

FÁBIO VIEIRA DE MIRANDA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL E SISTÊMICA DA ATORVASTATINA NO
REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE RATOS**

ARAÇATUBA – SP

2020

FÁBIO VIEIRA DE MIRANDA

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO LOCAL E SISTÊMICA DA ATORVASTATINA NO
REPARO ÓSSEO DE DEFEITOS CRÍTICOS EM CALVÁRIA DE RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
do Campus de Araçatuba – Unesp, para a
obtenção do Grau de DOUTOR EM
ODONTOLOGIA – Área de Concentração
Implantodontia.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez
Faverani

Coorientador: Prof. Associado Osvaldo Magro
Filho

ARAÇATUBA – SP

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M672a Miranda, Fábio Vieira de.
Efeito da administração local e sistêmica da atorvastatina
no reparo ósseo de defeitos críticos em calvária de ratos /
Fábio Vieira de Miranda. – Araçatuba, 2020
67 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Leonardo Perez Faverani

Coorientador: Prof. Osvaldo Magro Filho

1. Osteogênese 2. Atorvastatina 3. Regeneração óssea
I. T.

Black D7
CDD 617.64

DEDICATÓRIA

Eu dedico esta conquista a minha família, em especial a minha esposa, LETÍCIA que me ofereceu todo o suporte que me permitiu realizar o Doutorado. Dedico a ela que durante esses anos de curso me presenteou com a mais linda família, meus 2 filhos LUCCA e MIGUEL.

Dedico aos meus pais, JOÃO e ANA pelos ensinamentos durante toda minha vida.

Dedico aos meus avós, minha avó JACYRA que sempre acreditou nos meus sonhos e ao meu avô ALDO (*in memoriam*) que foi e continua sendo meu maior exemplo.

AGRADECIMENTOS

ESPECIAIS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

No momento que marca o fim desta longa jornada, deixo meu sincero e profundo agradecimento a quantos me deram suporte, coragem e apoio, especialmente:

- A Deus, pela vida;
- Ao Professor e grande AMIGO Leonardo Perez Faverani, meu orientador, uma pessoa íntegra e totalmente comprometida com o ensino, e que durante esses anos de doutorado não foi somente meu orientador, mas também um grande amigo;
- À minha família, principalmente aos meus pais que acreditaram no meu potencial e me deram força para isso tornar-se realidade;
- À minha esposa e melhor MÃE do mundo, que me incentivou e me motivou a concretizar mais esta etapa em minha vida;
- Aos meus filhos Lucca e Miguel pelo incentivo emocional que me forneceram;
- Aos meus verdadeiros amigos que fiz neste trajeto, meus companheiros de pós-graduação, Gustavo, Tarik, William e Valthierre;
- Ao meu coorientador, Professor Osvaldo Magro Filho por todo suporte e apoio;
- Aos professores e funcionários da FOA-UNESP;
- A todos os que me ofereceram auxílio, incluindo as pessoas que não citei nominalmente aqui, agradeço por me permitirem concluir mais uma etapa da minha vida acadêmica e profissional.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, na pessoa do diretor Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara e ao Vice-diretor Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” com o atual Coordenador Prof. Associado André Luiz Fraga Briso.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pela disponibilidade e prontidão.

Aos Funcionários do Diagnóstico e Cirurgia, pelo carinho e respeito.

Aos colegas da pós-graduação (Gustavo, Tarik, William e Valthierre), pela amizade e aprendizado.

Aos técnicos Fernanda e Joseane do laboratório São Camilo de Maringá que me auxiliaram em todo processamento da imunoistoquímica.

Miranda FV. **Efeito da administração local ou sistêmica da atorvastatina no reparo ósseo de defeitos críticos em calvária de ratos**. 2020. 67 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

RESUMO

Objetivo: O presente estudo teve como objetivo comparar o efeito da Atorvastatina, aplicada de forma local e sistêmica, em defeitos críticos de calotas de ratos. **Material e métodos:** 36 (trinta e seis) ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), adultos foram divididos aleatoriamente em 3 grupos, o grupo aplicação de membrana de colágeno com água destilada (GAD) com defeitos de tamanho crítico contendo água destilada; o grupo aplicação Sistêmica de Atorvastatina (GAS) foram realizado defeitos de tamanho crítico e os animais foram tratados com atorvastatina (3,6mg/kg/dia) por gavagem; e o grupo de aplicação local de Atorvastatina (GAL) com defeitos de tamanho crítico contendo Atorvastatina. Cada grupo foi avaliado através da histometria, mensuração do defeito residual, área de osso néo formado (AON), área de membrana e tecido mole, contagem de células (osteócitos, osteoblastos, células inflamatórias) e imunoistoquímica (OSTEOCALCINA e CD31), nos períodos de 14 e 28 dias. **Resultados:** Os dados mostraram diminuição do defeito residual para GAS quando comparada ao GAL ($p=0,024$) e ao GAD ($p=0,033$), o GAS revelou diminuição de número de osteócitos em comparação ao GAD ($p=0,026$), e em comparação com GAL ($p=0,020$). Os osteoblastos não apresentaram diferença entre os grupos ($p>0,05$), a quantidade de fibroblastos mostrou maiores somente para o GAL de 14 para 28 dias ($p=0,019$). Aos 28 dias, tanto para GAL quanto GAS, a quantidade de células inflamatórias foram maiores comparadas ao GAD ($p<0,05$). A marcação de imunoistoquímica para CD31 não apresentou alteração, e OCN nos osteoblastos mostrou maior imunomarcacão aos 14 dias em comparação aos 28 dias somente para o GAS ($p=0,026$; Holm-Sidak), OCN na marcação da matriz extra celular (MEC) mostrou aumento da imunomarcacão aos 14 quando comparado aos 28 dias no GAL e GAS ($p=0,041$; Holm-Sidak). **Conclusão:** A Atorvastatina promoveu efeito positivo na osteogênese e sugere-se que ela não exerça função anti-inflamatória.

Palavras-chave: Osteogênese. Atorvastatina. Regeneração óssea.

Miranda FV. **Effect of local or systemic administration of atorvastatin on bone repair of critical defects in rats' calvaria.** 2020. 67 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2020.

ABSTRACT

Objective: This study aimed to compare the effect of Atorvastatin, applied locally and systemically, on critical defects of rat caps. **Material and medicaments:** 36 (thirty-six) rats (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), adults were randomly divided into 3 groups, the collagen membrane application group with distilled water (GAD) with critical size defects containing distilled water; the systemic application group of Atorvastatin (GAS) was performed with critical size defects and the animals were treated with atorvastatin (3.6mg/kg/day) per gavage; and the local application group of Atorvastatin (GAL) with critical size defects containing Atorvastatin. Each group was evaluated by histometry, measurement of the residual defect, area of neo formed bone (AON), area of membrane and soft tissue, cell count (osteocytes, osteoblasts, inflammatory cells) and immunohistochemistry (OSTEOCALCINE and CD31), in periods of 14 and 28 days. **Results:** The data showed a decrease of residual defect for GAS when compared to GAL ($p=0.024$) and GAD ($p=0.033$), GAS showed a decrease of osteocytes in comparison to GAD ($p=0.026$), and in comparison to GAL ($p=0.020$). The osteoblasts did not present difference between the groups ($p>0.05$), the amount of fibroblasts showed higher only for the GAL from 14 to 28 days ($p=0.019$). At 28 days, both for GAL and GAS, the amount of inflammatory cells were higher compared to GAD ($p<0.05$). The immunohistochemistry marking for CD31 showed no change, and CSF in osteoblasts showed higher immunomarkings at 14 days compared to 28 days only for GAS ($p=0.026$; Holm-Sidak), CSF in extra cellular matrix marking (SCM) showed increased immunomarkings at 14 days compared to 28 days in GAL and GAS ($p=0.041$; Holm-Sidak). **Conclusion:** Atorvastatin promoted a positive effect on osteogenesis and it is suggested that it does not have an anti-inflammatory function.

Keywords: Osteogenesis. Atorvastatin. Bone regeneration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Organograma com a divisão dos grupos	19
Figura 2- Imagens panorâmicas representativas dos períodos de 14 dias, aumento de 4x. Coloração H&E a GAD, b. GAL e c. GAS.....	26
Figura 3- Imagens panorâmicas representativas nos períodos de 28 dias, aumento original de 4x Coloração H&E a. GAD, b. GAL e c. GAS	27
Figura 4- Esquema histológico mostrando em (a) imagem panorâmica aumento original de 4x, (b) aumento da área selecionada 10x e (c) aumento de 40x, coloração H&E. Setas em preto (c) indicando novos osteócitos. GAD 14 dias	28
Figura 5- Esquema histológico mostrando em (a) imagem panorâmica aumento original de 4x, (b) aumento da área selecionada 10x e (c) aumento original de 40x, coloração H&E. Setas em preto (c) indicando novos osteócitos. GAL 14 dias	29
Figura 6- Esquema histológico mostrando em (a) imagem panorâmica aumento original de 4x, (b) aumento da área selecionada 10x e (c) aumento original de 40x, coloração H&E. Setas em preto (c) indicando novos osteócitos. GAS 14 dias.....	30
Figura 7- Esquema histológico mostrando em (a) imagem panorâmica aumento original de 4x, (b) aumento da área selecionada 10x e (c) aumento original de 40x, coloração H&E. Setas em preto (c) indicando novos osteócitos. GAD 28 dias.	31
Figura 8- Esquema histológico mostrando em (a) imagem panorâmica aumento original de 4x, (b) aumento da área selecionada 10x e (c) aumento original de 40x, coloração H&E. Setas em preto (c) indicando novos osteócitos. GAL 28 dias.	32
Figura 9- Esquema histológico mostrando em (a) imagem panorâmica aumento original de 4x, (b) aumento da área selecionada 10x e (c) aumento original de 40x, coloração H&E. Setas em preto (c) indicando novos osteócitos. GAS 28 dias.....	33
Figura 10- Imagem panorâmica com aumento de 4x representando os locais de contagem de células, coto esquerdo, área central e coto direito. Período experimental	

de 14 dias, (a) AD, (b) GAL e (c) GAS. (Coloração H&E, aumento original 1000x). Representando nas imagens com setas os osteoblastos e com * os osteócitos. 34

Figura 11- Imagem panorâmica com aumento de 4x representando os locais de contagem de células, coto esquerdo, área central e coto direito. Período experimental de 28 dias, (a) GAD, (b) GAL e (c) GAS. (Coloração H&E, aumento original 1000x). Representando nas imagens com setas os osteoblastos e com * os osteócitos.. 35

Figura 12- Imagens representativas da análise imunoistoquímica da OCN. Setas em preto mostrando osteoblastos positivos para a marcação e setas em amarelo indicando MEC com marcação positiva. Representando (a-a2) GAD 14 dias, (b-b2) grupo AD 28 dias, (c-c2) GAL 14 dias, (d-d2) GAL 28dias, (e-e2) GAS 14 dias e (f-f2) GAS 28 dias. (a-f) coto esquerdo, (a1-f1) área central e (a2-f2) coto direito. (Aumento de 1000X análise imunoistoquímica de OCN)..... 36

Figura 13- Imagens representativas da análise imunoistoquímica da CD31. Setas em preto mostrando células endoteliais positivas para a marcação. Representando (a-a2) GAD 14 dias, (b-b2) GAD 28 dias, (c-c2) GAL 14 dias, (d-d2) GAL 28dias, (e-e2) GAS 14 dias e (f-f2) GAS 28 dias. (a-f) coto esquerdo, (a1-f1) área central e (a2-f2) coto direito. (Aumento de 1000X análise imunoistoquímica de CD31) 37

Figura 14- Imagem Gráfica representativa dos valores médios e desvio padrão do número de osteócitos para os grupos experimentais GAD, GAL e GAS aos 14 e 28 dias de pós-operatório. * GAL e GAS aos 28 dias mostraram aumento dos valores com $p < 0,05$ 38

Figura 15- Imagem Gráfica representativa dos valores médios e desvio padrão do número de osteoblastos para os grupos experimentais GAD, GAL e GAS aos 14 e 28 dias de pós-operatório. * O número de osteoblastos não apresentou diferenças estatísticas significativas com $p > 0,05$ 38

Figura 16- Imagem Gráfica representativa dos valores médios e desvio padrão do número de fibroblastos para os grupos experimentais GAD, GAL e GAS aos 14 e 28 dias de pós-operatório. * GAL aos 14 e 28 dias mostraram aumento dos valores com $p < 0,05$ 38

Figura 17- Imagem Gráfica representativa dos valores médios e desvio padrão do número de células inflamatórias para os grupos experimentais GAD, GAL e GAS aos 14 e 28 dias de pós-operatório. * GAL e GAS aos 28 dias mostraram aumento dos valores com $p < 0,05$ 39

Figura 18- Imagem Gráfica representativa dos valores médios e desvio padrão do número de células endoteliais com marcação positiva com CD31 para os grupos experimentais GAD, GAL e GAS aos 14 e 28 dias de pós-operatório. * O número de células endoteliais marcadas não apresentou diferenças estatísticas significativas com $p > 0,05$ 39

Figura 19- Imagem Gráfica representativa dos valores médios e desvio padrão do número de osteoblastos com marcação positiva para OCN nos grupos experimentais GAD, GAL e GAS aos 14 e 28 dias de pós-operatório. *somente o GAS aos 14 e 28 dias mostrou aumento dos valores com $p < 0,05$ 39

Figura 20- Imagem Gráfica representativa dos valores médios e desvio padrão dos scores de MEC com marcação positiva para OCN nos grupos experimentais GAD, GAL e GAS aos 14 e 28 dias de pós-operatório. *somente o GAS aos 28 dias mostrou aumento dos valores com $p < 0,05$ 40

LISTA DE ABREVIATURAS

%= Porcentagem

AD= água destilada

AON= Área de osso neoformado

AL= Atorvastatina local

AS= Atorvastatina Sistêmica

BMPs= Proteína morfogenética óssea

Ct= Tomografia computadorizada

CEUA= Comitê de Ética no Uso de Animais

DTC= Defeito de tamanho crítico

EUA= Estados Unidos da América

et. al= e colaboradores (outros)

Fig.= Figura

FOA= Faculdade de Odontologia de Araçatuba

GAD= Grupo água destilada

GAL= Grupo atorvastatina local

GAS= Grupo atorvastatina sistêmica

HMG-CoA= 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductase

LTDA= limitada

MEC= Matriz extra celular

OCN= Osteocalcina

PVPI= polivinilpirrolidona iodo

TGF- β = fator de crescimento transformador beta

TIF= Formato de arquivo de imagens com tags

TNF α = Fator de Necrose Tumoral α

UNESP= Universidade Estadual Paulista

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	3
2 PROPOSIÇÃO	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Anestesia e procedimento cirúrgico	17
3.2 Eutanásia e preparo das amostras para análise microscópica	19
3.3 Histometria	20
3.3.1 Defeito linear residual.....	20
3.3.2 Área de membrana e tecido mole	20
3.3.3 Área de osso neoformado	20
3.4 Contagem de células.....	21
3.5 Imunoistoquímica	21
3.5.1 CD31	21
3.5.2 Osteocalcina (osteoblastos)	22
3.5.3 Osteocalcina (MEC)	22
3.6 Análise estatística.....	22
4 RESULTADOS	23
4.1 Histometria	23
4.1.1 Defeito Linear residual.....	23
4.1.2 Área de membrana e tecido mole	23
4.1.3 Área de osso neoformado	23
4.2 Contagem de células.....	23
4.2.1 Osteócitos.....	23
4.2.2 Osteoblastos.....	24
4.2.3 Fibroblastos	24
4.2.4 Células inflamatórias	24
4.3 Imunoistoquímica	25
4.3.1 CD31	25
4.3.2 Osteocalcina (osteoblastos)	25
4.2.3 Osteocalcina (MEC)	25
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS.....	50

1 INTRODUÇÃO

Na literatura, é possível observar estudos relacionados à reparação de defeitos ósseos críticos tanto na área médica como na odontológica. Dessa forma, várias pesquisas são realizadas em busca da reparação ou de um substituto ósseo ideal, que apresente propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras.¹⁻³

No processo de reparação óssea, primeiramente os osteoclastos são ativados e encaminhados para o local de reparação onde realizam a reabsorção do osso trabecular. Após esta fase, acontece a inativação da reabsorção óssea, os osteoclastos são substituídos por macrófagos, que realizam a remoção da matriz e restos celulares, ocorrendo, assim, a fase de reversão, pois induz a sua substituição óssea. Os osteoblastos iniciam a formação de uma nova matriz, sintetizando colágeno e outras substâncias, formando o osteoide, substância na qual será formadora do osso novo.⁴⁻⁶

Estudos mostram que as Proteínas BMPs são essenciais para o desenvolvimento e remodelação óssea, estando presentes na formação endocondral e intramembranosa. Elas agem estimulando e promovendo a diferenciação das células, formação de matriz cartilaginosa, e a sua presença também promove a quimiotaxia.⁷⁻¹¹ A alteração da concentração das BMPs foi observada em diversos estudos realizados em que as estatinas se mostraram capazes de promover o aumento nas concentrações das proteínas BMPs, favorecendo a formação óssea.¹²⁻

14

As estatinas são lipoproteínas utilizadas principalmente no tratamento de hipercolesterolemia, para reduzir os níveis de colesterol no sangue, inibindo a enzima HMG-CoA redutase.¹⁵ O colesterol é fundamental para o correto funcionamento do organismo, fazendo parte de mecanismos importantes como a produção de hormônios, metabolismo do cálcio, de forma fundamental na formação e manutenção óssea^{3, 16}, porém em níveis muito elevados tendem a ser prejudiciais.^{6, 17, 18}

As principais estatinas comercializadas são: pravastatina, sinvastatina, fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, pitavastatina e rosuvastatina. Todas apresentam estruturas análogas, a (3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductase), sendo que ela atua pela inibição da HMG-CoA redutase, coenzima que participa da

biossíntese do colesterol, e formação deste colesterol no fígado.^{19, 20} A última listagem de medicamentos realizada antes da quebra da patente da Atorvastatina a posicionava nos EUA como a droga mais vendida em 2010, segundo dados da indústria.²¹ Além de diminuir os níveis de colesterol no sangue, as estatinas agem como anti-inflamatórios, antioxidantes, antibacterianos e também atuam na osteogênese e angiogênese.^{2, 3, 22-27}

Dentre os diversos estudos na literatura a respeito de regeneração óssea foi possível encontrar alguns que utilizam o grupo das estatinas para estimular os fatores osteogênicos. Estudos realizadas por Mundy et al. e Ayukawa et al. mostram que, além de reduzir os níveis de colesterol, há outros efeitos benéficos das Estatinas como a sinalização e ou estimulação das BMP-2 e diferenciação osteoblástica, indicando um potencial osteogênico. Isso tem despertado a atenção para novas pesquisas na área de regeneração óssea.^{2, 3}

