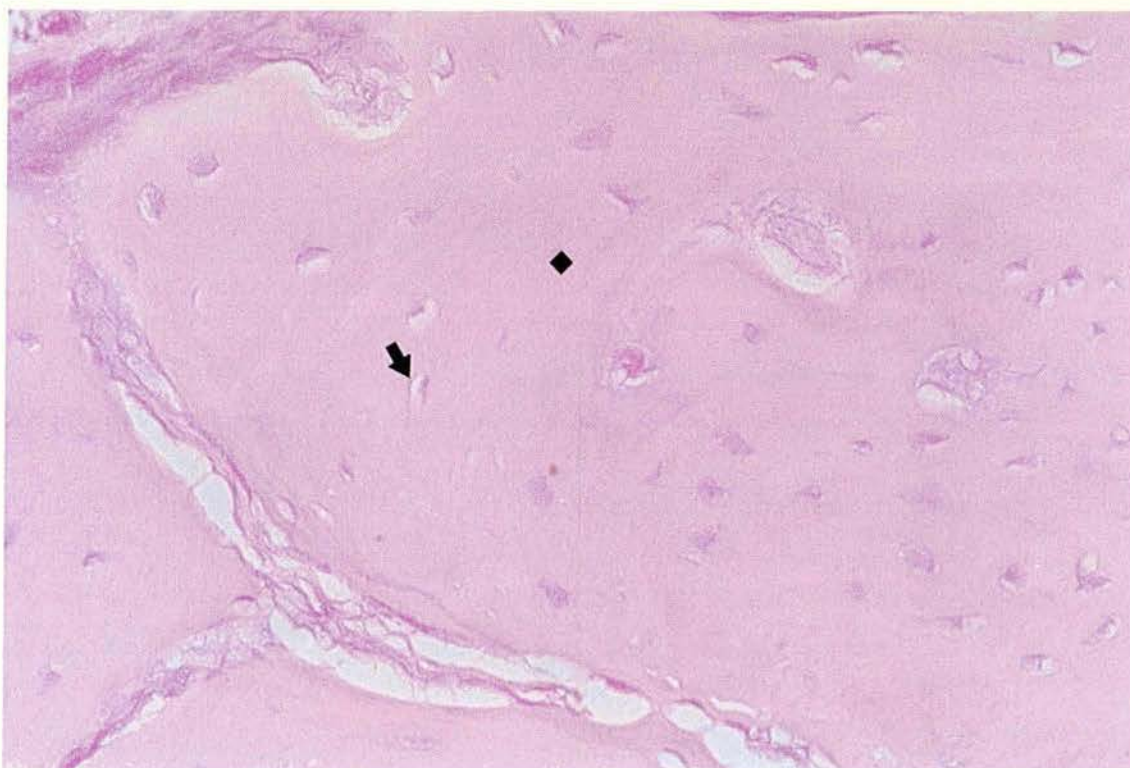


FIGURA 27 - Período de 60 dias, controle ovariectomizado (6C): tecido ósseo neoformado maduro (◆) contendo osteócitos pequenos (➤). Aumento original 400X

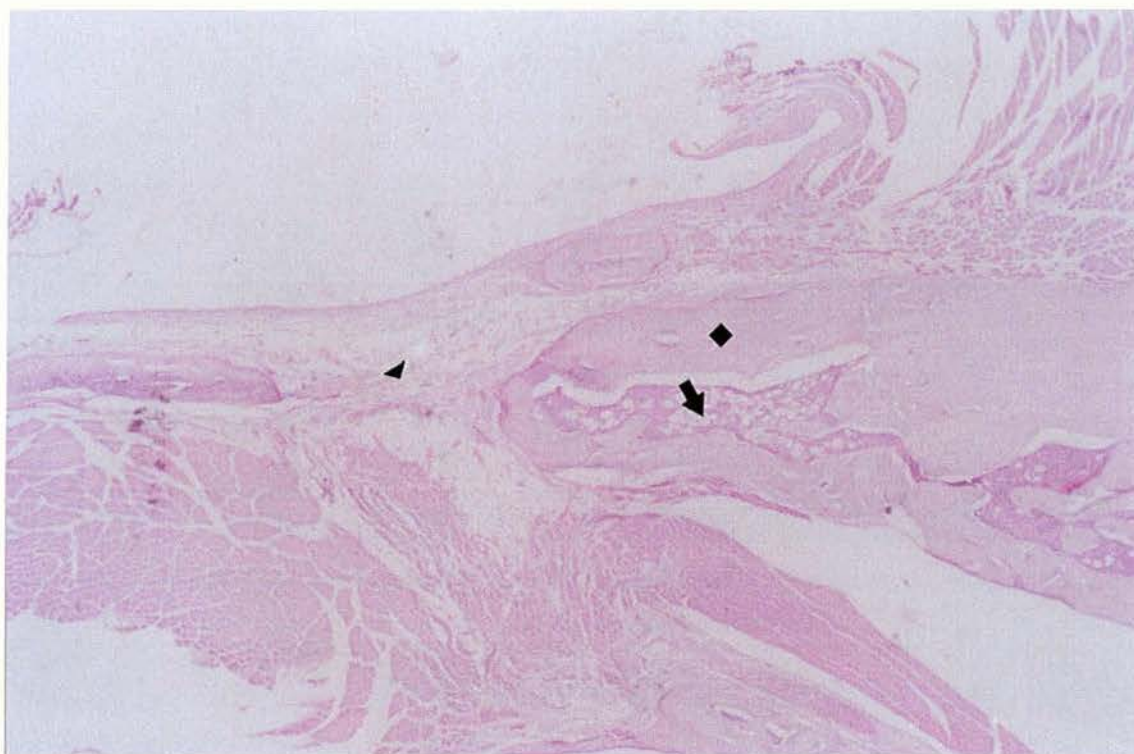


FIGURA 28 - Período de 60 dias, grupo tratado ovariectomizado (8T): defeito apresentando bastante osso neoformado (◆) com tecido medular (➤) e tecido de granulação na região central (➤). Aumento original 25X

5.4 Análise histomorfométrica

As densidades de volume das variações histológicas, quantificadas durante o processo de reparação óssea estão demonstradas na Tabela 18.

Tabela 18- Resultados da análise histomorfométrica por animal de todos os grupos estudados e suas respectivas médias

Grupos	Densidade de volume					Médias
1T	0,03	0,21	0,00	0,13	0,15	0,08
2T	0,40	0,50	0,45	0,52	0,47	0,47
3T	0,31	0,60	0,44	0,36	0,08	0,36
4T	0,31	0,79	0,68	0,59	0,59	0,59
5T	0,37	0,02	0,13	0,05	0,15	0,14
6T	0,60	0,34	0,44	0,50	0,63	0,50
7T	0,22	0,33	0,30	0,47	0,63	0,39
8T	0,65	0,88	0,75	0,53	0,70	0,70
1C	0,12	0,00	0,12	0,00	0,13	0,07
2C	0,28	0,70	0,21	0,35	0,44	0,40
3C	0,84	0,85	0,86	0,85	0,85	0,85
4C	0,07	0,05	0,03	0,15	0,07	0,07
5C	0,32	0,07	0,12	0,53	0,19	0,25
6C	0,45	0,31	0,29	0,61	0,41	0,42

A estatística descritiva desses dados encontram-se nas Tabelas 19 e 20.

Tabela 19- Estatística descritiva referente à histomorfometria das diferentes condições de tratamento

Grupos	média	mediana	mínimo	máximo	DP
Controle normal	0,376	0,280	0,000	0,860	0,328
Controle OV	0,232	0,170	0,030	0,610	0,190
Tratado normal	0,344	0,360	0,000	0,790	0,236
Tratado OV	0,420	0,440	0,020	0,880	0,240

OV: ovariectomizado

DP: desvio padrão

Tabela 20- Estatística descritiva da histomorfometria dos vários períodos de observação

Sacrifício	média	mediana	mínimo	máximo	DP
15 dias	0,094	0,070	0,000	0,370	0,088
30 dias	0,390	0,400	0,070	0,700	0,168
60 dias	0,628	0,665	0,290	0,880	0,217

DP: desvio padrão

Diante dos resultados descritos na Tabela 18 foi realizada a análise de variância (ANOVA), cujos resultados se encontram na Tabela 21.

