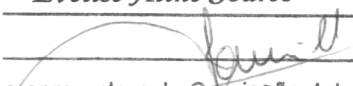




UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

EVELISE ALINE SOARES

**“EFEITOS DA HIPERLIPIDEMIA E SINVASTATINA SOBRE A
MORFOLOGIA, RESISTÊNCIA MECÂNICA E CAPACIDADE
OSTEOGÊNICA EM CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* DO GENE
DO RECEPTOR DE LDL (LDLr-/-)”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Evelise Aline Soares

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do Título de Doutor em
Biologia Celular e Estrutural, na área de
Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. José Angelo Camilli

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

So11e Soares, Evelise Aline, 1978-
Efeitos da hiperlipidemia e sinvastatina sobre a morfologia, resistência mecânica e capacidade osteogênica em camundongos Knockout do gene do receptor de LDL (LDLr-/-) / Evelise Aline Soares. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: José Angelo Camilli.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Hiperlipidemia. 2. Sinvastatina. 3. Ossos – Crescimento. 4. Resistência mecânica. 5. Receptores LDL. I. Camilli, José Angelo, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Título em Inglês: Hyperlipidemia and effects of simvastatin on the morphology, mechanical strength and osteogenic capacity in mice knockout LDL receptor gene (LDLR-/-)

Palavras-chave em Inglês: Hyperlipidemia; Sinvastatin; Bone – Growth; Mechanical strength; LDL receptors.

Área de concentração: Anatomia

Titulação: Doutor em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora: José Angelo Camilli [Orientador], Tatiana Carla Tomiosso, Ana Maria Duarte Dias Costa, Eliana Aparecida Rezende Duek, Mário Sérgio Oliveira Swerts.

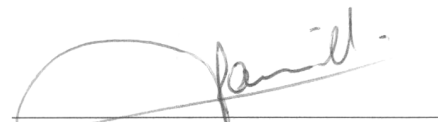
Data da defesa: 12-12-2011

Programa de Pós Graduação: Biologia Celular e Estrutura

Campinas, 12 de Dezembro de 2011.

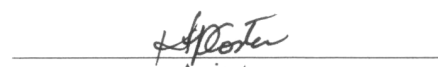
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Angelo Camilli (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Duarte Dias Costa



Assinatura

Profa. Dra. Eliana Aparecida Rezende Duek



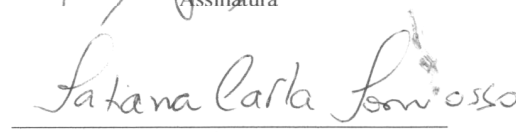
Assinatura

Prof. Dr. Mário Sérgio Oliveira Swerts



Assinatura

Profa. Dra. Tatiana Carla Tomiosso



Assinatura

Profa. Dra. Ana Paula Tiemi Taniguti

Assinatura

Profa. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden

Assinatura

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Assinatura

“Nulla Medicina sine Anatomía”
(apud Dī Dío)

Dedicatória

A Deus ...

“Porque tu és minha rocha e a minha fortaleza, pelo que, por amor do teu nome, guia-me e encaminha-me” (Salmo 31:3).

Aos Meus Pais, Vicente e Penha ...

“Vou precisar sempre do meu pai e de minha mãe ... Não importa a idade que eu tenha nem onde eles estarão. Faz-me sorrir, limpa-me as lágrimas, abraça-me, observa o meu sucesso, vê-me cair e coloca-me de pé, faz-me caminhar com segurança, às vezes põe-me doida (risos). Mas são uma promessa vinda de Deus, sei que sempre terei Amor.

Obrigada pelas oportunidades, amizade, amor incondicional, companhia e presença em cada momento de minha vida. Amo vocês.

Ao Meu Esposo, Thiago ...

“A consciência de amar e ser amado traz um conforto e riqueza à vida que nada mais consegue trazer” (Oscar Wilde).

O seu carinho, apoio, incentivo, companheirismo, respeito e fiel presença são fundamentais em minha vida. Te Amo.

Agradecimento Especial

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Angelo Camilli ...

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original” (Albert Einstein)

Agradeço pela atenção, ensinamentos, paciência e por tornar meu sonho uma realidade, minha mente não se fechará jamais para novas ideias.

Ao Cadáver

“Àquele sobre cujo peito não se derramaram lágrimas de saudades, sobre cujo ataúde não se jogaram flores, de cujo nome não se soube, sobre cujo, feitos não se escreveu a história, mas cuja lembrança, em nós, haverá de ser eterna como a saudade, grande como altruísmo, eloquente como o seu gesto, dando tudo à mesma humanidade que tudo lhe negou em vida.” (Autor desconhecido - transcrito do mural do Laboratório de Anatomia da UFRN)

Parte do aprendizado e do ensinamento da Anatomia.

Ao amigo, Wilson Romero ...

*“A verdadeira amizade pode basear-se somente na união de modos de ser semelhantes”
(Beethoven)*

Seres semelhantes e desesperados com a biomecânica ... risos ... Obrigado por tudo amigo! O melhor título obtido é o da sua amizade.

Meus Amigos, Andréa e Marcelo ...

“A amizade é um meio de nos isolarmos da humanidade cultivando algumas pessoas” (Carlos Drummond de Andrade)

Obrigada pela amizade, respeito, eternos momentos de diversão e a confiança em dividir comigo os maiores amores de suas vidas, a Rafa e a Gabi. Amo vocês.

Aos Amigos e ex-professores ...

“ ... O amigo: um ser que a vida não explica ... Que só se vai ao ver outro nascer ... E o espelho de minha alma multiplica ... ” (Vinicius de Moraes).

José Antônio Dias Garcia, Luciane Riehl, Neman Salomão Neto e Anelena Moretto Salomão, obrigada pelas lições de vida, respeito, carinho e eterna amizade.

Agradecimentos

Ao *Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural* por ter me acolhido e dando a oportunidade de minha formação. Ao *CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)* pelo auxílio financeiro.

A *Lilium Senne Panagio* pela atenção e presteza durante minha jornada no Programa de Pós-graduação em Celular e Estrutural.

Ao *Prof. Itamar Ferreira* e o tecnólogo *José Luís Lisboa* pelo auxílio na realização dos ensaios mecânicos dos fêmures no Laboratório de Propriedades Mecânica de Metas e Cerâmicas.

A Coordenação de *Pesquisa e Pós-graduação da Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS*, pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa em seus laboratórios. Ao amigo *Antônio Marcos Martins dos Santos* pela auxílio nos cortes histológicos.

Ao *Prof. Dr. José Antônio Dias Garcia* pelos modelos experimentais (camundongos LDL^{-/-} e selvagens) utilizados na tese.

Aos professores, *Prof. Dr. Mário Sérgio Oliveira Swerts*, *Profa. Dra. Ana Maria Duarte Dias Costa* e *Profa. Dra. Elaine Minatel* pelos conhecimentos, respeito, incentivo, sugestões e considerações no Exame de Qualificação e Pré-banca.

Aos meus colegas de trabalho da UNIFENAS, *Prof. Douglas Bueno da Silva*, *Profa. Clemente Pinto Rodrigues*, *Profa. Maria Cristina Costa Resck*, *Célio Vilela* e *Rogério Leandro dos Santos*.

Ao *Prof.Dr. Eric Batista Ferreira* pelo auxílio referente à análise estatística.

A minha amiga, cunhada, comadre e irmã *Andrea Riccio*, pela companhia, paciência correções infinitas do português da minha tese.

Sumário

RESUMO	12
ABSTRACT	13
<i>1 INTRODUÇÃO</i>	<i>14</i>
1.1 Camundongos <i>Knockout</i> para o gene do receptor de LDL (LDLR-/-).....	14
1.2 Hiperlipidemias	15
1.3 Hiperlipidemias e tecido ósseo	17
1.4 Estatinas e o reparo ósseo	19
Referências	23
<i>2 OBJETIVOS</i>	<i>28</i>
2.1 Objetivos Gerais	28
2.2 Objetivos Específicos	28
<i>3 MATERIAIS E MÉTODOS</i>	<i>29</i>
3.1 Protocolo animal	29
3.2 Procedimento cirúrgico	30
3.3 Medidas das dimensões dos fêmures	32
3.4 Teste mecânico dos fêmures	33
3.5 Análise histomorfométrica	37
3.5.1. Falha óssea do osso parietal	37
3.5.2 Área trabecular e do osso cortical do fêmur	39
3.6 Determinações plasmáticas	39
3.6.1 Determinação de triglicerolemia	40
3.6.2 Determinação de colesterolemia	40

3.6.3 Determinação de colesterol HDL	41
3.6.4 Determinação de colesterol VLDL e LDL	41
3.6.5. Dosagem sérica do cálcio	41
3.7 Análise estatística	42
Referências	43
<i>4 RESULTADOS</i>	45
4.1 Efeito da hiperlipidemia sobre as propriedades biomecânicas e morfológicas de fêmures de camundongos LDLr-/-.....	46
4.2 Efeito da sinvastatina sobre as propriedades morfológicas e biomecânicas de fêmures em camundongos	65
4.3 Efeito da hiperlipidemia e sinvastatina sobre o reparo de defeitos ósseos na calvária de camundongos LDLr-/- alimentados ou não com dieta hiperlipídica.....	84
<i>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</i>	99
<i>APÊNDICES</i>	100

Lista de Siglas e Abreviaturas

Δ (g) – Ganho de peso em gramas.
Apo - Apolipoproteína .
ApoE - Apolipoproteína E.
AOR(μm^2) - Área de osso regenerado.
ASBMR - *The American Society for Bone and Mineral Research*.
BMP - Proteína óssea morfogenética.
BMP-2 - Proteína morfogenética óssea 2.
Camundongos LDLr/- - Camundongos homozigotos para a ausência do gene do receptor de LDL (LDLr/-) gerados no *background* C57BL6.
CF - Comprimento do fêmur.
COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.
CT – Colesterol total.
DMO - Densidade mineral óssea.
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético.
HC – Hiperlipidemia combinada.
HDL - lipoproteína de alta densidade.
HF- Hipercolesterolemia familiar.
HMG-CoA redutase - Hidroximetilglutaril-coenzima-A.
Kg – Quilograma.
LD - Largura do fêmur distal.
LDiaf - Largura da diáfise do fêmur.
LDL - Lipoproteína de baixa densidade.
LP - Largura do fêmur proximal.
mg – Miligrama.
mm – Milímetros.
Mpa - Mega Pascal (N/mm²).
N – Newton.
PTH – Paratormônio.
SF – Solução fisiológica.
ST - Secções transversais.
SUS - Sistema Único de Saúde.
TON(%) - Taxa de osso neoformado.
TCL(%)Taxa do comprimento linear.
TG – Triglicérides.
USA – Estados Unidos da América.
VLDL - *Very low density lipoprotein*.
WT - *Wild-type* / Camundongo selvagem.

RESUMO

Introdução: O tecido ósseo pode sofrer alterações em suas propriedades bioquímicas, morfológicas, bioquímicas e biomecânicas sob a influência de determinadas doenças. Níveis elevados de colesterol e hiperlipidemia podem causar alterações no osso, comprometendo a osteogênese e resistência mecânica. A sinvastatina é um medicamento do grupo de estatinas mais comumente utilizado para o tratamento da hiperlipidemia, reduzindo o nível de colesterol. Além disso, estudos com estatinas têm demonstrado bons resultados na prevenção e tratamento da osteoporose. **Objetivos:** Avaliar o efeito da hiperlipidemia e da utilização de sinvastatina sobre as propriedades biomecânicas, a estrutura do osso cortical e trabecular e osteogênese em camundongos LDLr(-/-) e selvagens. **Métodos:** Neste estudo foram utilizados camundongos do tipo selvagem (C57BL6) (Grupo W) e camundongos homozigotos para a ausência do gene receptor LDL (LDLr(-/-)) (Grupo L), todos do sexo masculino com 3 meses de idade. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, que foram subdivididos em quatro grupos de 12 animais cada: Experimento I (grupo W – ração padrão; Grupo WH – dieta hiperlipídica; Grupo L – ração padrão e Grupo LH – dieta hiperlipídica) e Experimento II tratados com sinvastatina (S) (Grupo WS – ração padrão; Grupo WHS – dieta hiperlipídica; Grupo LS – ração padrão e Grupo LHS – dieta hiperlipídica). Após 15 dias de experimentação um defeito ósseo de 3mm de diâmetro foi produzida cirurgicamente no osso parietal direito em cada animal. No final de 60 dias de experimentação os animais foram sacrificados. O sangue foi coletado e os fêmures e o osso parietal direito foram retirados para estudo histológico e mecânico. **Resultados:** Os dados obtidos neste estudo originou três artigos. O primeiro artigo “Efeitos da hiperlipidemia sobre as propriedades biomecânicas e morfológicas do fêmur de camundongos LDLr(-/-)” aceito para publicação no *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, o segundo “Efeitos da sinvastatina sobre as propriedades morfométricas e mecânicas no fêmur de camundongos” formatado para submissão ao *Journal of Orthopaedic Research* e o terceiro artigo “Efeitos da hiperlipidemia e sinvastatina na reparação óssea de defeitos na calvária de camundongos LDLr(-/-)” esta sendo preparado para a publicação. **Conclusão:** A dieta hiperlipídica causa alterações na integridade óssea e que o uso da sinvastatina foi eficaz para preservar as propriedades biomecânicas do fêmur nos animais tratados com dieta comercial, no entanto, seu efeito sobre o tecido ósseo pode ser comprometido pela ingestão de uma dieta rica em gorduras. A osteogênese foi restrita nos camundongos LDLr(-/-), principalmente nos grupos alimentados com dieta rica em gorduras.

Palavras-chave – Hiperlipidemia; Sinvastatina, Crescimento ósseo; Resistência mecânica.

ABSTRACT

Introduction: The bone tissue can suffer alterations in their biochemical morphological and biomechanical properties under influence of certain diseases. High levels of cholesterol and hyperlipidemia can cause changes in the bone, compromising osteogenesis and mechanical strength. The simvastatin is a drug of the statins group most commonly used for the treatment of hyperlipidemia, reducing the cholesterol level. Additionally, studies with statins have demonstrated good result in the prevention and treatment of osteoporosis. **Objectives:** Evaluate the effect of hyperlipidemia and the use of simvastatin on the biomechanical properties, structure of cortical and trabecular bone and osteogeneses in LDLr(-/-) and wild-type mice. **Methods:** In this study were used wild-type (W) mice (C57BL6) and homozygous mice for the absence of the LDL receptor gene LDLr(-/-) (L), all male with 3 months of age. The animals were divided into two experimental groups that were subdivided into four groups of 12 animals each: Experiment I (Group W – standard ration; Group WH – high-fat diet; Group L - standard ration; Group LH – high-fat diet) and Experiment II with simvastatin (S) (Group WS – standard ration; Group WHS – high-fat diet; Group LS - standard ration; Group LHS – high-fat diet). After 15 days of experimentation a bone defect measuring 3mm in diameter was surgically produced in the right parietal bone in each animal. At the end of 60 days of experimentation the animals were euthanatized. Blood was collected and the femurs and the right parietal bone were removed for mechanical and histological study. **Results:** The data obtained in this study originated three articles. The first article “Effect of hyperlipidemia on femoral biomechanics and morphology in LDLr(-/-) mice” was accepted for publication in the Journal of Bone and Mineral Metabolism, the second “Effects of simvastatin on morphometric and mechanical properties in the femur of mice” was submitted to Journal of Orthopaedic Research and the third article “Effect of hyperlipidemia and simvastatin on bone repair of the calvaria of the LDLr(-/-) mice” is being prepared for publication. **Conclusions:** The high-fat diet caused alteration in bone integrity and the treatment with simvastatin was effective in preserving the biomechanical properties and structure of the femur in the animals treated with low-fat diet, however, its effect on bone tissue can be compromised by a high-fat diet. Osteogenesis was reduced in LDLr(-/-) mice, especially in the high-fat diet groups.

Keywords: hyperlipidemia; Simvastatin; Bone growth; Mechanical strength.

I Introdução

1.1 Camundongos *Knockout* para o gene do receptor de LDL (LDLR^{-/-})

Segundo Smithies e Maeda (1995), os camundongos naturalmente apresentam níveis elevados de HDL (lipoproteína de alta densidade). Em contrapartida, níveis de LDL (lipoproteína de baixa densidade) são baixos em relação aos valores encontrados em humanos. Tais condições, aliás, exercem um papel protetor contra a aterosclerose. Camundongos também apresentam a ausência da lipoproteína A, uma lipoproteína pró-aterogênica presente em humanos. Embora existam diferenças no transporte e no metabolismo de lipídios entre camundongos e humanos, alterações em partes específicas das vias tornam as duas espécies similares.

Nas décadas de 60 e 70, foram desenvolvidas dietas capazes de induzir uma hiperlipidemia leve em camundongos (Vesselinovitch e Wissler, 1968). Uma vez alimentadas por vários meses com tais dietas, certas cepas desenvolviam lesões com estrias de gordura na porção proximal da aorta (Roberts e Thompson, 1976). No início da década de 80, vários pesquisadores caracterizaram as lipoproteínas e demonstraram as diferenças nos níveis destas associadas às diferentes cepas de camundongos (Leboeuf et al., 1983; Lusi et al., 1983). Paigen et al. (1987) desenvolveram um método que permitiu quantificar lesões ateroscleróticas em camundongos. Na década de 90, a engenharia genética permitiu o desenvolvimento de modelos de camundongos transgênicos capazes de desenvolver lesões avançadas em contraste com as discretas lesões observadas em camundongos selvagens alimentados com dietas aterogênicas (Breslow, 1996). Há concordância de que camundongos knockout para ApoE (apolipoproteína E) ou para o receptor de LDL podem desenvolver lesões que compartilham aspectos semelhantes às lesões humanas avançadas (Calara et al., 2001; Johnson e Jackson, 2001; Song et al., 2001).

Os camundongos LDLr^{-/-}, quando submetidos a dietas lipídicas, apresentam níveis elevados de IDL (lipoproteína de densidade intermediária) e LDL e um aumento pronunciado das lipoproteínas. Camundongos machos e fêmeas LDLr^{-/-} são férteis, possuem os níveis de colesterol total no plasma 35 vezes maior que nos animais selvagens (WT), apresentam um aumento de 7 a 8 vezes na quantidade de IDL, sem apresentar mudanças significativas no HDL, e os níveis de triacilgliceróis são normais (Ishibashi et al., 1993).

Estudos recentes mostraram que camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica por 15 dias apresentaram aterosclerose, aumento de 4,7 e 1,2 vezes na concentração plasmática de colesterol e triglicérides, respectivamente, em relação aos camundongos LDLr^{-/-} com dieta padrão (Krieger et al., 2006). Além disso, é possível detectar a hipertensão arterial e hipertrofia ventricular esquerda quando alimentados com dieta hiperlipídica (Garcia et al., 2008).

1.2 Hiperlipidemias

As gorduras, também denominadas lipídeos, são substâncias ricas em energia. Servem como fonte principal de combustível para os processos metabólicos do corpo, sendo obtidas dos alimentos ou formadas no corpo (sobretudo no fígado), armazenadas nos adipócitos para uso futuro. São elementos essenciais das membranas celulares, das bainhas de mielina que envolvem as células nervosas e biliares. O colesterol e os triglicerídeos se ligam a determinadas proteínas para se deslocar no sangue. Essa combinação denomina-se lipoproteínas (Beers e Berkow, 2001).

As lipoproteínas são partículas esféricas constituídas por um núcleo de lipídeos neutros, não polares (ésteres de colesterol e triglicérides), envolvidos por substâncias relativamente polares (fosfolípidos, colesterol livre e proteínas). O componente proteico das lipoproteínas é denominado de apolipoproteína (apo) e são classificadas como: apo A (apoA-I,

apoA-II e apoA-IV), apo B (apoB-100 e apoB-48), apo C (apoC-I, apoC-II, apoC-III) e apo E, variando no tamanho e na composição química. As apolipoproteínas participam, com os lipídios, fosfolipídios, colesterol, triglicérides e éster de colesterol, na formação de cinco classes de lipoproteínas: quilomícron, HDL, LDL, IDL e VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) (Novak e Bydlowski, 1996).

A elevação das concentrações de lipoproteínas no sangue caracteriza uma hiperlipidemia ou dislipidemia, sendo esta decorrente de fatores genéticos e/ou ambientais (Kassim et al., 2010; Yamada, 2011). Evidências clínicas, experimentais, metabólicas e epidemiológicas, acumuladas ao longo de várias décadas, demonstraram que níveis elevados de colesterol total, colesterol LDL e triglicérides estão correlacionados com maior incidência de hipertensão, hiperlipidemia e doença aterosclerótica (Jeppesen et al., 1998; Lwin-Mm-Khin et al., 2011).

As hiperlipidemias estão associadas a altos índices de mortalidade por doenças coronarianas, pois constituem um dos principais fatores envolvidos na aterogênese (Arslanian-Engoren, 2011; Koba e Hirano, 2011). A hiperlipidemia ocorre por causa do aumento das triglicérides (TG) - (hipertrigliceridemia isolada), aumento do colesterol (hipercolesterolemia isolada) ou por uma combinação das duas (dislipidemia mista). Pode, ainda, ser causada pela redução do HDL ou pelo aumento dos TG ou LDL (Orsó et al., 2009; Hall e Lorenc, 2010).

Segundo a IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2007), as hiperlipidemias podem ser classificadas laboratorialmente da seguinte forma:

- 1) Hipercolesterolemia isolada (aumento do CT e ou LDL);
- 2) Hipertrigliceridemia isolada (aumento dos TG);
- 3) Hiperlipidemia Mista (aumento do CT e dos TG);
- 4) Diminuição isolada do HDL ou associada ao aumento dos TG ou LDL.

As hiperlipidemias primárias têm origem genética, associadas ao histórico familiar de hipercolesterolemia familiar (HF) ou combinada (HFC), hipercolesterolemia poligênica, hipertrigliceridemia familiar ou síndrome da quilomicronemia, doenças decorrentes de mutações gênicas. Já as hiperlipidemias secundárias são causadas por outras doenças obesidade, alcoolismo, hipotireoidismo, diabetes mellitus, síndrome nefrótica, icterícia obstrutiva, insuficiência renal crônica ou uso de medicamentos (anabolizantes, corticosteróides, betabloqueadores e doses altas de diuréticos). O tratamento dessas hiperlipidemias consiste em controlar a doença de base (Santos et al., 2004; Arslanian-Engoren, 2011).