A dificuldade encontrada para aplicação clínica da estatina é encontrar um método e administração da substância apropriados.²⁸ Essa dificuldade também foi observada em revisão sistemática e meta análise.²⁹ Foi avaliado no estudo os efeitos osteogênicos locais da fluvastatina incorporada à gelatina biodegradável em ratos, avaliando o micro Ct e histológico, concluindo que a gelatina biodegradável contendo fluvastatina promoveu osteogênese em calvaria de ratos, revelando o potencial deste método em estudos de regeneração.²⁸

Além disso, estudo in vivo utilizando defeitos críticos em crânio de coelhos avaliaram o uso de sinvastatina administrada localmente com o BioOss®, assim, observaram através da histologia, imunoistoquímica e fluorescência, sugerindo que o uso local de sinvastatina melhora significativamente a regeneração óssea nas fases iniciais de cicatrização.²⁶

Mundy et al. realizaram o estudo in vitro e in vivo, utilizando respectivamente a cultura óssea de calvária de neonatos (lovastatina, sinvastatina, fluvastatina e mevastatina) e injeções subcutâneas em ratos (lovastatina e sinvastatina). Dessa forma, observaram o aumento na neoformação óssea pelo uso de sinvastatina e lovastatina, podendo estas estatinas promover a diferenciação dos osteoblastos pela estimulação da BMP-2.³

Também, verificou-se que diversos estudos em animais^{2, 3, 15, 30-32} foram realizados para avaliação de regeneração óssea utilizando sinvastatina sistêmica. Alguns autores^{24, 33, 34} utilizaram a atorvastatina em animais para avaliar a

regeneração e metabolismo ósseo. A classificação das estatinas quanto à solubilidade e origem apresentam diferenças, a sinvastatina é a estatina mais lipofílica e de origem natural, já a atorvastatina é menos lipofílica e de origem sintética³⁵. Essas características das estatinas estão relacionadas diretamente com a absorção, podendo variar de acordo com a via de administração escolhida.²⁹

A estatina induz a diferenciação osteoblástica, consequentemente a osteogênese e a nova formação óssea. Isto ocorre pelo aumento da expressão BMP-2 e supressão da apoptose de osteoblastos. Esta revisão mostrou que existe bastante controvérsia em relação à dose, via de administração e efeitos da terapia. Sendo necessário mais estudos a longo prazo e futuros ensaios clínicos para estabelecer uma relação entre as opções de administração com o reparo ósseo e a regeneração.²³

Estudo clínico utilizou a sinvastatina em região pós-operatória de terceiros molares, apresentou aumento com diferença estatisticamente significativa nos valores médios de cinza no grupo que utilizou sinvastatina quando comparados ao grupo controle. O estudo apresentou limitação quanto ao tempo, que não foi adequado, para verificar a eficácia da Sinvastatina na reparação óssea completa. Com isso, ele requer estudos histológicos e novos ensaios clínicos.¹⁹

Observa-se grande divergência de opiniões e resultados sobre a ação e influência das estatinas no tecido ósseo. Sugerindo novos estudos para tentar estabelecer a dosagem e modo de administração para poder avaliar esses efeitos.³⁶

Uma revisão sistemática concluíram que nem todas as estatinas foram testadas, observaram que tem dificuldade para estipular a concentração eficaz e também o meio de administração da droga, sugerindo mais estudos.²⁹

Outro fator relevante observado em alguns estudos foram que a maioria das estatinas não apresentam efeito colateral significativos favorecendo o seu uso de forma sistêmica e local.^{29, 37} Estudo em animais utilizaram sinvastatina, lovastatina e atorvastatina, observou-se que a atorvastatina foi a única que apresentou toxicidade hepática e miopatia.³⁷

2 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho de pesquisa comparou o efeito da Atorvastatina, aplicada de forma local e sistêmica, em defeitos críticos de calotas de ratos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Seguindo o guia de referência para estudos em animais ³⁸, 36 (trinta e seis) ratos (*Rattus Norvegicus*, *Albinus*, *Wistar*), adultos, com peso corporal entre 400 e 450g foram utilizados para a realização deste estudo. Os animais foram cedidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP, mantidos em gaiolas, em ambiente climatizado. Esses foram alimentados com ração sólida padrão e água “ad libitum”, durante todo o experimento. O projeto de pesquisa foi inicialmente enviado para o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP, o qual obteve parecer favorável sob o protocolo número FOA nº 00161-2017 (ANEXO A).

3.1 Anestesia e procedimento cirúrgico

Após jejum de 12 horas pré-operatório sem restrição hídrica, os animais foram submetidos à sedação por meio da administração via intramuscular de Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil Farmacêuticos LTDA, Campinas, Brasil), na dosagem de 70mg/Kg, e do Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), 5mg/Kg. Após indução anestésica, foi realizada tricotomia na região fronto-parietal, posicionamento do animal em decúbito ventral e anti-sepsia da área com polivinilpirrolidona (PVPI) tópico.

O acesso cirúrgico foi realizado por meio de incisão semicircunferencial no sentido antero-posterior. O retalho total foi rebatido e assim, exposição do osso parietal de ambos os lados foi obtida. Uma trefina cirúrgica (Härte precision grip) de diâmetro interno de 4 mm e externo de 5 mm (Anexo C), e com auxílio de um motor de baixa rotação foi realizada a osteotomia na região mediana entre os parietais até a cortical interna. O osso parietal osteotomizado foi removido e a dura-máter mantida intacta, deixando um defeito de tamanho crítico (DTC) de 5mm de diâmetro. ³⁹

Os grupos foram divididos da seguinte forma;

Grupo água destilada (GAD), a membrana Bio-Gide® foi embebida com água destilada após a confecção do defeito ósseo.

Grupo atorvastatina local (GAL) receberam localmente atorvastatina, após a confecção do defeito e posicionamento da membrana Bio-Gide®, a mesma foi

embebida com a solução de 4,3mg de atorvastatina dissolvida em 10mL de água destilada.²⁸

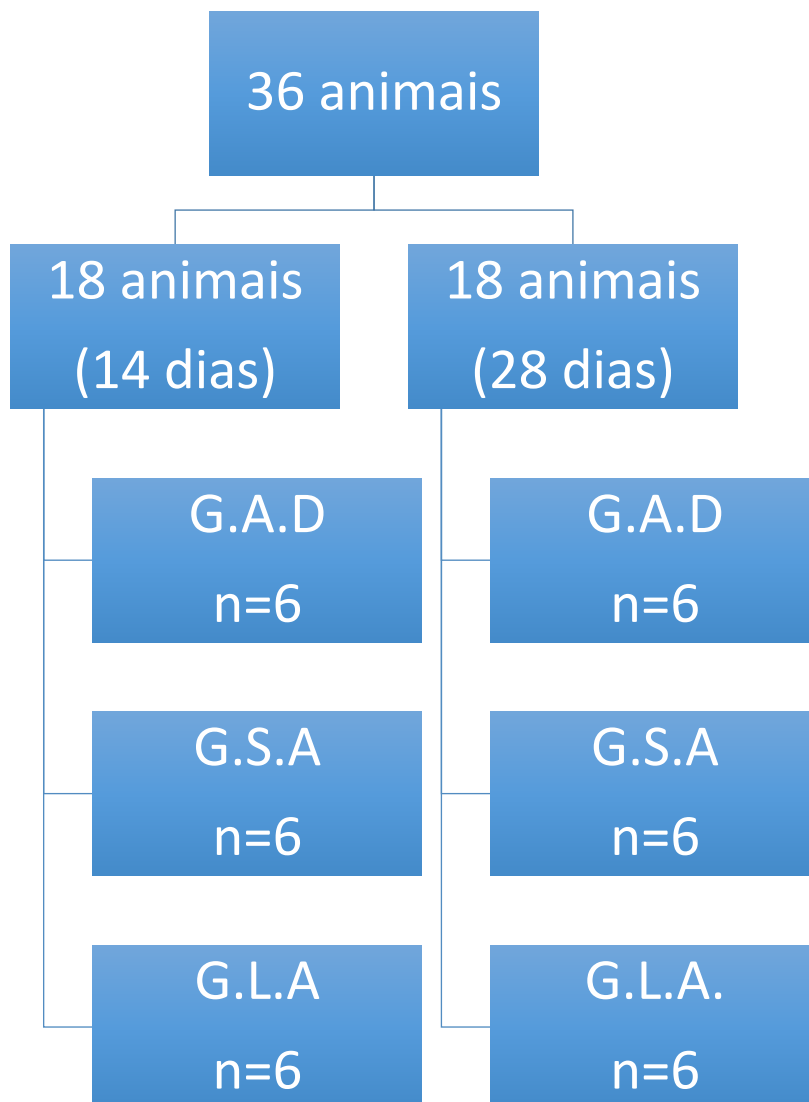
Grupo atorvastatina sistêmica (GAS) tratados com atorvastatina sistêmica receberam o medicamento por gavagem na concentração de 3,6mg/kg/dia⁴⁰.

A eutanásia foi realizada em 14 e 28 dias de pós-operatório. (Imagens da metodologia, ANEXO C) e como ilustrado no organograma a seguir (Figura 2).

O defeito ósseo foi realizado em 36 animais, divididos em 3 grupos, e preenchidos de acordo com o grupo representado. Finalizado o procedimento, o retalho total foi reposicionado, a sutura foi feita com fio de Seda 4-0 (ETHICON Nylon Suture®, Johnson, São José dos Campos, Brasil) por pontos interrompidos simples.

O DTC de todos os animais foi sobreposto com a membrana de colágeno (membrana Bio-Gide®: Membrana de Colágeno Natural Porcino Reabsorvível Geistlich, Wolhusen, Suíça) e preenchido por coágulo.

Figura 1- Organograma com a divisão dos grupos



Fonte: Autor

3.2 Eutanásia e preparo das amostras para análise microscópica

Em cada período de pós-operatório, 6 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia, por meio de superdosagem anestésica utilizando o Pentobarbital Sódico na dosagem de 150 mg/Kg pela via intraperitoneal.

As calvárias foram removidas e fixadas em solução de formalina tamponada 10% (Reagentes Analíticos; Dental Dinâmica Ltda, Catanduva, Brasil) por 48 horas e depois lavadas em água corrente por 24 horas.

A área do defeito cirúrgico original e os tecidos circunjacentes foram removidos

em bloco. Após descalcificação inicial em solução de Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10%, cada espécime foi dividido longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original. Após um período de descalcificação⁴¹ adicional, as peças foram processadas conforme protocolo de inclusão em parafina. Foram realizados cortes semisseriados com 5 µm de espessura na direção longitudinal, em que as lâminas histológicas de codificação “par” foram coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E) e as “ímpares” para análise histomorfométrica.

3.3 Histometria

Os cortes foram montados em lâminas histológicas e fixados com lamínula e resina permont. Estas lâminas foram fotomicrografadas em microscópio óptico (Nikon® eclipse E100) acoplado à uma câmera fotográfica (Biovera® IS500). As imagens foram obtidas com a objetiva de 4x, 10x, 40X e 100x, o menor aumento foi realizado para montar as imagens panorâmicas do defeito, e na sequência imagens ampliada (10x, 40x e 100x) na porção central do defeito crítico e nas laterais, áreas dos cotos direito e esquerdo para coloração em hematoxilina e eosina (H&E) e imunoistoquímica.

3.3.1 Defeito linear residual

Utilizando as imagens panorâmicas foram realizadas a análise do defeito residual, mensurada de forma linear, através da ferramenta “straight”.

3.3.2 Área de membrana e tecido mole

O programa de captura de imagens utilizado foi o ISListen versão 3.2. Foram gravadas em arquivo TIF e analisadas em programa computacional IMAGE J (Programa Analisador de Imagens, Ontário, Canadá). Para o cálculo histométrico da área de membrana e tecido mole na região do defeito crítico, inicialmente o programa foi calibrado para utilizar pixels como medida padrão, na ferramenta “set scale”. Posteriormente, as imagens foram abertas no programa e, assim, pela ferramenta “freehands” foi calculada a área em pixels, quando houve a presença de áreas separadas foi realizado a somatória das áreas.

3.3.3 Área de osso neoformado

Para o cálculo histométrico da área de osso neoformado na região do defeito crítico, foi utilizada a mesma metodologia adotada para calcular a área de membrana e tecido mole.

3.4 Contagem de células

A contagem de células foi realizada a partir de imagens capturadas em aumento de 1000X ⁴², lâminas coradas com H&E. As imagens foram capturadas em três locais; coto esquerdo (imediatamente entre a interface do osso remanescente), área central do defeito e coto direito (imediatamente entre a interface do osso remanescente), de acordo com adaptações a partir da publicação de Benetti, 2019 ⁴³. A seguir, foi realizado a contagem de células inflamatórias, osteoblastos, fibroblastos e osteócitos. para contabilizar estas células foi utilizada a ferramenta tipo “crosses” no IMAGE J com 10000 pixels por área, totalizando 494 “crosses” por imagem.

3.5 Imunoistoquímica

As reações imunoistoquímicas foram feitas a partir do tecido que foi submetido ao processo de desparafinização. Após este processo e tratamento dos tecidos com soluções próprias para recuperação de epítopes, os cortes histológicos foram incubados com painel de anticorpos policlonais CD31 Lote A0649 (Biorbyt®) e OSTEOCALCINA (OCN) Lote BS7110 (Biorbyt®). Estas proteínas foram escolhidas para avaliar as respostas celulares referentes a vascularização ⁴⁴ e mineralização óssea ⁴⁴⁻⁴⁷, respectivamente. A amplificação foi realizada por polímeros em processo totalmente automatizado, no equipamento Ventana BenchMark GX. A revelação foi feita com kit UltraView DAB Lote F07797-F07855- (HRP Multimer. número de série: 1452607, Chromogen, número de série: 1497597, Cooper. número de série: 1454240, Inhibitor. número de série: 1467415 e H2O2. número de série 1465306)

Controles positivos e negativos foram utilizados para atestar a fidelidade das reações. As reações imunoistoquímicas foram avaliadas através da análise quantitativa, realizada a partir da contagem das células marcadas.⁴³ As imagens foram capturadas com o mesmo protocolo utilizado para a contagem de células na histometria. A contagem de células foi realizada a partir de imagens capturadas em aumento de 1000X ⁴², para contabilizar as células foi utilizada a ferramenta “grid” tipo “crosses” no IMAGE J com 10000 pixels por área, totalizando 494 “crosses” por imagem. As imagens foram capturadas em três locais: coto esquerdo do defeito, área central e coto direito do defeito, de acordo com adaptações a partir da publicação de Benetti 2019 ⁴³.

3.5.1 CD31

A seguir foi realizado a contagem das células endoteliais marcadas positivamente para o anticorpo CD31.

3.5.2 Osteocalcina (osteoblastos)

Já com o anticorpo OCN foram identificadas e contabilizadas células osteoblasticas e pré osteoblasticas.

3.5.3 Osteocalcina (MEC)

Foi realizado a análise semi quantitativa para mensurar a Matriz extra celular (MEC), para esta análise foi utilizada um SCORE de imunomarcção ⁴³ que variou de 0 a 4, onde 0 sem Imunomarcção (ausência de rotulagem na matriz extracelular e ausência completa de células imunoreativas), 1 Imunoexpressão baixa (rotulagem fraca da matriz extracelular e aproximadamente um quarto das células imunoreativas), 2 Imunoexpressão moderada (rotulagem moderada da matriz extracelular e aproximadamente metade das células imunoreativas), 3 Imunoexpressão forte (forte rotulagem da matriz extracelular e aproximadamente três quartos das células imunoreativas) e 4 Imunoexpressão muito severa (rotulagem extremamente forte da matriz extracelular e aproximadamente todas as células imunoreativas).

O score foi realizado por um examinador treinado previamente e calibrado. Os dados coletados na histometria e imunoistoquímica foram agrupados em uma planilha e submetidos a análises estatísticas. A matriz extra celular é composta por colágeno em sua maior parte e pela substância fundamental, que contem proteínas não colagenosas. Uma destas proteínas presentes em maior abundância é a Osteocalcina, ela é sintetizada exclusivamente por osteoblastos. A osteocalcina parece estar envolvida no controle do processo de mineralização do osso, prevenindo a mineralização excessiva⁴⁸

3.6 Análise estatística

Todos os testes estatísticos foram analisados no programa estatístico SigmaPlot 12.0 (Exakt graph and Data analysis, San Jose, CA, USA), considerando o nível de significância de 5%.

Para todos os parâmetros quantitativos analisados nesta pesquisa, a normalidade dos valores obtidos foi testada através do teste Shapiro-Wilk que indicou serem homogêneos ($p > 0,05$). Posteriormente o teste ANOVA dois fatores foi aplicado e seguindo de Pós-teste Holm-Sidak quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Histometria

4.1.1 Defeito Linear residual

Em relação do defeito residual linear, de uma maneira geral, pode-se observar a diminuição do defeito para GAS quando comparada ao GAL ($p=0,024$) e ao GAD ($p=0,033$). A interação GAL versus GAD não apresentou diferença estatística ($p=0,765$), revelando que tanto aos 14 dias quanto aos 28 dias o GAS demonstrou menor defeito residual que GAL e GAD.

4.1.2 Área de membrana e tecido mole

A degradação da membrana não sofreu nenhuma influência da Atorvastatina, a qual demonstrou degradação paulatina durante os tempos, não diferindo quanto a presença e também com o tipo de aplicação da atorvastatina ($p>0,05$).

4.1.3 Área de osso neoformado

A análise histológica está representada no quadro geral das imagens panorâmicas (Figuras 2 e 3), vistas em menor aumento 4X para avaliar a presença dos cotos e do defeito. Na análise histológica nos aumentos de 4x, 10x e 40x, no período de 14 dias, a área de proximidade com a borda do defeito (Figura 4, 5 e 6), notou-se formação de novo osso, com osteoblastos jovens e área de grande celularidade.

A presença da atorvastatina no período de 14 dias revelou maior quantidade de osteoblastos ativos e osteócitos, e a aplicação sistêmica (GAS), pôde-se notar uma pequena alteração do tecido, observando maior quantidade tecido ósseo.

Aos 28 dias (Figura 7, 8 e 9), a qualidade do tecido ósseo se alterou, ficando com áreas mais maduras, mais notado com a presença da atorvastatina, e o uso sistêmico proporcionou maior quantidade de tecido mineralizado e osteoblastos.

4.2 Contagem de células

A contagem de células foi realizada em 3 locais, representadas pelo coto direito, área central e coto esquerdo (Figura 10, 11, 12 e 13) a qual está com os dados representativos nos gráficos (Figura 14, 15, 16 e 17).