Tabela 21- Análise de variância dos dados da histomorfometria apresentados na Tabela 18

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Razão F	p
1	3	0,338	0,113	5,511	0,002*
2	2	2,476	1,238	60,532	0,001*
1 x 2	6	0,216	0,035	1,757	0,127
Resíduo	51	1,043	0,020		
Total	62	3,998	0,064		

1: indica as condições de tratamento: controle normal, controle ovariectomizado, tratado normal, tratado ovariectomizado

2: representa os períodos de 15, 30 e 60 dias de sacrifício

*diferença estatisticamente significativa

Os grupos referentes as condições de tratamento e aos períodos de sacrifício foram analisados pelo teste de Tukey, demonstrados, respectivamente nas Tabelas 22 e 23.

Tabela 22- Teste de Tukey para os dados da histomorfometria das diferentes condições de tratamento

	Controle normal	Controle OV	Tratado normal	Tratado OV
Médias	0,376	0,232	0,344	0,420
Controle normal		0,005705*	0,0503746	0,998498
Controle OV			0,150809	0,006362*
Tratado normal				0,494929
Tratado OV				

OV: ovariectomizado

*diferença estatisticamente significativa

Tabela 23- Teste de Tukey para os dados da histomorfometria dos vários períodos de observação

Sacrifício	15 dias	30 dias	60 dias
Médias	0,094	0,390	0,628
15 dias		0,000123*	0,000123*
30 dias			0,000145*
60 dias			

*diferença estatisticamente significativa

Na Tabela 22 verificamos que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle normal e controle ovariectomizado e entre os grupos controle ovariectomizado e tratado ovariectomizado. Em relação aos tempos de sacrifício, observamos na Tabela 23 que houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos.

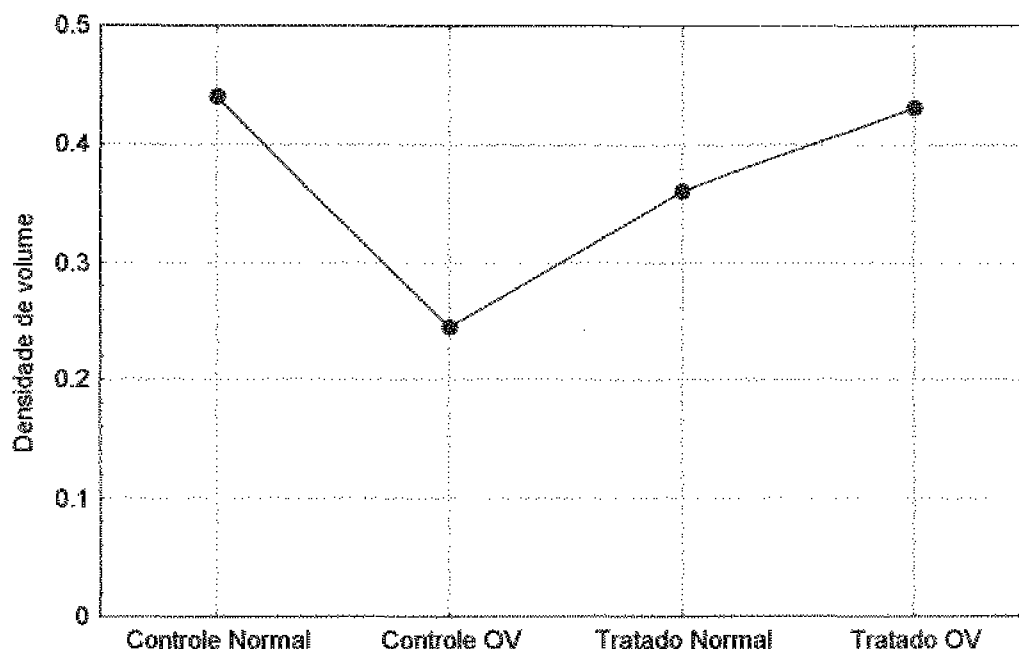


FIGURA 29- Gráfico das médias da histomorfometria referentes as condições de tratamento

Na Figura 29 notamos que houve uma diferença expressiva nas médias da densidade de volume dos grupos controle normal e controle ovariectomizado, sendo constatado através da análise estatística que a reparação entre os grupos controle foi menor nos animais ovariectomizados. Observando, ainda, a Figura 29 podemos verificar, também, diferença acentuada entre as médias dos dois grupos ovariectomizados, sendo revelado pelos testes estatísticos que a sinvastatina promoveu uma melhora na reparação óssea das ratas ovariectomizadas.

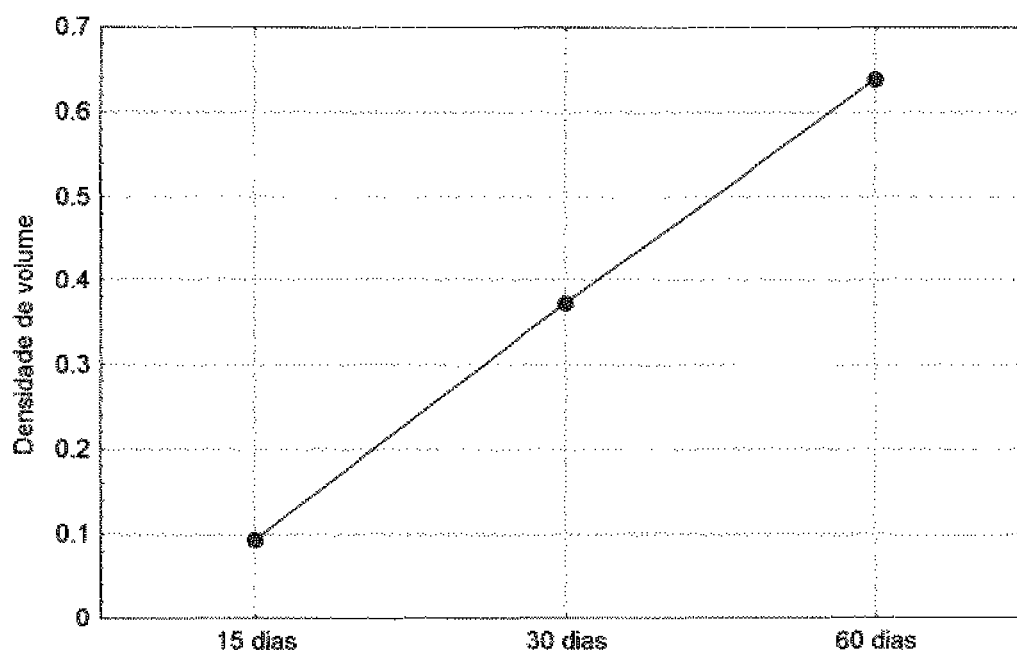


FIGURA 30- Gráfico das médias da histomorfometria referentes aos períodos de sacrifício

Observamos na Figura 30 que a média da densidade de volume do defeito ósseo foi aumentando de acordo com o tempo de sacrifício, sendo demonstrado, estatisticamente, que existem diferenças significantes entre esses grupos.

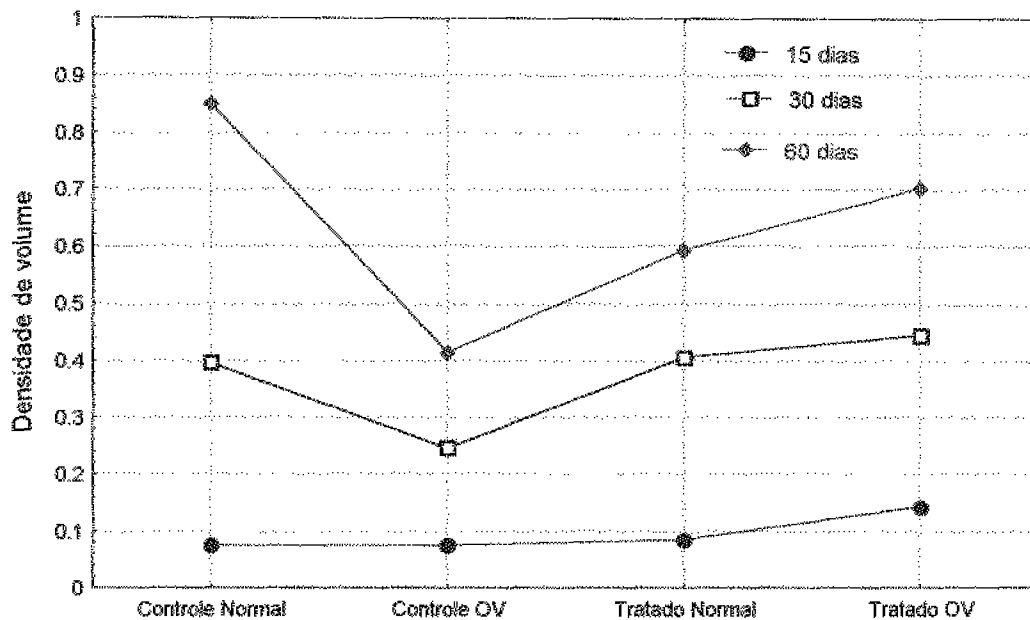


FIGURA 31- Gráfico das médias da histomorfometria referentes as condições de tratamento x períodos de sacrifício

Na Figura 31 observamos que a reparação dos grupos controle normal, controle ovariectomizado, tratado normal e tratado ovariectomizado apresentou comportamento semelhante nos três períodos de observação. Nos grupos de trinta e sessenta dias nota-se que as diferenças entre ratas normais e ovariectomizadas são mais evidentes do que aos 15 dias. A análise estatística aplicada sobre a interação dos fatores condições de tratamento e tempos de sacrifício mostrou que não há diferenças significantes entre os 12 grupos estudados.