O tratamento das hiperlipidemias baseia-se em mudanças de hábitos de vida (controle de peso, mudanças alimentares, combate ao tabagismo e estímulo ao exercício físico) e, quando não atingidos os objetivos propostos, deve ser considerado o tratamento medicamentoso (SBC, 2007). Para o tratamento medicamentoso da hiperlipidemias, as estatinas são drogas amplamente utilizadas, pois inibem a hidroximetilglutaril-coenzima-A (HMG-CoA) redutase, caracterizando o grupo de fármacos mais potentes e eficazes para reduzir o LDL (Rang e Dale, 2006; Kassim et al., 2011; Bruckert e Rosenbaum, 2011). Desde que foram aprovados para uso no tratamento da hiperlipidemias em 1987, diversos estudos clínicos vêm demonstrando que esses medicamentos são capazes de reduzir eventos cardiovasculares, quer na prevenção primária quer na prevenção secundária da doença arterial coronariana (Shepherd, Coble e Ford, 1995).

1.3 Hiperlipidemias e tecido ósseo

A relação hiperlipidemias e alterações no tecido ósseo vem sendo discutida em diferentes estudos (Funaba et al., 1997; Krieger et al., 2007). Os altos níveis de colesterol causam redução da massa óssea, diminuição da remodelagem óssea, intensa proliferação de osteoclastos e

inibição da atividade dos osteoblastos (Luegmayr et al., 2004; Krieger et al., 2007; Luisetto e Camozzi, 2009).

A hiperlipidemia é atribuída como uma das possíveis causa de osteonecroses (Glueck et al., 2001; Powell et al., 2010), morte celular de dois componentes do osso: a medula hematopoiética e os osteócitos (Borjaille et al., 2006). Os lipídios oxidados podem inibir a atividade osteoblástica, influenciando na formação mineral do osso (Luegmayr et al., 2004).

Funaba et al. (1997) evidenciaram que ratos Wistar hiperlipidêmicos apresentavam maior reabsorção óssea decorrente da intensa ação osteoclástica quando comparados com os ratos normolipídicos. Krieger et al. (2007) estudaram o efeito da hiperlipidemia na remodelagem óssea da mandíbula de ratos Wistar hiperlipidêmicos e normolipídicos. Após análise histomorfométrica, os autores concluíram que os ratos hiperlipidêmicos apresentavam erosão óssea nas corticais bucal e lingual da mandíbula, com diminuição acentuada do número de osteoblastos, aumento da reabsorção óssea e diminuição da osteogênese.

O processo fisiológico da coagulação é fundamental para a reparação tecidual, inclusive a reparação óssea (Moraes et al., 2005). As hiperlipidemias exercem ações aterogênicas diretas e indiretas, alterando o processo de coagulação e dificultando a reparação tecidual (Hunt, 1990; Broze, 1991).

Premaor e Furlanetto (2006) e Banugaria et al (2010) referem-se que a hiperlipidemia está associada à hipovitaminose D, o que pode acarretar inúmeras alterações no metabolismo ósseo, uma vez que a vitamina D auxilia na manutenção da massa óssea (Fraser, 1995), mobiliza cálcio do osso para a circulação (Norman, 2001; Lips (2001), participa da maturação de colágeno (Van Leeuwen et al., 2001; Levine, 2003) e estimula a formação de osteocalcina, osteopontina e fosfatase alcalina (Bouillon, Okamura e Norman, 1995).

Evidências clínicas mostram uma associação entre aterosclerose e calcificação vascular, com surgimento de osteoporose (Graham et al., 2010). No entanto, nenhum mecanismo ainda explica exatamente esse paralelo. Uma hipótese seria que os lipídios oxidados, característicos da hiperlipidemia, atenuariam a osteogênese e ocasionariam uma resistência o paratormônio (PTH), regulando os processos de reabsorção óssea (Sage et al., 2010).

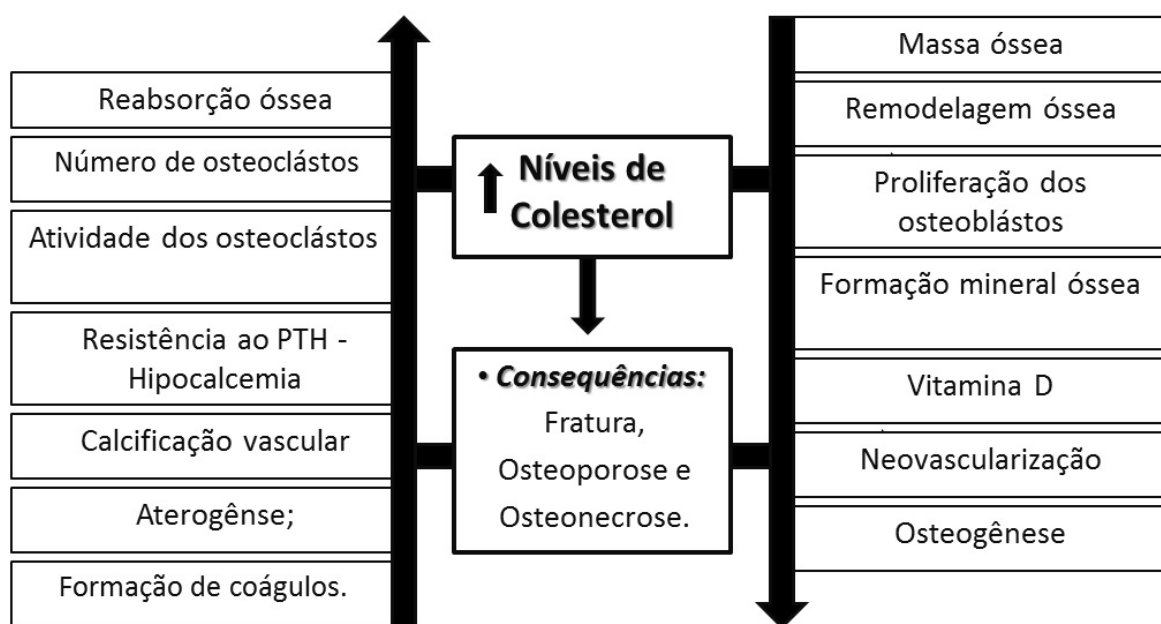


Figura 01. Esquema referente aos efeitos da hiperlipidemia sobre o tecido ósseo.

1.4 Estatinas e reparo ósseo

A regeneração óssea é regulada por hormônios, citosinas e fatores de crescimento ósseo, como a proteína óssea morfogenética (BMP) (King et al., 1997; Bostrom, 1998). Na busca de acelerar a osteogênese, surgiram estudos de medicamentos que estimulam a formação de um novo tecido ósseo, entre estes as estatinas (Mundy et al., 1999; Lacroix et al., 2000; Kodach et al., 2007).

O tratamento com estatinas é indicado com intuito de auxiliar no reparo ósseo (Rejnmark et al., 2010), embora tenham sido relatados resultados divergentes em estudos clínicos sobre os efeitos das estatinas sobre a densidade mineral óssea (DMO) e remodelação óssea (Rejnmark et al., 2004; Pauly et al., 2009).

As estatinas são capazes de reduzir a morbidade e mortalidade cardiovascular, principalmente através de seu efeito hipocolesterolêmico (Braga Júnior et al., 2002; Lupattelli et al., 2004). Além de diminuir os níveis de LDL, as estatinas também apresentam efeitos benéficos no tratamento da osteoporose (Chan et al., 2000; Yaturu, 2003; Chen et al., 2010), minimizam os riscos de fraturas ósseas (Schlienger e Meier, 2003; Sugiyama et al., 2000), aumentam a densidade mineral óssea (Sugazaki et al., 2010) e aumentam a atividade osteoblástica (Bauer, 2007).

O efeito bloqueador da formação de placas ateroscleróticas permite que usuários de estatinas desenvolvam vascularização adequada ao local de fraturas ósseas, sendo o suprimento sanguíneo fundamental para a neoformação óssea (Horiuchi e Maeda, 2006). No entanto, o mecanismo de ação exata da estatina no tecido ósseo ainda não é conhecido.

Em 1999, a American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) divulgou os primeiros estudos relacionando as estatinas com a diminuição de fraturas ósseas. Estudos conduzidos por Bauer et al. (1999) concluíram que mulheres idosas usuárias de estatinas apresentavam menores taxas de fraturas de quadril e aumento da massa óssea. Meier et al. (2000) e Whang et al. (2000), através de levantamentos epidemiológicos e acompanhamentos clínicos de pacientes, observaram que o uso de estatinas reduzia em 50% as chances de fraturas ósseas.

Com base nos diversos estudos analisados pela ASBMR, na 22ª reunião anual em Toronto, as estatinas foram consideradas estimuladoras da osteogênese em humanos e em modelos animais (Wilkie et al., 2000). Elas podem agir sob o metabolismo ósseo através de

vários mecanismos. Segundo Mundy et al. (1999), a estatina exerce ação anabólica óssea devido a um aumento da síntese osteoblástica da proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2), um fator de crescimento que provoca a proliferação osteoblástica (Staal et al., 2003). Para Farwell et al. (2008), o tratamento com estatinas tem sido associado ao aumento dos níveis de vitamina D, o que seria uma explicação plausível para a diminuição do risco de fratura.

A sinvastatina é uma estatina que se destaca. É amplamente utilizada na clínica cardiológica, pois apresenta baixo custo e é fornecida com prescrição médica pelas Unidades Básicas de Saúde pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A sinvastatina, através do seu metabólito ativo, o beta-hidroxiácido, inibe específica e competitivamente a HMG-CoA redutase, enzima que catalisa a conversão da HMG-CoA em mevalonato, que é uma passagem precoce e limitante na biossíntese do colesterol. Dessa forma, a sinvastatina aumenta moderadamente o HDL e reduz o LDL o VLDL, o colesterol plasmático total, e os triglicerídeos plasmáticos (Schulz et al., 2006; Alario, 2007; Silva et al., 2008).

Embora seja empregada no combate da hiperlipidemia, a sinvastatina mostra-se eficaz como estimuladora da neoformação óssea. Lupattelli et al. (2004) observaram que mulheres hipocolesterolêmicas submetidas a doses diárias de 40mg de sinvastatina, via oral, apresentavam densidade mineral óssea superior quando comparadas a pacientes que não tomavam a droga. Oxlund e Andreasse (2004) observaram que ratos tratados com sinvastatina apresentavam maior força biomecânica em suas vértebras, dificultando fraturas e desgastes. Whang et al. (2000) e Wilkie et al. (2000), também com modelo animal, constataram aumento significativo da formação óssea após ostomias. Mundy et al. (1999) observaram que, após receberem sinvastatina oral, os ratos apresentavam atividade osteoblástica mais intensa e aumento da expressão da proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2), com consequente aumento do volume do osso trabecular dos animais. Wang et al. (2007) detectaram o aumento na consolidação óssea de

fratura em tíbia de ratas ooforectomizadas que receberam aplicação sinvastatina (10mg/Kg/dia) sob o local da lesão óssea.

Estudos realizados com fêmures de coelhos osteotomizados, demonstraram que a sinvastatina acelera o processo de reparo ósseo, sendo maior o efeito nos estágios iniciais de osteogênese (Saraf et al., 2007). Segundo Rizzo et al. (2004) e (2006), estudos observacionais têm mostrado uma redução no risco de fraturas osteoporóticas com o uso de estatina, mas ainda não se sabe se o uso dessas drogas pode ter efeito benéfico sobre a formação óssea.

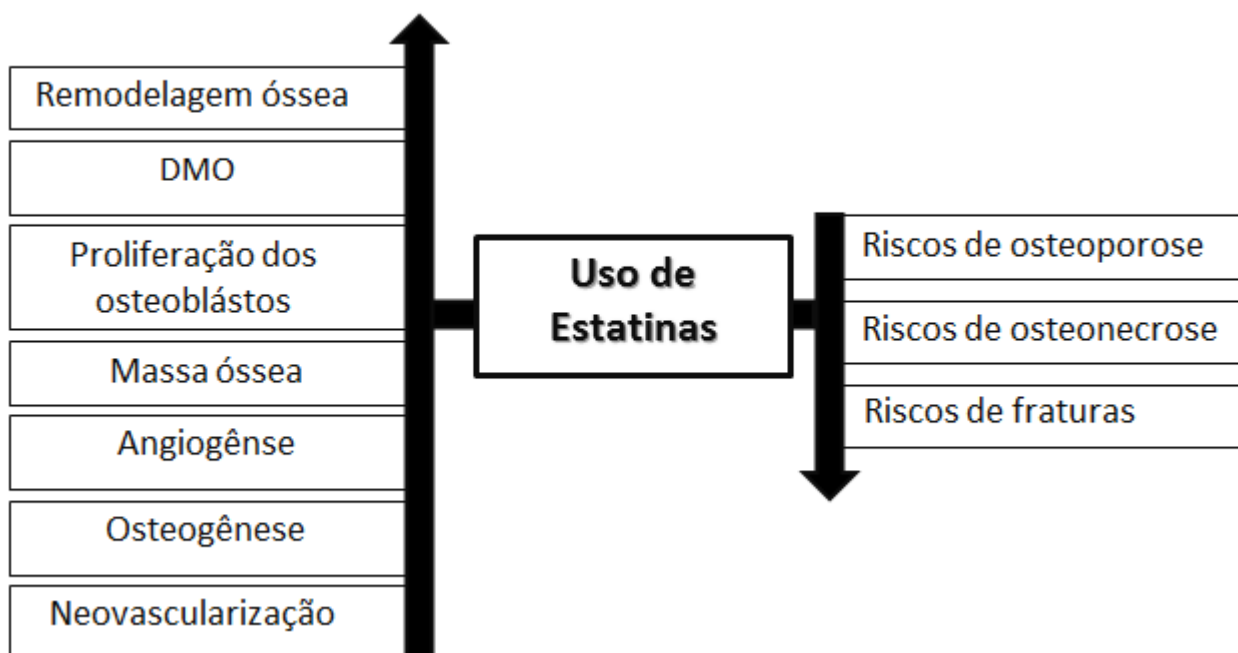


Figura 01. Esquema referente aos efeitos da sinvastatina sobre o tecido ósseo.

Referências

- ALARIO JD. Sinvastatina. Disponível em: <<http://www.biolabfarma.com.br/adCms/Documentoshow.aspx?Documento=367#2>> Acesso em 05/10/2009.
- ARSLANIAN-ENGOREN C. J. 2011. Women's Risk Factors and Screening for Coronary Heart Disease. *Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. doi: 10.1111/j.1552-6909.2011.01234.x.
- BANUGARIA SG, AUSTIN SL, BONEY A, WEBER TJ, KISHNANI PS. 2010. Hypovitaminosis D in glycogen storage disease type I. *Mol Genet Metab*. 99(4):434-7.
- BAUER, D.C. Statins and bone: basic science confirmed but clinical studies conflicting. Disponível em: <http://www.medscape.com/viewarticle/41925>> Acesso em 10/08/2007.
- BAUER, DC; MUNDY, GR; JAMEL, SA. et al. 1999. Statin use, bone mass and fracture: an analysis of two prospective studies. *J Bone Miner Res*. 14(suppl 1):S179.
- BEERS, MH; BERKOW, R. Manual Merck: Diagnósticos e Tratamentos. 17ed. São Paulo: Roca, 2001.
- BORJAILLE, BP; BRANDÃO, LR ; HASEGAWA, TM et al. 2006. Osteonecrose e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. *Rev Bras Reumatol*, 6(supl.1):36-44.
- BOSTROM, M. P. G. 1998. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop*, 355:116-23.
- BOUILLON R; OKAMURA WH; NORMAN AW. 1995. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr*. 16:200-57.
- BRAGA JÚNIOR, JWR; SOUZA, AWS; NORONHA, LK; FURIA, JK; SZEJNFELD, VL. 2002. Estatinas e densidade mineral óssea: mitos e verdades. *Rev. bras. reumatol*. 42(2):111-114
- BRESLOW, J.L. 1996. Mouse models of atherosclerosis. *Science*. 272 :685-88.
- BROZE, G.J. 1991. Endothelial injury, coagulation, and atherosclerosis. *Coronary Artery Disease*.2:131-5.
- BRUCKERT E, ROSENBAUM D. 2011. Lowering LDL-cholesterol through diet: potential role in the statin era. *Curr Opin Lipidol*. 22(1):43-8.
- CALARA, F; SILVESTRE, M; CASANADA, F. et al. 2001. Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice. *J Pathol*. 195:257-63.
- CHAN, KA; ANDRADE, SE; BOLES M. et al. et al. 2000. Inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and risk of fracture among older women. *Lancet*. 355(9222):2185-8, 2000.
- CHEN SH, CHOU FF, KO JY. 2010. The use of simvastatin with aromasin in an ovariectomized rat model: effects on the skeletal system *Chang Gung Med J*. 33(5):509-14.
- FARWELL WR, SCRANTON RE, LAWLER, EV, et al. 2008. The association between statins and cancer incidence in a veterans population. *Journal of the National Cancer Institute*. 100(2):134-139.
- FRASER, DR. 1995. Vitamin D. *Lancet*. 345:104-7.
- FUNABA M. 1997. Increased cartilage and bone formation in spontaneously hypercholesterolemic rats. *Life Sci*.61(6):645-52.
- GARCIA, JAD; SANTOS, L; MOURA, AL ; RICARDO, KFS; WANSCHER, ACBA ; WANSCHER, AACBA; SHISHIDO, SM ; SPADARI-BRATFISCH, R; SOUZA, HP;

- KRIEGER, MH. 2008. S-Nitroso-N-Acetylcysteine (SNAC) Prevents Myocardial Alterations in Hypercholesterolemic LDL Receptor Knockout Mice by Antiinflammatory Action. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. 51:78-85.
- GLUECK CJ; FREIBERG RA; FONTAINE RN. et al. 2001. Hypofibrinolysis, thrombophilia, osteonecrosis. *Clin orthoped*. 386:19-33.
- GLUECK CJ; MCMAHON RE; BOUQUOT, J. et al. 1996. Thrombophilia, hypofibrinolysis, and alveolar osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 81:557-66.
- GRAHAM LS, TINTUT Y, PARHAMI F, KITCHEN CM, IVANOV Y, TETRADIS S, EFFROS RB. 2010. Bone density and hyperlipidemia: the T-lymphocyte connection. *J Bone Miner Res*. 25(11):2460-9.
- HALL SL, LORENC T. 2010. Secondary prevention of coronary artery disease. *Am Fam Physician*. 81(3):289-96.
- HORIUCHI N; MAEDA T. 2006. Statins and bone metabolism. *Oral Dis*. 12(2):85-101.
- HUNT, B.J. 1990. The relation between abnormal hemostatic function and the progression of coronary disease. *Curr Op Cardiol*. 5:758-64.
- ISHIBASHI, S; BROWN, MS; GOLDSTEIN, JL; et al. 1993. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*. 92(2):883-893.
- IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose - Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras de Cardiol*. 88(supl I), 2007.
- JEPPESEN, J; HEIN, HO; SUADICANI, P. et al. 1998. Triglyceride concentration and ischemic heart disease: an eight-year follow-up in the Copenhagen Male Study. *Circulation*. 24(97):1029-36.
- JOHNSON, JL; JACKSON, CL. 2001. Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse. *Atherosclerosis*. 154:399-406.
- KASSIM SH, LI H, VANDENBERGHE LH, HINDERER C, BELL P, MARCHADIER D, WILSON A, CROMLEY D, REDON V, YU H, WILSON JM, RADER DJ. 2010. Gene therapy in a humanized mouse model of familial hypercholesterolemia leads to marked regression of atherosclerosis. *PLoS One*. 5(10):e13424.
- KING,GN; KING,N.; CRUCHLEY,AT. et al. 1997. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promoters wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res*. 76(8):1460-70.
- KOBA S, HIRANO T. 2011. Risk factors for hypertension among rural Thais. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 42(1):208-17.
- KODACH, LL; BLEUMING, SA;PEPPELENBOSCH, M.. et al. The effect of statins in colorectal cancer is mediated through the bone morphogenetic protein pathway. *Gastroenterology*. v.133, n.4, p.1272-81, Oct 2007.
- KRIEGER MH, SANTOS KFR, SHISHIDO SM, ET al. 2006. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide*. 14:12-20.
- KRIEGER MH, STEIMETZ T, GUGLIELMOTTI MB et al. 2007. Effect of Experimental Hypercholesterolemia on Mandibular Bone Remodeling. University of Buenos Aires, Argentina. Disponível em: <http://iadr.confex.com/iadr/2006Brisb/techprogram/abstract_82934.htm>.

- KRIEGER, MH.; SANTOS, KFR.; SHISHIDO, SM. et al. 2006. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide*. 14:12-20.
- KRIEGER, MH; STEIMETZ, T; GUGLIELMOTTI, MB; GIGLIO, M. Effect of Experimental Hypercholesterolemia on Mandibular Bone Remodeling. University of Buenos Aires, Argentina. Disponível em: <http://iadr.confex.com/iadr/2006Brisb/techprogram/abstract_82934.htm> Acesso em 10/12/2007.
- LACROIX, AZ; CAULEY, JA; JACKSON, R. 2000. Does statin use reduces risk of fracture in postmenopausal women? *Journal of Bone and Mineral Research*, 15(S155):126-9
- LEBOEUF, RC; PUPPIONE, DL; SCHUMAKER, VN. et al. 1983. Genetic control of lipid transport in mice. I: structural properties and polymorphisms of plasma lipoproteins. *J Biol Chem*. 258:5063-70.
- LEVINE, MA. 2003. Normal Mineral homeostasis Interplay of Parathyroid Hormone and Vitamin D. In: Hochberg Z, ed. *Vitamin D and Rickets*. Basel: Karger. 6:14-33.
- LIPS P. 2001. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev*, 22:477-501.
- LUEGMAYR E; GLANTSCHNIG H; WESOLOWSKI GA; et al. 2004. Osteoclast formation, survival and morphology are highly dependent on exogenous cholesterol/lipoproteins. *Cell Death Differ*. 11(Suppl 1):S108-18.
- LUISETTO G, CAMOZZI VJ. 2009. Statins, fracture risk, and bone remodeling. *Endocrinol Invest*. 32(4 Suppl):32-7.
- LUPATTELLI, G., SCARPONI, AM, VAUDO, G. et al. 2004. Simvastatin increases bone mineral density in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Metabolism*. 53(6):744-748.
- LUSIS AJ, TAYLOR B, WANGENSTEIN RW. et al 1983. Genetic control of lipid transport in mice. II: genes controlling structure of high density lipoproteins. *J Biol Chem*. 258:5071-78.
- LWIN-MM-KHIN, TASSANEE S, ORANUT P, CHAWEEWON B. 2011. Risk factors for hypertension among rural Thais. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 42(1):208-17.
- MEIER, CR; SCHLIENGER, RG; KRAENZLIN, ME. et al. 2000. HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of fractures. *JAMA*. 286:3205-3210.
- MORAES, MEL; SOARES, MG; TAKESHITA, WM, et al. 2005. Radiography study of the bone repairing in tibias of stress rats: optical density by digital radiography. *Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS*, 20(49): 257-261.
- MUNDY, G; GARRETT, R; HARRIS, S. et al. 1999. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*, 286:1946-51.
- National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) final report. *Circulation*. 2002; 106: 3143-421.
- NORMAN, AW. 2001. On becoming a molecular endocrinologist. *Steroids*. 66:129-36.
- NOVAK, EM; BYDLOWSKI, SP. 1996. *Biologia Molecular das Dislipidemias. Variação Genética das Apolipoproteínas*. *Arq Bras Cardiol*. 69(6):411-4117.
- ORSÓ, E; AHRENS, NCD; SCHMITZ, G. 2009. Familial hypercholesterolemia and lipoprotein(a) hyperlipidemia as independent and combined cardiovascular risk factors. *Atheroscler*, 10(5):74-78.