4.2.1 Osteócitos

A contagem de osteócitos no coto esquerdo apresentou diferença estatística significativa no teste ANOVA em relação ao grupo ($p=0,012$). Para determinar a

variação entre os grupos foi feito o método Holm-Sidak e pode-se observar que a contagem de osteócitos não se alteraram cronologicamente de 14 dias para os 28 dias. O GAS revelou diminuição de número de osteócitos em comparação ao GAD ($p=0,026$), e a diminuição no GAS em comparação com GAL ($p=0,020$). Não foi observado diferença quando os grupos foram comparados aos 14 dias ($p>0,05$), já aos 28 dias somente GAS apresentou maiores valores quando comparado com GAD ($p=0,025$).

O número de osteócitos na área central apresentou diferença estatística significativa no teste ANOVA em relação ao fator de variação “grupo” ($p=0,039$).

Para determinar a variação entre os grupos foi feito o método Holm-Sidak e pode-se observar maior número de osteócitos quando comparados o fator de variação “grupo” para o GAL quando comparado ao GAD ($p=0,035$). Para a contagem de osteócitos no coto direito, todos os parâmetros avaliados foram similares ($p>0,05$; ANOVA 2 fatores) (Figura 14).

4.2.2 Osteoblastos

A quantidade de osteoblastos no coto esquerdo, na área central e no coto direito foram similares, independente do parâmetro analisado ($p>0,05$; ANOVA 2 fatores) (Figura 15).

4.2.3 Fibroblastos

A quantidade de fibroblastos no coto esquerdo mostrou maiores somente para o GAL de 14 para 28 dias ($p=0,019$). Na avaliação intra grupos no período de 14 dias GAL não diferiram de GAD e as outras comparações tiveram diferenças e aos 28 dias nenhum grupo se diferiu, eles foram similares.

A quantidade de fibroblastos na área central e no coto direito foi semelhante para todos os grupos, independente do período analisado ($P>0,05$, ANOVA 2 fatores) (Figura 16).

4.2.4 Células inflamatórias

O número de células inflamatórias nos cotos esquerdo e direito não apresentaram diferença estatística significativa no teste ANOVA. Na área central apresentou diferença estatística significativa no teste ANOVA em relação ao grupo X tempo $p=0,046$. Aos 14 dias não diferiu GAS do GAD, teve maior número de células inflamatórias no GAL. Aos 28 dias tanto o GAL quanto GAS a quantidade de células foi maior comparada ao GAD (Figura 17).

4.3 Imunoistoquímica

4.3.1 CD31

Na imunoistoquímica, as células endoteliais positivas para o marcador CD31 não apresentaram diferença estatística significativa em nenhum dos locais avaliados ou períodos analisados (14 e 28 dias) ($p>0,05$; ANOVA 2 fatores) (Figura 18).

4.3.2 Osteocalcina (osteoblastos)

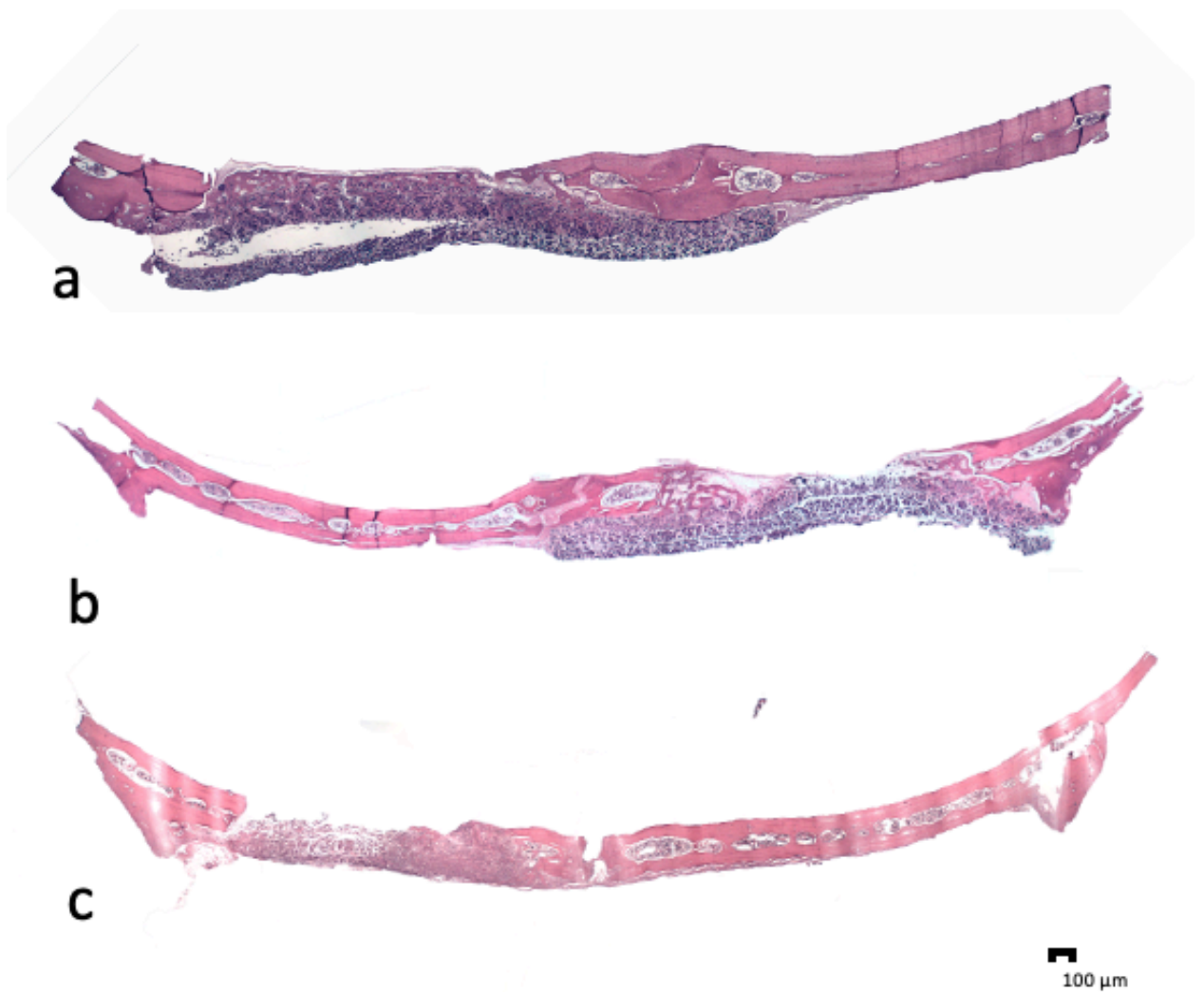
A contagem dos osteoblastos com marcação positiva para OCN nos cotos esquerdo e direito foi similar para os grupos e períodos analisados ($p>0,05$; ANOVA 2 fatores). Na área central, a contagem de osteoblastos marcados positivamente com OCN, cronologicamente mostrou maior imunomarcação aos 14 dias em comparação aos 28 dias somente para os GAS ($p=0,026$; Holm-Sidak). As demais comparações foram similares para os grupos ($p>0,05$) (Figura 19).

4.2.3 Osteocalcina (MEC)

A marcação da MEC pelo marcador OCN no coto esquerdo mostrou que somente o GAL mostrou diminuição da imunomarcação de 14 para 28 dias ($p=0,041$; Holm-Sidak). As demais comparações foram similares para os grupos ($p>0,05$).

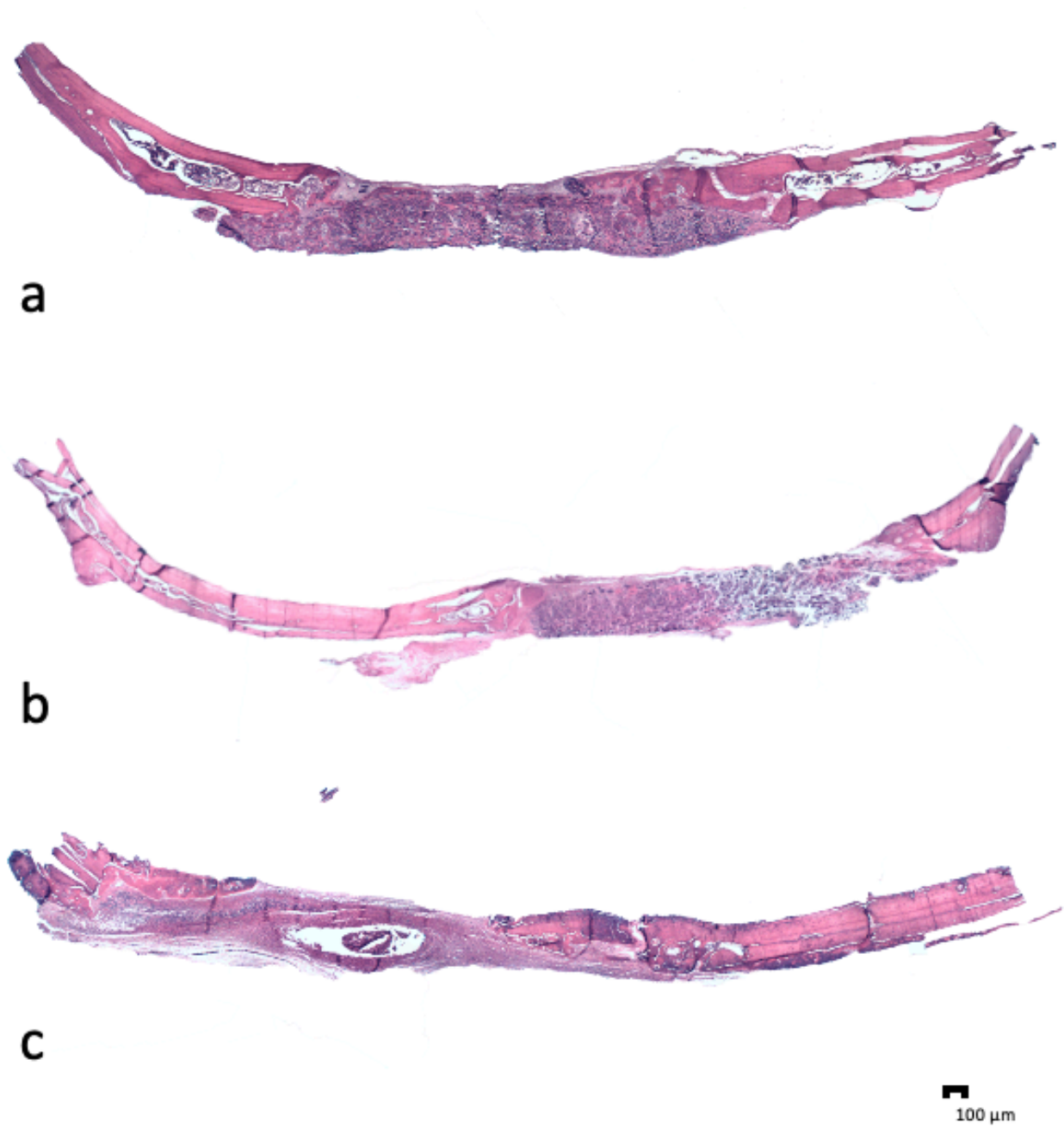
Na área central, a MEC marcada com OCN apresentou menor imunomarcação na evolução cronológica somente para GAS ($p<0,001$; Holm-Sidak). As demais comparações foram similares para os grupos ($p>0,05$) (Figura 20).

Figura 2- Imagens panorâmicas representativas dos períodos de 14 dias, aumento de 4x. Coloração H&E a GAD, b. GAL e c. GAS



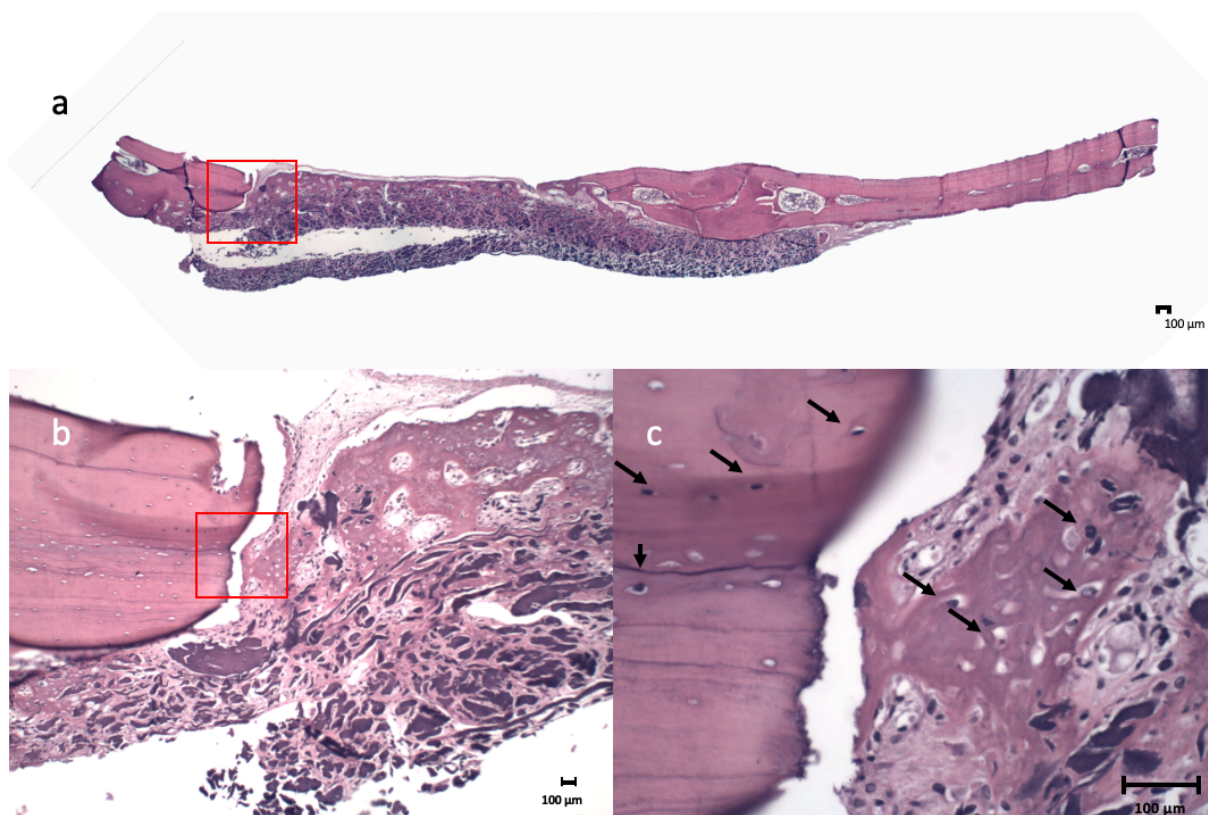
Fonte: Autor

Figura 3- Imagens panorâmicas representativas nos períodos de 28 dias, aumento original de 4x Coloração H&E a. GAD, b. GAL e c. GAS



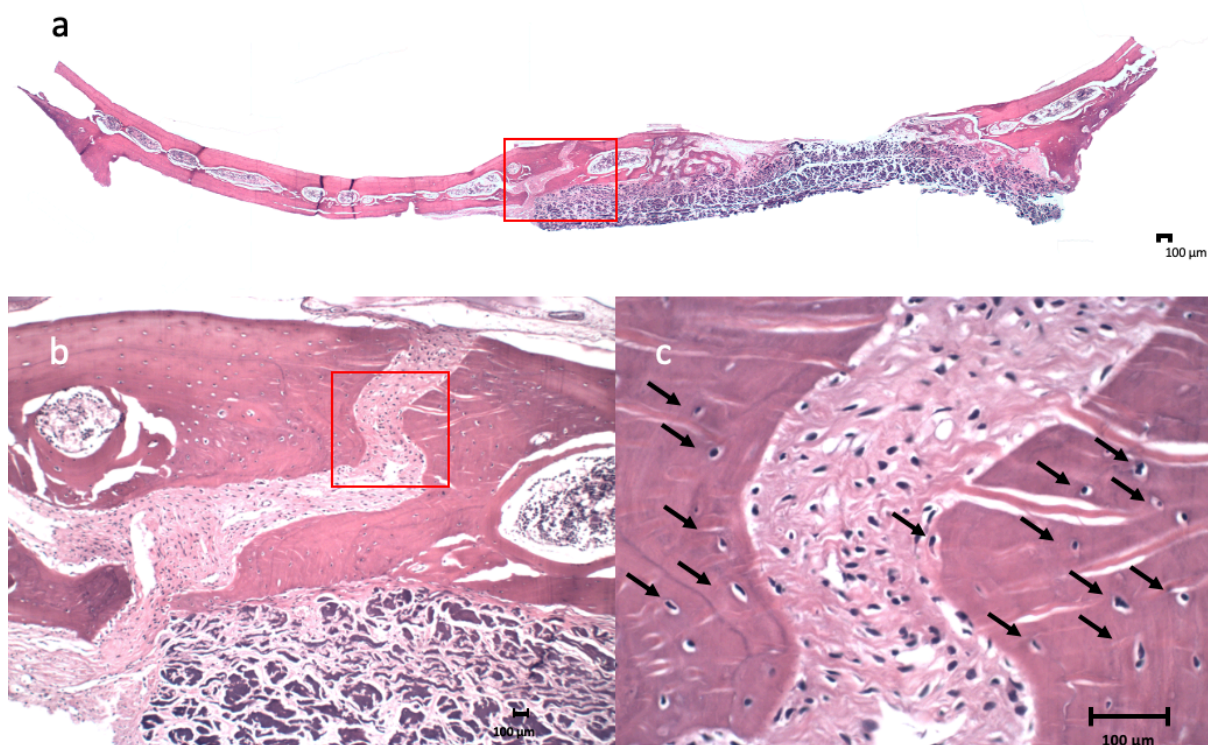
Fonte: Autor

Figura 4- Esquema histológico mostrando em (a) imagem panorâmica aumento original de 4x, (b) aumento da área selecionada 10x e (c) aumento de 40x, coloração H&E. Setas em preto (c) indicando novos osteócitos. GAD 14 dias