Na análise dos resultados da histomorfometria dos grupos tratados em relação ao tempo de tratamento foram realizadas a estatística descritiva (Tabela 24 e 25) e a análise de variância (Tabela 26).

Tabela 24- Estatística descritiva referente a histomorfometria dos grupos tratados com diferentes tempos de tratamento e sacrifício

Grupos	média	mediana	mínimo	máximo	DP
T=15 e S=15	0,1140	0,0900	0,0000	0,3700	0,1124
T=15 e S=30	0,4867	0,500	0,3400	0,6300	0,0918
T=30 e S=30	0,3740	0,3450	0,800	0,6300	0,1673
T=30 e S=60	0,6557	0,6800	0,3100	0,8800	0,1885

T: tempo de tratamento

S: tempo de sacrifício

DP: desvio padrão

Tabela 25- Estatística descritiva quanto a histomorfometria dos grupos tratados normal e ovariectomizados

Grupos	média	mediana	mínimo	máximo	DP
Normal	0,3447	0,3600	0,0000	0,7900	0,2366
OV	0,4205	0,4400	0,0200	0,8800	0,2405

OV: ovariectomizados

DP: desvio padrão

Tabela 26- Análise de variância dos dados da histomorfometria dos grupos tratados apresentados na Tabela 26

Fonte de Variação	Grau de Liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Razão F	p
1	3	1,298	0,433	19,801	0,001*
2	1	0,0303	0,0303	1,387	0,249
1 x 2	3	0,00735	0,00245	0,112	0,952
Resíduo	28	0,612	0,0218		
Total	35	1,988	0,0568		

1: indica os diferentes tempos de tratamento e sacrifício

2: representa os grupos tratados normal e ovariectomizado

*diferença estatisticamente significativa

Na análise de variância descrita na Tabela 26, verificamos que os dados da densidade de volume do defeito ósseo dos grupos tratados normal e ovariectomizado (variável 2) foram semelhantes. Entretanto, foram encontradas diferenças significantes entre os resultados histomorfométricos dos vários tempos de tratamento e sacrifício (variável 1), sendo então submetidos ao teste de Tukey (Tabela 27).

Tabela 27- Teste de Tukey para os diferentes tempos de tratamento e sacrifício

	T=15 e S=15	T=15 e S=30	T=30 e S=30	T=30 e S=60
Médias	0,1140	0,4867	0,3740	0,6557
T=15 e S=15		0,000216*	0,002771*	0,000165*
T=15 e S=30			0,400687	0,189275
T=30 e S=30				0,008879*
T=30 e S=60				

T: tempo de tratamento

S: tempo de sacrifício

Analisando a Tabela 27, constatamos que foram encontradas diferenças significantes entre os grupos sacrificados em 15, trinta e sessenta dias. Entretanto, entre os grupos sacrificados em trinta dias, não houve diferença na reparação óssea dos animais tratados por 15 ou trinta dias.

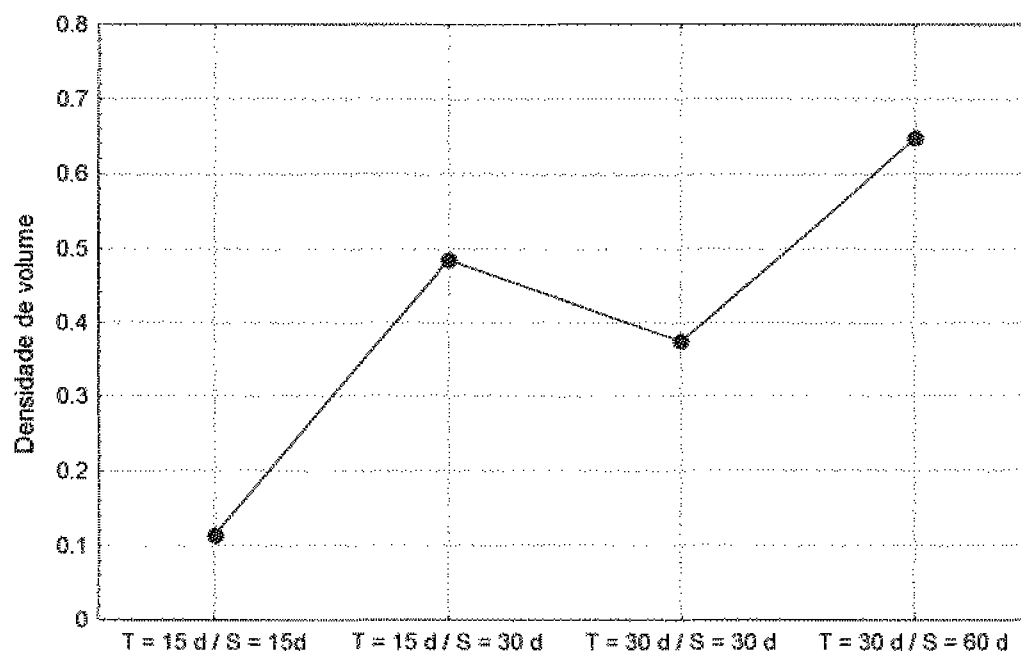


FIGURA 32- Gráfico das médias da histomorfometria para todos os tempos de tratamento e sacrifício

Na Figura 32 observamos que as médias da densidade de volume da reparação óssea foi maior nos grupos de sessenta dias, seguidas pelas médias dos grupos de trinta e 15 dias. Essas diferenças observadas foram estatisticamente significantes. Os grupos tratados por 15 ou trinta dias e sacrificados em 30 dias apresentaram resultados semelhantes.

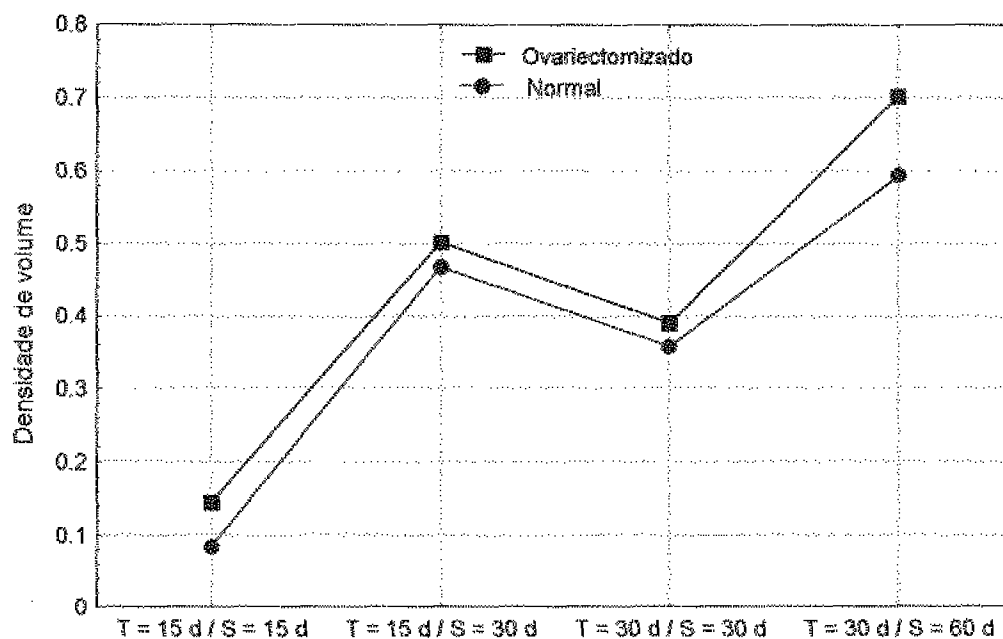


FIGURA 33- Gráfico das médias da histomorfometria para os grupos tratados normal e ovariectomizado x tempos de tratamento e sacrifício

A Figura 33 demonstra que a reparação óssea dos grupos tratados normal e ovariectomizado apresentaram o mesmo comportamento nos diferentes tempos de tratamento e sacrifício.