- OXLUND H, ANDREASSEN TT. 2004. Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone loss while increasing cortical bone formation. *Bone*. 34(4):609-18.
- PAIGEN B, MORROW A, HOLMES PA. et al. 1987. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 68:231-40.
- PAULY S, LUTTOSCH F, MORAWSKI M, HAAS NP, SCHMIDMAIER G, WILDEMANN B. 2009. Simvastatin locally applied from a biodegradable coating of osteosynthetic implants improves fracture healing comparable to BMP-2 application. *Bone*. 45(3):505-11.
- POWELL C, CHANG C, NAGUWA SM, CHEEMA G, GERSHWIN ME. 2010. Steroid induced osteonecrosis: An analysis of steroid dosing risk. *Autoimmun Rev*. 9(11):721-43.
- PREMAOR, MO; FURLANETTO, TW. 2006. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. *Arq Bras Endocrinol Metab*, 50(1):25-37.
- RANG HP, DALE JM, RITTER JM. 2006. Rang and Dale's Pharmacology. 6ed. Nova Iorque: Churchill/Livingstone.
- REJNMARK L; BUUS NH; VESTERGAARD P. et al. 2004. Effects of simvastatin on bone turnover and BMD: a 1-year randomized controlled trial in postmenopausal osteopenic women. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(5):737-744.
- REJNMARK, L; VESTERGAARD, P; HEICKENDORFF, L. et al. 2010. Simvastatin Does Not Affect Vitamin D Status, but Low Vitamin D Levels Are Associated with Dyslipidemia: Results from a Randomised, Controlled Trial *International Journal of Endocrinology*. doi:10.1155/2010/957174.
- RIZZO M, DI FEDE G, MANSUETO P. et al. 2004. Statins and osteoporosis: myth or reality? *Minerva Med*. 95(6):521-7.
- RIZZO M, RINI GB. Statins, fracture risk, and bone remodeling: What is true? *Am J Med Sci*. 332(2): 55-60.
- ROBERTS, A.; THOMPSON, J.S. 1976. Inbred mice and their hybrids as an animal model for atherosclerosis research. *Adv Exp Med Biol*. 67:313-27.
- SAGE AP, LU J, ATTI E, TETRADIS S, ASCENZI MG, ADAMS DJ, DEMER LL, TINTUT Y. 2010. Hyperlipidemia induces resistance to PTH bone anabolism in mice via oxidized lipids. *J Bone Miner Res*. DOI:10.1002/jbmr.312.
- SANTOS RD, GIANNINI SD, MORIGUCHI EH, et al. 2004. Prevenção da Aterosclerose – Dislipidemia. *Revista AMRIGS*, 48(1) 43-65.
- SARAF SK, SINGH A, GARBYAL RS, et al. 2007. Effect of simvastatin on fracture healing--an experimental study. *Indian J Exp Biol*. 45(5):444-9.
- SBC – Sociedade Brasileira de Cardiologia. Consenso Brasileiro Sobre Dislipidemias. Disponível em <<http://publicacoes.cardiol.br/consenso/1994/6301/63010014.pdf>> Acesso em 10/12/2007.
- SCHLIENGER, R.G.; MEIER, C.R. 2003. HMG-CoA reductase inhibitors in osteoporosis: do they reduce the risk of fracture? *Drugs Aging*. 20:321-36.
- SCHULZ, I. 2006. Tratamento das dislipidemias: como e quando indicar a combinação de medicamentos hipolipemiantes. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 5(2):344-359.
- SHEPHERD, J.; COBBE, S.M.; FORD, I. 1995. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 333:1301-7.
- SILVA RM, NETO FCP, BERTONCELLO D. 2008. Efeitos da simvastatina sobre propriedades biomecânicas de ossos de ratas ovariectomizadas. *Revista Médica de Minas Gerais*, 18(1):31-36.

- SMITHIES, O; MAEDA, N. 1995. Gene targeting approaches to complex genetic diseases: atherosclerosis and essential hypertension. *Proc Natl Acad Sci.* 92:266-72.
- SONG, L; LEUNG, C; SCHINDLER, C. 2001. Lymphocytes are important in early atherosclerosis. *J Clin Invest.* 108:251-59.
- STAAL, A, FRITH, JC, FRENCH, MH. et al. 2003. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18 (1):88–96.
- SUGAZAKI M, HIROTANI H, ECHIGO S, TAKEYAMA S, SHINODA H. 2010. Effects of mevastatin on grafted bone in MRL/MpJ mice. *Connect Tissue Res.* 51(2):105-12.
- SUGIYAMA, M, KODAMA, T, KONISHI, K. et al. 2000. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein – 2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 271(3):688-92.
- VAN LEEUWEN, JP, GERT-JAN, C M; VAN DEN, B. et al. 2001. 24,25-Dihydroxyvitamin D(3) and bone metabolism. *Steroids*, 66:375-80.
- VESSELINOVITCH, D.; WISSLER, R.W. 1968. Experimental production of atherosclerosis in mice. 2: effects of atherogenic and high-fat diets on vascular changes in chronically and acutely irradiated mice. *J Atheroscler Res.* 8:497-523.
- WANG JW, XU SW, YANG DS, LV RK. 2007. Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat. *Osteoporosis international.* 18(12):1641-1650.
- WHANG, K; ZHAO, M; OIAO, M; MUNDY, G. 2000. Administration of lovastatin locally in low doses in a novel delivery system induces prolonged bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15: F380.
- WILKIE, D.; BOWMAN, C.; LYGA, A. 2000. Cerivastatin increases cortical bone formation in OVX rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15: S549.
- YAMADA N. 2011. Atherosclerosis from the point of view of hypothesis to evidence based medicine. *Nippon Rinsho.* 69(1):7-12.
- YATURU, S. 2003. Skeletal effects of statins. *Endocr Pract.* 9(4):315-20.

2 Objetivos

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito da hiperlipidemia e do uso da sinvastatina sobre as propriedades biomecânicas, estrutura do osso cortical e trabecular e osteogênese em camundongos *knockout* para o gene do receptor de LDL (LDLr^{-/-}) e camundongos C57BL6 (Wild Type).

2.2 Objetivos Específicos

* Avaliar as propriedades biomecânicas estruturais (força máxima de ruptura, deslocamento na força máxima e rigidez extrínseca do osso) e materiais (módulo de elasticidade, tensão máxima e deformação na tensão máxima) em camundongos Wild Type e *knockout* (LDLr^{-/-}), alimentados com dieta hiperlipídica e com dieta normal, tratados ou não com sinvastatina.

* Determinar os valores séricos de cálcio (total e iônico), triglicerídeos, colesterol total e fração (HDL, LDL e VLDL) em camundongos Wild Type e *knockout* (LDLr^{-/-}), alimentados com dieta hiperlipídica e com dieta normal, tratados ou não com sinvastatina.

* Analisar morfometricamente a estrutura do osso cortical e trabecular dos fêmures em camundongos Wild Type e *knockout* (LDLr^{-/-}), alimentados com dieta hiperlipídica e com dieta normal, tratados ou não com sinvastatina.

* Avaliar a capacidade de reparo ósseo em falha produzida no osso parietal de camundongos Wild Type e *knockout* (LDLr^{-/-}), alimentados com dieta hiperlipídica e com dieta normal, tratados ou não com sinvastatina.

3 *Material e Métodos*

3.1 Protocolo animal

Os experimentos foram realizados em camundongos selvagens (Wild Type – Linhagem C57BL6) e em camundongos homozigotos para a ausência do gene do receptor de LDL (LDLr^{-/-}) gerados no *background* C57BL6, machos, com 3 meses de idade, pesando 22±3g. Os animais foram obtidos da *Jackson Laboratories (EUA)* e criados no biotério da pós-graduação da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), em estantes ventiladas (Alesco®) com controle de temperatura e controle de 12 horas no ciclo claro/escuro, em caixas para roedores com forração de maravalha. Os camundongos foram divididos em dois grupos experimentais (n=48 cada grupo) e subdivididos em quatro grupos cada (n=12) assim constituídos:

Experimento I – Hiperlipidemia

* **Subgrupo W** - Camundongos selvagens que receberam ração comercial (Nuvital®) + solução fisiológica (SF) a 0,9% através de gavagem por 60 dias (n=12).

* **Subgrupo WH** - Camundongos selvagens que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5 % ácido cólico + solução fisiológica (SF) (0,9%) através de gavagem por 60 dias (n=12).

* **Subgrupo L** - Camundongos LDLr^{-/-} que receberam ração comercial (Nuvital®) + SF (0,9%) através de gavagem por 60 dias (n=12).

* **Subgrupo LH** - Camundongos LDLr^{-/-} que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5 % ácido cólico + SF (0,9%) através de gavagem por 60 dias (n=12).

Experimento II – Hiperlipidemia com Sinvastatina

* **Subgrupo WS** - Camundongos selvagens que receberam ração comercial (Nuvital®) + Sinvastatina via oral (gavagem) na dose de 20mg/kg/dia por 60 dias (n=12).

* **Subgrupo WHS** - Camundongos selvagens que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5 % ácido cólico + Sinvastatina via oral (gavagem) na dose de 20/mg/kg/dia por 60 dias (n=12).

* **Subgrupo LS** - Camundongos LDLr-/- que receberam ração comercial (Nuvital®) + Sinvastatina via oral (gavagem) na dose de 20/mg/kg/dia por 60 dias (n=12).

* **Subgrupo LHS** - Camundongos LDLr-/- que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5 % ácido cólico + Sinvastatina via oral (gavagem) na dose de 20/mg/kg/dia por 60 dias (n=12).

Todos os animais foram alimentados com as respectivas dietas e receberam água *ad libitum*. Durante o experimento, a ingestão líquida e a ingestão sólida foram mensuradas com o auxílio de uma Balança Eletrônica de Precisão Modelo EK-2000G - AND. Além disso, semanalmente, os animais eram pesados para a caracterização do estado nutricional.

3.2 Procedimento cirúrgico

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade José do Rosário Vellano de Alfenas – UNIFENAS (Protocolo n.º 23A/2010), Alfenas – MG, realizou-se este estudo respeitando-se a Legislação Brasileira de Animais de Experimentação regulamentada pela Lei Federal 6.638 (1979). Todo o experimento obedeceu aos princípios éticos em experimentação animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Ao completar 15 dias de experimentação, os animais foram submetidos à cirurgia para produção de uma falha no osso parietal direito. Para o início do procedimento, os animais foram anestesiados com uma solução final de cloridrato de xilazina 2% (Rompun®, Bayer Animal Health) e cloridrato de ketamina 10% (Dopalen®, Agribbrands Brasil Ltda.) diluídos a 2mg/ml e 10mg/ml em solução salina (0,9%) (Alcon®, Alcon Labs. do Brasil Ltda.), respectivamente. Foi administrada, por via intraperitoneal, uma dose única de 0,1ml para cada 10g de peso corporal. A abóbada craniana de cada animal foi tricotomizada e esterilizada. Em seguida, realizada uma incisão longitudinal na pele da calota craniana, e o periósteo foi rebatido para expor a superfície do osso parietal direito. Com um *punch* dermatológico, foi produzida uma falha (defeito) óssea, com 3 mm de diâmetro, que atravessou por completo a espessura da parede do osso (figura 1A). A falha permaneceu vazia (figura 1B). Então, o periósteo foi reposicionado e a pele, suturada. Todos os animais foram tratados com analgésico (dipirona sódica 500 mg/mL) adicionado à água (*ad libitum*) na dose de 875 mg/kg durante os três primeiros dias do pós-operatório. Após 24 horas do procedimento cirúrgico, os animais voltaram aos seus respectivos protocolos experimentais.

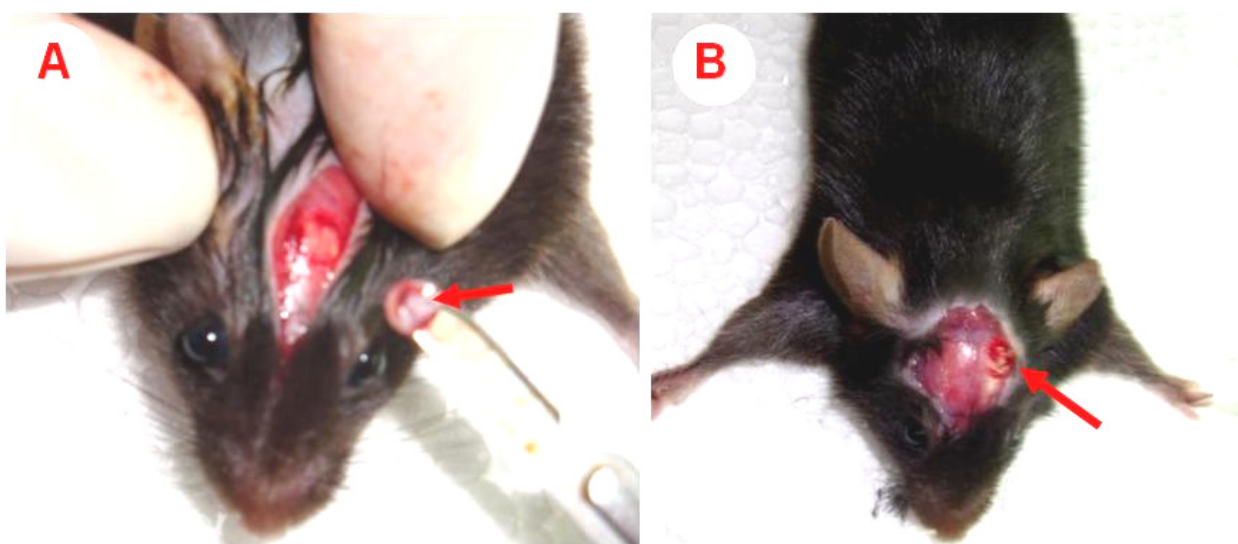


Figura 1. Falha óssea produzida com *punch* dermatológico de 3 mm em osso parietal. Na seta (↑), o fragmento ósseo retirado (A) para a manutenção da falha aberta (B).

Passados 60 dias, 45 deles após o procedimento cirúrgico, os camundongos foram anestesiados. Em seguida, o sangue foi coletado por via retro-orbital para a análise laboratorial de cálcio total, colesterol total HDL, LDL, VLDL e triglicérides. Após a eutanásia com dose excessiva do anestésico, as calotas cranianas e os fêmures direitos dos animais foram coletados para procedimento histológico. Os fêmures direitos dos animais foram coletados, limpos, medidos (medida das dimensões), acondicionados em gaze embebida em solução fisiológica (0.9%) e armazenados em freezer (-20°C) até o dia anterior ao ensaio mecânico (Soares et al, 2010; Nakagaki et al., 2011).

3.3 Medidas das dimensões dos fêmures

O tecido mole dos fêmures foram removidos e com um paquímetro digital (Starrett®) foram feitas às medidas do comprimento do fêmur, largura das epífises proximal e distal, e diáfise (figura 2). Cada medida corresponde à distância entre dois pontos de referência do próprio osso (Lammers et al., 1998). As medidas obtidas foram: (A) Comprimento do fêmur (CF): do ponto mais proximal na cabeça do fêmur até o ponto mais distal na outra extremidade do osso; (B) Largura da diáfise do fêmur (LDiaf): largura através da porção mais estreita na metade do fêmur; (C) Largura do fêmur proximal (LP): do ponto mais anterior na cabeça do fêmur até a ponta trocanter maior; (D) Largura do fêmur distal (LD): largura através dos côndilos (sentido ântero-posterior), perpendicular ao comprimento do fêmur.

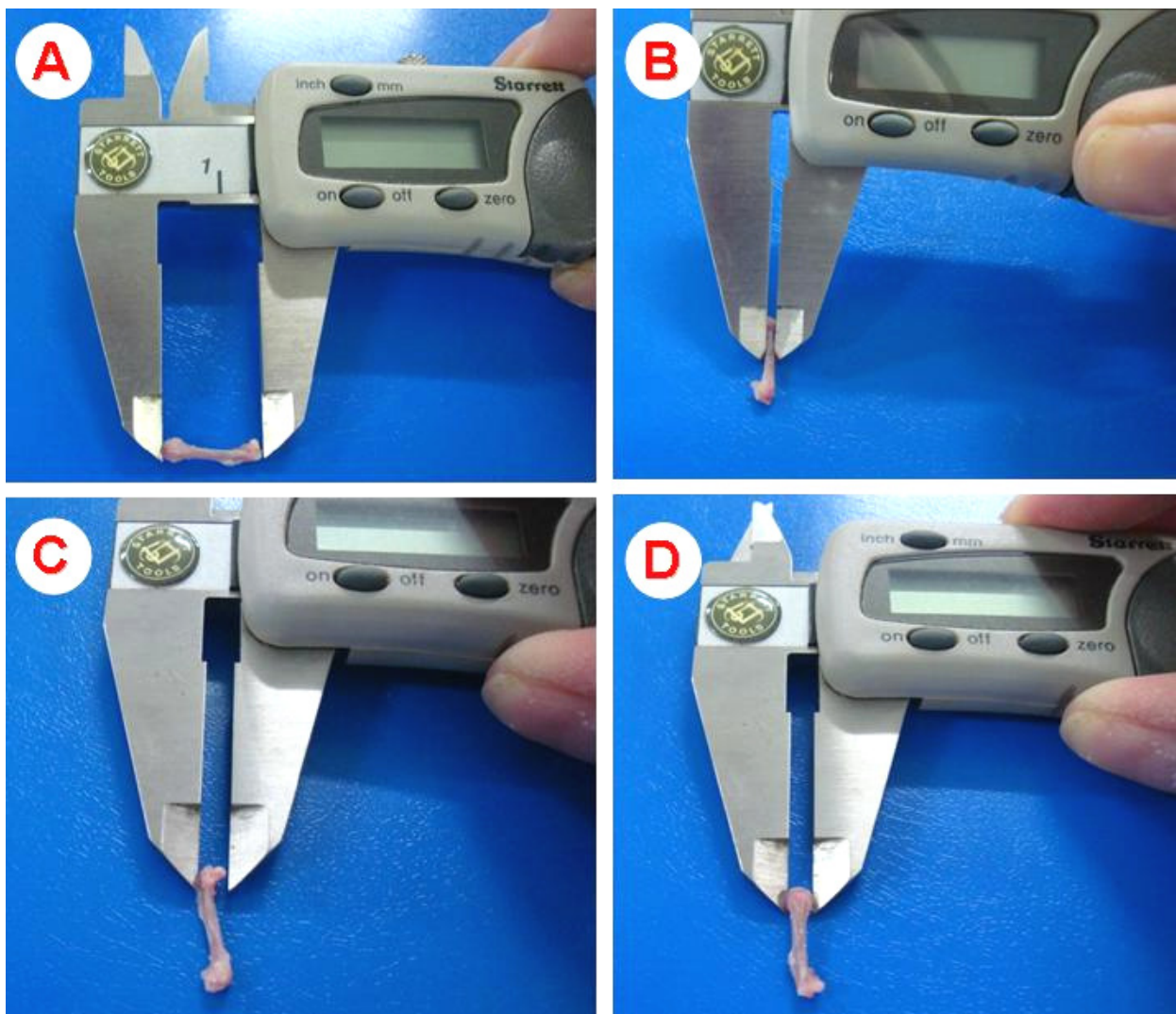


Figura 2. Medidas das dimensões do fêmur, Comprimento do fêmur (A), Largura da diáfise do fêmur (B), Largura do fêmur proximal (C) e Largura do fêmur distal (D).

3.4 Teste mecânico dos fêmures

Para a realização do teste mecânico, após o sacrifício os fêmures direitos dos animais foram coletados, limpos e acondicionados em gaze embebida em solução fisiológica (0.9%) e armazenado em freezer (-20°C) até o dia anterior ao ensaio (Soares et al., 2010; Nakagaki et al., 2011). Os fêmures direito de cada animal foram testados mecanicamente, até sua fratura completa, em teste de flexão em três pontos a uma velocidade de 0,05 mm/s (3 mm/min) no

equipamento mecânico MTS (modelo TESTSTAR II), com célula de carga de 100 Kgf. O ponto superior e os dois suportes inferiores possuíam 0,5 mm de raio em suas extremidades (Robertson et al, 2006). A distância entre os dois suportes inferiores foi de 5mm (Akhter et al, 2001). Cada fêmur foi testado no plano ântero-posterior (concavidade voltada para cima), com o lado anterior voltado para cima suportando compressão e com o lado posterior para baixo suportando tensão (figura 3).