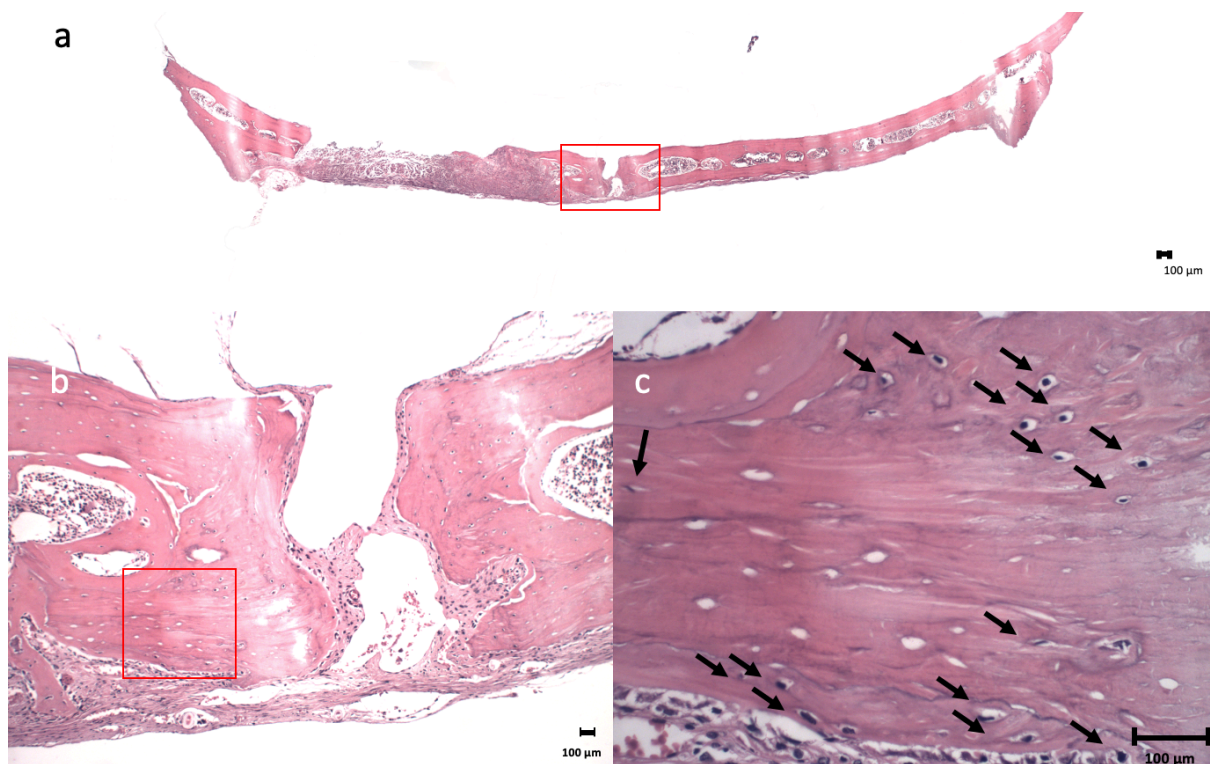
Fonte: Autor

Figura 5- Esquema histológico mostrando em (a) imagem panorâmica aumento original de 4x, (b) aumento da área selecionada 10x e (c) aumento original de 40x, coloração H&E. Setas em preto (c) indicando novos osteócitos. GAL 14 dias



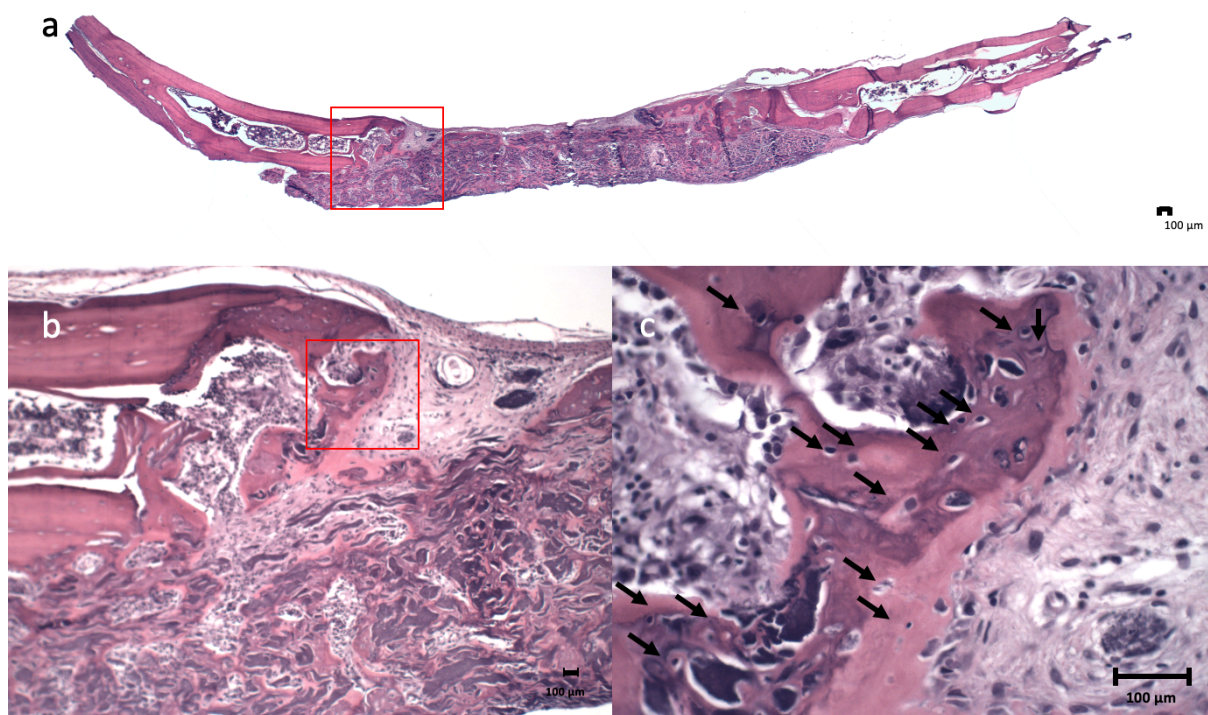
Fonte: Autor

Figura 6- Esquema histológico mostrando em (a) imagem panorâmica aumento original de 4x, (b) aumento da área selecionada 10x e (c) aumento original de 40x, coloração H&E. Setas em preto (c) indicando novos osteócitos. GAS 14 dias.



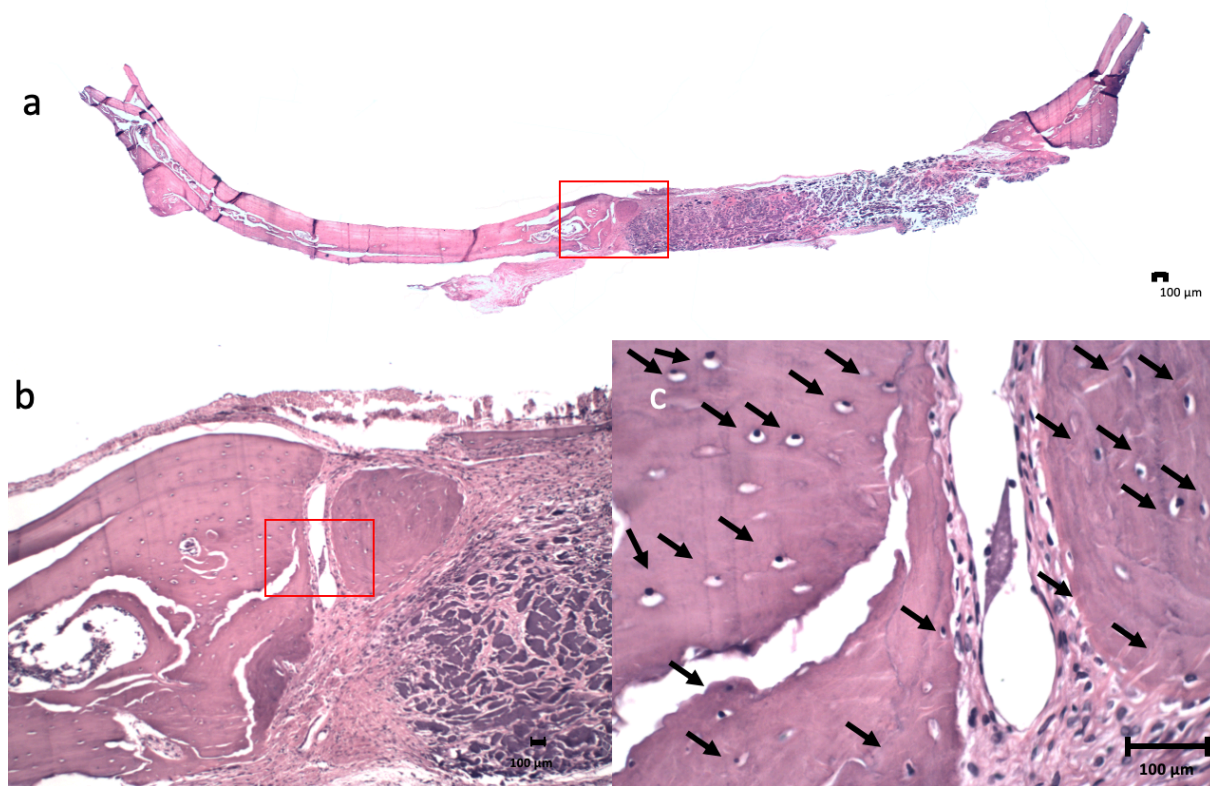
Fonte: Autor

Figura 7- Esquema histológico mostrando em (a) imagem panorâmica aumento original de 4x, (b) aumento da área selecionada 10x e (c) aumento original de 40x, coloração H&E. Setas em preto (c) indicando novos osteócitos. GAD 28 dias.



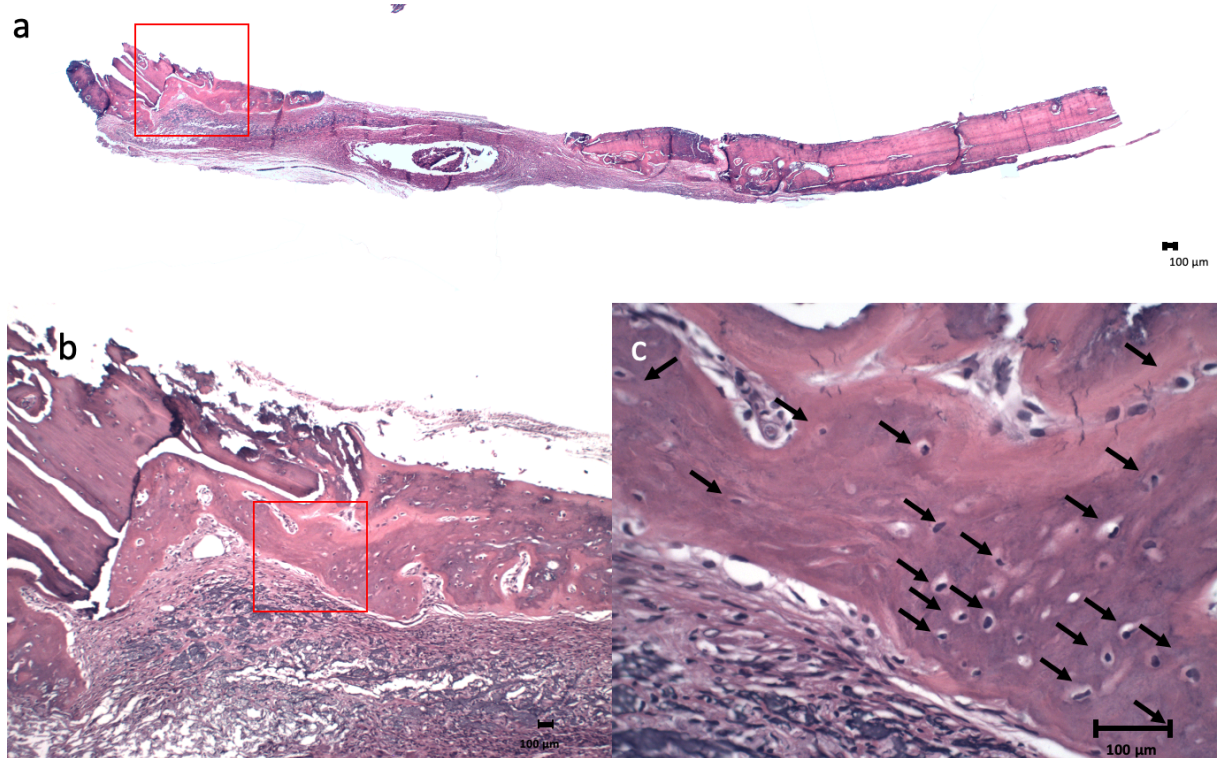
Fonte: Autor

Figura 8- Esquema histológico mostrando em (a) imagem panorâmica aumento original de 4x, (b) aumento da área selecionada 10x e (c) aumento original de 40x, coloração H&E. Setas em preto (c) indicando novos osteócitos. GAL 28 dias.



Fonte: Autor

Figura 9- Esquema histológico mostrando em (a) imagem panorâmica aumento original de 4x, (b) aumento da área selecionada 10x e (c) aumento original de 40x, coloração H&E. Setas em preto (c) indicando novos osteócitos. GAS 28 dias.



Fonte: Autor

Figura 10- Imagem panorâmica com aumento de 4x representando os locais de contagem de células, coto esquerdo, área central e coto direito. Período experimental de 14 dias, (a) AD, (b) GAL e (c) GAS. (Coloração H&E, aumento original 1000x). Representando nas imagens com setas os osteoblastos e com * os osteócitos.

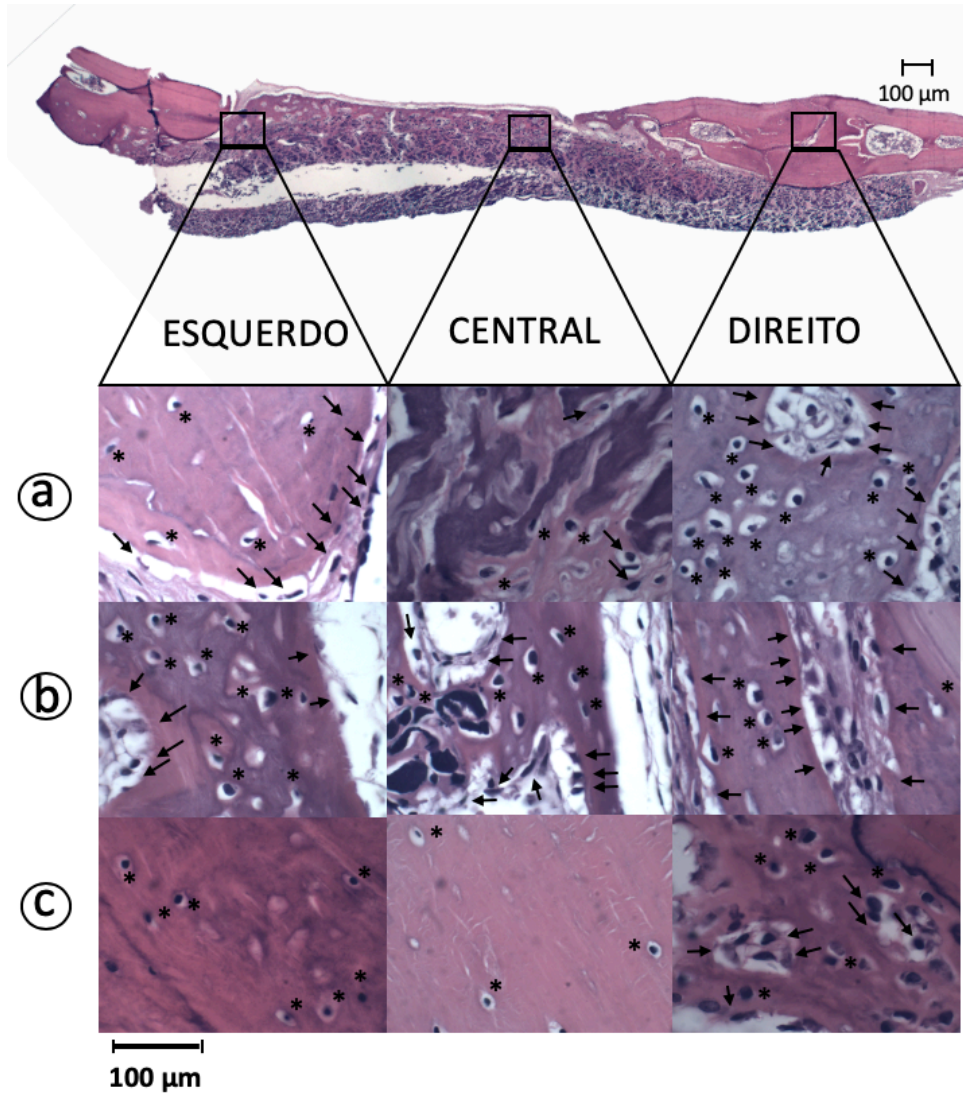


Figura 11- Imagem panorâmica com aumento de 4x representando os locais de contagem de células, coto esquerdo, área central e coto direito. Período experimental de 28 dias, (a) GAD, (b) GAL e (c) GAS. (Coloração H&E, aumento original 1000x). Representando nas imagens com setas os osteoblastos e com * os osteócitos..