Diante dos resultados apresentados, podemos afirmar com 95% de certeza que:

- a) entre os grupos controle, o ovariectomizado apresentou menor média na análise histomorfométrica;
- b) a sinvastatina aumentou a densidade de volume ósseo do defeito nas ratas ovariectomizadas, entretanto não teve efeito no processo de reparação dos grupos normais;

- c) a densidade de volume de osso neoformado do defeito foi maior no período de sessenta dias, seguidos pelos tempos de trinta e 15 dias de sacrifício;
- d) não foram observadas diferenças entre os tempos de tratamento na análise histomorfométrica.

6 DISCUSSÃO

As estatinas têm sido utilizadas por mais de uma década, para o tratamento de hipercolesterolemia e doenças coronárias, tendo sua eficácia e segurança demonstradas em vários trabalhos clínicos (Pedersen et al.⁷⁵, 1996; Maron⁶¹, 2000; Moghadasian & Frohlich⁶⁶, 2001). Estudos recentes demonstraram que as estatinas, também, apresentam influência sobre o tecido ósseo, promovendo aumento de formação óssea e redução do risco de fraturas. Esses efeitos parecem ser independentes da redução do colesterol, pois os mesmos não são observados com o uso de outros agentes hipolipidêmicos (Moghadasian & Frohlich⁶⁶, 2001).

Mundy et al.⁷⁰, 1999 foram os primeiros a descrever a capacidade das estatinas em aumentar a expressão da BMP em cultura de células ósseas humanas e de camundongos. Os autores observaram, também, que a administração de lovastatina sobre a calvária de camundongos promoveu formação óssea e que ratas normais e ovariectomizadas tratadas com sinvastatina apresentaram aumento no volume de osso trabecular e redução do número de osteoclastos.

Esses achados incentivaram o desenvolvimento de vários estudos com o objetivo de associar o uso das estatinas com a qualidade do osso em homens e mulheres (Chan et al.¹⁸, 2000; Chung et al.¹⁹, 2000; Wang et al.¹⁰⁶, 2000), assim como no nosso trabalho,

observar os efeitos da sinvastatina no processo de reparação óssea em mandíbulas de ratas normais e ovariectomizadas.

Os resultados obtidos na dosagem do colesterol realizada neste trabalho, demonstraram que os grupos ovariectomizados apresentaram nível de colesterol sanguíneo superior aos animais normais. Esses dados estão de acordo com vários estudos que revelam um aumento do LDL colesterol em mulheres após a menopausa e uma hipercolesterolemia em ratas ovariectomizadas.

Mulheres pós-menopausa apresentam elevado risco de doenças cardiovasculares devido ao aumento do colesterol total e LDL, bem como diminuição do HDL (Sonmez et al.⁸⁸, 1999; Tsang et al.⁹⁵, 2000). Esses efeitos são reduzidos pela terapia de reposição com estrógeno, indicando que o nível de colesterol sanguíneo é influenciado pelo teor de estrógeno presente no organismo (Kishida & Ebihara⁴⁵, 2000).

Sohn et al.⁸⁷, 1999 verificaram um aumento de 16% no nível de colesterol sanguíneo em hamsters submetidos à ovariectomia aos três meses de idade e sacrificados após 65 dias. Lucas et al.⁵⁶, 2000 constataram que ratas ovariectomizadas aos noventa dias de idade e sacrificadas após 45 dias apresentaram um aumento de 22% do colesterol plasmático. Kishida & Ebihara⁴⁵, 2000 observaram que a ovariectomia realizada em ratas com dez meses de idade elevou o nível de colesterol em 12% após 21 dias da cirurgia. Além disso, Qiang et al.⁷⁶, 2000 notaram que a taxa de colesterol de ratas ovariectomizadas aos quatro meses de idade foi superior ao grupo controle em 13% após um período de observação de quatro semanas.

Entre os grupos controle do nosso trabalho, a ovariectomia provocou um aumento de 6% no nível de colesterol sanguíneo. As diferenças encontradas entre esses trabalhos podem ser atribuídas à espécie e idade dos animais, tempo de sacrifício e método utilizado para dosagem do colesterol.

Observamos, ainda, que o tratamento com sinvastatina não apresentou efeito hipolipidêmico, tanto em ratas normais, como nos animais ovariectomizados. Esses dados concordam com outros estudos, que demonstram a ineficácia das estatinas na redução do nível do colesterol sanguíneo em ratos e hamsters (Endo et al.²⁸, 1979; Sakono et al.⁷⁹, 1996; Fujioka & Tsujita³⁰, 1997; Lunden et al.⁵⁸, 1997; Hajri et al.³³, 1997; Krause & Princen⁴⁹, 1998).

A administração das estatinas em humanos, coelhos e cães inibe a enzima HMG-CoA redutase, provocando um aumento compensatório no número desta enzima. Esse efeito estimula a superfície dos hepatócitos a expressarem receptores de LDL, responsáveis pela extração dessas lipoproteínas do plasma. Em ratos, também, observa-se aumento compensatório da HMG-CoA redutase após o uso das estatinas, entretanto esse efeito não é seguido pelo aumento de receptores LDL. Esses mecanismos ainda não estão bem esclarecidos, mas tem sido sugerido que a inibição da enzima HMG-CoA redutase em ratos leva a uma degradação dos receptores LDL (Fujioka & Tsujita³⁰, 1997).

A densidade óptica ou fotográfica é a medição do negrume do filme através de um fotodensitômetro, que compara a intensidade da luz que entra em uma determinada área em um lado do

filme revelado com a intensidade daquela luz quando ela emerge pelo outro lado. Assim o valor da densidade óptica depende da aparência da radiografia, que é afetada pelas mudanças na exposição e nas condições de revelação (Eastman Kodak Company²⁵, 1980). Neste trabalho os valores da densidade óptica foram transformados em equivalentes de alumínio, tornando a densitometria óptica um método reproduzível, independente dos fatores de exposição e revelação do filme, possibilitando a comparação das densidades ópticas obtidas em diferentes radiografias (Trouerbach et al.⁹⁴, 1984; Verhoeven et al.⁹⁹, 1998).

Alguns estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de estabelecer uma correlação entre as leituras da densidade óptica das radiografias e a análise histológica, como Carvalho et al.¹⁵ (1980) e Bodner et al.⁹ (1993), que observaram a reparação dos alvéolos após a extração dentária em ratos e Louzada et al.⁵⁵ (1989) que estudaram o preenchimento ósseo de defeitos em ulna de coelhos. Todos esses autores notaram semelhança entre os resultados das análises densitométrica e histológica, constatando que a densitometria óptica é um método eficaz na avaliação da reparação óssea.

A densitometria realizada neste trabalho apresentou concordância apenas com alguns dos resultados obtidos na histomorfometria. As análises densitométrica e histomorfométrica revelaram que o processo de reparação óssea foi melhor no grupo tratado entre os animais ovariectomizados e no período de 60 dias de observação. Entretanto, a histomorfometria foi capaz de evidenciar outros achados, como menor quantidade de neoformação óssea do

grupo controle ovariectomizado em relação ao controle normal e a melhor reparação no período de trinta dias quando comparado com 15 dias.

Portanto a densitometria não foi tão eficaz quanto a histomorfometria na observação de todas as variações presentes entre os grupos. Isso pode ser explicado pelo fato de que as leituras das densidades ópticas das radiografias foram realizadas apenas no centro dos defeitos ósseos. A análise histológica mostrou que nos períodos de 15 e trinta dias as trabéculas ósseas neoformadas eram restritas as bordas do defeito, e provavelmente não eram suficientemente maduras para determinar radiopacidade nas radiografias. Apenas nos períodos de 60 dias foi encontrado tecido ósseo neoformado maduro no centro da lesão, tornando-se possível a observação das variações de radiopacidade. Este trabalho demonstrou que a densitometria pode ser utilizada para avaliar a reparação óssea, mas torna-se desnecessária quando existe a possibilidade de fazer análises histológicas e morfométricas.

A análise histológica de todos os grupos por nós analisados revelou que a reparação óssea inicia-se nas margens do defeito e à partir do periósteo. Esses achados confirmam o que já foi observado por outros autores, que o periósteo tem um grande potencial osteogênico, sendo fundamental no processo de reparação (Eyre-Brook²⁹, 1983; Kostopoulos & Karring⁴⁷, 1995).