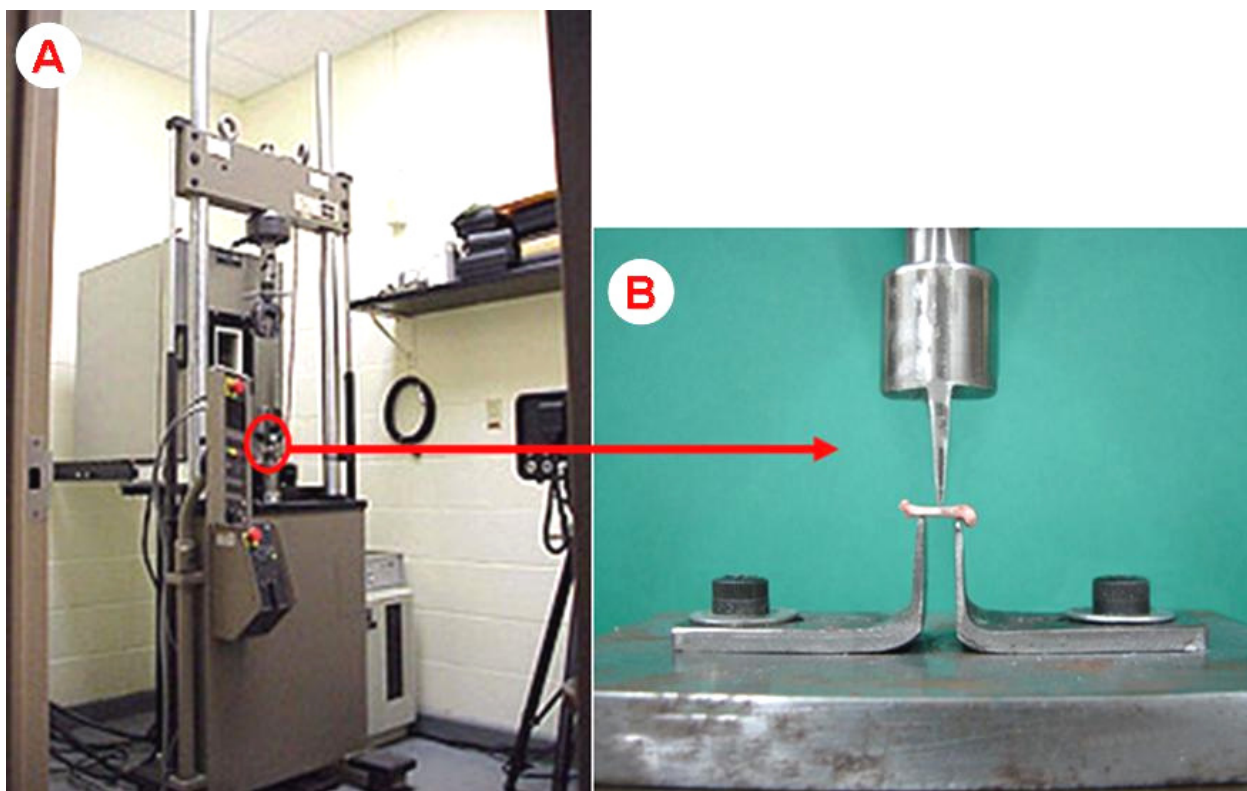


Figura 3. Modulo de flexão MTS (modelo TESTSTAR II) (A); teste de flexão do fêmur em três pontos a uma velocidade de 0,05 mm/s (3 mm/min) com célula de carga de 100 Kgf (B).

Os dados de força (*Maximum load*) e deslocamento (*Displacement*) foram obtidos diretamente do sistema MTS e gravadas com um computador acoplado à máquina de ensaio. Esses dados foram utilizados para a aquisição e cálculo das propriedades estruturais: carga máxima, deslocamento com a carga máxima e rigidez extrínseca. A rigidez extrínseca foi calculada como a inclinação da porção mais linear da região elástica da curva da força e

deslocamento (Akhter et al., 2001; Huang et al., 2003). Depois da execução do teste de três pontos de cada espécime, as duas extremidades do local da ruptura foram processadas para se obter os parâmetros da área de secção transversal da diáfise (osso cortical). As extremidades distais do fêmur foram processadas por técnica histológica, realizando-se cortes com 5µm de espessura, que foram corados com Hematoxilina-Eosina. As extremidades proximais teve seus tecidos moles removidos e foram fotografadas por uma câmera digital de alta resolução com uma régua em milímetros para calibração do software (Huang et al., 2003). As imagens das duas extremidades foram analisadas com auxílio do software *NIS-Elements: Advanced Research* (USA). A partir das medidas obtidas de cada extremidade, foi determinada a média de cada um dos parâmetros. Os parâmetros da área de secção transversal foram utilizados para calcular o momento de inércia de área da diáfise. Para esse cálculo, foi assumido que a diáfise tinha um formato elíptico (Turner et al., 1992; Huang et al., 2003). Para isso, foi utilizada a equação:

$$I = \frac{\pi}{64} [ab^3 - (a - 2t)(b - 2t)^3]$$

Onde I é o momento de inércia de área; a é a largura da área de secção transversal na direção médio-lateral; b é a largura da área de secção transversal na direção anteroposterior; e t é a média da espessura do osso cortical. A média da espessura cortical foi calculada das medidas feitas em cada um dos quadrantes da área cortical da diáfise (figura 4) (Turner et al, 1992).

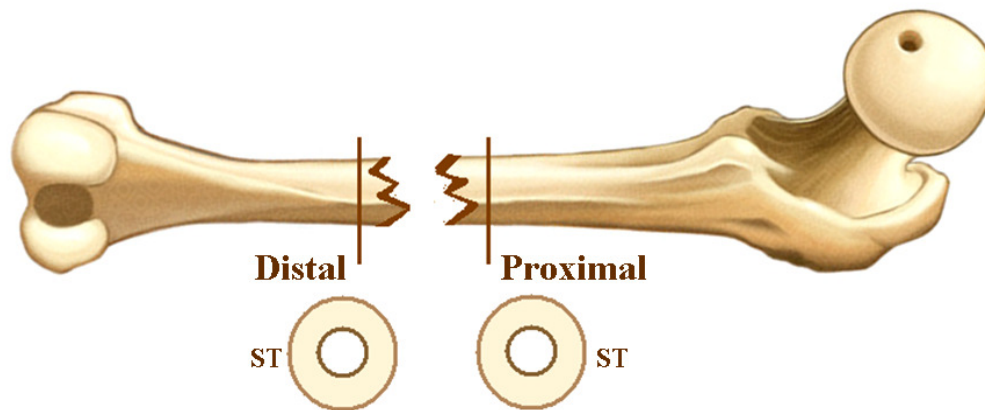


Figura 4. Cortes de secções transversais (ST) do fêmur utilizado no teste mecânico. A extremidade distal foi analisada por microscopia de luz, enquanto a proximal teve sua imagem capturada por máquina fotográfica digital de alta resolução. As secções que apresentavam alguma ruptura (falha) ao longo da diáfise foram descartadas.

As propriedades materiais foram calculadas a partir desses parâmetros (Turner e Burr, 1993; Akhter et al., 2001; Huang et al., 2003). As propriedades materiais determinadas foram: tensão máxima (*maximum stress*), módulo elástico (*elastic modulus*) e deformação (*strain*). Elas serão obtidas pelas equações:

$$\sigma = \frac{\text{força} \cdot L \cdot c}{4I}$$

$$\varepsilon = \frac{12 \cdot c \cdot d}{L^2}$$

$$E = \frac{\text{rigidez} \cdot L^3}{48I}$$

Onde: σ é a tensão; L é a distância entre os dois suportes inferiores; c é igual à metade de b (descrito anteriormente); ε é a deformação; d é o deslocamento; E é módulo elástico. A força poderá ser a máxima ou a correspondente ao limite elástico. Os testes foram realizados no equipamento do Laboratório de Propriedades Mecânicas da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM) - UNICAMP.

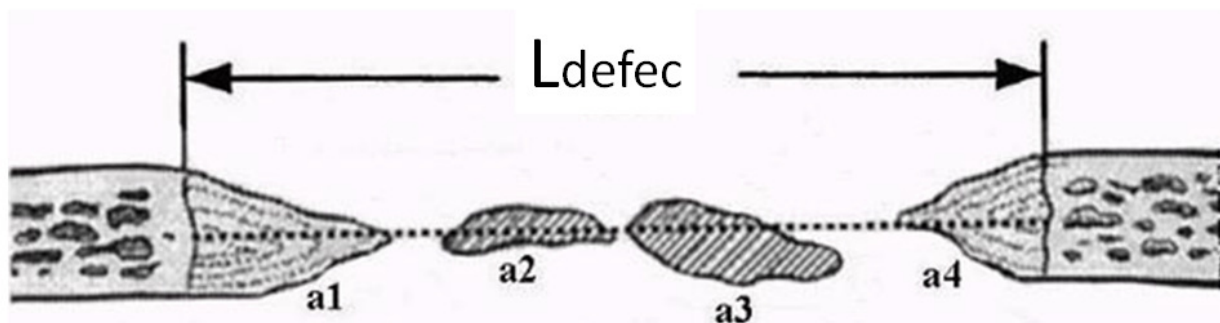
3.5 Análise histomorfométrica

3.5.1. Falha óssea do osso parietal

As calotas cranianas foram fixadas em solução de formalina a 10% em solução de tampão fosfato 0,1 M pH 7, por um período de 72 horas à temperatura ambiente, e, em seguida, foram imersas em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para a descalcificação. As amostras foram desidratadas em gradiente de álcool, diafanizados em xilol e embebidas em parafina líquida a 60° para confecção dos blocos de parafina. Foram obtidos cortes transversais (5 µm de espessura) corados com Hematoxilina-Eosina (Junqueira e Junqueira, 1983).

A quantificação do volume (%) de osso neoformado no interior da falha óssea foi baseada no estudo de Gosain et al (2000). As imagens das secções histológicas foram analisadas no software *NIS-Elements: Advanced Research*.

O osso neoformado dentro do defeito foi determinado por dois métodos. No primeiro método, a porcentagem do novo osso dentro do defeito (falha) foi calculada com base no comprimento linear do osso neoformado com relação ao comprimento inicial do defeito. O comprimento linear do novo osso foi determinado como a soma dos comprimentos de cada secção óssea formada, medida através do eixo central do defeito (Figura 5a e 6). No segundo método, a porcentagem do novo osso foi calculada com base na área de secção transversal do novo osso relativa à área do defeito inicial. A área do osso neoformado será calculada como a soma das áreas de secção óssea existente (Figura 5b e 6).

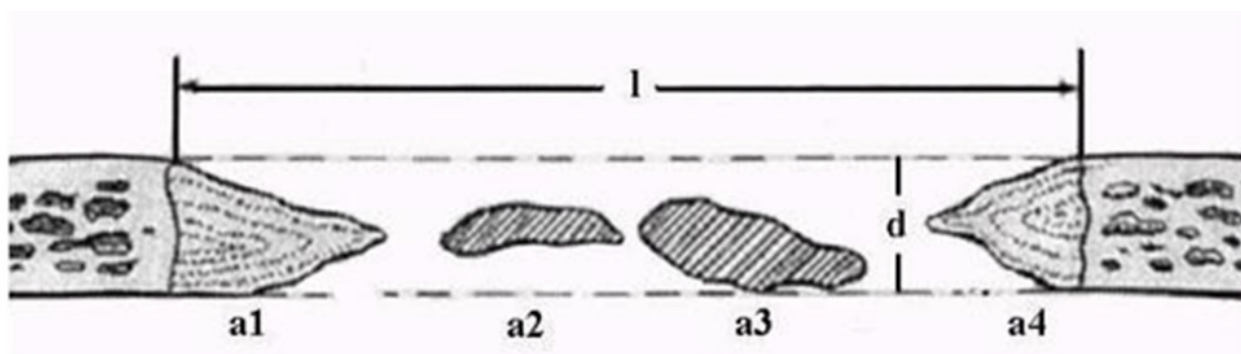


Comprimento linear do osso neoformado ($L_{\text{nov}} = \text{Comprimento } (a1 + a2 + a3 + a4)$

Comprimento do defeito inicial: L_{defec}

Porcentagem do osso neoformado = $(L_{\text{nov}}/L_{\text{defec}}) \times 100$

Figura 5a. Esquema do método utilizado para o cálculo do osso neoformado, baseado no comprimento linear.



Área do osso neoformado = área $(a1 + a2 + a3 + a4)$

Área do defeito inicial: $l \times d$

Porcentagem do osso neoformado = $\frac{\text{Área do osso neoformado} \times 100}{\text{Área do defeito inicial}}$

Figura 5b. Esquema do método utilizado para o cálculo do osso neoformado, baseado na área de secção transversal.

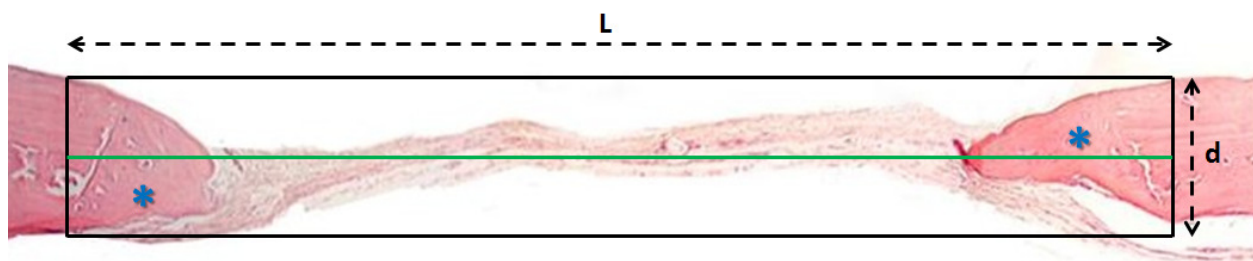


Figura 6. Método de Gosain et al. (2000) demonstrado no osso parietal de camundongo. Linha verde representa o comprimento do defeito (falha) óssea inicial (correspondência a figura 5a); linha preta delimita a área do defeito inicial no momento da operação (correspondência a figura 5b); asterisco azul indica a localização do osso neoformado, onde foi calculada a área de osso neoformado. Corte histológico corado com Hematoxilina e Eosina (HE).

3.5.2 Área trabecular e do osso cortical do fêmur

Para esta análise, foram utilizados seis fêmures de cada grupo (seis animais por grupo), sendo que, para cada fêmur, foram utilizados seis cortes histológicos e, de cada corte, foram capturados dois campos. Assim, foi utilizado um total de 72 campos, que foram escolhidos aleatoriamente. O número mínimo e confiável de campos para as medidas morfométricas foram obtido de acordo com o estudo de Mandarim-de-Lacerda (1995). Para essa análise, foi utilizada a epífise distal e a diáfise do fêmur esquerdo. As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% por 72 horas à temperatura ambiente e descalcificadas em solução de ácido fórmico, formol e citrato de sódio durante 35 dias. Em seguida, as amostras foram processadas através de técnicas histológicas de rotina e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes transversais com 5µm de espessura, que foram corados com Hematoxilina-Eosina. Na sequência, foi realizada a medida da área e da espessura das trabéculas ósseas na epífise distal dos fêmures e a mensuração da área e espessura cortical da diáfise dos fêmures, com auxílio do software *NIS-Elements: Advanced Research* (USA) com objetiva de 20X acoplado a um fotomicroscópio da marca Nikon modelo Eclipse E400 com câmera Nikon modelo DXM 1200C.

3.6 Determinações plasmáticas

As determinações séricas de cálcio total, triglicerídeos, colesterol total e frações (HDL, LDL e VLDL) foram obtidas por métodos espectrofotométricos. Foram empregados sistemas colorimétricos e enzimáticos, cujos procedimentos técnicos utilizados seguiram os protocolos descritos nos kits comercialmente disponíveis. Estas análises foram realizadas no laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário Alzira Vellano - UNIFENAS.

3.6.1 Determinação de triglicerolemia

A triglicerolemia foi determinada pelo método enzimático colorimétrico, que utiliza quatro enzimas, conforme o kit triacilgliceróis GPO-ANA da Labtest. O glicerol liberado pela hidrólise do triacilglicerol contido no soro, catalisada pela lipase da lipoproteína, é convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato, que é oxidado pela dihidroxiacetona e pelo peróxido de hidrogênio na presença de glicerolfosfato oxidase. A reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e ESPAS é catalisada pela peroxidase, produzindo a quinoneimina, que tem máximo de absorbância em 540nm (Trinder, 1969). O kit é composto de: solução tampão 50mmol/L, pH 6,5; acetato de mg 5mmol/L, ESPAS 1 mmol/L, 4-aminoantipirina 0,7 mmol/L, ATP 0,3 mmol/L, glicerolquinase $\geq 800\text{U/L}$, glicerolfosfato $\geq 2500\text{U/L}$, lipase da lipoproteína $\geq 100\text{KU/L}$, peroxidase $\geq 350\text{U/L}$, azida sódica 1,54 mmol/L. As amostras foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante, e, após a leitura da absorbância em 540 nm, a concentração de triglicérides foi calculada em mg/dL.

3.6.2 Determinação de colesterolemia

A colesterolemia foi determinada pelo método enzimático, conforme kit colesterol Liquiform da Labtest, utilizando-se associação da reação de oxidação, catalisada pelo colesterol oxidase, após hidrólise dos ésteres de colesterol, com leitura de absorbância em 500 nm (Trinder, 1969). O kit de dosagem é composto por: tampão 50 mmol/L, contendo 0,01g/dL, pH 7,0, colesterol esterase ($\geq 150\text{U/L}$), colesterol oxidase ($\geq 175\text{U/L}$), peroxidase ($\geq 1000\text{U/L}$), 4-aminoantipirina 0,5 nmol/L, fenol 2,4 mmol/L, solução padrão 200 mg/dL, preservativos e conservantes. As amostras foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante do kit, e, após a leitura da absorbância em 500 nm, foi calculada a concentração de colesterol em mg/dL.

3.6.3 Determinação de colesterol HDL

Para determinação do HDL, foi utilizado o sistema enzimático do kit colesterol HDL da Labtest para precipitação das lipoproteínas de baixa e de alta densidade (LDL e VLDL) e determinação do colesterol HDL no sobrenadante após centrifugação (Warnick et al., 2001). O kit contém: precipitante com ácido fosfotúngstico 1,5 mmol/L e cloreto de magnésio 54 mmol/L, solução padrão 20 mg/dL de HDL e reagente de cor - colesterol Liquiform Labtest. Após a medida da absorbância das amostras em 500 nm, foi calculada a concentração de colesterol HDL em mg/dL.

3.6.4 Determinação de colesterol VLDL e LDL

Os valores das concentrações do colesterol VLDL foram obtidos pela divisão dos valores de triglicérides por cinco; os valores do colesterol LDL, pela subtração de colesterol HDL e VLDL do colesterol total (Friedewald, Levy e Fredrickson, 1972).

3.6.5. Dosagem sérica do cálcio

O sangue dos animais foi coletado e o soro obtido e centrifugado a 3.000 rpm e para a determinação o cálcio, seguindo o método proposto pela Labtest-Diagnóstica (Brasil), no qual se utiliza um reagente aquoso estabilizado. O método colorimétrico foi usado para determinar o cálcio sérico, que foi medido em espectrofotômetro (Gehaka G3410, Brasil) a 570 nm da cor produzida pelo complexo formado entre ortocresoftaleína complexona e o cálcio, em pH alcalino (Tenorio et al., 2005).

3.7 Análise estatística

A análise estatística dos referentes à análise morfométrica e biomecânica dos fêmures dados foi realizada pela Análise de Variância (ANOVA) One-Way, e a comparação das médias entre os grupos foi realizada aplicando-se do teste Tukey-Kramer. Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média. Todos os testes foram feitos com 5% de nível de significância.

A análise estatística referente à morfometria da falha óssea foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e analisado por meio de análise de variância seguido de teste de *Tukey*, a 5% de significância. O esquema de análise adotado foi o fatorial triplo (2x2x2), em que os fatores considerados foram o tipo de camundongo (selvagem ou LDLr-/-), ração consumida (comercial ou hiperlipídica) e solução (fisiológica ou sinvastatina). Foram feitas 5 repetições de cada tratamento. Todas as análises foram feitas no software R (R Development Core Team, 2011), por meio do pacote *ExpDes* (Cavalcanti, 2010).

Referências

- AKHTER, M.P., CULLEN, D.M., GONG, G., et al. 2001. Bone biomechanical properties in prostaglandin EP₁ and EP₂ knockout mice. *Bone*. 29: 121-125.
- CAVALCANTI, P. P. 2010. Experimental Designs: um pacote R para análise de experimentos. 2010. 90p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2010.
- FRIEDEWALD, WT; LEVY, RI; FREDRICKSON, DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparatory ultracentrifugation. *Clin Chem*. 18:499-502.
- GOSAIN AK, SONG L, YU P, MEHRARA BJ, MAEDA CYBS, Gold LI, Longaker MT. 2000. Osteogenesis in Cranial Defects: Reassessment of the Concept of Critical Size and the Expression of TGF- β Isoforms. *Plastic & Reconstructive Surgery*. 106(2): 360-371.
- HUANG, T.H., LIN, S.C., CHANG, F.L., HSIEH, S.S., LIU, S.H., YANG, R.S. 2003. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *J Appl Physiol*, 95: 300-307.
- JUNQUEIRA ULC, JUNQUEIRA SMML. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia – São Paulo Editora Santos, 1983.
- LAMMERS, AR; GERMAN, RZ; LIGHTFOOT, PS. 1998. The impact of muscular dystrophy on limb bone growth and scaling in mice. *Acta Anat*, 162:199-208.
- MANDARIM-DE-LACERDA CA. 1999. What is the interest of normal and pathological morphological research to be quantitative? The example of the stereology. *Braz. J. Morphol*, 16(2):131-139.
- MANDARIM-DE-LACERDA CA. 1995. Métodos quantitativos em morfologia. EdUERJ, Rio de Janeiro, 1-131.
- NAKAGAKI WR, BERTRAN CA, SANTO-NETO H, Camilli JA. 2011. Mechanical, biochemical and morphometric alterations in the femur of mdx mice. *Bone*. 48(2):372-379.
- R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- ROBERTSON, G., XIE, C., CHEN, D., AWAD, H. et al. 2006. Alteration of femoral bone morphology and density in COX-2 $-/-$ mice. *Bone*. 39:767-772.
- SHIRANE HY, ODA DY, PINHEIRO TC, CUNHA MR. 2010. Implantes de biomateriais em falha óssea produzida na fíbula de ratos. *Rev. bras. ortop*. 45(5):478-482.
- SOARES EV, FÁVARO WJ, CAGNON VH, BERTRAN CA, CAMILLI JA. 2010. Effects of alcohol and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around hydroxyapatite implants. *J Bone Miner Metab*. 28(1):101-7.

- TENORIO, AS; ALVES, SB; BEZERRA, AL, et al. 2005. Efeito do treinamento físico sobre o tecido ósseo e a concentração sérica de cálcio em camundongos fêmeas ovariectomizadas. *Acta Cir. Bras.* 20 (4):280-283.
- TRINDER R. 1969. Determination of glucose in blood using glucose with alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem*, 6:27-27.
- TURNER CH, AKHTER MP, HEANEY RP. 1992. The effects of fluoridated water on bone strength. *J Orthop Res*, 10: 581-587.
- TURNER, C.H., BURR, D.B. 1993. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*, 14: 595-608
- WARNICK, GR; NAUCK, M; RIFAI, N. 2001. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays. *Clin Chem*, 47: 1579-1596.