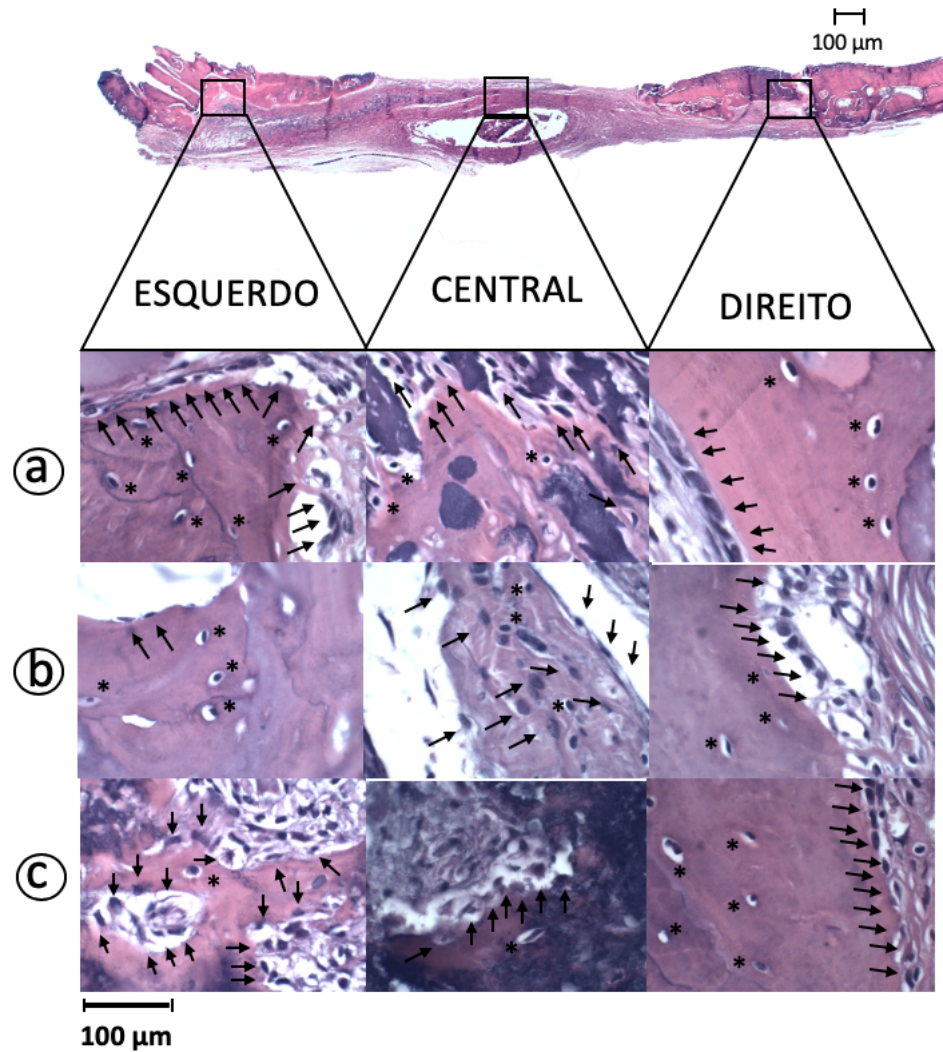
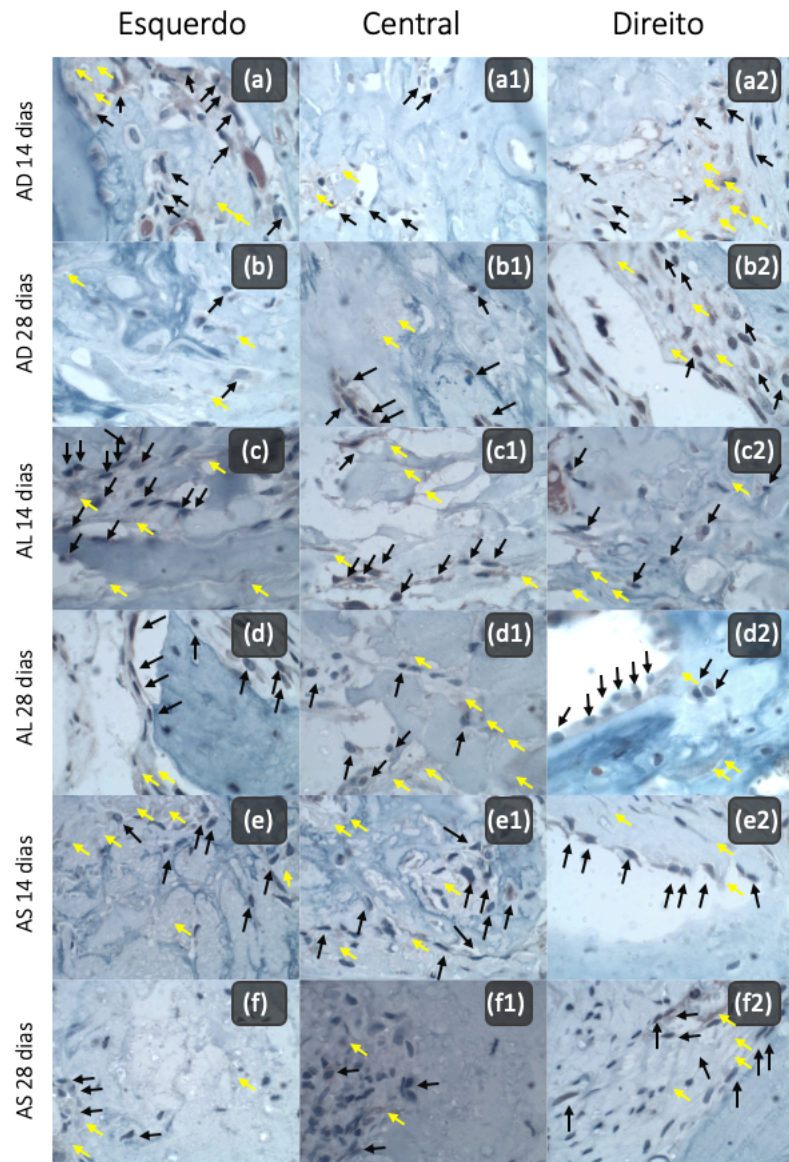
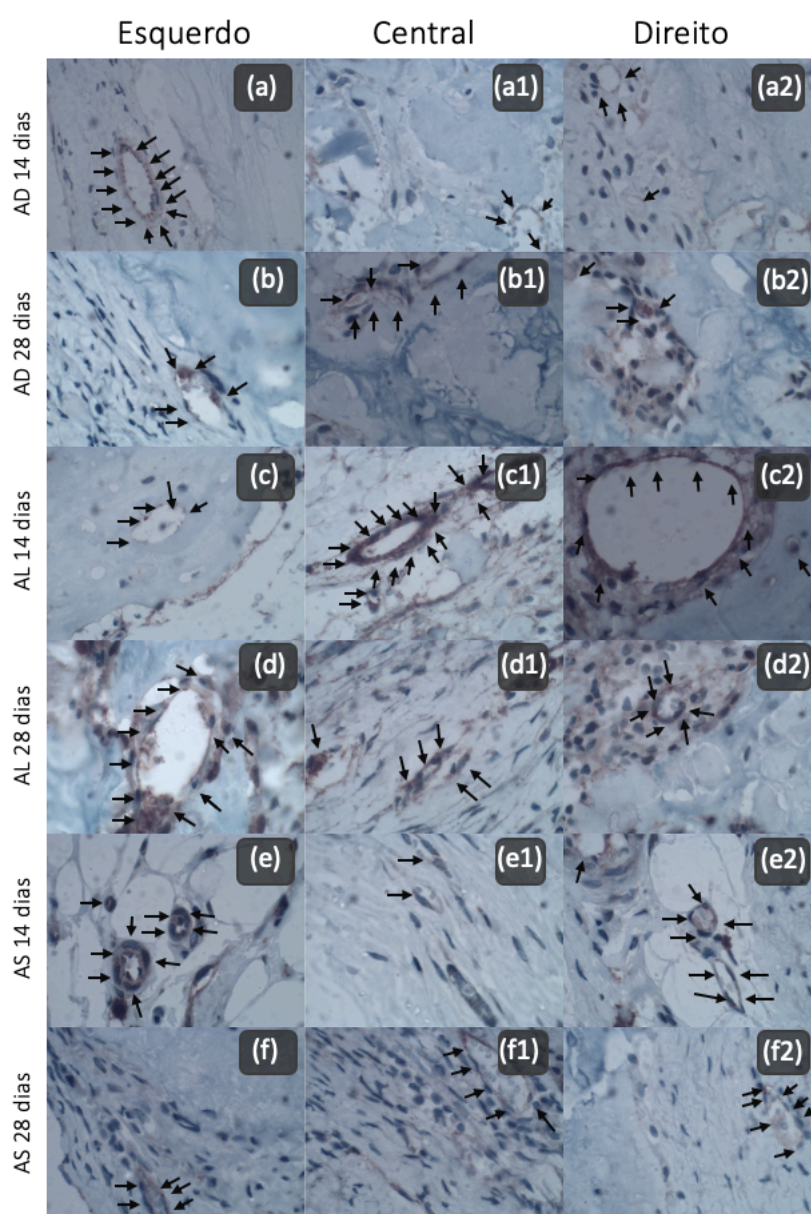


Figura 12- Imagens representativas da análise imunoistoquímica da OCN. Setas em preto mostrando osteoblastos positivos para a marcação e setas em amarelo indicando MEC com marcação positiva. Representando (a-a2) GAD 14 dias, (b-b2) grupo AD 28 dias, (c-c2) GAL 14 dias, (d-d2) GAL 28dias, (e-e2) GAS 14 dias e (f-f2) GAS 28 dias. (a-f) coto esquerdo, (a1-f1) área central e (a2-f2) coto direito. (Aumento de 1000X análise imunoistoquímica de OCN)



Fonte: Autor

Figura 13- Imagens representativas da análise imunoistoquímica da CD31. Setas em preto mostrando células endoteliais positivas para a marcação. Representando (a-a2) GAD 14 dias, (b-b2) GAD 28 dias, (c-c2) GAL 14 dias, (d-d2) GAL 28 dias, (e-e2) GAS 14 dias e (f-f2) GAS 28 dias. (a-f) coto esquerdo, (a1-f1) área central e (a2-f2) coto direito. (Aumento de 1000X análise imunoistoquímica de CD31)



Fonte: Autor

Figura 14- Imagem Gráfica representativa dos valores médios e desvio padrão do número de osteócitos para os grupos experimentais GAD, GAL e GAS aos 14 e 28 dias de pós-operatório. * GAL e GAS aos 28 dias mostraram aumento dos valores com $p<0,05$.

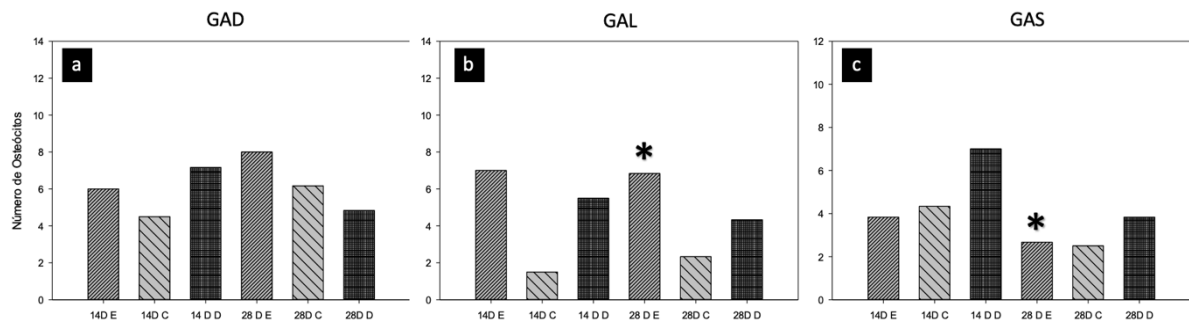


Figura 15- Imagem Gráfica representativa dos valores médios e desvio padrão do número de osteoblastos para os grupos experimentais GAD, GAL e GAS aos 14 e 28 dias de pós-operatório. * O número de osteoblastos não apresentou diferenças estatísticas significativas com $p>0,05$.

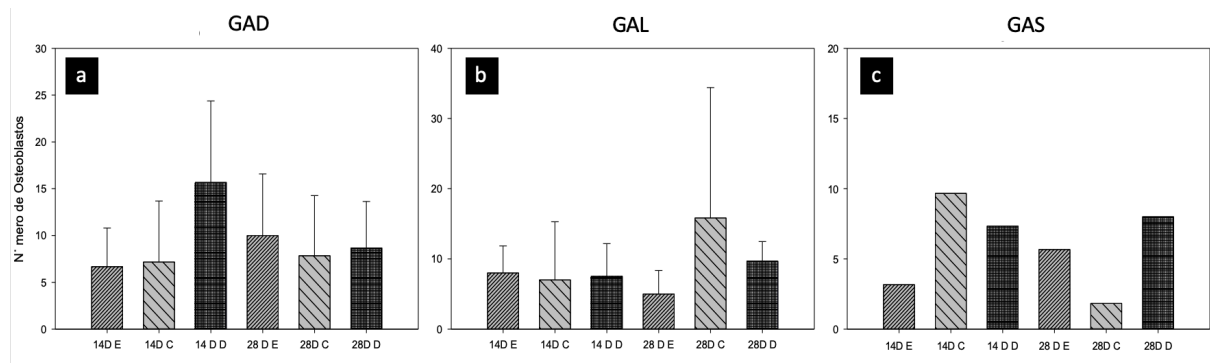


Figura 16- Imagem Gráfica representativa dos valores médios e desvio padrão do número de fibroblastos para os grupos experimentais GAD, GAL e GAS aos 14 e 28 dias de pós-operatório. * GAL aos 14 e 28 dias mostraram aumento dos valores com $p<0,05$.

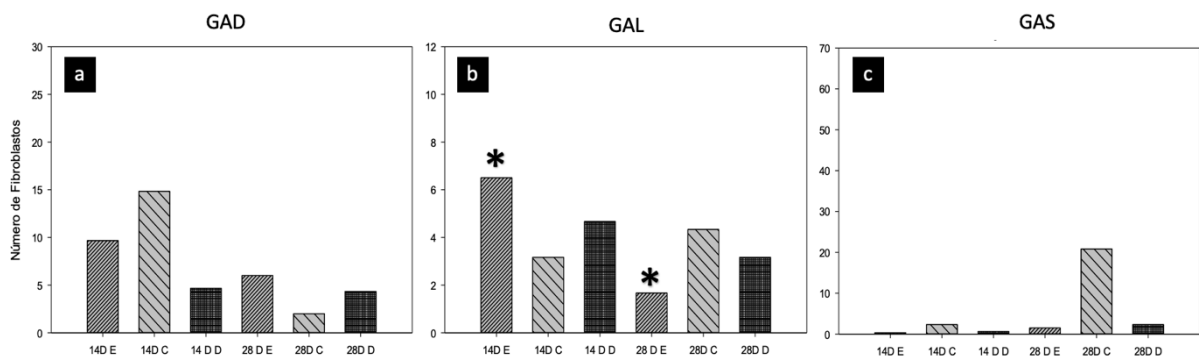


Figura 17- Imagem Gráfica representativa dos valores médios e desvio padrão do número de células inflamatórias para os grupos experimentais GAD, GAL e GAS aos 14 e 28 dias de pós-operatório. * GAL e GAS aos 28 dias mostraram aumento dos valores com $p<0,05$.

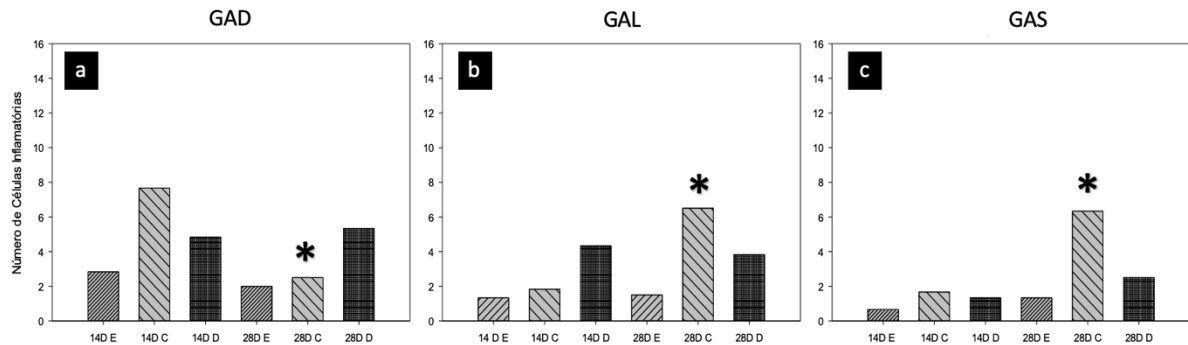


Figura 18- Imagem Gráfica representativa dos valores médios e desvio padrão do número de células endoteliais com marcação positiva com CD31 para os grupos experimentais GAD, GAL e GAS aos 14 e 28 dias de pós-operatório. * O número de células endoteliais marcadas não apresentou diferenças estatísticas significativas com $p>0,05$.

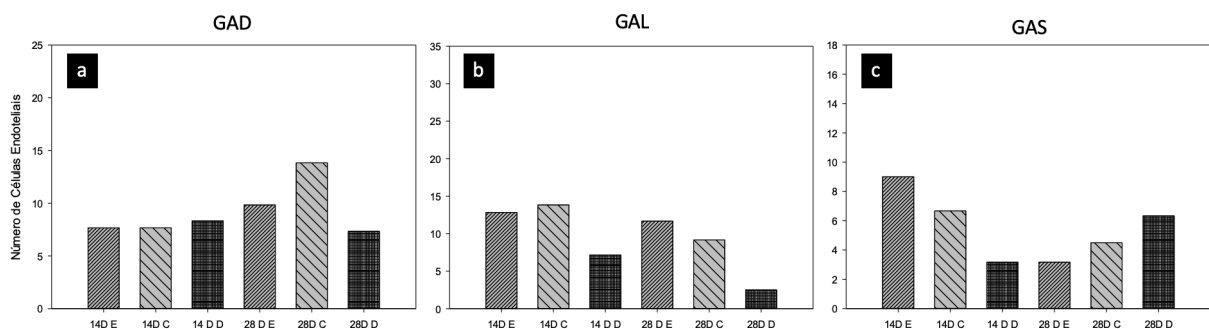


Figura 19- Imagem Gráfica representativa dos valores médios e desvio padrão do número de osteoblastos com marcação positiva para OCN nos grupos experimentais GAD, GAL e GAS aos 14 e 28 dias de pós-operatório. *somente o GAS aos 14 e 28 dias mostrou aumento dos valores com $p<0,05$.

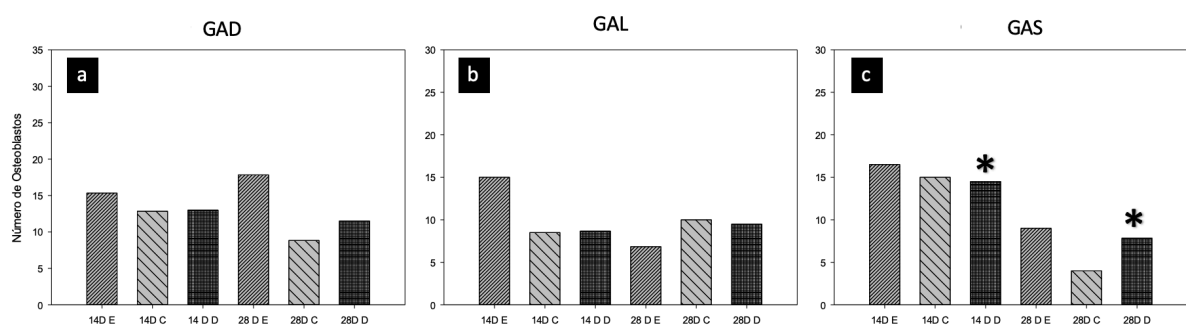
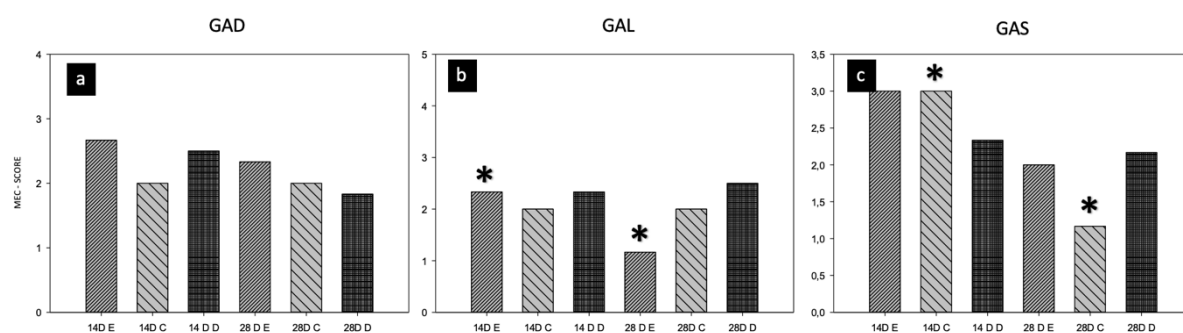


Figura 20- Imagem Gráfica representativa dos valores médios e desvio padrão dos scores de MEC com marcação positiva para OCN nos grupos experimentais GAD, GAL e GAS aos 14 e 28 dias de pós-operatório. *somente o GAS aos 28 dias mostrou aumento dos valores com $p<0,05$.