Foram encontrados osteoclastos nos três períodos de observação, principalmente nos grupos de 15 dias, sendo também notadas linhas de aposição nos tempos de trinta e sessenta dias. Esses

dados indicam que durante o processo de reparação óssea ocorre remodelação do osso primário, formando um tecido mais maduro, com osteócitos menores e dispostos em padrão lamelar (Sandberg et al.⁸⁰, 1993; Vortkamp et al.¹⁰³, 1998). O tecido ósseo restaura completamente a sua estrutura original (Mourad⁶⁹, 1997; Junqueira & Carneiro⁴¹, 1999; Katburian & Arana⁴³, 1999), sendo que em alguns cortes histológicos do período de sessenta dias foi impossível delimitar o limite da borda posterior do defeito, devido a intensa similaridade entre osso antigo e neoformado.

Em vários cortes histológicos foram observadas esquirolas ósseas, ora contornadas por osteoclastos, ora envoltas por tecido osteogênico. Esses fragmentos ósseos provavelmente apresentaram ação osteoindutora sobre as células mesenquimais indiferenciadas da região, a qual foi favorecida pela utilização da barreira física, concentração de proteínas e fatores de crescimento (Szachowicz⁹⁰, 1995; Pecora et al.⁷⁴, 1997).

Nos períodos de sessenta dias verificou-se que o defeito estava preenchido por grande quantidade de tecido ósseo neoformado, mas ainda continha tecido de granulação na região central do mesmo. Entretanto, Dahlin et al.²¹ (1988) constataram que defeitos mandibulares de ratos, revestidos por uma barreira de politetrafluoretileno, apresentaram completa cicatrização após 6 semanas da cirurgia e pouco ou nenhuma evidência de reparação foi notada nos defeitos sem barreiras após 22 semanas. Possivelmente, a reparação óssea no nosso trabalho tenha sido mais lenta porque a barreira foi apenas posicionada sobre o defeito, enquanto que Dahlin

et al.²¹ (1988) fixaram a mesma através de uma sutura trans-óssea. A falta de fixação da barreira pode ter favorecido a infiltração de tecido conjuntivo que interferiu no processo de reparação (Linde et al.⁵⁴, 1993; Dahlin et al.²³, 1994; Pecora et al.⁷⁴, 1997; Almeida et al.³, 2000), sendo que em alguns cortes nós notamos a presença de tecido conjuntivo e muscular dentro do defeito.

A análise histomorfométrica revelou que entre os grupos controle, os animais ovariectomizados apresentaram reparação óssea inferior às ratas normais nos períodos de trinta e sessenta dias de observação. Em vários trabalhos com animais experimentais, a ovariectomia tem sido associada com deficiência do processo de reparação óssea.

Walsh et al.¹⁰⁴, 1997 realizaram ovariectomia bilateral em ratas fêmeas com três meses de idade e após seis semanas induziram uma fratura transversal no fêmur. Através de testes biomecânicos e análises histológicas constataram que a deficiência de estrógeno prejudicou a cicatrização após duas semanas da realização da lesão.

Kubo et al.⁵¹, 1999 submeteram ratas com oito semanas de idade à ovariectomia e após 34 semanas à fratura de fêmur. As análises radiográficas, histológicas e biomecânicas revelaram que a reparação do grupo ovariectomizado foi idêntica ao controle em um período de seis semanas depois da indução das fraturas, sendo notado somente após 12 semanas uma cicatrização inferior nos animais com ovariectomia.

Por outro lado, Blythe & Buchsbaum⁸ (1976) verificaram que a deficiência de estrógeno não interferiu no processo de reparação em fraturas de fíbulas de ratas. Os animais foram ovariectomizados com seis semanas de idade, sendo as fraturas e a análise de resistência realizados, respectivamente, duas e seis semanas após a ovariectomia. Talvez, se esses autores tivessem observado a reparação das fraturas por análise histológica, poderiam ter constatado alguma deficiência no processo de reparo das ratas ovariectomizadas.

Wronski et al.¹⁰⁹, 1988 e Lane et al.⁵², 1998 estudaram as alterações do tecido ósseo decorrentes da ovariectomia. Alguns dias antes do sacrifício, os animais receberam injeções de calcein, que resulta na deposição de fluorocromo na superfície óssea. A análise histomorfométrica das tíbias revelaram diminuição da conectividade trabecular, aumento do número de osteoblastos e osteoclastos e intensa atividade de formação e reabsorção óssea. No entanto, apenas com a análise histomorfométrica, sem marcadores do tecido ósseo, não foi possível notarmos as alterações descritas por esses autores.

Observamos, também, através da análise histomorfométrica que a sinvastatina favoreceu a reparação óssea entre os grupos ovariectomizados. Entretanto entre as ratas normais, o uso desse medicamento não apresentou efeito sobre o processo de reparação.

Provavelmente, o efeito da sinvastatina sobre a reparação dos defeitos mandibulares das ratas ovariectomizadas está associado com o aumento da densidade óssea na osteoporose provocada pelo uso desse medicamento. Wang et al.¹⁰⁶ (1995)

estudando fêmur de coelhos com osteoporose induzida por esteróide, verificaram que os animais tratados com esteróide e lovastatina durante 13 semanas apresentaram maior densidade do osso em relação ao grupo tratado apenas com esteróide. Mundy et al.⁷⁰ (1999) notaram um aumento do volume de osso trabecular em ratas ovariectomizadas e tratadas com sinvastatina. Além disso, Wang et al.¹⁰⁶ (2000) e Chan et al.¹⁸ (2000) analisando históricos médicos de vários pacientes com mais de sessenta anos de idade constataram que as estatinas conferem proteção contra fraturas por osteoporose. Portanto, a sinvastatina parece não ter efeito sobre o processo de reparo ósseo, mas apresenta eficácia no tratamento da osteoporose.

Alguns trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de investigar o efeito de alguns medicamentos usados no tratamento da osteoporose, sobre o processo de reparação óssea.

Silva⁸⁶, 2000 observou a ação do bifosfonato, alendronato sódico, sobre a reparação óssea de defeitos cirúrgicos produzidos em tíbias de ratas ovariectomizadas. Os animais sofreram cirurgia para excisão dos ovários e para confecção do defeito ósseo, respectivamente, aos dois e três meses de idade. Os sacrifícios foram realizados três, sete e 14 dias após a produção do defeito. Através de análise histológica, o autor constatou que o alendronato sódico acelerou o processo de reparo ósseo nos tempos experimentais de sete e 14 dias, sendo esse efeito dose-dependente.

Arisawa⁴, 2000 avaliou a ação da calitonina de salmão sobre a reparação de defeitos ósseos circunscritos revestidos por barreira de politetrafluoretileno em mandíbulas de ratas, com ou sem a

presença de hormônios ovarianos. Após um mês da ovariectomia, os animais foram submetidos à cirurgia para confecção de um defeito ósseo bicortical, sendo sacrificados depois de três, sete, 14 e 21 dias. As análises densitométrica, histológica e morfométrica demonstraram que a reparação óssea foi prejudicada pela ovariectomia e a calcitonina favoreceu o processo de reparo em ratas normais e ovariectomizadas.

O principal mecanismo de ação da calcitonina e dos bifosfonatos sobre o tecido ósseo é a inibição dos osteoclastos, diminuindo a reabsorção óssea (Chad¹⁷, 1997; Krane & Holick⁴⁸, 1998; Bandeira et al.⁵, 2000). Os bifosfonatos apresentam alta afinidade pelo tecido ósseo, sendo capazes de penetrar no interior dos osteoclastos. Estudos recentes têm demonstrado que os bifosfonatos podem ser classificados em dois grupos de acordo com o modo de ação. O primeiro grupo é composto por bifosfonatos análogos ao pirofosfato, como o clodronato e etidronato, que inibem enzimas intracelulares ATP-dependentes, provocando a morte do osteoclasto. O outro grupo é formado por bifosfonatos que contêm nitrogênio, como o alendronato, pamidronato e risendronato, que inibem compostos isoprenóides da via do mevalonato na biossíntese do colesterol, como geranil pirofosfato e farnesil pirofosfato, que são importantes para prenilação de proteínas vitais à função celular dos osteoclastos (Luckman et al.⁵⁷, 1998; Russell et al.⁷⁸, 1999).

O principal mecanismo de ação das estatinas é o aumento da formação óssea através da estimulação da BMP, importante na diferenciação e indução dos osteoblastos (Mundy et

al.⁷⁰, 1999; Sugiyama et al.⁸⁹, 2000). Além disso, as estatinas induzem à apoptose dos osteoclastos pelo mesmo mecanismo dos bifosfonatos contendo nitrogênio (Luckman et al.⁵⁷, 1998).