4 Resultados

Os resultados do presente estudo permitiram a elaboração de três artigos científicos.

I) Artigo - “*Effect of hyperlipidemia on femoral biomechanics and morphology in LDLr-/- mice*” – Aceito para publicação pelo *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. Fator de Impacto = 2.23 / Qualis A1 – Ciências Biológicas.

II) Artigo - “*Effects of simvastatin on morphometric and mechanical properties in the femur of mice*” – Submetido ao *Journal of Orthopaedic Research*.

III) Artigo – “*Efeito da hiperlipidemia e sinvastatina sobre o reparo de defeitos ósseos na calvária de camundongos LDLr-/- alimentados ou não com dieta hiperlipídica*” – Encontra-se em processo de versão em inglês.

4.1 Effect of hyperlipidemia on femoral biomechanics and morphology in LDLr^{-/-} mice

Artigo aceito para publicação no *Journal of Bone and Mineral Metabolism*.

Soares, E.A.;¹ Nakagaki, W.R.;² Garcia, JAD;¹ Camilli, J.A.^{2*}

¹ Department of Anatomy, University of José Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, MG, Brazil;

² Department of Anatomy, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

* Corresponding author: Phone: +55 19 3521-6104; fax: +55 19 3521-6185.

E-mail address: jcamilli@unicamp.br (J.A. Camilli).

Short title: Hyperlipidemia and femoral alterations

Keywords: Hyperlipidemia; LDL receptor knockout mice; bone; mechanical properties

Article type: Original Research

* Correspondence to: José Angelo Camilli PhD, Department of Anatomy, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, 13083-865, Campinas, SP, Brazil. Telephone: +(55) 19-3521-6102. Fax: +(55) 19-3289-3124. E-mail: jcamilli@unicamp.br

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of hyperlipidemia on the biomechanical and morphological properties of the femur of LDL receptor gene knockout mice (LDLr^{-/-}) mice. Ten wild-type mice (C57BL6) and 10 LDLr^{-/-} mice generated on a C57BL6 background were used.

Male 3-month-old animals were divided into four groups (n = 5): group W (wild type) and group L (LDLr^{-/-}) receiving low-fat commercial ration, and group WH (wild type) and group LH (LDLr^{-/-}) receiving a high-fat diet. After 60 days, blood samples were collected for laboratory analysis of calcium, triglycerides, and cholesterol. The femur was excised for mechanical testing and morphometric analysis. LDLr^{-/-} mice receiving the high-fat diet presented more marked alterations in the mechanical and morphological properties of femoral cortical and trabecular bone. Changes in the plasma levels of calcium, triglycerides, cholesterol, and fractions were also more pronounced in this group. The present results demonstrate that hyperlipidemia causes alterations in the structure and mechanical properties of the femur of LDLr^{-/-} mice. These effects were more pronounced when associated with a high-fat diet.

INTRODUCTION

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world and most of these diseases are due to traditional risk factors such as hiperlipidemia [1]. In an attempt to better understand hyperlipidemia, advances in genetic engineering have permitted the development of transgenic low-density lipoprotein (LDL) receptor gene knockout (LDLr^{-/-}) mice. These experimental animals develop advanced cardiac and arterial injuries due to elevated plasma levels of cholesterol and triglycerides, irrespective of the diet consumed. In contrast, discrete cardiovascular injuries and moderate lipid levels are observed in wild-type (C57BL6) mice fed high-fat diets [2].

Apolipoprotein E (ApoE) or LDL receptor knockout mice develop lesions that resemble the advanced cardiovascular injuries seen in humans [3]. Recent studies have shown that LDLr^{-/-} mice fed a high-fat diet for 15 days present atherosclerosis, arterial hypertension, left ventricular hypertrophy, and a 4.7- and 1.2-fold increase in the plasma concentration of

cholesterol and triglycerides, respectively, when compared to LDLr^{-/-} mice fed a standard diet [3,4].

In addition to cardiovascular diseases, there is evidence that high levels of cholesterol and triglycerides cause alterations in bone tissue. Krieger *et al.* [5] demonstrated an increase in the number of osteoclasts, inhibition of osteoblastic activity and decreased bone remodeling in hyperlipidemic rats. According to Luegmary *et al.* [6] elevated levels of cholesterol including both LDL and high-density lipoprotein (HDL) may lead to an imbalance in the bone remodeling process, reducing bone mass by increasing the activity and differentiation of osteoclasts.

Hyperlipidemia causes a reduction of bone density *in vivo* due to the inhibition of osteoblast differentiation by bioactive lipids [7,8]. Atherogenic lipids have been shown to promote osteoclast differentiation *in vitro* [9]. Tintut *et al.* [10] analyzed femurs of mice with hyperlipidemia and observed that their osteoclasts were larger than those of the control group, suggesting an increased functional activity of these cells. A reduction of alveolar bone density, intense osteoclast activity and increased oxidative stress giving origin to periodontal disease have been observed in hyperlipidemic rats [11]. Clinical evidence indicates an association between hyperlipidemia and osteoporosis, probably due to the uptake of bone calcium for the deposition in vascular calcifications [6].

Hyperlipidemia and osteoporosis are highly prevalent diseases and currently represent the main public health problems in the world. Therefore, it is interesting to develop a good experimental model for the study of treatments designed to control these diseases. In this respect, the objective of the present study was to evaluate the effect of hyperlipidemia on the biomechanical and morphological properties of the femur of LDLr^{-/-} mice.

MATERIALS AND METHODS

Animal model

Ten wild-type (C57BL6) mice and 10 homozygous LDLr^{-/-} mice generated on a C57BL6 background were used. Male 3-month-old animals were obtained from Jackson Laboratories (USA). The animals were maintained in ventilated racks (Alesco®) at a controlled temperature under a 12-h light/dark cycle. The mice were divided into four groups of 5 animals each: group W (wild-type mice) and group L (LDLr^{-/-} mice) receiving standard ration (Nuvital®) for 60 days; group WH (wild-type mice) and group LH (LDLr^{-/-} mice) receiving a high-fat diet (20% total fat, 1.25% cholesterol, and 0.5% cholic acid) for 60 days. All animals received water *ad libitum*. During the experiment, water and food intake was measured daily and weight gain was recorded weekly.

After 60 days, all animals were anesthetized by intraperitoneal injection of xylazine/ketamine (Bayer AS and Parke-Davis, respectively) at a concentration of 6-40 mg/kg. Blood was collected for the analysis of serum total calcium, triglycerides, total cholesterol, and fractions (HDL, LDL, VLDL). Next, the animals were sacrificed by an overdose of the anesthetic and the femurs were collected for mechanical testing and histological processing.

Animal experimentation was carried out according to the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Ethics Research Institutional Committee of UNIFENAS (University of José Rosário Vellano) protocol number 23A/2010.

Plasma levels of calcium, triglycerides, cholesterol and fractions

Plasma lipids were determined as described by Garcia et al. [3] including total cholesterol (TC), HDL cholesterol, and VLDL and LDL (VLDL) cholesterol. HDL cholesterol was measured after the addition of heparin and manganese to precipitate apolipoprotein B containing VLDL, followed by centrifugation at 15000g for 15 minutes. The supernatant solution was then used for determination of HDL cholesterol. The blood samples were collected from all animals in each group. Blood samples were collected by means of a cardiac puncture. The serum concentrations of calcium were determined by chemiluminiscence and expressed in mg/dL [12].

Mechanical test

The animals' right femurs were removed and stored in a freezer (-20°C) until the day prior to the mechanical test. For the mechanical test, femurs (n = 05 per group) were submitted to three-point bending testing until complete fracture at a velocity of 3 mm/min. An MTS TestStar II apparatus with a load cell of 100 Kgf was used. The upper point and the two lower supports had a tip radius of 0.5 mm [13]. The distance between the two lower supports was 5 mm [14]. Each femur was tested in the anteroposterior plane (concave-up position), with the anterior surface of the bone facing upwards. The load and displacement data were obtained directly from the MTS system and recorded with a computer coupled to the testing machine. These data were used for the acquisition and calculation of the structural properties: maximum load, displacement at maximum load, and extrinsic stiffness. The extrinsic stiffness was calculated as the slope of the most linear portion of the elastic region of the load-displacement curve [14, 15]. After testing of the specimens in three-point bending, the failure sites of all bone specimens were photographed, together with a measurement standard, by a high-resolution digital camera at a standardized distance according to Huang et al. [15]. The parameters of cross-sectional cortical bone area of

the diaphysis were measured on the images using the NIS-Elements 3.0 software (Advanced Research, USA). The cross-sectional moment of inertia (CSMI) at the point of failure was calculated by the method of Turner et al. [16]:

$$I = \frac{\pi}{64} \left[ab^3 - (a - 2t)(b - 2t)^3 \right]$$

Where I is the CSMI, a is the width of the cross-sectional area in the mediolateral direction, b is the width of the cross-sectional area in the anteroposterior direction and t is the average cortical thickness [16]. The material properties were obtained from the structural properties [14]. The following material properties were evaluated: maximum stress, strain at maximum stress and elastic modulus. On the basis of the load-displacement data, these parameters were calculated using the following equations:

$$\sigma = \frac{load \cdot L \cdot c}{4I} \quad \varepsilon = \frac{12 \cdot c \cdot d}{L^2} \quad E = \frac{stiffness \cdot L^3}{48I}$$

Where σ is the stress, L is the distance between the two lower supports, c is the maximum distance from pixels to the line that crosses the center of the mass, ε is the strain, d is the displacement, and E is the elastic modulus. The tests were carried out at the Laboratory of Mechanical Properties, Faculty of Mechanical Engineering, UNICAMP.

Femur morphometry

Anatomical dimensions of the femur

After removal of all soft tissue from the femurs, the following four measurements were obtained with a digital caliper and magnifying glass according to Lammers et al. [17]: 1) femur length (measured from the most proximal point of the femoral head to the most distant end of the femur); 2) width of the femoral diaphysis (measured at the narrowest point of the mid-femur); 3) width of the proximal femur (measured from the anterior point of the femoral head to

the tip of the greater trochanter); 4) width of the distal femur (corresponding to the width of the condyle in the anteroposterior direction perpendicular to the length of the femur).

Epiphyseal trabecular bone

The distal epiphysis of the femur ($n = 5$ per group) was used for this analysis. Six histological sections were prepared for each femur and two fields of each section were captured. The specimens were fixed in 10% buffered formalin for 72 h and decalcified in a solution of formic acid, formalin and sodium citrate for 35 days. Next, the specimens were submitted to routine histological processing and embedded in paraffin. Longitudinal sections (5 μm) were obtained and stained with hematoxylin-eosin. The histological sections were examined under a Nikon 80i photomicroscope using a 20x objective. The images were captured with a Nikon DS-Ri1 camera for the analysis of trabecular bone area, area fraction and mean thickness using the NIS-Elements 3.0 Advanced Research software.

Diaphyseal cortical bone

The middle third of the femoral diaphysis ($n = 5$ per group) was used for this analysis. Cross-sections (5 μm) were obtained and stained with hematoxylin-eosin. Twelve histological sections (1 section = 1 field) were prepared for each bone. The images were captured using a 4x objective and the cortical bone area (cross-section area - medullary area) and mean cortical thickness were calculated.

Statistical Analysis

Final weight (g), daily fluid intake (ml), daily solid intake (g), laboratory analysis, biomechanical analysis of the femurs, the morphological and morphometric comparison were statistically compared among the groups by analysis of variance followed by the Tukey's test,

with the level of significance set at 1 and 5%, respectively. Means with different letters were significantly different (5%) from each other.

RESULTS

All mice gained weight throughout the experiment. The animals of the four groups consumed fluid and solid food sufficient to provide the hydration and energy necessary for the maintenance of their daily body activities. Solid food intake was higher in groups L and LH compared to groups W and WH (Table 1).

Analysis of the lipid profile showed no differences in plasma triglycerides levels between the W and WH groups, whereas a significant increase was observed in group L when compared to groups W and WH. Animals of the LH group presented severe triglyceridemia when compared to the other groups (Table 2). Plasma total cholesterol levels did not differ between groups W and WH. Animals of groups L and LH presented moderate and severe hypercholesterolemia, respectively, when compared to groups W and WH (Table 2). Plasma HDL levels differed between the four groups in the following increasing order: LH, W, L, and WH. No differences in plasma LDL or VLDL levels were observed between groups W and WH. However, plasma LDL and VLDL levels were higher in group L when compared to groups W and WH and LH animals presented severe LDL and VLDL elevation compared to group L (Table 2).

There were no significant differences in the plasma levels of total or ionic calcium between groups W, WH, and L (Table 2). However, LH animals presented lower plasma total and ionic calcium levels than animals of the other groups (Table 2).

Analysis of the dimensions of the femur showed a greater femur length in animals of group W compared to the other groups (Table 3). The widths of the proximal epiphysis, diaphysis and distal epiphysis were reduced in groups L and LH compared to groups W and WH (Table 3).

Mice of group LH presented a smaller trabecular area, trabecular thickness, cortical area and cortical thickness than animals of groups W, WH, and L (Table 3 and Figures 1 and 2). The morphometric parameters of spongy bone of the distal femoral epiphysis were reduced by approximately 40% in groups L and LH compared to groups W and WH. The cortical thickness and cortical area in the femoral diaphysis were reduced by 17 to 22% in animals of group LH compared to group W (Table 3 and Figures 1 and 2).

The results of the mechanical tests of the femur showed that a lower maximum load was necessary for complete bone failure in animals of group L when compared to the other groups. No differences in this structural property were observed between groups W, WH, and L (Table 4). There were no differences in displacement values between the four groups (Table 4). Analysis of stiffness showed no significant difference between groups W, WH and L, but this parameter was significantly lower in group LH (Table 4). Maximum stress was lower in groups L and LH than in groups W and WH (Table 4). The elastic modulus of the femur was significantly greater in animals of group W when compared to the other groups, which presented similar values. Femoral strain values were the same in groups W and WH but were higher than those observed in groups L and LH. The lowest strain values were obtained for the femurs of LH mice (Table 4). All material properties analyzed were reduced in mice of group L when compared to groups W and WH, whereas the structural properties of femurs were the similar in groups W, WH, and L (Table 4).

DISCUSSION

The relationship between hyperlipidemias and bone tissue alterations has been discussed in different studies [5,18], but reports correlating hyperlipidemia with the biomechanical properties of bone are scarce.

Studies on LDLr(-/-) mice demonstrated that these animals develop moderate hypercholesterolemia when fed a standard diet and atherosclerotic lesions when receiving a high-fat supplement. [3,4]. In the present study, mice fed a high-fat diet gained more weight than animals receiving a standard rodent diet. Dietary hyperlipidemia did not compromise the mechanical or morphometric properties of the femurs of WH animals, probably because of the protective action of HDL which was increased in this group. However, the genetic dyslipidemia seen in mice of group L, even in the presence of high plasma HDL levels, caused alterations in the material properties and morphometric parameters of the femur. Bone impairment (trabecular area and thickness, and cortical area and thickness) was more marked in the femurs of LH animals due to a drastic reduction in plasma HDL levels associated with a substantial increase of total cholesterol and LDL when compared to group L.

Studies investigating the use of drugs and specific diets need to pay special attention to the nutritional status of the experimental animals since variations in solid and liquid diet consumption may cause alterations in the biological responses of the animals [19]. According to Chorilli *et al.* [20] mice should consume mean daily amounts of ration and water higher than 4 g and 6 mL, respectively, to maintain an adequate nutritional status and to prevent malnutrition and dehydration. All animals studied here gained weight throughout the experiment. Solid and fluid ingestion was within the range recommended for mice [20]. Therefore, the biomechanical and morphometric parameters of the femurs were reduced due to the presence of genetic hyperlipidemia and consumption of a high-fat diet.

Plasma levels of triglycerides and total cholesterol and its fraction were elevated in LDLr^{-/-} mice of the L and LH groups when compared to wild-type mice (groups W and WH). These findings effectively demonstrated the presence of hyperlipidemia in LDLr^{-/-} mice and also showed that the high-fat diet drastically altered plasma lipid levels. Thus, LDLr^{-/-} mice traditionally employed in studies on cardiovascular diseases can also be used as a model to investigate the effects of hyperlipidemia on bone tissue and possible therapies since, unlike other animal models, plasma lipid levels remain elevated in these animals.

At present, different therapeutic strategies are used to increase HDL levels or to improve its function in an attempt to control hyperlipidemia and to reduce cardiovascular risks [21]. Mice of group WH presented elevated plasma HDL levels when compared to the other groups. HDL acts as a protective factor against cardiovascular diseases by promoting the reverse transport of LDL-cholesterol and exerts anti-inflammatory, antioxidant and antithrombotic effects [22]. The increase of HDL observed in WH animals was probably determinant for the development of moderate hyperlipidemia in this group, whereas the L and LH groups presented low HDL levels and high levels of triglycerides, total cholesterol and fractions, characterizing severe hyperlipidemia. In addition to its cardiovascular action, HDL inhibits osteoblast apoptosis induced by LDL, with beneficial effects on bone metabolism [23].

The geometric characteristics of cortical and trabecular bone such as thickness and area are factors directly related to bone strength and resistance to fractures [24]. In the present study, morphometric analysis of the femurs of L and LH mice revealed smaller trabeculae and thinner spongy bone in the distal epiphysis, lower cortical thickness of the diaphysis, and smaller anatomic dimensions when compared to groups W and WH. Therefore, bone architecture and volume were compromised in L and LH mice which presented severe hyperlipidemia, with a consequent loss of bone quality resulting in weaker femurs that are more prone to fractures.

According to Nuzzo *et al.* [25] hyperlipidemia is a risk factor for skeletal diseases and is associated with the mechanism of osteoporosis by interfering with the signaling in bone remodeling. Hyperlipidemia increases osteoclast activity and inhibits osteoblastic action, disturbing the balance between bone formation and resorption [6]. This imbalance has been attributed to a reduction in nitric oxide content, since osteoblast differentiation is mediated by an increase in the synthesis of this compound [26,27]. The association between hyperlipidemia and arterial hypertension has been reported to play a role in the inhibition of nitric oxide synthesis [26]. In view of these considerations, we suggest that in the present study nitric oxide synthesis was reduced in the femurs of animals with severe hyperlipidemia.

Hyperlipidemia is associated with hypovitaminosis, which can cause various bone metabolism disorders [28]. The vitamin D is involved in the maintenance of bone mass, mobilizes calcium from bone to the circulation [29], participates in the maturation of collagen, and stimulates the synthesis of osteocalcin, osteopontin and alkaline phosphatase [30]. In addition to vitamin D, the vitamin K is essential for skeletal growth. It acts as a regulator of available calcium in the bone matrix. Thereby, hypovitaminosis K may be related to bone fragility [31,32,33]. These findings agree with the present study in which lower calcium levels and more pronounced alteration were observed in the femurs of the LDLr^{-/-} mice that received a high-fat diet.

Mechanical tests provide knowledge regarding the material and structural properties of bones. Material properties are related to tissue composition (cells and organic and inorganic portion) and structural properties refer to the organ as a whole (mass, architecture, size, and distribution) [34]. Thus, the present study clearly demonstrated the relationship between hyperlipidemia and bone tissue alterations. To our knowledge, this is the first study investigating the effects of hyperlipidemia on the mechanical properties of the femur of LDLr^{-/-} mice.

In the present study, mechanical analysis of the femurs showed that structural (maximum load, displacement, and stiffness) and material parameters (maximum stress, strain, and elastic modulus) were increased in group W and reduced in group LH. This demonstrates impaired organization and a reduction of the collagen and mineral content in femurs of LH animals, rendering bone less resistant and more susceptible to fractures. Taken together, these results show that hyperlipidemia associated or not with a diet rich in cholesterol increases bone fragility.

The results of the present study showed more pronounced alterations in the mechanical properties and cortical and trabecular bone morphometric parameters of the femur in LDLr-/- mice receiving a high-fat diet. Changes in the plasma levels of calcium, triglycerides and cholesterol and its fractions were also more marked in this group. In contrast, wild-type mice receiving a high-fat diet presented high plasma HDL levels, which probably protected against alterations in the mechanical and morphological properties of the femur. In conclusion, LDLr-/- mice represent a good model for the study of bone diseases related to genetic hyperlipidemia or hyperlipidemia induced by a high-fat diet, which alters the mechanical properties of the femur, rendering bones more prone to fractures.

Acknowledgments

Wilson Romero Nakagaki was the recipient of fellowships from FAPESP (2007/07638-0) and CAPES/PROEX, Brazil.

Conflict of interest: All other authors have no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Lee TM, Lin SM, Chou TF, Chag NC (2005) Effect of simvastatin on left ventricular mass in hypercholesterolemic rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:1352-1358.
2. Breslow JL (1996) Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272:685-688.

3. Garcia JA, dos Santos L, Moura AL, Ricardo KF, Wanschel AC, Shishido SM, Spadari-Bratfisch RC, de Souza HP, Krieger MH (2008) S-Nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) prevents myocardial alterations in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice by antiinflammatory action. *J Cardiovasc Pharmacol* 51:78-85.
4. Krieger MH, Santos KF, Shishido SM, Wanschel AC, Estrela HF, Santos L, de Oliveira MG, Franchini KG, Spadari-Bratfisch RC, Laurindo FR (2006) Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide* 14:12-20.
5. Krieger MH, Steimetz T, Guglielmotti MB, Giglio M (2007) Effect of experimental hypercholesterolemia on mandibular bone remodeling. International Association for Dental Research. Unilever Hatton Awards. Available at: <http://iadr.confex.com/iadr/2006Brisb/preliminaryprogram/abstract_82934.htm>.
6. Luegmayer E, Glantschnig H, Wesolowski GA, Gentile MA, Fisher JE, Rodan GA, Reszka AA (2004) Osteoclast formation, survival and morphology are highly dependent on exogenous cholesterol/lipoproteins. *Cell Death Differ* 11:S108-118.
7. Parhami F, Tintut Y, Beamer WG, Gharavi N, Goodman W, Demer LL (2001) Atherogenic high-fat diet reduces bone mineralization in mice. *J Bone Miner Res* 16:182-188.
8. Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Berliner JA, Demer LL (1997) Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:680-687.
9. Tintut Y, Parhami F, Tsingotjidou A, Tetradis S, Territo M, Demer LL (2002) 8-Isoprostaglandin E2 enhances receptor-activated NFkappa B ligand (RANKL)-dependent osteoclastic potential of marrow hematopoietic precursors via the cAMP pathway. *J Biol Chem* 277:14221-14226.
10. Tintut Y, Morony S, Demer LL (2004) Hyperlipidemia promotes osteoclastic potential of bone marrow cells ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:6-10.
11. Sanbe T, Tomofuji T, Ekuni D, Azuma T, Tamaki N, Yamamoto T (2007) Oral administration of vitamin C prevents alveolar bone resorption induced by high dietary cholesterol in rats. *J Periodontol* 78:2165-2170.
12. Soares EV, Fávaro WJ, Cagnon VH, Bertran CA, Camilli JA (2009) Effects of alcohol and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around hydroxyapatite implants. *J Bone Miner Metab* 28:101-107.
13. Robertson G, Xie C, Chen D, Awad H, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Guldberg RE, Zhang X (2007) Alteration of femoral bone morphology and density in COX-2 $-/-$ mice. *Bone* 39:767-772.
14. Akhter MP, Cullen DM, Gong G, Recker RR (2001) Bone biomechanical properties in prostaglandin EP₁ and EP₂ knockout mice. *Bone* 29:121-125.
15. Huang TH, Lin SC, Chang FL, Hsieh SS, Liu SH, Yang RS (2003) Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *J Appl Physiol* 95:300-307.
16. Turner CH, Burr DB (1993) Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 14:595-608.