5 DISCUSSÃO

A investigação proposta por este estudo por meio das análises histomorfométrica e imunoistoquímica revelou que o aumento significativo da neoformação óssea nos defeitos de tamanho crítico foi observado no uso de Atorvastatina administrada sistemicamente.

O aumento significativo da área de osso neoformado não pôde ser observado nos grupos GAD e GAL, somente no GAS quando comparado com os demais, inclusive, as Figuras 7 e 10 evidenciam o aumento da quantidade de osteócitos viáveis e osteoblastos ativos para o GAS.

Esses achados indicam que a atorvastatina administrada sistemicamente exerceu um efeito osteogênico positivo, contribuindo para a formação óssea. Além disso, a aplicação local com AD e AL mostraram AON semelhantes nos períodos pós-operatórios de 14 e 28 dias.

Os resultados quantitativos também sugeriram que a administração sistêmica reduziu linearmente o defeito residual com o passar do tempo, conduzindo a neoformação óssea para o fechamento mais efetivo do defeito. Na histometria pode-se observar que o defeito residual linear foi menor no GAS. Isso pode ter relação com a via de administração da droga. Pela via sistêmica é mais fácil padronizar a quantidade de droga absorvida pelo organismo, como mostra estudos anteriores que existe diferença entre as formas de administração da droga, além da dificuldade de estabelecer a dosagem ideal ou a dosagem máxima para o efeito da droga.^{23, 28, 29, 37}

Na literatura há a utilização de estatinas em estudos animais, em que não é notada padronização, apresentando grande variação, de 0,1 a 120 mg/kg^{2, 23, 24, 37, 49-51}. Além da dose, o que difere do presente estudo é o tipo de estatina. A maioria dos estudos utilizaram a sinvastatina, e poucos estudos experimentais utilizaram atorvastatina. A atorvastatina é utilizada na maioria dos estudos clínicos⁵²⁻⁵⁴ em doses que variam de 10 a 80 mg/dia. Dificultando a comparação dos dados da literatura com os resultados obtidos neste estudo. A dose de atorvastatina sistêmica utilizada neste estudo foi 3,6mg/kg/dia, utilizada para animais com hipercolesterolemia, seguindo o estudo de Lin, S⁴⁰, em que esta dose não apresentou efeitos colaterais e revelou resultados osteogênicos positivos. A dose local utilizada neste estudo foi 4,3mg de atorvastatina dissolvida em 10mL de água destilada²⁸ por apresentar efeitos osteogênicos e nenhum efeito colateral.

A avaliação das doses de estatinas foram realizadas em alguns estudos.^{2, 55} No trabalho de Ayukawa, Y. et al somente a sinvastatina foi avaliada e, no estudo de Matriz, F.J.⁵⁵ et al diversas doses de sinvastatina foram testadas, na ordem de 1, 5, 10 e 20 mg/dia, mas somente uma dose de atorvastatina (2,5mg/kg/dia), não permitindo avaliar a dose mais efetiva desta última.

A área de membrana e de tecido mole não foi influenciada pela atorvastatina, além de não ser observado qualquer efeito colateral local, como necrose muscular relatado por Shahrezaee, M. et al.³⁷ em estudo experimental, que utilizou 20 mg/kg/dia de atorvastatina sistêmica. Além desta miopatia, a atorvastatina nesta dose apresentou hepatotoxicidade. O relato deste efeito colateral sistêmico de hepatotoxicidade foi o único relatado, e a dose utilizada foi superior a este estudo. Também não encontramos relatos de outros efeitos adversos envolvendo as demais estatinas.

No 14º dia após a cirurgia, a AON no tratamento com atorvastatina sistêmica foi significativamente maior do que com a atorvastatina local e água destilada. ($p=0,0281$). Além disso, linearmente, o defeito ósseo residual com uso de atorvastatina sistêmica foi significativamente menor do que o grupo de atorvastatina local e grupos de água destilada tratados no 14º dia após a cirurgia ($p=0,0236$; $p=0,016$, respectivamente). Com resultados diferentes Xu, X.C. et al demonstrou que o ganho ósseo foi significativo utilizando sinvastatina local 0,8 mg/0.05 mL em defeitos periodontais.⁵³ Este resultado atribuindo maior ganho ósseo com uso local pode ser justificado por se tratar de fármacos e doses distintas, ou também pela diferença na magnitude dos defeitos que pode ter influenciado os resultados.

Em relação à histomorfologia, por meio da contagem de células foi possível avaliar que não houve aumento do número celular em algumas regiões analisadas, tais como osteoblastos, fibroblastos e osteócitos. Pensando em nível de proliferação celular a atorvastatina se comportou semelhante a água destilada, somente com aumento do número de células pontuais e esse dado corrobora com o estudo de Shahrezaee, M. H. et al.³⁷

A contagem de células inflamatórias apresentaram diferenças estatísticas na área central, área crítica do defeito, onde aumentou aos 28 dias nas duas vias de administração. A inflamação faz parte o processo de reparo ósseo, entretanto para o defeito de 5 mm na calvária de ratos aos 28 dias, é um período em longo prazo do

reparo para apresentar processo inflamatório abundante. Esses achados são incongruentes com a propriedade anti-inflamatória sugerida por alguns autores.^{24 52}

Em relação à imunomarcagem do CD31, não houve proliferação vascular acentuada na presença das atorvastatinas, diferente de estudos anteriores que atribuem as estatinas maior proliferação endotelial e aumento do efeito anti-inflamatório.^{35, 51 24}

A CD31 utilizada neste estudo faz a marcação positiva somente em células endoteliais, não demonstra a expressão de proteínas nos osteoblastos diferenciados e em diferenciação. Estudo mais específico que utilizou o fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF) pode observar o aumento da expressão deste marcador em osteoblastos através da prenitação reduzida de proteínas.³⁵ A utilização de apenas um marcador vascular foi uma possível limitação do presente estudo. Onde não pode-se observar as características descritas na literatura^{2, 24, 27, 35, 51} das estatinas, que seria de promover a proliferação celular e efeito anti-inflamatório.

Estudo com cultura de células atribui a propriedade angiogênica à estatina por induzir a produção de óxido nítrico e inibir a apoptose de células endoteliais.²⁷ Por se tratar de um estudo *in vitro* encontramos limitações para comparar esses dados com os resultados do presente estudo. Entretanto, nota-se que a presença da atorvastatina não promoveu ação anti-inflamatória e não induziu a angiogênese de forma significativa. O aumento das células inflamatórias não interferiu na formação óssea, pois para ocorrer o reparo a presença de células inflamatórias se faz necessária, já os vasos sanguíneos observados nas lâminas se mostraram suficientes para promover a osteogênese.

A diminuição da marcação de OCN em osteoblastos e na MEC aos 14 dias para GAS complementa os achados da histometria, que revelou o aumento da AON. Como observado em estudo clínico com atorvastatina administrada de forma sistêmica em casos de osteoporose.⁵⁴ Já o estudo de Yue, X. Et al.²⁶ mostrou a administração local mais efetiva. Em relação ao benefício osteogênico das estatinas, outros estudos apresentaram resultados favoráveis, além de maior diferenciação de osteoblastos.^{2, 23, 51}

Ainda para a comprovação dos efeitos positivos da atorvastatina no reparo ósseo, os dados de degradação da membrana de colágeno e a AON mostraram que a membrana mesmo em defeito crítico é capaz de conduzir a formação óssea com

aumento dos dados reparacionais, como também visto por estudo prévio.⁵⁶ E mesmo assim, em especial a atorvastatina sistêmica promoveu maior osteogênese.

Neste estudo encontramos algumas limitações, que também são compartilhadas na literatura ^{23, 28, 29, 37}, tais como estabelecer a dose máxima efetiva das estatinas tanto na via sistêmica quanto local. Outra limitação do estudo foi o uso de apenas uma estatina, que neste estudo foi a atorvastatina, escolhida por ser a estatina mais utilizada para o tratamento de hipercolesterolemia.²¹ Apesar das estatinas apresentarem semelhança estrutural, temos diferença quanto a solubilidade³⁵. Essas características das estatinas estão relacionadas diretamente com a absorção, podendo variar de acordo com a via de administração escolhida.²⁹

Estudos futuros devem ser realizados para determinar a dose mais efetiva de atorvastatina para osteogênese, isto deve ser realizado para padronizar os estudos e para estabelecer uma dose a ser utilizada em estudos clínicos sem efeitos adversos. Outra proposta é comparar diferentes estatinas para estabelecer a mais efetiva.

6 CONCLUSÃO

Portanto, os resultados mostraram que a administração sistêmica de Atorvastatina promoveu efeito positivo na osteogênese de defeitos críticos na calvária de rato. Sugere-se que Atorvastatina não exerça função anti-inflamatória e não promova efeitos adicionais quanto a proliferação endotelial.

REFERÊNCIAS

1. Roden RD, Jr. Principles of bone grafting. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2010;22(3):295-300, v.
2. Ayukawa Y, Ogino Y, Moriyama Y, Atsuta I, Jinno Y, Kihara M, et al. Simvastatin enhances bone formation around titanium implants in rat tibiae. *J Oral Rehabil.* 2010;37(2):123-30.
3. Mundy G. GR, Harris S., Chan J., Chen D., Rossini G., Boyce B., Zhao M., Gutierrez G. Stimulation of Bone Formation in Vitro and in Rodents by Statins. *Science.* 1999;286(5446):1946-9.
4. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001;10 Suppl 2:S96-101.
5. Guyton AC. *Fisiologia Humana.* 11 ed 1981.
6. Mandal CC. High Cholesterol Deteriorates Bone Health: New Insights into Molecular Mechanisms. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015;6:165.
7. Sykaras N, Opperman LA. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *J Oral Sci.* 2003;45(2):57-73.
8. Senta H, Park H, Bergeron E, Drevelle O, Fong D, Leblanc E, et al. Cell responses to bone morphogenetic proteins and peptides derived from them: biomedical applications and limitations. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(3):213-22.
9. Jain AP, Pundir S, Sharma A. Bone morphogenetic proteins: The anomalous molecules. *J Indian Soc Periodontol.* 2013;17(5):583-6.
10. Chenard KE, Teven CM, He TC, Reid RR. Bone morphogenetic proteins in craniofacial surgery: current techniques, clinical experiences, and the future of personalized stem cell therapy. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:601549.
11. Rohanizadeh R, Chung K. Hydroxyapatite as a carrier for bone morphogenetic protein. *J Oral Implantol.* 2011;37(6):659-72.
12. Zhang H, Lin CY. Simvastatin stimulates chondrogenic phenotype of intervertebral disc cells partially through BMP-2 pathway. *Spine (Phila Pa 1976).* 2008;33(16):E525-31.
13. Liu C, Wu Z, Sun HC. The effect of simvastatin on mRNA expression of transforming growth factor-beta1, bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor in tooth extraction socket. *Int J Oral Sci.* 2009;1(2):90-8.
14. Nyan M, Sato D, Kihara H, Machida T, Ohya K, Kasugai S. Effects of the combination with alpha-tricalcium phosphate and simvastatin on bone regeneration. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(3):280-7.
15. Soares EA, Novaes RD, Nakagaki WR, Fernandes GJ, Garcia JA, Camilli JA. Metabolic and structural bone disturbances induced by hyperlipidic diet in mice treated with simvastatin. *Int J Exp Pathol.* 2015;96(4):261-8.
16. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature.* 2000;404(6778):635-43.
17. Helfenstein FFA. Farmacocinética das estatinas. *Arq Bras Cardiol [Internet].* 2005; 85(5):[9-14 pp.].
18. You L, Sheng ZY, Tang CL, Chen L, Pan L, Chen JY. High cholesterol diet increases osteoporosis risk via inhibiting bone formation in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2011;32(12):1498-504.

19. Chauhan AS, Maria A, Managutti A. Efficacy of Simvastatin in Bone Regeneration After Surgical Removal of Mandibular Third Molars: A Clinical Pilot Study. *J Maxillofac Oral Surg.* 2015;14(3):578-85.
20. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet.* 1994;344(8934):1383-9.
21. Health USSapil. U.S. Spending and prescription information. IMS Health <http://www.imshealth.com/portal/site/imshealth/menuitem.a46c6d4df3db4b3d88f611019418c22a/?vgnnextoid=ed2e5a6b5895f210VgnVCM100000ed152ca2RCRD&cpsextcurrchannel=1> 2010 [
22. Almog Y, Novack V, Eisinger M, Porath A, Novack L, Gilutz H. The effect of statin therapy on infection-related mortality in patients with atherosclerotic diseases. *Crit Care Med.* 2007;35(2):372-8.
23. Oryan A, Kamali A, Moshiri A. Potential mechanisms and applications of statins on osteogenesis: Current modalities, conflicts and future directions. *J Control Release.* 2015;215:12-24.
24. Sun G, Li Y, Ji Z. Atorvastatin attenuates inflammation and oxidative stress induced by ischemia/reperfusion in rat heart via the Nrf2 transcription factor. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(9):14837-45.
25. Masadeh M, Mhaidat N, Alzoubi K, Al-Azzam S, Alnasser Z. Antibacterial activity of statins: a comparative study of atorvastatin, simvastatin, and rosuvastatin. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012;11:13.
26. Yue X, Niu M, Zhang T, Wang C, Wang Z, Wu W, et al. In vivo evaluation of a simvastatin-loaded nanostructured lipid carrier for bone tissue regeneration. *Nanotechnology.* 2016;27(11):115708.
27. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med.* 2000;6(9):1004-10.
28. Tanabe K, Nomoto H, Okumori N, Miura T, Yoshinari M. Osteogenic effect of fluvastatin combined with biodegradable gelatin-hydrogel. *Dent Mater J.* 2012;31(3):489-93.
29. Bertl K, Steiner I, Pandis N, Buhlin K, Klinge B, Stavropoulos A. Statins in nonsurgical and surgical periodontal therapy. A systematic review and meta-analysis of preclinical in vivo trials. *J Periodontal Res.* 2018;53(3):267-87.
30. Du Z, Chen J, Yan F, Xiao Y. Effects of Simvastatin on bone healing around titanium implants in osteoporotic rats. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(2):145-50.
31. Garip S, Severcan F. Determination of simvastatin-induced changes in bone composition and structure by Fourier transform infrared spectroscopy in rat animal model. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;52(4):580-8.
32. Zhang Y, Zhang R, Li Y, He G, Zhang D, Zhang F. Simvastatin augments the efficacy of therapeutic angiogenesis induced by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of hindlimb ischemia. *Mol Biol Rep.* 2012;39(1):285-93.
33. Goes P, Lima NA, Rodrigues JA, Benevides NM, Brito GA, Lima V. Anti-inflammatory and Anti-resorptive Effects of Atorvastatin on Alveolar Bone Loss in Wistar Rats. *Braz Dent J.* 2016;27(3):267-72.
34. MirHashemi AH, Afshari M, Alaeddini M, Etemad-Moghadam S, Dehpour A, Sheikhzade S, et al. Effect of atorvastatin on orthodontic tooth movement in male wistar rats. *J Dent (Tehran).* 2013;10(6):532-9.

35. Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology*. 2003;144(2):681-92.
36. Anbinder AL, QM, Rocha RF. As estatinas e o tecido ósseo: revisão de literatura. *Revista de Odontologia da UNESP*. 2006;35(4):239-46.
37. Shahrezaee M, Oryan A, Bastami F, Hosseinpour S, Shahrezaee MH, Kamali A. Comparative impact of systemic delivery of atorvastatin, simvastatin, and lovastatin on bone mineral density of the ovariectomized rats. *Endocrine*. 2018;60(1):138-50.
38. Group NCRGW. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *J Physiol*. 2010;588(Pt 14):2519-21.
39. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimoës R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res*. 2014;25(8):879-93.
40. Sien L, JH, Ziwei F., Yanlong L., Haiyou W., Liang liang X., Yuxin S., Wayne L., Tie W., Ling Q., Liao C., Gang L. The Effects of Atorvastatin on the Prevention of Osteoporosis and Dyslipidemia in the High-Fat-Fed Ovariectomized Rats. *Calcified Tissue International*. 2015;96(6):541-51.
41. Messoria MR, Nagata MJ, Dornelles RC, Bomfim SR, Furlaneto FA, de Melo LG, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontal Res*. 2008;43(6):723-9.
42. Cintra LT, Benetti F, Ferreira LL, Rahal V, Ervolino E, Jacinto Rde C, et al. Evaluation of an experimental rat model for comparative studies of bleaching agents. *J Appl Oral Sci*. 2016;24(2):171-80.
43. Benetti F, Briso ALF, de Araujo Lopes JM, Carminatti M, Conti LC, Gallinari MO, et al. In vivo analysis of the presence of heme oxygenase-1, transcription factor Jun-D and CD90+/CD73+/CD105+/CD45- cells in the pulp of bleached teeth. *Int Endod J*. 2019;52(12):1723-37.
44. Bonardi JP, Pereira RDS, Boos Lima F, Faverani LP, Griza GL, Okamoto R, et al. Prospective and Randomized Evaluation of ChronOS and Bio-Oss in Human Maxillary Sinuses: Histomorphometric and Immunohistochemical Assignment for Runx 2, Vascular Endothelial Growth Factor, and Osteocalcin. *J Oral Maxillofac Surg*. 2018;76(2):325-35.
45. de Azevedo Queiroz IO, Mello WG, Martins CM, Dal Fabbro R, Narciso LG, Massunari L, et al. Systemic bone marker expression induced by grey and white mineral trioxide aggregate in normal and diabetic conditions. *Int Endod J*. 2018;51(8):889-900.
46. Griza GL. ESTUDO COMPARATIVO DE IMUNOMARCAÇÕES (OC, VEGF, TRAP) EM HUMANOS, NAS CIRURGIA DE LEVANTAMENTO DO ASSOALHO DE SEIO MAXILAR UTILIZANDO OSSO AUTÓGENO E HETERÓGENO. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP; 2015.
47. Pereira JC. Avaliação do processo de reparo em defeitos de calvária de ratos com membrana de celulose bacteriana e membrana de colágeno porcino. Análise histológica, histométrica e imunoistoquímica. Araçatuba-SP: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP; 2017.
48. Young MF. Bone matrix proteins: their function, regulation and relationship to osteoporosis. *Osteoporosis Int*. 2013;14(3):35-42.
49. Saraf SK, Singh A, Garbyal RS, Singh V. Effect of simvastatin on fracture healing--an experimental study. *Indian J Exp Biol*. 2007;45(5):444-9.