Os bifosfonatos e a calcitonina são medicamentos já estabelecidos para o tratamento da osteoporose. Entretanto, a descoberta dos efeitos das estatinas sobre o tecido ósseo é muito recente e necessita de mais estudos empenhados em compreender o seu mecanismo de ação, podendo assim trazer grandes avanços para a medicina e odontologia.

7 CONCLUSÕES

Através da análise dos resultados, concluiu-se que:

- a) A ovariectomia promoveu aumento no nível de colesterol sangüíneo em todos os períodos de observação;
- b) A sinvastatina não teve efeito hipolipidêmico, tanto nos grupos sem ovariectomia com nível normal de colesterol, como nos grupos ovariectomizados com hipercolesterolemia;
- c) Não foram observadas alterações estatisticamente significantes nos índices de colesterol sangüíneo em relação aos diferentes tempos de sacrifício e tratamento;
- d) Entre os grupos controle, a reparação óssea foi prejudicada pela ovariectomia;
- e) A sinvastatina favoreceu a reparação óssea guiada dos animais ovariectomizados, mas não apresentou efeito sobre ratas normais;
- f) O processo de reparação óssea foi melhor nos períodos de sessenta dias, seguidos pelos tempos de trinta e 15 dias de sacrifício;
- g) Não houve diferença estatisticamente significativa na reparação óssea quanto ao tempo de tratamento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 AABOE, M.; PINHOLT, E.M.; HJORTING-HANSEN, E. Healing of experimentally created defects: a review. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.33, n.5, p.312-8, 1995.
- 2 ALBERTS, A.W. et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.77, n.7, p.3957-61, July 1980.
- 3 ALMEIDA, J.D. et al. Estudo da reparação óssea em mandíbula de ratos. **Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos**, v.3, n.1, p.49-53, jan./jun. 2000.
- 4 ARISAWA, E.A.L. **Influência da calcitonina na regeneração óssea em mandíbulas de ratas ovariectomizadas**. 2000. 107p. Tese (Doutorado em Odontologia, Área de Concentração Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.

*Baseado em:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Rio de Janeiro. **Referências Bibliográficas NBR6023**. Rio de Janeiro, 2000. 22p.

- 5 BANDEIRA, F. et al. **Osteoporose**. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. 390p.
- 6 BELL, R.; BEIRNE, O.R. Effect of hidroxyapatite, tricalcium phosphate, and collagen on the healing of defects in the rat mandible. **J Oral Maxillofac Surg**, v.46, n.7, p.589-94, 1988.
- 7 BELLOSTA, S. et al. Non-lipid-related effects of statins. **Ann Med**, v.32, n.3, Apr. p.164-76, 2000.
- 8 BLYTHE, J.G.; BUCHSBAUM, H.J. Fracture healing in estrogen-treated and castrated rats. **Obstet Gynecol**, v.48, n.3, p.351-2, Mar. 1976.
- 9 BODNER, L. et al. Extraction site healing in rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.75, n.3, p.367-72, Mar. 1993.
- 10 BORELLI, A. Envelhecimento ósseo: osteoporose. In: CARVALHO FILHO, E.T.; PAPALÉO NETO, M. **Geriatría: fundamentos, clínica e terapêutica**. São Paulo: Atheneu, 1994. Cap. 22, p.297-308.
- 11 BOSTROM, M.P.G. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. **Clin Orthop**, v.355, p.116-23, Oct. 1998.

- 12 BOYNE, P.J. Regeneration of alveolar bone beneath cellulose acetate filter implants. **J Dent Res**, v.43, n.5, p.827, 1964. (Abstract 196).
- 13 BROWN, M.S.; FAUST, J.R.; GOLDESTINE, J.L. Induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML-236 B), a competitive inhibitor of the reductase. **J Biol Chem**, v. 253, n.4, p. 1121-8, Feb. 1978.
- 14 BROWNELL, A.G. Osteogenesis inhibitory protein: a (p)review. **Connect Tissue Res**, v.24, n.1, p.13-6, 1990.
- 15 CARVALHO, A. et al. Mineralização no processo de reparo em feridas de extração dentária em ratos: contribuição ao estudo densitométrico. **Ars Cvrandi Odontol**, v.7, n.7, p.304-12, Out. 1980.
- 16 CASTRO, M.L.; VIEIRA, J.G.H.; CHAIRA, A.R. Alterações do metabolismo do cálcio e doenças ósteo-metabólicas. In: PRADO, F.C.; RAMOS, J.; VALLE, J.R. **Atualização terapêutica: manual prático de diagnóstico e tratamento**. 19.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1999. p.537-44.
- 17 CHAD, L.D. Osteoporosis: prevention, diagnosis, and management. **Am J Med**, v.102, p.35-9, Jan. 1997.

- 18 CHAN, K.A. et al. Inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and risk of fracture among older women. **Lancet**, v.355, n.9222, p.2185-8, Jun. 2000.
- 19 CHUNG, Y. et al. HMG-CoA reductase inhibitors increase BMD in type 2 diabetes mellitus patients. **J Clin Endocrinol Metab**, v.85, n.3, p.1137-42, 2000.
- 20 CUI, Q. et al. Lovastatin prevents steroid induced adipogenesis and osteonecrosis. **Clin Orthop**, n.344, p.8-19, 1997.
- 21 DAHLIN, C. et al. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. **Plast Reconstr Surg**, v.81, n.5, p.672-6, May, 1988.
- 22 DAHLIN, C. et al. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. **Int Oral Maxillofac Implants**, v.4, n.1, p.19-25, 1989.
- 23 DAHLIN, C. et al. Restoration of mandibular nonunion bone defects. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.23, n.4 p.237-42, 1994.
- 24 DOUGLAS, C. R. Fisiologia do osso. In: **Tratado de fisiologia: aplicada às ciências da saúde**. 4.ed. São Paulo: Robe, 1999. Cap.87, 1221-36.

- 25 EASTMAN KODAK COMPANY. Resposta do filme. In:_. **Fundamentos de radiografia**. 1980. Cap. 5, p.45-56,
- 26 ELORRIAGA, M. et al. Changes in skeletal metabolism after the administration of demineralized bone proteins and fluoride. **Rev Esp Fisiol**, v.51, n.3, p.163-4, 1995.
- 27 ENDO, A.; KURODA, M.; TANZAWA, K. Competitive inhibition of 3-hidroxy-3-methylglutaril coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. **FEBS Lett**, v.72, n.2, p.323-6, Dec. 1976.
- 28 ENDO, A. et al. Effects of ML-236B on cholesterol metabolism in mice and rats: lack of hypocholesterolemic activity in normal animals. **Biochim Biophys Acta**, v.575, p.266-76, 1979.
- 29 EYRE-BROOK, A.L. The periosteum: its function reassessed. **Clin Orthop**, n.189, p.300-7, Oct. 1984.
- 30 FUJIOKA, T.; TSUJITA, Y. Effects of single administration of pravastatin sodium on hepatic cholesterol metabolism in rats. **Eur J Clin Pharmacol**, v.323, n. 2-3, p.223-8, 1997.

- 31 GLEW, R.H. Metabolismo dos lipídeos II: Vias do metabolismo dos lipídeos especiais. In: DEVLIN, T.M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 4.ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1998. Cap. 10, p.328-67.
- 32 GOSAIN, A.K. et al. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-[beta] isoforms. **Plast Reconstr Surg**, v.106, n.2, p.360-71, Aug. 2000.
- 33 HAJRI, T. et al. Reduced cholesterol absorption in hamsters by cerivastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. **Eur J Clin Pharmacol**, v.320, n.1, p.65-71, Feb. 1997.
- 34 HAMELIN, B.A.; TURGEON, J. Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. **Trends Pharmacol Sci**, v.19, p.26-37, Jan. 1998.
- 35 HIDELOLT, C.F. Osteoporosis and oral bone loss. **Dentomaxillofac Radiol**, v.26, p.3-15, 1997.
- 36 HILL, P.A.; ORTH, M. Remodelação Óssea. **Rev Dental Press de Biol Oral**, v.1, n.1, p.67-75, 2000.

- 37 HOFFMAN, W.F. et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. 4. Side chain ester derivatives of mevinolin **J Med Chem**, v.29, n.5, p.849-52, 1986.
- 38 HOLLINGER, J.; WONG, M.E.K. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.82, n.6, p.594-606, Dec. 1996.
- 39 ISHIDOU, Y. et al. Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. **J Bone Miner Res**, v.10, n.11, p.1651-9, 1995.
- 40 JIN, Y.; YANG, L. J. The relationship between bone morphogenic protein and neoplastic bone diseases. **Clin Orthop**, v.259, p.233-38, Oct. 1990.
- 41 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In:_. **Histologia básica**. 9. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999. Cap. 8, p.111-28.
- 42 KABAN, L.B.; GLOWACKI, J. Induced Osteogenesis in the repair of experimental mandibular defects in rats. **J Dent Res**, v.60, n.7, p.1356-64, July 1981.