17. Lammers AR, German RZ, Lightfoot PS (1998) The impact of muscular dystrophy on limb bone growth and scaling in mice. *Acta Anat* 162:199-208.
18. Xiao Y, Cui J, Li YX, Shi YH, Wang B, Le GW, Wang ZP (2009) Dyslipidemic high-fat diet affects adversely bone metabolism in mice associated with impaired antioxidant capacity. *Nutrition* 27:214-220.
19. Weisbroth SH, Paganelli RG, Salvia M (1977) Evaluation of a disposable system during shipment of laboratory rats and mice. *Lab Anim Sci* 27:186-194.
20. Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN (2007) Animais de laboratório: o camundongo. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 28:11-23.
21. Ragbir S, Farmer JA (2010) Dysfunctional high-density lipoprotein and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 12:343-348.
22. Duffy D, Rader DJ (2009) Update on strategies to increase HDL quantity and function. *Nat Rev Cardiol* 6:455-463.
23. Brodeur MR, Brissette L, Falstraalt L, Moreau R (2008) HDL3 reduces the association and modulates the metabolism of oxidized LDL by osteoblastic cells: a protection against cell death. *J Cell Biochem* 105:1374-85.
24. Epstein S (2007) Is Cortical Bone Hip? What determines cortical bone properties? *Bone* 141:S03-08.
25. Nuzzo V, de Milita AM, Ferraro T, Monaco A, Florio E, Miano P, Montemarano E, Zuccoli A, de Terlizzi F (2009) Analysis of skeletal status by quantitative ultrasonometry in a cohort of postmenopausal women with high blood cholesterol without documented osteoporosis. *Ultrasound Med Biol* 35:717-722.
26. Marte AP, Santos RD (2007) Dyslipidemia and hypertension: physiopathology. *Rev Bras Hipertens* 14:252-257.
27. Diniz P, Soejima K, Ito G (2002) Nitric oxide mediates the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on the osteoblast proliferation and differentiation. *Nitric Oxide* 7:18-23.
28. Premaor, MO, Furlanetto, TW (2006) Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. *Arq Bras Endocrinol Metab* 50:25-37.
29. Norman AW (2001) On becoming a molecular endocrinologist. *Steroids* 66:129-136.
30. Bouillon R, Okamura WH, Norman AW (1995) Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr* 16:200-257.
31. Hodges SJ, Bejui J, Leclercq M, Delmas PD (1993) Detection and measurement of vitamins K1 and K2 in human cortical and trabecular bone. *J Bone Miner Res* 8:1005-1008.
32. Vermeer C, Shearer MJ, Zittermann A, Bolton-Smith C, Szulc P, Hodges S, Walter P, Rambeck W, Stocklin E, Weber P (2004) Beyond deficiency: potential benefits of increased intakes of vitamin K for bone and vascular health. *Eur J Nutr* 43:325-335.
33. Iwamoto J, Takeda T, Sato Y (2004) Effects of vitamin K2 on osteoporosis. *Curr Pharm Des* 10:2557-2576.
34. Ferretti JL, Capozza RF, Mondelo N, Zanchetta JR (1993) Interrelationships between densitometric, geometric and mechanical properties of rat femora: inferences concerning mechanical regulation of bone modeling. *J Bone Miner Res* 8:1389-1396.

Table 1. Weekly weight gain (Δ g) and fluid and solid food intake of mice of groups W, WH, L, and LH.

Variable	W	WH	L	LH
Δ (g)	4.30 $\pm$ 0.11 ^a	5.30 $\pm$ 0.17 ^b	4.70 $\pm$ 0.10 ^c	5.80 $\pm$ 0.04 ^d
Fluid intake (mL)	6.00 $\pm$ 0.14 ^a	6.10 $\pm$ 0.12 ^a	6.13 $\pm$ 0.08 ^a	6.23 $\pm$ 0.08 ^b
Solid intake (g)	5.21 $\pm$ 0.40 ^a	5.40 $\pm$ 0.40 ^a	5.80 $\pm$ 0.40 ^b	6.00 $\pm$ 0.30 ^b

Results are reported as the mean $\pm$ standard deviation. Two means followed by the same superscript letter did not differ from one another ($p > 0.05$, Tukey test). Group W (wild-type mice) and group L (LDLr-/- mice) receiving standard ration; group WH (wild-type mice) and group LH (LDLr-/- mice) receiving a high-fat diet.

Table 2. Plasma levels of triglycerides, cholesterol and its fractions, and total and ionic calcium in mice of groups W, WH, L, and LH.

Variable	W	WH	L	LH
Triglycerides (mg/dL)	87.80 $\pm$ 1.20 ^a	93.00 $\pm$ 1.50 ^a	148.3 $\pm$ 6.80 ^b	196.0 $\pm$ 4.50 ^c
Total cholesterol (mg/dL)	126.5 $\pm$ 2.50 ^a	152.0 $\pm$ 13.5 ^a	303.5 $\pm$ 8.00 ^b	892.5 $\pm$ 24.0 ^c
HDL (mg/dL)	49.20 $\pm$ 1.40 ^a	67.70 $\pm$ 1.70 ^b	59.70 $\pm$ 4.40 ^c	34.30 $\pm$ 3.20 ^d
LDL (mg/dL)	64.50 $\pm$ 2.00 ^a	78.00 $\pm$ 4.60 ^a	184.5 $\pm$ 4.00 ^b	716.0 $\pm$ 40.3 ^c
VLDL (mg/dL)	16.00 $\pm$ 2.00 ^a	18.20 $\pm$ 1.10 ^a	37.00 $\pm$ 4.10 ^b	45.50 $\pm$ 2.10 ^c
Total calcium (mEq/L)	10.20 $\pm$ 0.23 ^a	10.00 $\pm$ 0.23 ^a	10.00 $\pm$ 0.50 ^a	07.50 $\pm$ 0.25 ^b
Ionic calcium (mmol/l)	05.00 $\pm$ 0.20 ^a	04.90 $\pm$ 0.14 ^a	04.70 $\pm$ 0.20 ^a	03.10 $\pm$ 0.13 ^b

Results are reported as the mean $\pm$ standard deviation. Two means followed by the same superscript letter did not differ from one another ($p > 0.05$, Tukey test). Group W (wild-type mice) and group L (LDLr-/- mice) receiving standard ration; group WH (wild-type mice) and group LH (LDLr-/- mice) receiving a high-fat diet.

Table 3. Morphometric parameters obtained for animals of groups W, WH, L, and LH.

Parameter	W	WH	L	LH
FL (mm)	13.0±0.4 ^a	12.0±0.6 ^b	11.6±0.5 ^b	12.0±0.4 ^b
PW (mm)	3.0±0.10 ^a	3.0±0.10 ^a	2.6±0.07 ^b	2.5±0.08 ^b
WDia (mm)	2.15±0.17 ^a	2.16±0.07 ^a	1.8±0.08 ^b	1.7±0.08 ^b
DW (mm)	3.40±0.14 ^a	3.35±0.12 ^a	3.2±0.07 ^b	3.16±0.08 ^b
TA (µm ²)	2.50±0.14 ^a	2.45±0.08 ^a	1.89±0.04 ^b	1.50±0.13 ^c
TT (µm)	0.18±0.02 ^a	0.15±0.03 ^a	0.07±0.01 ^b	0.06±0.01 ^c
CA (µm ²)	4.62±0.1 ^a	4.61±0.08 ^a	4.27±0.12 ^b	3.60±0.03 ^c
CT (µm)	0.90±0.02 ^a	0.89±0.02 ^a	0.85±0.05 ^b	0.74±0.02 ^c

Group W (wild-type mice) and group L (LDLr^{-/-} mice) receiving standard ration; group WH (wild-type mice) and group LH (LDLr^{-/-} mice) receiving a high-fat diet. FL: femur length; PW: proximal femur width; WDia: femur width at the diaphysis; DW: distal femur width; TA: trabecular area; TT: trabecular thickness; CA: cortical area; CT: cortical thickness. Results are reported as the mean ± standard deviation. Two means followed by the same superscript letter did not differ from one another ($p > 0.05$, Tukey test).

Table 4. Structural and material properties of the femurs of mice of groups W, WH, L, and LH.

Mechanical properties	W	WH	L	LH
<i>Structural properties</i>				
Maximum load (N)	17.35±1.17 ^a	16.0±2.1 ^a	16.3±3.0 ^a	13.19±0.9 ^b
Displacement (mm)	0.22±0.02 ^a	0.42±0.12 ^a	0.22±0.01 ^a	0.37±0.1 ^a
Stiffness (N/mm)	112.0±17.7 ^a	74.3±20.2 ^a	92.0±57.56 ^a	35.19±8.3 ^b
<i>Material properties</i>				
Maximum stress (MPa)	15.06±7.0 ^a	9.0±2.60 ^a	6.1±0.5 ^b	6.2±2.0 ^b
Strain (mm/mm)	0.13±0.01 ^a	0.22±0.10 ^a	0.25±0.06 ^b	0.10±0.0 ^c
Elastic modulus (MPa)	80.3±40 ^a	35.15±6.15 ^b	17.50±17.60 ^b	29.0±8.70 ^b

Results are reported as the mean ± standard deviation. Two means followed by the same superscript letter did not differ from one another ($p > 0.05$, Tukey test). Group W (wild-type mice) and group L (LDLr^{-/-} mice) receiving standard ration; group WH (wild-type mice) and group LH (LDLr^{-/-} mice) receiving a high-fat diet.

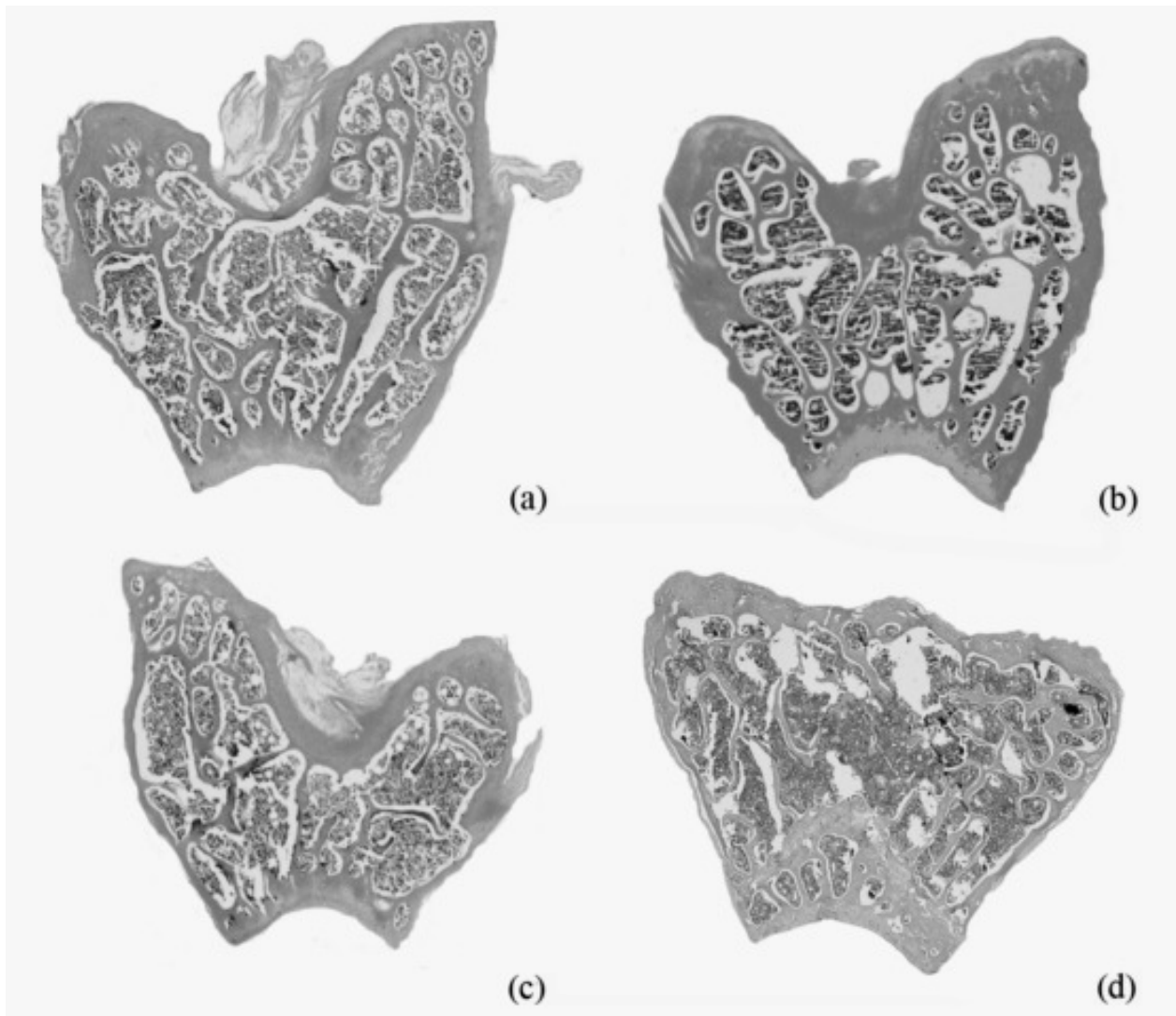


Fig. 1 Photomicrographs of cross-sections of the femur showing spongy bone in the distal femoral epiphysis of mice of groups W (1a), WH (1b), L (1c), and LH (1d) (hematoxylin–eosin staining). The reduced trabecular thickness and smaller trabecular area in the femur of animals of group LH are clearly visible (20x objective).

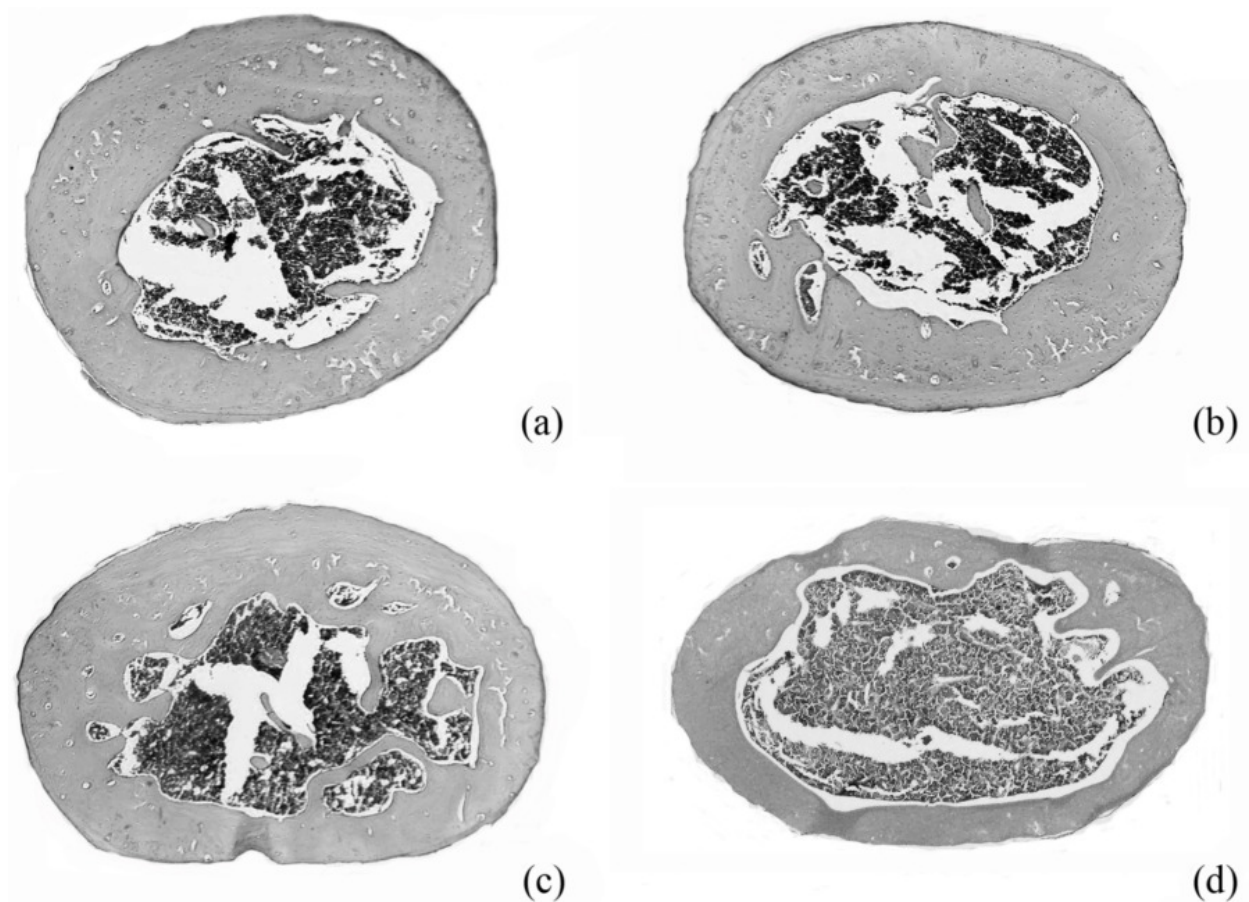


Fig. 2 Photomicrographs of cross-sections of the femoral diaphysis of mice of groups W (1a), WH (1b), L (1c), and LH (1d) (hematoxylin–eosin staining). The reduced cortical thickness in the femur of animals of group LH is clearly visible (4x objective).

4.2 Effects of simvastatin on morphometric and mechanical properties in the femur of mice.

Soares, E.A.;¹ Nakagaki, W.R.;² Garcia, JAD;¹ Camilli, J.A.^{2*}

¹ Department of Anatomy, University of José Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, MG, Brazil;

² Department of Anatomy, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

* Corresponding author: Phone: +55 19 3521-6104; fax: +55 19 3521-6185.

E-mail address: jcamilli@unicamp.br (J.A. Camilli).

Short title: Hyperlipidemia and femoral alterations

Keywords: Simvastatin; Hyperlipidemia; LDL receptor knockout mice; bone; mechanical properties

Article type: Original Research

* Correspondence to: José Ângelo Camilli PhD, Department of Anatomy, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), P.O. Box 6109, 13083-865, Campinas, SP, Brazil. Telephone: +(55) 19-3521-6102. Fax: +(55) 19-3289-3124. E-mail: jcamilli@unicamp.br

ABSTRACT

Simvastatin is a drug capable of enhancing HDL and decreasing LDL, triglycerides and total cholesterol serum levels. Besides these benefic effects in treating hyperlipidemia, simvastatin has been also put in evidence due to its action on bone tissue since it diminishes osteoblast's apoptosis and inhibits osteoclast's action. Although effective on bone tissues, there are few

reports of simvastatin's action on bone biomechanics. In this way, the present study aimed to evaluate simvastatin effects on femoral biomechanics and cortical/trabecular bone structure of wild type mice nourished with hyperlipidic diet. Methods: three-month-old male wild type mice (C57BL6 strain) were divided into four experimental groups (n = 5): 1) Group W, nourished with a standard diet; 2) Group WH, fed with a hyperlipidic diet; 3) Group WS, nourished with a standard diet plus oral simvastatin (20mg/kg/day); and 4) Group WHS, fed with a hyperlipidic diet plus oral simvastatin (20mg/kg/day). All animals received only their specific diet and water at will (*ad libitum*) for sixty days. At the end of the experiment, blood samples were collected for laboratorial analysis of calcium, triglycerides, and total cholesterol and fractions serum levels. Femurs were isolated for mechanical tests and morphometric analysis. Results: Group WH mice presented greater bone compromising for all variables: mechanical properties (structural and material), trabecular thickness, and triglycerides, and total cholesterol and fractions serum levels. Conclusion: a hyperlipidic diet intake was a risk factor for bone integrity but the use of simvastatin minimized bone structural and material properties alterations.

1. INTRODUCTION

Cardiovascular diseases are the main world's death cause in humans and are associated to traditional risk factors such as hyperlipidemias [1], smoking, arterial hypertension and misbalanced diet consumption [2, 3]. The treatment of hyperlipidemia is based on two pillars: change of patient's life habits and drug intake, the last used when the former had not improved lipids serum level (what is a strong ally for maintaining cardiovascular health) [3]. Statins are often indicated for drug treatment of hyperlipidemias because they inhibit hydroxymethylglutaryl-coenzyme-A (HMG-CoA) reductase, among other mechanisms, and are

the most powerful and efficient drug group in increasing HDL (High Density Lipid) and decreasing LDL (Low Density Lipid), total cholesterol, VLDL (Very Low Density Lipid) and triglycerides serum level [4]. Besides reducing cardiovascular morbidity/mortality, mainly through its hypocholesterolemic effect [5], statins also present benefic effects on bone tissue, sometimes being indicated for osteoporosis treatment [6, 7]. Studies had demonstrated that statins not only minimize bone fracture risk but yet increase bone mineral density [8] and osteoblastic activity [9].

The first studies referring the use of simvastatin and its benefic action on bone tissue were performed by Mundy et al. [1], Song et al. [11], and Staal et al. [12]. Through an *in vitro* bone cells study, Mundy et al. [10] observed a rise in BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein) after statins application (lovastatin, simvastatin, mevastatin and fluvastatin). Wong and Rabie [13] demonstrated the effects of simvastatin on bone metabolism, associating the use of this drug to an increasing osteogenesis and inhibiting bone reabsorption, resembling an alendronate sodium-like mechanism.