50. Anbinder AQ, Rocha R. As estatinas e o tecido ósseo: revisão de literatura. *Revista de Odontologia da UNESP*. 2006;35(4):239-46.
51. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*. 1999;286(5446):1946-9.
52. Majima T, Shimatsu A, Komatsu Y, Satoh N, Fukao A, Ninomiya K, et al. Increased bone turnover in patients with hypercholesterolemia. *Endocr J*. 2008;55(1):143-51.
53. Xu XC, Chen H, Zhang X, Zhai ZJ, Liu XQ, Qin A, et al. Simvastatin prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis after ovariectomy. *J Transl Med*. 2014;12:284.
54. El-Nabarawi N, El-Wakd M, Salem M. Atorvastatin, a double weapon in osteoporosis treatment: an experimental and clinical study. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:1383-91.
55. Maritz FJ, Conradie MM, Hulley PA, Gopal R, Hough S. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(10):1636-41.
56. Al Rifaiy M, Qutub O, Alasqah M, Al-Sowygh Z, Mokeem S, Alrahlah A. Effectiveness of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in reducing peri-implant inflammatory response in individuals vaping electronic cigarettes: A randomized controlled clinical trial. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2018;22:132-6.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Avaliação da atividade osteoindutora da sinvastatina e atorvastatina em defeitos críticos e na osseointegração de implantes: um estudo in vivo"**, Processo FOA nº 00161-2017, sob responsabilidade de Osvaldo Magro Filho apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 22 de Fevereiro de 2017.

VALIDADE DESTES CERTIFICADO: 22 de Fevereiro de 2019.

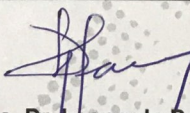
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 22 de Março de 2019.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Evaluation of the osteoinduction activity of sinvastatin and atorvastatin in critical defects and in osseointegration of implants: an in vivo study"**, Protocol FOA nº 00161-2017, under the supervision of Osvaldo Magro Filho presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on February 22, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 22, 2019.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 22, 2019.



Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

ANEXO B – Normas da revista selecionada para a submissão do artigo com intenção de publicação.

CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH

Link:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/16000501/homepage/forauthors.html>

ANEXO C – Imagens auxiliares para da metodologia do trabalho de pesquisa.

Figura 21. a. área cirúrgica após tricotomia e aplicação de PVPI. b. acesso cirúrgico realizado por meio de incisão semicircunferencial para exposição do osso parietal

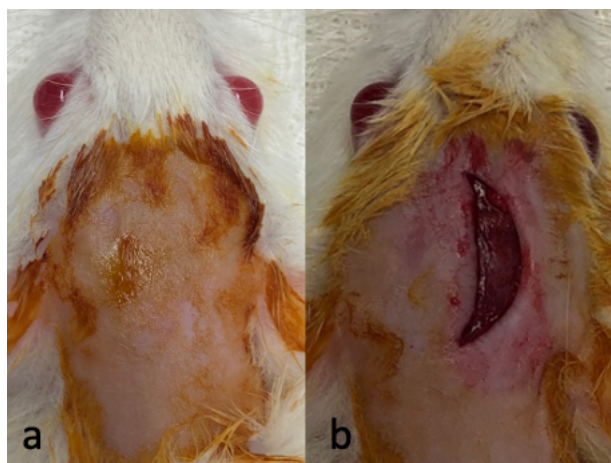


Figura 22. fragmentado da calota após remoção com a trefina.

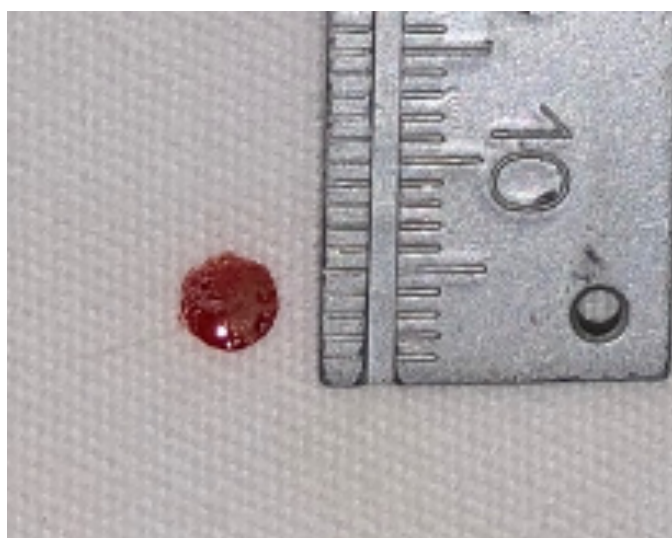


Figura 23. a. posicionamento da membrana Bio-Gide®, seringa depositando a solução de 4,3mg de atorvastatina dissolvida em 10mL de água destilada. b. membrana em posição para o fechamento do retalho.c. sutura do retalho com fio de Seda 4-0 (ETHICON Nylon Suture®, Johnson, São José dos Campos, Brasil) por pontos interrompidos simples.

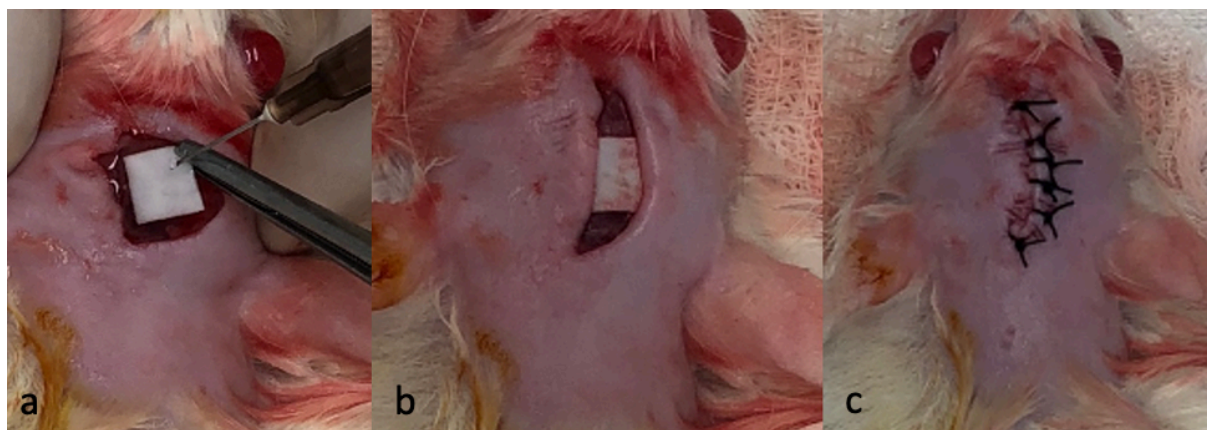


Figura 24. Seringa contendo atorvastatina na concentração de 3,6mg/kg/dia, com agulha para gavagem.

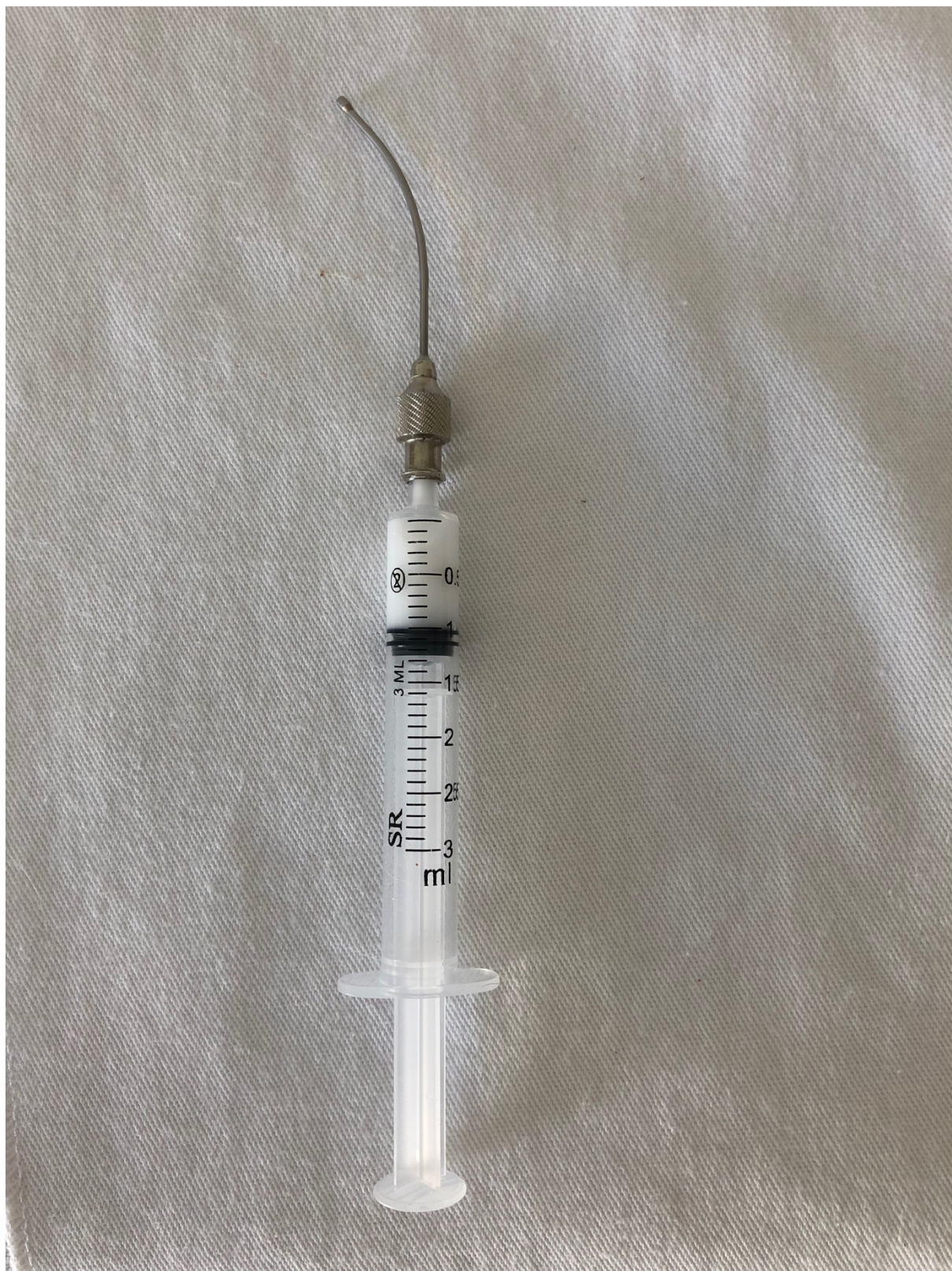


Figura 25. Animal do GAS recebendo a atorvastatina por gavagem na concentração de 3,6mg/kg/dia.



Figura 26. mensuração do defeito total, de forma linear, através da ferramenta “straight”.

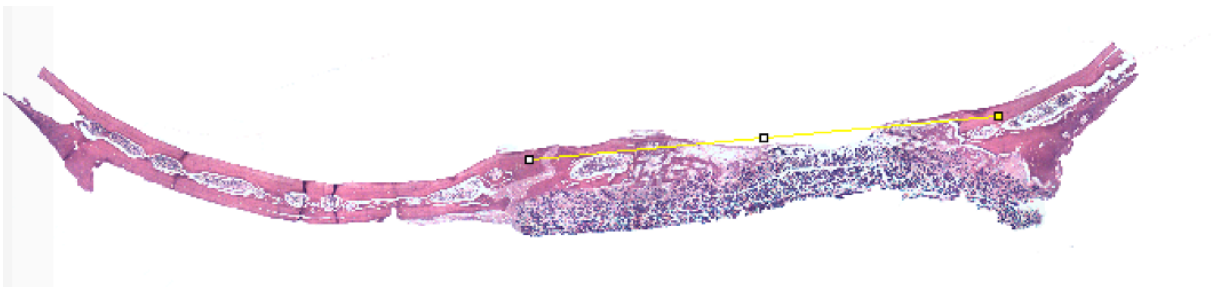


Figura 27. mensuração do defeito residual, de forma linear, através da ferramenta “straight”.

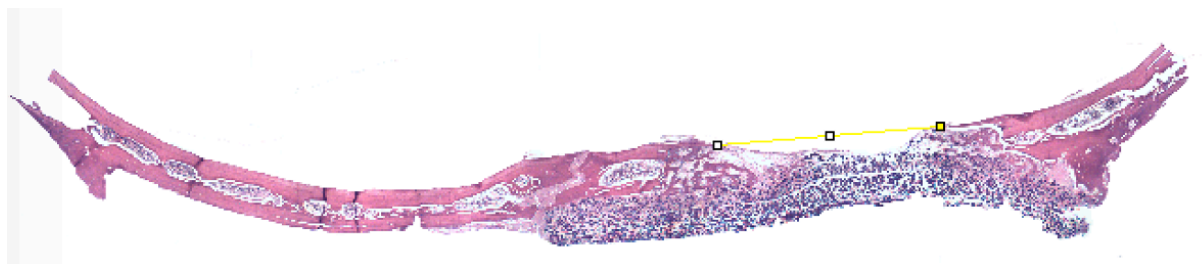


Figura 28. Demarcação de AON, pela ferramenta “freehands”, calculada a AON em pixels, após a marcação foi realizado a somatória das áreas.

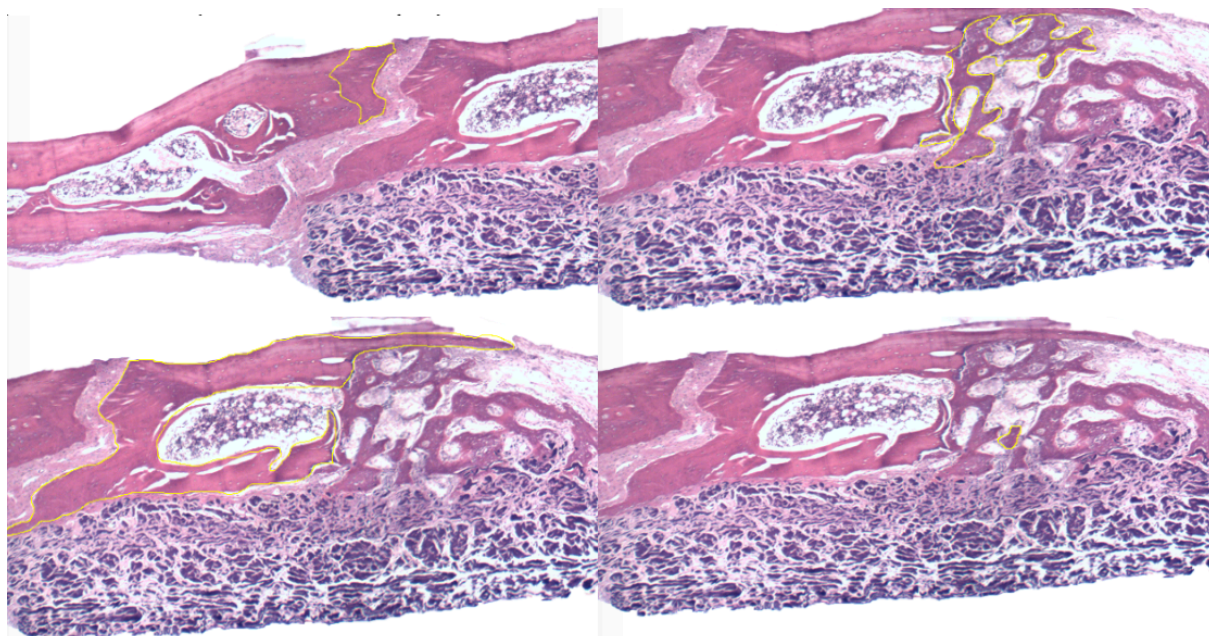


Figura 29. Demarcação da área de membrana e tecido mole, pela ferramenta “freehands”, calculada em pixels.

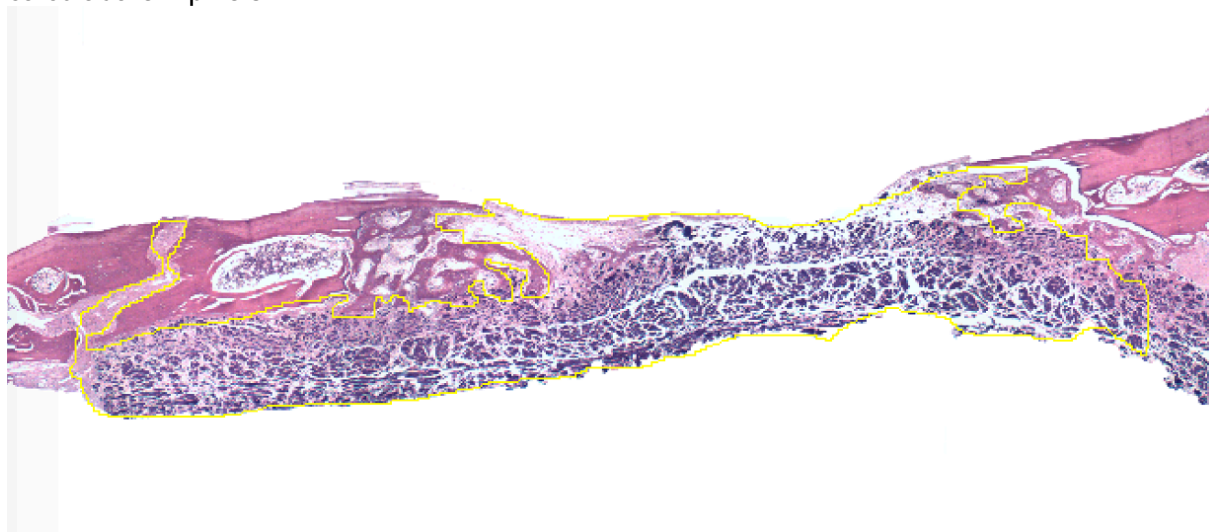


Figura 30. Ferramenta “grid”, auxiliar para contagem das células em maior aumento.