- 43 KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Tecido ósseo. In:_. **Histologia e embriologia Oral**. São Paulo: Panamericana, 1999. Cap. 3, p. 40-75.
- 44 KING, G.N. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. **J Dent Res**, v.76, n. 8, p.1460-70, Aug. 1997.
- 45 KISHIDA, T.; EBIHARA, K. Ovarian hormone deficiency-induced hypercholesterolemia is reversed by taurine. **Nutr Res**, v. 20, n.8, p.1173-82, 2000.
- 46 KOLBECK, S. et al. Digital radiography: A predictor of regenerate bone stiffness in distraction osteogenesis. **Clin Orthop**, n.366, p.221-8, Sept. 1999.
- 47 KOSTOPOULOS, L.; KARRING, T. Role of periosteum in the formation of jaw bone. **J Clin Periodontol**, v.22, n.3, p.247-54, Mar. 1995.
- 48 KRANE, S.M.; HOLICK, M.F. Doença óssea metabólica. In: HARRINSON et al. **Medicina interna**. 13.ed. São Paulo: McGraw Hill, Interamericana, 1998. p.2282-87.

- 49 KRAUSE, B.R.; PRINCEN, H.M.G. Lack of predictability of classical animal models for hypolipidemic activity: a good time for mice? **Atherosclerosis**, v.140, n.1, p.15-24, Sept. 1998.
- 50 KRIBBS, P.J. Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. **J Prosthet Dent**, v.63, n.3, p.218-22, Feb. 1990.
- 51 KUBO, T. et al. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 68, n.5-6, p.197-202, 1999.
- 52 LANE, N.E. et al. Acute changes in trabecular bone connectivity and osteoclast activity in the ovariectomized rat *in vivo*. **J Bone Miner Res**, v.13, n.2, p.229-36, Feb. 1998.
- 53 LENNERNÄS, H.; FAGER G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. **Clin Pharmacokinetic**, v.32, n.5, p.403-25, May 1997.
- 54 LINDE, A. et al. Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. **J Periodontol**, v.64, n.11, p.1116-28, Nov. 1993.

- 55 LOUZADA, M. J. Q. et al. Microdensitometria em radiografias de perfurações ósseas. **Rev Bras Orthop**, v.24, n.5, p.165-8, maio 1989.
- 56 LUCAS, E. A. et al. Prune suppresses ovariectomy-induced hypercholesterolemia in rats. **J Nutr Biochem**, v.11, n.5, p.255-9, May 2000.
- 57 LUCKMAN, S.P. et al. Nitrogen-containing biphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including ras. **J Bone Miner Res** v.13, n.4, p.581-9, 1998.
- 58 LUNDEEN et al. Characterization of the ovariectomized rat model for the evaluation of estrogen effects on plasma cholesterol levels. **Endocrinology**, v.138, n.4, p.1552-8, 1997.
- 59 MANOLAGAS, S.C.; JILKA, R.L. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. **N Eng J Med**, v.332, n.5, p.305-11, Feb. 1995.
- 60 MARCANTONIO, E.; MARCANTONIO, R.A.C.; CIRELLI, J. A. Regeneração óssea: vertical e horizontal. In: TUNES, U. R.; RAPP, G.E. **Atualização em periodontia e implantodontia**. São Paulo: Artes Médicas, 1999. Cap.º15, p. 296-316.

- 61 MARON, D.J.; FAZIO, S.; LINTON, M.F. Current Perspectives on statins. **Circulation**, v.101, n.2, p.207-13, Jan. 2000.
- 62 MASSY, Z.A.; KEANE, W.F.; KASISKE, B.L. Inhibition of the mevalonate pathway: benefits beyond cholesterol reduction? **Lancet**, v.347, n.8994, p.102-3, Jan.1996.
- 63 MEGHJI, S. Bone remodelling. **Br Dent J**, v. 172, n. 6, p. 235-42, Mar. 1992.
- 64 MELCHER, A.H.; DREYER, C.J. Protection of the blood clot in healing circumscribed bone defects. **J Bone Joint Surg**, v.44, n.2, p.424-30, May 1962.
- 65 MODESTO FILHO, J.; AZEVEDO, L.A.P.; AZEVEDO, L.C.P. Tratamento de osteoporose. **J Bras Med**, v.71, n.5/6, p.77-9, nov./ dez. 1996.
- 66 MOGHADASIAN, M.H.; FROHLICH, J.J. Statins and bones. **Canadian Medical Association**, v.164, n.6, p.803-5, Mar. 2001.
- 67 MORIYA, Y.; ITO, K.; MURAI, S. Effects of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. **J Oral Sci**, v.40, n.4, p.171-5, 1998.

- 68 MOURA, R.A. et al. Determinações bioquímicas. In:_. **Técnica de laboratório**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1994. Cap.6, p.35-96.

- 69 MOURAD, L. A. Structured and function of musculoskeletal system. In: McCANCE, K.L.; HUETHER, S.E. **Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children**. 3. Ed. Sant Louis: Mosby, 1997. Chap.40, p.1405-34.

- 70 MUNDY, G. et al. Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by statins. **Science**, v. 286, n. 5446, p. 1946-51, 1999.

- 71 MURRAY, G., HOLDEN, R., ROSCHLAU, W. Experimental and clinical study of new growth of bone in a cavity. **Am J Surg**, v.93, p.385-7, 1957.

- 72 NYMAN, S. et al. The regenerative potential of the periodontal ligament: an experimental study in the monkey. **J Clin Periodontol**, v.9, n.3, p.257-65, 1982.

- 73 PAGE, C.P. et al. As drogas e os sistemas endócrino e metabólico. In:_. **Farmacologia integrada**. Trad. I.C. Gubert. São Paulo: Manole, 1999. Cap. 12 p.253-86.

- 74 PECORA, G. at al. Bone regeneration with a calcium sulfate barrier. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.84, n.4, p.424-9, Oct. 1997.

- 75 PEDERSEN, T.R. et al. Safety and tolerability of cholesterol lowering with simvastatin during 5 years in the scandinavian survival study. **Arch Intern Med**, v.156, n.18, p.2085-92, Oct. 1996.

- 76 QIANG, Q. et al. Selective estrogenic effects of a novel triphenylethylene compound, FC1271a, on bone, cholesterol level, and reproductive tissues in intact and ovariectomized rats. **Endocrinology**, v.141, n.2, p.809-20, Feb. 2000.

- 77 ROGERS, M.J. Statins: lower lipids and better bones? **NatMed**, v.6, n.1, p.21-5, Jan. 2000.

- 78 RUSSEL, R.G.G. et al. The Pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. **J Bone Miner Res** v.14, n.2, p.53-65, Oct. 1999.

- 79 SAKONO, M. et al. Lymphatic transport of cholesterol in normocholesterolemic rats treated with pravastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase. **Atherosclerosis**, v.124, n.1, p.95-102, Jul. 1996.

- 80 SANDBERG, E.; ARO, H. T.; VUORIO, E. I. Gene expression during bone repair. **Clin Orthop**, n.289, p.292-312, Apr. 1993.

- 81 SATO, T.; MORITA, I.; MUROTA, S. Involvement of cholesterol in osteoclast-like cell formation via cellular fusion. **Bone**, v.23,n.2, p. 135-40, Aug. 1998.
- 82 SAVILLE, P.D. Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rat: a model of osteoporosis. **J Am Geriatr Soc**, v.17, n.2, p.155-66, 1969.
- 83 SCHENK, R.K. Bone regeneration: biologic basis. In: Buser, D.; Dahlin, C.; Schenk, R. K. **Guided bone regeneration in implant dentistry**. Chicago: Quintessence Books, 1994. p. 49-100.
- 84 SCHMITZ, J.; HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop**, v.355, n.205, p.299-308, Apr. 1986.
- 85 SHIMIZU, M. et al. Bone Wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats. **J Electron Microsc**, v.47, n.5, p.517-26, 1998.