Considering the great number of hyperlipidemic individuals undergoing simvastatin treatment and concerning its probable effects on bone tissue, the present study had the objective to evaluate the effects of simvastatin on femoral biomechanics and cortical/trabecular bone structure of wild type mice nourished with hyperlipidic diet.

2. MATERIALS AND METHODS

Animal model

Animal experimentation was carried out according to the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and

was approved by the Ethics Research Institutional Committee of UNIFENAS (University José do Rosário Vellano) under protocol number 23A/2010.

Twenty wild-type (C57BL6) mice were used. Three-month-old male animals were obtained from Jackson Laboratories (USA). The animals were maintained in ventilated racks (Alesco®) at a controlled temperature and at a 12-hour light/dark cycle. The mice were divided into four groups of five animals each: 1) Group W, nourished with a commercial diet (Nuvital®) + 0.9% saline solution, given by gavage for 60 days; 2) Group WH, fed with a hyperlipidic diet (20% total fat, 1.5% cholesterol and 0.5% cholic acid) + 0.9% saline solution, given by gavage for 60 days; 3) Group WS, nourished with a commercial diet (Nuvital®) + oral simvastatin (20mg/kg/day), given by gavage for 60 days; and 4) Group WHS, fed with a hyperlipidic diet (20% total fat, 1.5% cholesterol and 0.5% cholic acid) + oral simvastatin (20mg/kg/day), given by gavage for 60 days.

During the experiment, water and food intake were measured daily and weight gain was recorded weekly.

After 60 days, all animals were anesthetized by intra-peritoneal injection of xylazine (Bayer AS®)/ketamine (Parke-Davis) at a concentration of 6-40 mg/kg. Blood was collected for analysis of total calcium, triglycerides, total cholesterol and fractions (HDL, LDL, and VLDL) serum levels. Next, the animals were sacrificed by an overdose of the anesthetic and their femurs were collected for mechanical testing and histological processing.

Calcium, triglycerides, total cholesterol and fractions serum levels

Lipids serum levels were determined as described by Garcia et al. [3] including total cholesterol (TC) and fractions (HDL, VLDL and LDL). HDL was measured after the addition of

heparin and manganese to precipitate apolipoprotein B containing VLDL, followed by centrifugation at 15000r for 15 minutes. The supernatant solution was then used for determining the HDL fraction. The blood samples were collected by means of heart puncture in all animals of each group. Calcium serum concentrations were determined by chemiluminescence and expressed in mg/dL [12].

Mechanical test

The right femur of all animals was removed and stored in a freezer (-20°C) until the day prior to the mechanical test. For this, the femurs (n = 5 per group) were submitted to three-point bending testing until complete fracture at a velocity of 3 mm/min. An MTS TestStar II apparatus with a load cell of 100 kgf was used. The upper point and the two lower supports had a tip radius of 0.5 mm [13]. The distance between the two lower supports was 5 mm [14]. Each femur was tested in the anterior-posterior plane (concave-up position), with the anterior surface of the bone facing upwards. The load and displacement data were obtained directly from the MTS system and recorded with a computer coupled to the testing set. These data were used for acquisition and calculation of the structural properties: maximum load, displacement at maximum load, and extrinsic stiffness. The extrinsic stiffness was calculated as the slope of the most linear portion of the elastic region of the load-displacement curve [14, 15]. After testing the specimens in three-point bending, the failure sites of all bone were photographed, coupled to a measurement pattern, by a high-resolution digital camera at a standardized distance according to Huang et al. [15]. The parameters of cross-sectional cortical bone area of the diaphysis were measured on the images using the NIS-Elements 3.0 software (Advanced Research, USA). The cross-sectional moment of inertia (CSMI) at the point of failure was calculated by the formula of Turner et al. [16]:

$$I = \frac{\pi}{64} [ab^3 - (a - 2t)(b - 2t)^3]$$

Where I is the CSMI; a is the width of the cross-sectional area in the medium- lateral direction; b is the width of the cross-sectional area in the anterior-posterior direction; and t is the average cortical thickness [16]. The material properties were obtained from the structural properties [14] and the following material properties were evaluated: maximum stress, strain at maximum stress and elastic modulus. On the basis of the load-displacement data, these parameters were calculated using the following equations:

$$\sigma = \frac{load \cdot L \cdot c}{4I} \quad \varepsilon = \frac{12 \cdot c \cdot d}{L^2} \quad E = \frac{stiffness \cdot L^3}{48I}$$

Where σ is the stress; L is the distance between the two lower supports; c is the maximum distance from pixels to the line that crosses the center of the mass; ε is the strain; d is the displacement; and E is the elastic modulus. The tests were carried out at the Laboratory of Mechanical Properties, Faculty of Mechanical Engineering, UNICAMP.

Femur morphometry

Anatomical dimensions of the femur

After removal of all soft tissue from the femurs, the following four measurements were obtained with a digital caliper and magnifying glass according to Lammers et al. [17]: 1) femur length (measured from the most proximal point of the femoral head to the most distant end of the femur); 2) femur diaphysis width (measured at the narrowest point of the mid-femur); 3) proximal femur width (measured from the anterior point of the femoral head to the tip of the greater trochanter); 4) distal femur width (corresponding to the width of the condyles in the anterior-posterior direction perpendicular to the length of the femur).

Epiphyseal trabecular bone

The femur distal epiphysis (n = 5 per group) was used for this analysis. Six histological sections were prepared for each femur and two fields of each section were captured. The specimens were fixed in 10% buffered formalin for 72h and decalcified in a solution of formic acid, formalin and sodium citrate for 35 days. Next, the specimens were submitted to routine histological processing and embedded in paraffin. Longitudinal sections (5 µm) were obtained and stained with hematoxylin-eosin. The histological sections were examined under a Nikon 80i photomicroscope using a 20x objective. The images were captured with a Nikon DS-Ri1 camera for the analysis of trabecular bone area, area fraction and mean thickness using the NIS-Elements 3.0 Advanced Research software.

Diaphyseal cortical bone

The middle third of the femur diaphysis (n = 5 per group) was used for this analysis. Cross-sections (5 µm) were obtained and stained with hematoxylin-eosin. Twelve histological sections (1 section = 1 field) were prepared for each bone. The images were captured using a 4x objective and the cortical bone area (cross-section of medullary area) and mean cortical thickness were calculated.

Statistical Analysis

Final weight (g), daily fluid intake (ml), daily solid food intake (g), laboratory analyses, femoral biomechanical analysis, and morphological and morphometric aspects were statistically compared among the groups by analysis of variance followed by Tukey's test at 1 and 5% levels of significance, respectively. Means with different letters were significantly different (5%) from each other.

3. RESULTS

During the experiment, all mice went on weight gain and satisfactory fluid and solid food intake. Solid food and fluid consumption were similar in all experimental groups (Table 1). Groups WH and WHS mice presented a greater weight gain in comparison to groups W and WS animals (Table 1).

We do not observe triglycerides serum level differences in the lipid profile analysis of groups WH and WHS mice. Nevertheless, in these animals triglycerides serum levels were higher than those in groups W and WS ones (Table 2). Total cholesterol serum levels showed no differences among groups W, WS, and WHS, but group WH mice presented themselves with hypercholesterolemia and simvastatin prevented it in group WHS mice (Table 2). In relation to cholesterol fractions serum levels we noted that groups W and WS mice do not showed HDL fraction serum level differences, but in groups WH and WHS animals there was a rise in HDL serum level. Concerning LDL fraction, group WHS animals presented lesser values than the other groups but group WH mice showed high values of this cholesterol fraction (Table 2). VLDL fraction serum levels were equal for all experimental groups (Table 2). Total and ionized calcium serum levels were statistically the same in all groups (Table 2).

Analyses on femur size revealed that groups W, WH, WS and WHS mice did not show difference in relation to femur length, proximal femur width, width of the diaphysis of the femur and distal femur width (Table 3). As well as the former, values for trabecular area, cortical thickness and cortical area were the same for animals of all groups (Table 1; figures 1 and 2). The trabecular thickness in group WH mice was lesser in comparison to the other groups (Table 3; figures 1 and 2). The morphometric parameters for trabecular bone thickness of the femur distal

epiphysis for group WH animals were about 16.6% lesser than those for group W mice (Table 3; figures 1 and 2).

The results from femur mechanical tests for analysis of structural properties showed that the maximum load enough for complete femur failure as well as the bone displacement in animals of all four groups did not present statistic differences (Table 4). Analysis of femur extrinsic stiffness for groups W and WH mice were equal but lesser to the values obtained through analysis of this structural property for groups WH and WHS animals (Table 4).

Referring to material properties analysis, we verified that femur maximum stress for groups W, WH and WS mice did not present significant differences. However, hyperlipidic diet intake even associated to simvastatin use did not prevent maximum stress alterations for group WHS animals (Table 4). Elastic modulus analysis for groups W and WS demonstrated higher values than those found for groups WH and WHS. Strain values obtained through groups W, WH, WS and WHS femur analyses were not different (table 4).

4. DISCUSSION

The present study showed that hyperlipidic diet induced an environmental factor-induced mixed hyperlipidemia in C57BL6 strain mice, characterized by triglyceride and total cholesterol rise for group WH animals. The use of simvastatin prevented hypercholesterolemia and reduced total cholesterol and LDL serum levels, but did not prevent hypertriglyceridemia in group WHS mice as well as did not reduced HDL serum levels. In relation to femur biomechanical and morphometric analyses, group WH mice presented a combined (mixed) hyperlipidemia associated to reduction of trabecular bone thickness and femur structural and material properties alterations. Simvastatin prevented morphological alterations and minimized femur biomechanical changes for group WHS mice.

The use of especial diets and drug intake need to be more cautiously analyzed, mainly referring to nutritional status, because fluid and solid food consumption variations may induce changes in biological responses in experimental animals [25]. Our results showed that all animals went on weight gain. Besides that, we noted that fluid and solid food intake remained within expected standard patterns [26, 27]. Differences found in biomechanics and trabecular area among the experimental groups were due to hyperlipidic diet and simvastatin administration effects and not to malnutrition and/or dehydration.

Obesity, sedentarism and fat-rich diet intake are determinants for developing of metabolic diseases and their complications [28, 29, 30]. Animals nourished with hyperlipidic diet presented greater weight gain and higher lipid serum levels during the experiment.

Simvastatin induced triglycerides decrease and HDL rise serum level [31]. Nevertheless, simvastatin was not capable of reducing triglycerides serum level in animals nourished with hyperlipidic diet and they developed hypertriglyceridemia. According to Campos, Carvalho et al. [31], total cholesterol serum level tend to decrease with the use of simvastatin. In our study, group WH mice presented high total cholesterol serum level while group WHS ones showed the least levels, demonstrating that simvastatin was efficient in reducing total cholesterol serum level.\

Fat-poor diet consumption and weight loss lead to HDL rise in 5 to 20% [32]. Mice nourished with hyperlipidic diet associated to simvastatin use presented total cholesterol and LDL low levels, while animals fed with the same diet but not in use of simvastatin showed total cholesterol and LDL high levels. LDL serum level rise is considered a risk factor for cardiovascular diseases and bone tissue alterations [33, 34, 35]. HDL serum level of animals fed with hyperlipidic diet treated or not with simvastatin were the same.

According to Sposito et al. [36], some statins cause intracellular calcium concentration reduction, in the same way that familial hypercholesterolemia has been related to calcium homeostasis alterations (occurrence of calcium sequestration for arterial deposition) [37]. Our results demonstrated that independently from hyperlipidemia and simvastatin use all mice maintained balanced total and ionized calcium serum levels.

The relationship between hyperlipidemia and bone tissue alterations has been discussed in different studies [38, 39]. However, few papers clarify the effects of hyperlipidemia and simvastatin use over bone morphology and mechanical properties.

Bone physical characteristics, cortical area, cortical thickness, and trabecular area offer important data concerning resistance to bone fracture [20]. Femur dimensions, cortical area and cortical thickness analyses showed that there were no differences among experimental groups. Nevertheless, femur trabecular area thickness of mice nourished with hyperlipidic diet was about 16% less than that from the other groups. It is probably because high cholesterol serum level causes bone mass reduction, decreased bone remodeling, intensive proliferation of osteoclasts and inhibition of osteoclasts activity, consequently jeopardizing trabecular architecture and possibly causing osteoporosis [34, 35, 38].

Clinical and experimental studies demonstrate that the use of simvastatin prevents trabecular mass reduction for its enhancing action on osteoblastic activity, bone repair speeding, and increasing in Bone Morphogenetic Protein (BMP-2) expression and bone mineral density [5, 10, 40]. In the present study, animals fed with hyperlipidic diet and using simvastatin did not present trabecular thickness alterations. We believe that simvastatin acts in cholesterol synthesis step, blocking the conversion of HMG-CoA into mevalonic acid. In this way, the generation of geranyl pyrophosphate and farnesyl pyrophosphate, both late metabolites in this cascade, would

be deficient, thus inhibiting protein prenylation, a fundamental process in regulation of osteoclasts' metabolism, since its inhibition leads to a higher apoptosis of these cells [41]. It has been hypothesized from the action of bisphosphonates on cholesterol metabolism, because simvastatin directly inhibit the synthesis of farnesyl pyrophosphate thus preventing proteins prenylation. Consequently, it reduces bone reabsorption [42], increases bone mineral density and lows fracture incidence [43].

Mechanical tests allow structural and material properties knowledge. Material properties are related to tissue composition (cells and organic and inorganic parts). Structural properties refer to the organ as a whole (mass, architecture, size and distribution) [44]. So, femur mechanical analysis showed that structural (displacement and stiffness) and material (maximum tension, deformity and elastic modulus) properties are more compromised in mice nourished with hyperlipidic diet (group WH animals). The use of simvastatin in group WHS mice minimized structural and material properties alterations. Diminished bone stiffness, which is associated to an eventual low bone mineralization rate [45] and elastic modulus changes are due to bone decalcification, reduced mineral matrix and bone fragility factors [46]. This demonstrates the deficient organization and a low collagen and mineral contents in femurs of mice fed with hyperlipidic diet (hyperlipidemic animals), what makes bones less resistant and more suitable to fractures. In front of fat-rich diet consumption, simvastatin does not prevent bone compromising.

5. REFERÊNCIAS

1. Lee TM, Lin SM, Chou TF, Chag, NC. 2005. Effect of simvastatin on left ventricular mass in hypercholesterolemic rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H1352–H1358.
2. Koba S, Hirano T. 2011. Risk factors for hypertension among rural Thais. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 42(1):208-17.
3. Schulz I. 2006. Tratamento das dislipidemias: como e quando indicar a combinação de medicamentos hipolipemiantes. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 50(2): 344-359.

4. Silva RM, Neto FCP, Bertencello D. 2008. Efeitos da sinvastatina sobre propriedades biomecânicas de ossos de ratas ovariectomizadas. *Revista Médica de Minas Gerais*. 18(1):31-36.
5. Lupattelli G, Scarponi AM, Vaudo G, Siepi D, Roscini AR, Gemelli F, Pirro M, Latini RA, Sinzinger H, Marchesi S, Mannarino E. 2004. Simvastatin increases bone mineral density in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Metabolism*. 53(6):744-748.
6. Yaturu S. 2003. Skeletal effects of statins. *Endocr Pract*. 9(4):315-20.
7. Chan KA, Andrade SE, Boles M, Buist DS, Chase GA, Donahue JG, Goodman MJ, Gurwitz JH, LaCroix AZ, Platt R. 2000. Inhibitors of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and risk of fracture among older women. *Lancet*. 355(9222):2185-8.
8. Pauly S, Luttsch F, Morawski M, Haas NP, Schmidmaier G, Wildemann B. 2009. Simvastatin locally applied from a biodegradable coating of osteosynthetic implants improves fracture healing comparable to BMP-2 application. *Bone*. 45(3):505-11.
9. Bauer DC. 2007. Statins and bone: basic science confirmed but clinical studies conflicting. Disponível em: <http://www.medscape.com/viewarticle/41925>> Acesso em 10/08/2007.
10. Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G, Boyce B, Zhao M, Gutierrez G. 1999. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*. 286(5446):1946-51.
11. Song C, Guo Z, Ma Q, Chen Z, Liu Z, Jia H, Dang G. 2003. Simvastatin induces osteoblastic differentiation and inhibits adipocytic differentiation in mouse bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 308:458-62.
12. Staal A, Frith JC, French MH, Swartz J, Güngör T, Harrity TW, Tamasi J, Rogers MJ, Feyen JH. 2003. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *J Bone Miner Res*. 18(1): 88-96.
13. Wong RWK, Rabie ABM. 2003. Statin collagen grafts used to repair defects in the parietal nobe of rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 41(4): 244-248.
14. Garcia JA, dos Santos L, Moura AL, Ricardo KF, Wanschel AC, Shishido SM, Spadari-Bralfish RC, de Souza HP, Krieger MH (2008) S-Nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) prevents myocardial alterations in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice by antiinflammatory action. *J Cardiovasc Pharmacol* 51:78-85.
15. Mehrabian M, Qiao JH, Hyman R, Ruddie D, Laughton C, Lusis AJ. 1993. Influence of the apoA-II gene locus on HDL levels and fatty streak development in mice. *Arterioscler Thromb*. 13(1):1-10.
16. Soares EV, Fávaro WJ, Cagnon VH, Bertran CA, Camilli JA. 2009. Effects of alcohol and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around hydroxyapatite implants. *J Bone Miner Metab* 28(1):101-7.
17. Nakagaki WR, Bertran CA, Santo-Neto H, Camilli JA. 2011. Mechanical, biochemical and morphometric alterations in the femur of mdx mice. *Bone*. 48(2):372-379.
18. Akhter MP, Cullen DM, Gong G, Recker RR (2001) Bone biomechanical properties in prostaglandin EP₁ and EP₂ knockout mice. *Bone* 29: 121-125.
19. Robertson G, Xie C, Chen D, Awad H, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Guldberg RE, Zhang X Alteration of femoral bone morphology and density in COX-2 $-/-$ mice. *Bone* 39: 767-772.
20. Huang TH, Lin SC, Chang FL, Hsieh SS, Liu SH, Yang RS (2003) Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *J Appl Physiol* 95: 300-307.

21. Turner CH, Akhter MP, Heaney RP. 1992. The effects of fluoridated water on bone strength. *J Orthop Res*, 10: 581-587.
22. Turner CH, Burr DB (1993) Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 14: 595-608.
23. Lammers AR, German RZ, Lightfoot PS (1998) The impact of muscular dystrophy on limb bone growth and scaling in mice. *Acta Anat* 162:199-208.
24. Mandarim-de-Lacerda CA. 1995. Métodos quantitativos em morfologia. EdUERJ, Rio de Janeiro, 1-131.
25. Weisbroth SH, Paganelli RG, Salvia M (1977) Evaluation of a disposable system during shipment of laboratory rats and mice. *Lab Anim Sci*. 27:186-194.
26. Chen SH, Chou FF, Ko JY. 2010. The use of simvastatin with aromasin in an ovariectomized rat model: effects on the skeletal system. *Chang Gung Med J*. 33(5):509-14.
27. CCAC. Canadian Council on Animal Care. 1984. Guide to the care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal Care: Ottawa, 208p.
28. Zambon L, Duarte FO, Freitas LF, Scarmagnani FRR, Dâmaso A, Duarte ACGO, Senefiorese, M. 2009. Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos. *Rev. Nutr*. 22(5):707-715.
29. Rolland C, Broom I. 2011. The Effects of Very-Low-Calorie Diets on HDL: A Review. *Cholesterol*. 2011:306278.
30. Márquez-Sandoval F, Macedo-Ojeda G, Viramontes-Hörner D, Fernández BJ, Salas SJ, Vizmanos B. 2011. The prevalence of metabolic syndrome in Latin America: a systematic review. *Public Health Nutr*. 13:1-12
31. Campos VL, Carvalho I. 2007. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. *Quím Nova*. 30(2):425-430.
32. National Cholesterol Education Program (NCEP). 2002. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) final report. *Circulation*.; 106: 3143-421.
33. Alshehri AM. 2010. Metabolic syndrome and cardiovascular risk. *J Family Community Med*. 17(2):73-8.
34. Yamaguchi T, Sugimoto T, Yano S, Yamauchi M, Sow H, Chen Q, Chihara K. Plasma lipids and osteoporosis in postmenopausal women. *Endocrine. J*. v.49, p. 211–217, 2002.
35. Luegmayer E, Glantschnig H, Wesolowski GA, Gentile MA, Fisher JE, Rodan GA, Reszka A A. 2004. Osteoclast formation, survival and morphology are highly dependent on exogenous cholesterol/lipoproteins. *Cell Death Differ*. 11(Suppl 1):S108-18.
36. Sposito AC, Mansur AP, Coelho OR, Nicolau JC, Ramires JA. 1999. Additional reduction in blood pressure after cholesterol-lowering treatment by statins (lovastatin or pravastatin) in hypercholesterolemic patients using angiotensin-converting enzyme inhibitors (enalapril or lisinopril). *Am J Cardiol*. 83:1497-9.
37. Awan Z, Alwaili K, Alshahrani A, Langsetmo L, Goltzman D, Genest J. 2010. Calcium homeostasis and skeletal integrity in individuals with familial hypercholesterolemia and aortic calcification. *Clin Chem*. 56(10):1599-607.
38. Krieger MH, Steimetz T, Guglielmotti MB, Giglio M. 2007. Effect of Experimental Hypercholesterolemia on Mandibular Bone Remodeling. University of Buenos Aires,

Argentina. Disponível em: <http://iadr.confex.com/iadr/2006Brisb/techprogram/abstract_82934.htm> Acesso em 10/12/2007.

39. Xiao Y, Cui J, Li YX, Shi YH, Wang B, Le GW, Wang ZP. 2010. Dyslipidemic high-fat diet affects adversely bone metabolism in mice associated with impaired antioxidant capacity. *Nutr.* 27(2):214-20
40. Wang JW, Xu SW, Yang DS, Lv RK. 2007. Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat. *Osteoporosis int.* 18(12):1641-1650.
41. Braga Júnior JWR, Souza AWS, Noronha LK, Furia JK, Szejnfeld VL. 2002. Estatinas e densidade mineral óssea: mitos e verdades. *Rev bras reumatol.* 42(2):111-114
42. Cummings SR, Bauer DC. 2000. Do statins prevent both cardiovascular disease and fracture? *JAMA.* 283: 3255-7.
43. Chen SH, Chou FF, Ko JY. 2010. The use of simvastatin with aromasin in an ovariectomized rat model: effects on the skeletal system *Chang Gung Med J.* 33(5):509-14.
44. Ferretti JL, Cointry GR, Capozza RF, Capiglioni R, Chiappe MA. 2001. Analysis of biomechanical effects on bone and on the muscle-bone interactions in small animal models. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 1(3): 263-274.
45. Hernandez CJ, Beaupré GS, Keller TS, Carter D.R. 2001. The influence of bone volume fraction and ash fraction on bone strength and modulus. *Bone*, 29(1): 74-8.
46. Ruppel, M.E., Miller, L.M., Burr, D.B. 2008. The effect of the microscopic and nanoscale structure on bone fragility. *Osteoporos. Int.*, 19(9): 1251-65.