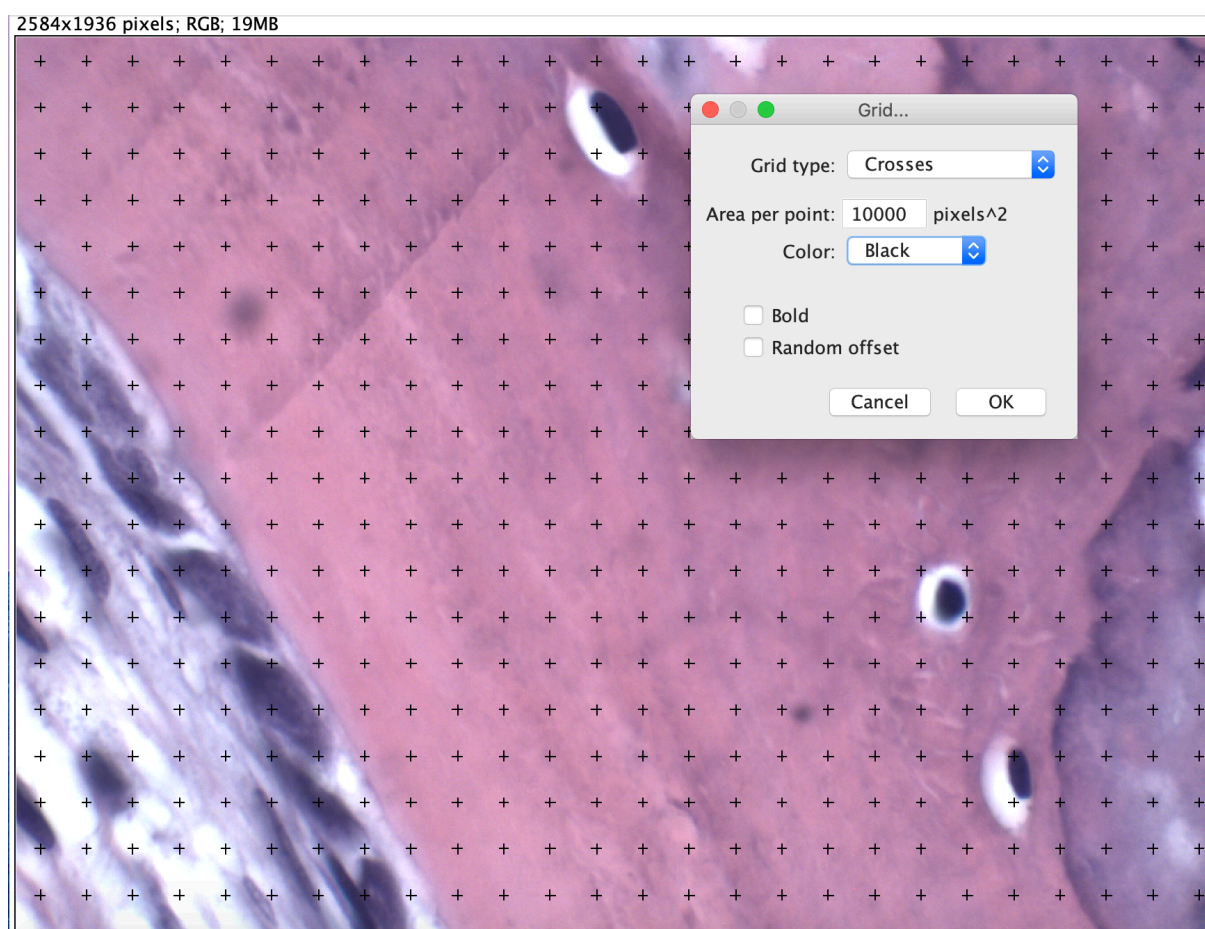


Figura 31. Ferramenta de contagem de células, demonstrando neste caso a contagem de osteoblastos.

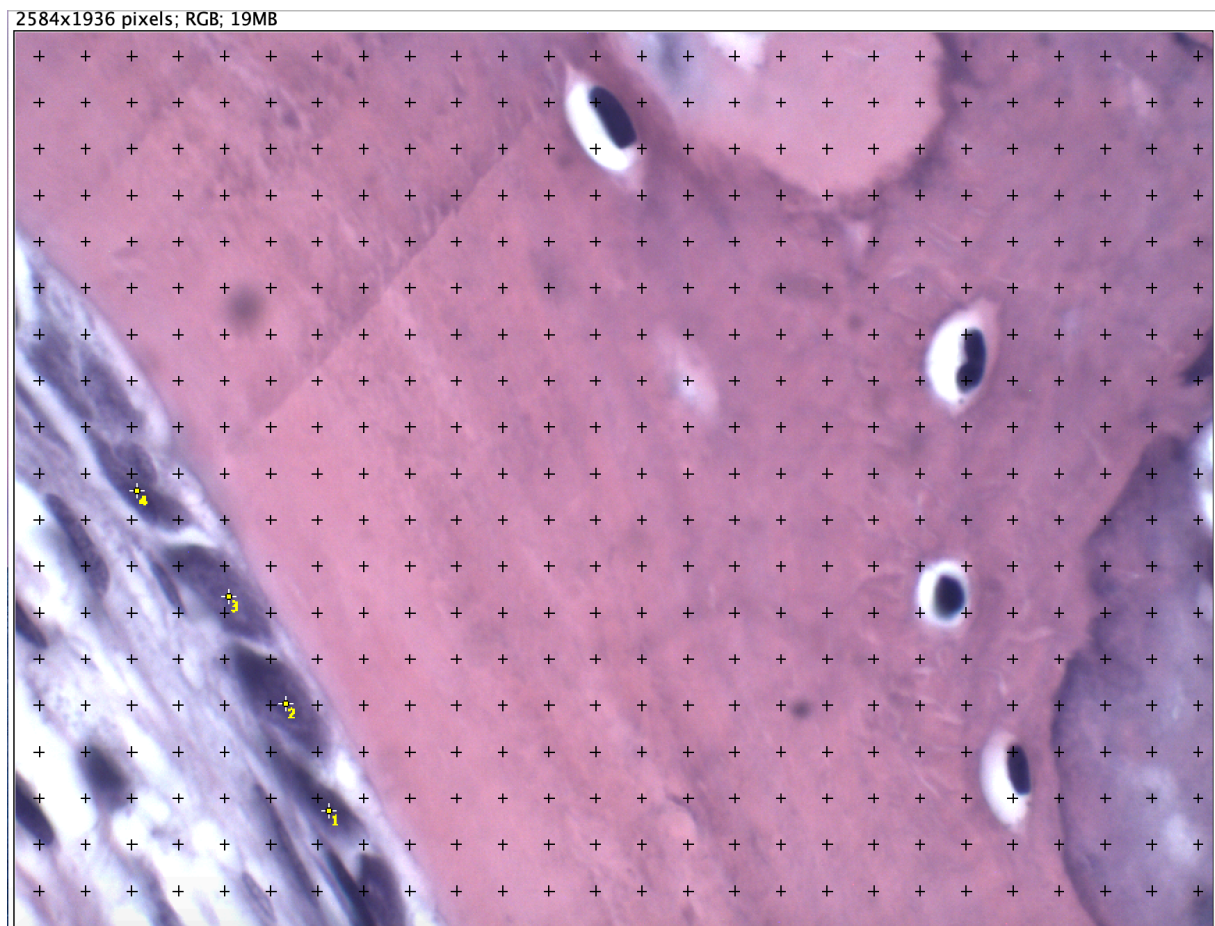


Figura 32. Ferramenta de contagem de células, demonstrando neste caso a contagem de fibroblastos.

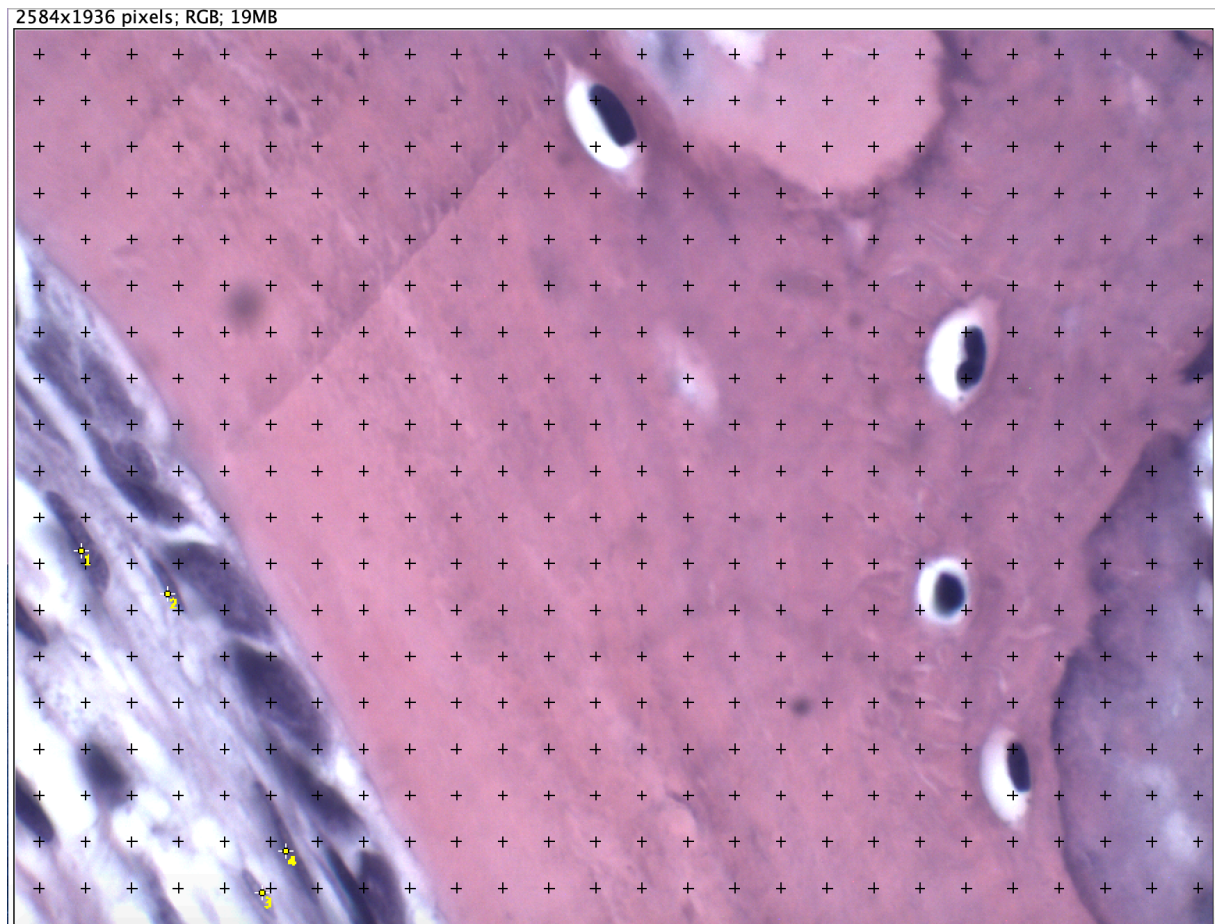


Figura 33. Ferramenta de contagem de células, demonstrando neste caso a contagem de osteócitos.

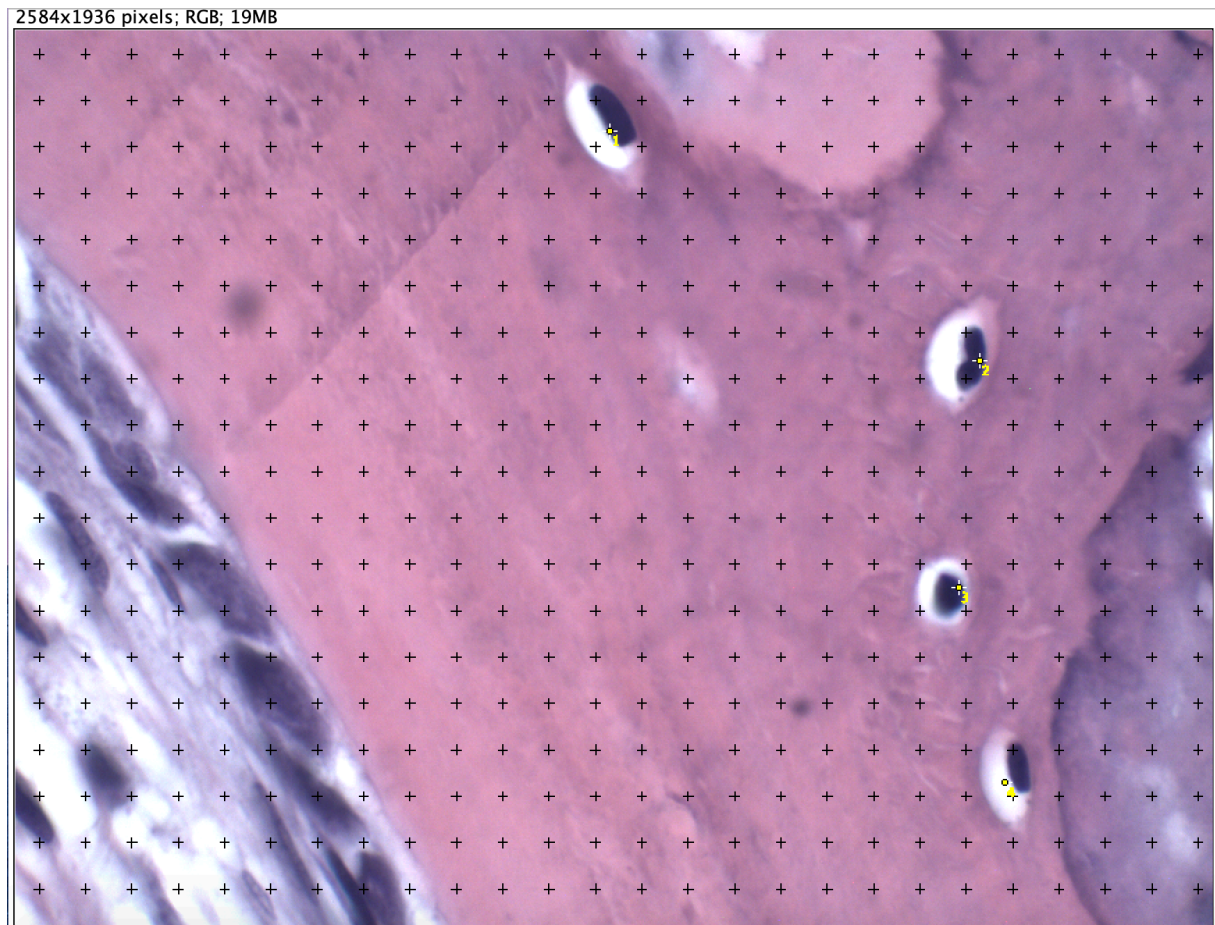


Figura 34. Ferramenta “grid”, auxiliar para contagem das células em maior aumento.

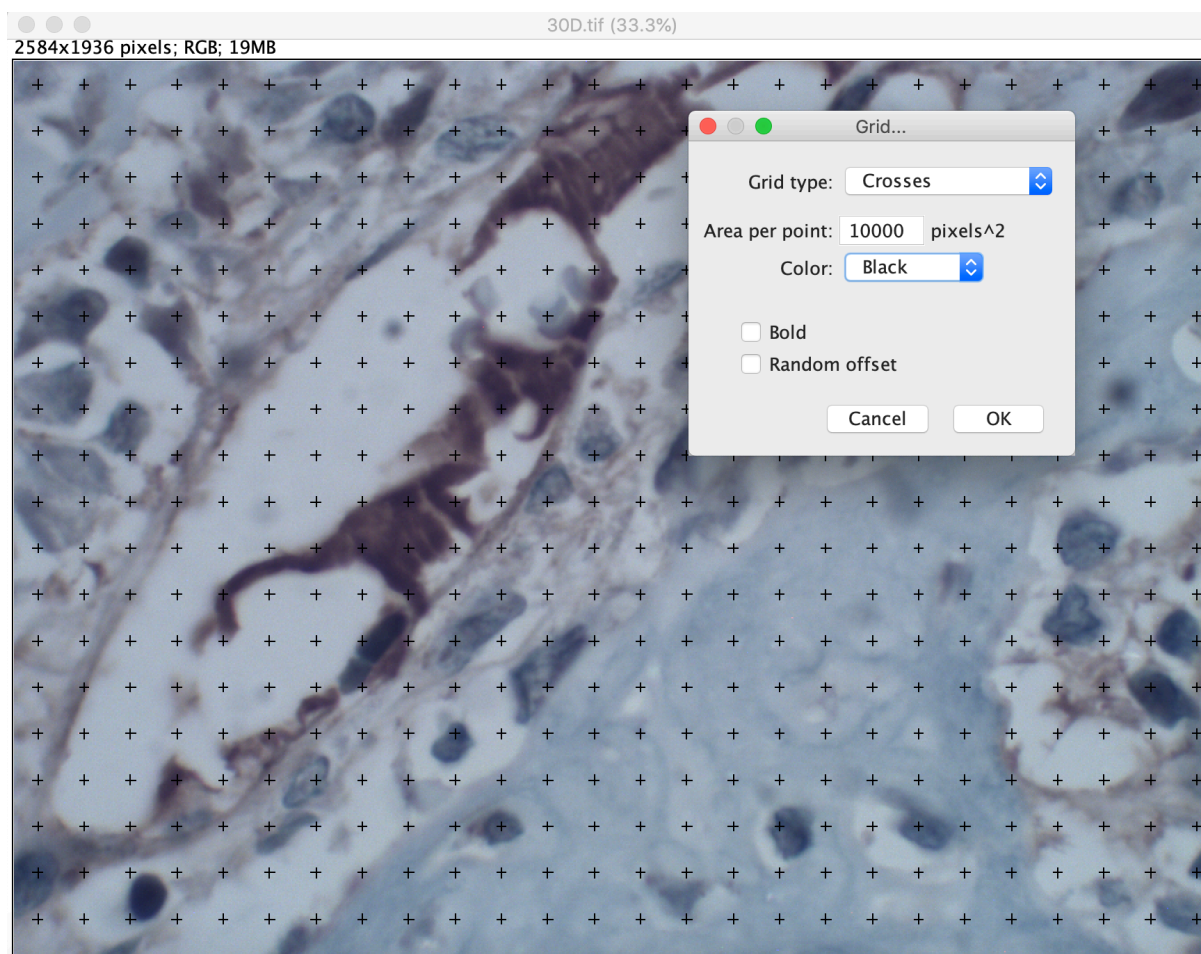


Figura 35. Ferramenta de contagem de células, demonstrando neste caso a contagem de células marcadas positivamente para CD 31.

2584x1936 pixels; RGB; 19MB