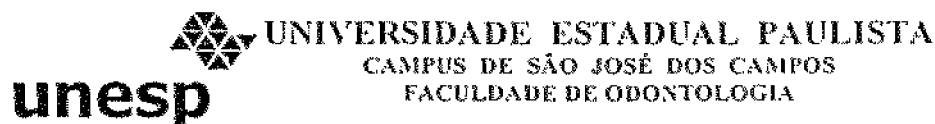
- 86 SILVA, C. M. O. M. **Avaliação do alendronato sódico sobre a reparação óssea na ausência dos hormônios ovarianos.** 2000. 102p. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos.
- 87 SOHN, E.; DAGGY, B. P.; ARJMAND, B. H. Ovariectomized hamster: a potencial model of postmenopausal hypercholesterolemia. **J Nut Med**, v.10, p.660-3, Nov. 1999.
- 88 SONMEZ, A. et al. Effects of misoprostol on lipoprotein (a) levels of ovariectomized rats. **Fertil Steril**, v.72, n.3, p.518-21, Sept.1999.
- 89 SUGIYAMA, M. et al. Compactin and Simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.271, n.3, p.688-92, 2000.
- 90 SZACHOWICZ, E.H. Facial bone wound healing. **Otolaryngol Clin North Am**, v.28, n.5, p.865-80, Oct. 1995.

- 91 TAGA, R.; STIPP, A.C.M. **Manual prático de morfometria ao microscópio óptico: planejamento e desenvolvimento de um experimento.** Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB-USP), 1994. (Apostila)
- 92 TANAKA, M. et al. The effect of aging and ovariectomy on mandibular condyle in rats. **J Prosthet Dent**, v.79, n.6, p.685-90, Jun. 1998.
- 93 TODESCAN, F.F.; IMBRONITO, A.V. Tratamento dos defeitos ósseos para colocação de implantes. In: GONÇALVES, E.A.N. **Atualização na clínica odontológica: a prática da clínica geral.** São Paulo: Artes Médicas, 1998, p.275-308.
- 94 TROUERBACH, W.T. et al. A study of the radiographic aluminum equivalent values of the mandible. **Oral Surg**, v.58, n.5, p.610-6, Nov. 1984.
- 95 TSANG, T.S. et al. Risks of coronary heart disease in women: current understanding and evolving concepts. **Mayo Clinic Proceed**, v.75, n.12, p.1289-303, Dec. 2000.
- 96 TSUJITA, Y. et al. CS-514 a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaril coenzyme A reductase. **Bochim Biophys Acta**, v.877, n.1, p.50-60, 1986.

- 97 URIST, M. R. Bone formation by autoinduction. **Science**, v.150, n.3692, p.893-9, Oct. 1965.
- 98 VANCE, D.E.; BOSH, H.V. Cholesterol in the year 2000. **Bochim Biophs Acta**, v.1529, p.1-8, 2000.
- 99 VERHOEVEN, J.W. et al. Densitometric measurements of the mandible: accuracy and validity of intraoral versus extraoral radiographical techniques in an *in vitro* study. **Clin Oral Implants Res**, v.9, n.5, p.333-42, Oct. 1998.
- 100 VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística**. 4.ed. Rio de Janeiro: Campus, 1986, 294p.
- 101 VOET, D. et al. Metabolismo dos lipídeos. In:_. **Fundamentos da bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2000. Cap.19, p.562-610.
- 102 VON WOWER, N. Bone mineral content of mandibles: normal reference value-rate of age-related bone loss. **Calcif Tissue Int**, v.43, n.4, p.193-8, 1988.
- 103 VORTKAMP, A. et al. Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. **Mech Dev**, v.71, n.1-2, p.65-76, Feb. 1998.

- 104 WALSH, W.R. et al. Fracture healing in rat osteopenia model. **Clin Orthop**, v.342, p.218-27, Sep. 1997.
- 105 WANG, G.J.; CHUNG, K.C.; SHEN, W.J.S. Lipid clearing agents in steroid-induced osteoporosis. **J Formos Med Assoc**, v.94, n.10, p.589-92, 1995.
- 106 WANG, P.S. et al. HMG-CoA Reductase inhibitors and the risk of hip fractures in elderly patients. **J Am Med Assoc**, v.283, n.24, p.3211-6, Jun. 2000.
- 107 WATSON, E. L. et al. The measurement of mandibular cortical bone height in osteoporotic vs. non-osteoporotic postmenopausal women. **Spec Care Dent**, v.15, n.3, p.124-8, 1995.
- 108 WITZTUM, J.L. Fármacos usados no tratamento das hiperlipoproteínemias. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Trad. J.G.Hardvan; L.E. Limbird. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. Cap. 36, p.643-60.
- 109 WRONSKI, T.J.; CINTRÓN, M.; DANN, L.M. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. **Calcif Tissue Int**, v.43, n.3, p.179-83, Sept. 1988

Anexo A- Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Animal- São
José dos Campos



CERTIFICADO

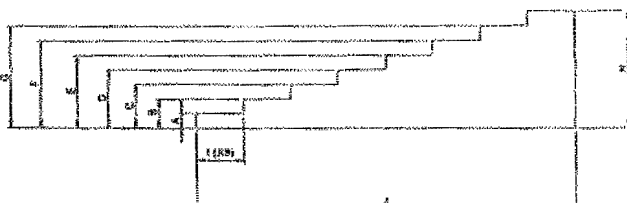
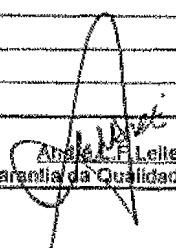
CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 003/2000-PA/CEP, sobre "Influência da Sinvastatina na reparação óssea de mandíbulas de ratas ovariectomizadas", sob a responsabilidade de Juliana Campos Junqueira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 28 de março de 2000.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Paulo Villela Santos Júnior", is written over a horizontal line.

Prof. Dr. Paulo Villela Santos Júnior
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

**Anexo B- Relatório das medidas da escala de alumínio, realizado pela
Schrader Bridgeport Brasil Ltda.**

Schrader Bridgeport Brasil Ltda. Factory and Office Address: Av. Marek Assad, 1600 - Parque Mela Lus P.O. Box 242 - CEP 12300000 - Jacareí - SP - Brasil Phone (012) 351-8544 - Fax (012) 351-8547 Certificação ISO 9001 / QS 9000 (DQS N° 61300-02)		
RELATÓRIO DE INSPEÇÃO DE AMOSTRAS		
RIA N° 12	Data: 02/02/2001	Pag. 1 de 1
Nome do Cliente: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP		
Descrição: ESCALA DE ALUMÍNIO (STEP WEDGE) P/ DENSITOMETRIA ÓPTICA		
Quantidade: 01 peça		
		
ITEM	RESULTADOS ENCONTRADOS	
A	0,498 mm	
B	1,004 mm	
C	1,569 mm	
D	2,127 mm	
E	2,675 mm	
F	3,212 mm	
G	3,755 mm	
H	4,288 mm	
I	5,077 mm	
J	40,613 mm	
L	5,159 mm	
		
André F. Leite Garantia da Qualidade		Fabiano Pereira Labor. Metrologia

JUNQUEIRA, J. C. Effects of the simvastatin on bone regeneration in the mandibles of ovariectomized rats and on the level of blood cholesterol. 2001. 144f. Tese (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos.

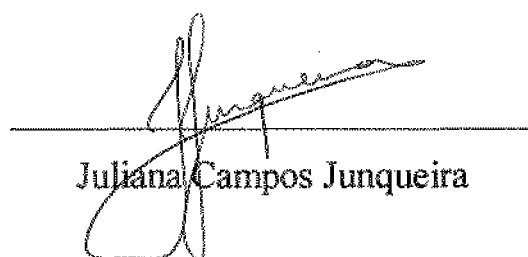
ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effects of the simvastatin on guided bone regeneration of mandibles of ovariectomized rats and to observe the blood cholesterol level in these animals. 70 female rats were divided into four groups; normal control, ovariectomized control, normal treated and ovariectomized treated. A month after the ovariectomy a bone defect was created in the mandible, which was covered by a polytetrafluoroethylene membrane. Immediately after surgery the treated groups received 20 mg/K/day of simvastatin orally for 15 or 30 days. The rats were sacrificed 15, 30 and 60 days after the surgery, a blood sample was extracted to observe the cholesterol levels and the mandible was extracted to densiometric, histological and morphometric analyses. All specimens were submitted to analysis of variance (ANOVA) and to Tukey's method. The ovariectomized groups presented higher cholesterol level than the treated normal group and no significant statistical difference was found between the different treatment periods and the sacrifice times. The densiometric, histological and morphometric analyses showed that the treated ovariectomized group presented more quantity of new bone formation when compared to the control ovariectomized, but no statistical difference was observed between the treatment periods. It can be concluded that the deficiency of estrogen increased the level of blood cholesterol and that the simvastatin helped the new bone formation in the ovariectomized animals.

Key-words: Bone regeneration, simvastatin, ovariectomy, cholesterol, optical densitometry, histomorphometry

Autorizo a reprodução xerográfica deste trabalho

São José dos Campos, 01 de agosto de 2001



Juliana Campos Junqueira