Fig. 1 Photomicrographs of cross-sections of the femur showing trabecular bone in distal femoral epiphysis of groups W (a), WH (b), WS (c), and WHS (d) mice. Hematoxylin–eosin staining. (20x objective).

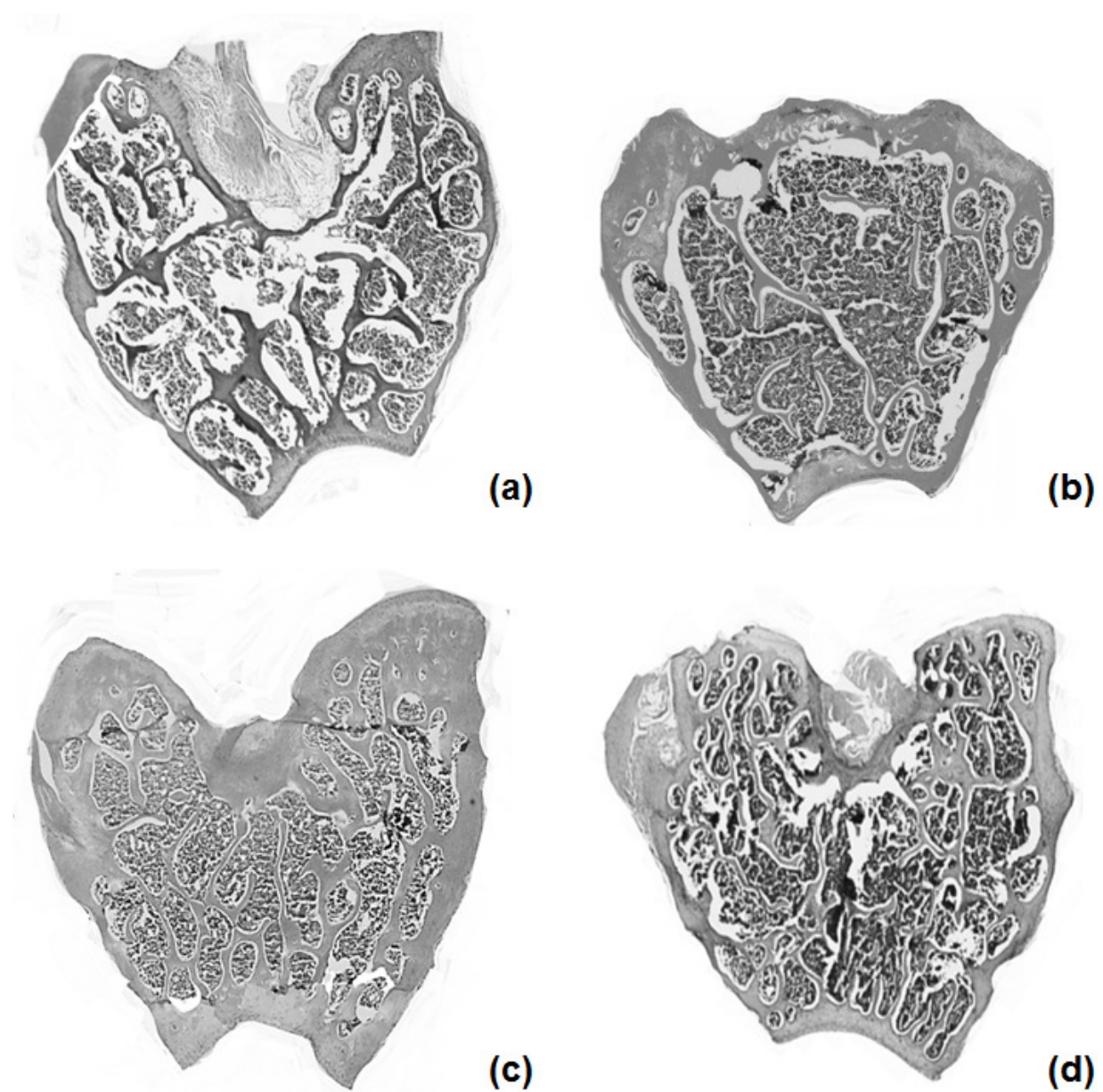


Fig. 2 Photomicrographs of cross-sections of femoral diaphysis of groups W (1a), WH (1b), WS (1c), and WHS (1d) mice. Hematoxylin–eosin staining. (4x objective).

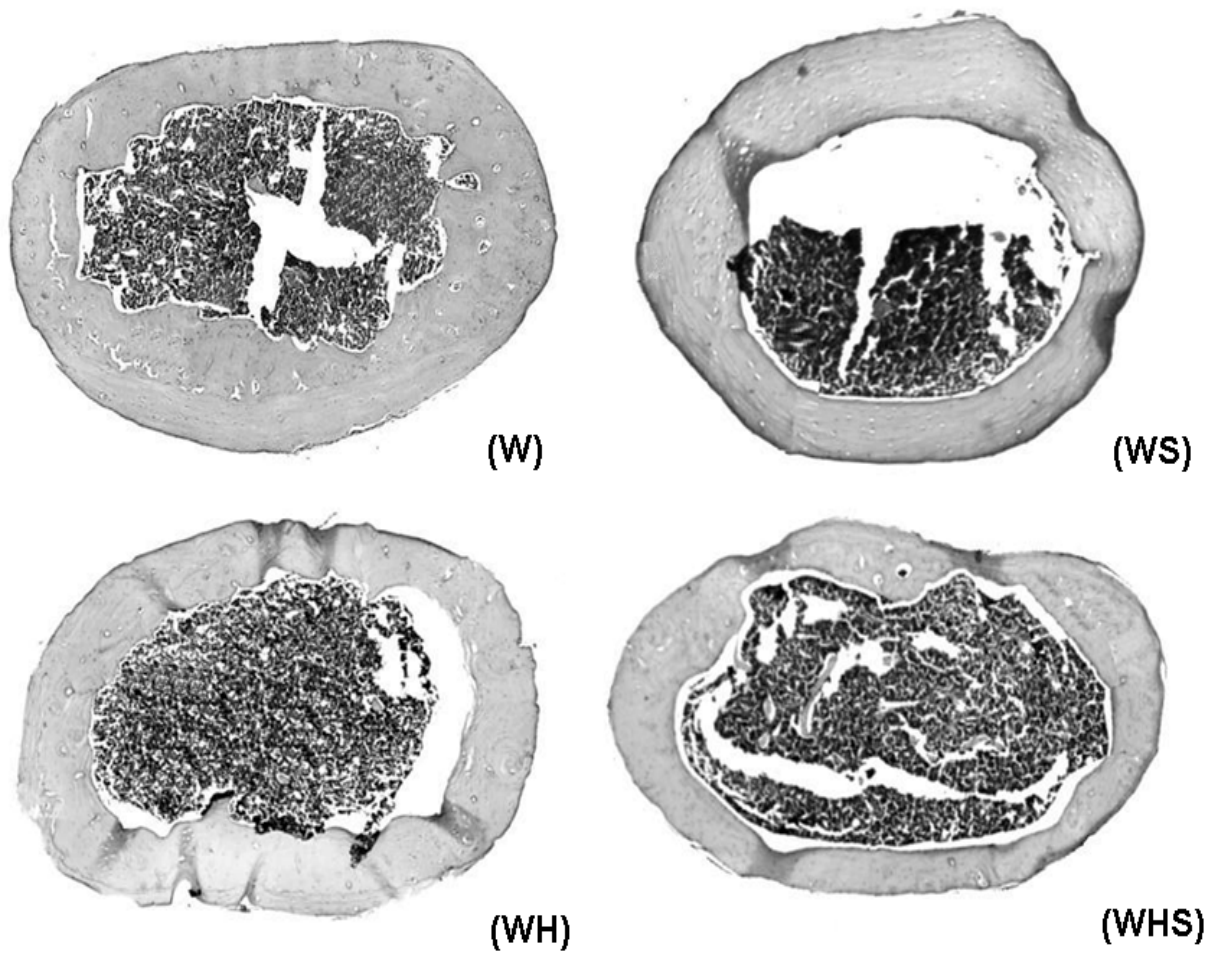


Table 1. Weekly weight gain (Δ g), fluid and solid food intake of groups W, WH, WS, and WHS mice.

Variable	W	WH	WS	WHS
Δ (g)	4.3 $\pm$ 0.11 ^a	5.3 $\pm$ 0.17 ^b	4.7 $\pm$ 0.51 ^a	5.30 $\pm$ 0.08 ^b
Fluid intake (mL)	6.0 $\pm$ 0.14 ^a	6.1 $\pm$ 0.12 ^a	6.1 $\pm$ 0.2 ^a	6.0 $\pm$ 0.12 ^a
Solid intake (g)	5.2 $\pm$ 0.40 ^a	5.3 $\pm$ 0.17 ^a	4.7 $\pm$ 0.51 ^a	5.3 $\pm$ 0.10 ^a

Results are reported as the mean $\pm$ standard deviation. Two means followed by the same superscript letter did not differ from one another ($p > 0.05$, Tukey test).

Table 2. Triglycerides, cholesterol and its fractions, and total and ionized calcium serum levels in groups W, WH, WS, and WHS mice.

Variáveis	W	WH	WS	WHS
Triglycerides (mg/dL)	87.8 $\pm$ 1.20 ^a	93 $\pm$ 1.50 ^b	88.8 $\pm$ 3.9 ^a	92.8 $\pm$ 0.44 ^b
Total cholesterol (mg/dL)	126.5 $\pm$ 2.50 ^a	152 $\pm$ 13.5 ^b	122 $\pm$ 11.2 ^a	112 $\pm$ 12.0 ^a
HDL (mg/dL)	49.2 $\pm$ 1.40 ^a	67.7 $\pm$ 1.70 ^b	49 $\pm$ 1.3 ^a	69 $\pm$ 1.2 ^b
LDL (mg/dL)	64.5 $\pm$ 2.0 ^a	78 $\pm$ 4.6 ^b	64 $\pm$ 1.6 ^a	29 $\pm$ 2.5 ^c
VLDL (mg/dL)	16 $\pm$ 2.0 ^a	18.2 $\pm$ 1.1 ^a	16.2 $\pm$ 1.7 ^a	18.3 $\pm$ 0.87 ^a
Total calcium (mEq/L)	10.2 $\pm$ 0.23 ^a	10 $\pm$ 0.23 ^a	10 $\pm$ 0.4 ^a	9.5 $\pm$ 0.5 ^a
Ionic calcium (mmol/l)	5.0 $\pm$ 0.2 ^a	4.9 $\pm$ 0.14 ^a	4.7 $\pm$ 0.2 ^a	4.6 $\pm$ 0.3 ^a

Results are reported as the mean $\pm$ standard deviation. Two means followed by the same superscript letter did not differ from one another ($p > 0.05$, Tukey test).

Table 3. Morphometric parameters obtained for groups W, WH, WS, and WHS animals.

Medida	W	WH	WS	WHS
FL (mm)	13.0±0.4 ^a	12±0.6 ^a	12.7±0.5 ^a	12.6±0.3 ^a
PW (mm)	3.0±0.10 ^a	3.0±0.10 ^a	3.02±0.1 ^a	3.0±0.14 ^a
WDia (mm)	2.15±0.17 ^a	2.16±0.07 ^a	2.13±0.11 ^a	2.16±0.15 ^a
DW (mm)	3.4±0.14 ^a	3.35±0.12 ^a	3.2±0.14 ^a	3.40±0.11 ^a
TA (mm ²)	2.50±0.14 ^a	2.5±0.08 ^a	2.40±0.1 ^a	2.5±0.1 ^a
TT (mm)	0.18±0.08 ^a	0.15±0.1 ^b	0.18±0.03 ^a	0.17±0.04 ^a
CA (mm ²)	4.62±0.10 ^a	4.62±0.08 ^a	4.63±0.10 ^a	4.61±0.08 ^a
CT (mm)	0.90±0.02 ^a	0.89±0.02 ^a	0.91±0.02 ^a	0.90±0.04 ^a

FL: fêmur length; PW: proximal femur width; WDia: femur width at the diaphysis; DW: distal femur width; TA: trabecular area; TT: trabecular thickness; CA: cortical area; CT: cortical thickness. Results are reported as the mean ± standard deviation. Two means followed by the same superscript letter did not differ from one another ($p > 0.05$, Tukey test).

Table 4. Structural and material properties of the femurs of mice of groups W, WH, WS e WHS.

Mechanical properties	W	WH	WS	WHS
Structural properties				
Maximum load (N)	17.35±1.17 ^a	16.0±2.1 ^a	16.31±3.0 ^a	14.5±1.50 ^a
Displacement (mm)	0.22±0.02 ^a	0.42±0.12 ^a	0.28±0.11 ^a	0.4±0.2 ^a
Stiffness (N/mm)	112.0±17.6 ^a	74.3±20.2 ^a	145.2±31.84 ^b	157±32.7 ^b
Material properties				
Maximum stress (MPa)	15.06±7.0 ^a	9.0±2.6 ^a	16.5±0.41 ^a	13.6±0.74 ^b
Elastic modulus (MPa)	80.3±40 ^a	35.15±6.15 ^b	78.37±0.42 ^a	32.67±0.43 ^b
Strain (mm/mm)	0.13±0.01 ^a	0.22±0.1 ^a	0.14±0.01 ^a	0.13±0.02 ^a

Results are reported as the mean ± standard deviation. Two means followed by the same superscript letter did not differ from one another ($p > 0.05$, Tukey test).

4.3 Efeito da hiperlipidemia e sinvastatina sobre o reparo de defeitos ósseos na calvária de camundongos LDLr-/- alimentados ou não com dieta hiperlipídica

Soares, E.A.;¹ Nakagaki, W.R.;² Camilli, J.A.^{2*}

¹ Departamento de Anatomia da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, MG, Brasil;

² Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

A hiperlipidemia ou dislipidemia é caracterizada por uma elevação das concentrações de lipoproteínas no sangue, sendo esta decorrente de fatores genéticos e/ou ambientais (Kassim et al., 2010; Yamada, 2011). Evidências clínicas, experimentais, metabólicas e epidemiológicas, acumuladas ao longo de várias décadas, demonstraram que níveis elevados de colesterol total, colesterol LDL e triglicerídeos estão relacionados com maior incidência de doenças cardiovasculares e do sistema esquelético (Lwin-Mm-Khin et al., 2011; Arslanian-Engoren, 2011; Farwell et al., 2008).

A associação entre a hiperlipidemia e seus efeitos sobre o tecido ósseo ainda não foram esclarecidos, no entanto, estudos clínicos e experimentais demonstraram que a hiperlipidemia está associada à redução da massa óssea e alteração na remodelagem óssea, (Luisetto e Camozzi, 2009; Krieger et al., 2007; Luegmayr et al., 2004), osteonecroses (Glueck et al., 2001; Powell et al., 2010) e osteoporoses (Graham et al., 2010).

O tratamento das hiperlipidemias baseia-se em mudanças de hábitos de vida associado ou não ao uso de estatinas, que são drogas amplamente utilizadas, pois inibem a hidroximetilglutaril-coenzima-A (HMG-CoA) redutase, caracterizando o grupo de fármacos mais potentes e eficazes para reduzir o LDL (Rang et al., 2006; Kassim et al., 2010; Bruckert e Rosenbaum, 2011). As estatinas, além de diminuem os níveis lipídicos também apresentam efeitos benéficos sobre o tecido ósseo, uma vez que elas exercem ação anabólica óssea devido a um aumento da síntese osteoblástica da proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2), um fator de crescimento que provoca a proliferação osteoblástica (Staal et al., 2003). Desta forma as estatinas são indicadas por alguns clínicos no tratamento da osteoporose (Chen et al., 2010).

Considerando os efeitos da hiperlipidemia e estatina sobre o tecido ósseo, o presente estudo teve como objetivo avaliar o reparo de defeitos ósseos produzidos cirurgicamente no crânio de camundongos LDLr(-/-) e camundongos selvagens, alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com sinvastatina.

MATERIAL E MÉTODOS

Protocolo animal

Os experimentos foram realizados em camundongos selvagens (Wild Type – Linhagem C57BL6) e em camundongos homozigotos para a ausência do gene do receptor de LDL (LDLr(-/-) gerados no *background* C57BL6, machos, com 3 meses de idade, pesando 22±3g. Os animais foram obtidos da *Jackson Laboratories (EUA)* e criados no biotério da pós-graduação da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), em estantes ventiladas (Alesco®) com controle de temperatura e controle de 12 horas no ciclo claro/escuro, em caixas para roedores

com forração de maravalha. Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em oito grupos (n=6), assim constituídos:

Grupo W - Camundongos selvagens que receberam ração comercial (Nuvital®) + solução fisiológica (SF) a 0,9% através de gavagem por 60 dias (n=06).

Grupo WH - Camundongos selvagens que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5 % ácido cólico + solução fisiológica (SF) (0,9%) através de gavagem por 60 dias (n=06).

Grupo WS - Camundongos selvagens que receberam ração comercial (Nuvital®) + Sinvastatina via oral (gavagem) na dose de 20mg/kg/dia por 60 dias (n=06).

Grupo WHS - Camundongos selvagens que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5 % ácido cólico + Sinvastatina via oral (gavagem) na dose de 20/mg/kg/dia por 60 dias (n=06).

Grupo L - Camundongos LDLr/- que receberam ração comercial (Nuvital®) + SF (0,9%) através de gavagem por 60 (n=06).

Grupo LH - Camundongos LDLr/- que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5 % ácido cólico + SF (0,9%) através de gavagem por 60 dias (n=06).

Grupo LS - Camundongos LDLr/- que receberam ração comercial (Nuvital®) + Sinvastatina via oral (gavagem) na dose de 20/mg/kg/dia por 60 dias (n=06).

Grupo LHS - Camundongos LDLr/- que receberam ração hiperlipídica com 20% de gordura total, 1,25% de colesterol e 0,5 % ácido cólico + Sinvastatina via oral (gavagem) na dose de 20/mg/kg/dia por 60 dias (n=06).

Todos os animais foram alimentados com as respectivas dietas e receberam água *ad libitum*. Durante o experimento, a ingestão líquida e a ingestão sólida foram mensuradas. Além disso, semanalmente, os animais eram pesados para a caracterização do estado nutricional.

Princípios éticos

O presente estudo foi aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade José do Rosário Vellano de Alfenas – UNIFENAS (Protocolo n.º 23A/2010), Alfenas – MG, obedeceu aos princípios éticos em experimentação animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e a Legislação Brasileira de Animais de Experimentação regulamentada pela Lei Federal 6.638 (1979).

Procedimento cirúrgico

Ao completar 15 dias de experimentação, os animais foram submetidos à cirurgia para produção de uma falha no osso parietal direito. Para o início do procedimento, os animais foram anestesiados com uma solução final de cloridrato de xilazina 2% (Rompun®, Bayer Animal Health) e cloridrato de ketamina 10% (Dopalen®, Agribbrands Brasil Ltda.) diluídos a 2mg/ml e 10mg/ml em solução salina (0,9%) (Alcon®, Alcon Labs. do Brasil Ltda.), respectivamente. Foi administrada, por via intraperitoneal, uma dose única de 0,1ml da solução anestésica para cada 10g de peso corporal. A abóbada craniana foi tricotomizada e esterilizada. Em seguida, realizada uma incisão longitudinal na pele da calota craniana, e o perióstio foi rebatido para expor a superfície do osso parietal direito. Com um *punch* dermatológico, foi produzida uma falha óssea, com 3mm de diâmetro, que atravessou por completo a espessura da parede do osso (figura 1A). A falha permaneceu vazia (figura 1B). Então, o perióstio foi reposicionado e a pele suturada. Todos os animais foram tratados com analgésico (dipirona sódica 500 mg/mL) adicionado à água (*ad libitum*) na dose de 875 mg/kg durante os três

primeiros dias do pós-operatório. Após 24 horas do procedimento cirúrgico, os animais voltaram aos seus respectivos protocolos experimentais.

Depois de 45 dias da realização do procedimento cirúrgico os camundongos foram eutanasiados com dose excessiva do anestésico, os ossos parietais direitos dos animais foram coletados para procedimento histológico.

Análise Histomorfométrica

As calotas cranianas foram fixadas em solução de formalina a 10% em solução de tampão fosfato 0,1 M pH 7, por um período de 72 horas à temperatura ambiente, e, em seguida, foram imersas em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) para a descalcificação. As amostras foram desidratadas em gradiente de álcool, diafanizados em xilol e embebidas em parafina líquida a 60° para confecção dos blocos de parafina. Foram obtidos cortes transversais (5µm de espessura) corados com Hematoxilina-Eosina (Junqueira e Junqueira, 1983).

A quantificação do volume (%) de osso neoformado no interior da falha óssea foi baseada no estudo de Gosain et al (2000). As imagens das secções histológicas foram analisadas no software *NIS-Elements: Advanced Research*.

O osso neoformado dentro do defeito foi determinado por dois métodos. No primeiro método, a porcentagem do novo osso dentro da falha foi calculada com base no comprimento linear do osso neoformado com relação ao comprimento inicial do defeito. O comprimento linear do novo osso foi determinado como a soma dos comprimentos de cada secção óssea formada, medida através do eixo central da falha. No segundo método, a porcentagem do novo osso foi calculada com base na área de secção transversal do novo osso relativa à área do defeito inicial.

A área do osso

Análise estatística

A análise estatística foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado (DIC) e analisado por meio de análise de variância seguido de teste de *Tukey*, a 5% de significância. O esquema de análise adotado foi o fatorial triplo (2x2x2), em que os fatores considerados foram o tipo de camundongo (selvagem ou LDLr^{-/-}), ração consumida (comercial ou hiperlipídica) e solução (fisiológica ou sinvastatina). Foram feitas 5 repetições de cada tratamento. Todas as análises foram feitas no software R (R Development Core Team, 2011), por meio do pacote *ExpDes* (Cavalcanti, 2010).

RESULTADOS

A morfometria demonstrou que ocorreu neoformação óssea apenas nas bordas das falhas e que em nenhum animal foi observado formação de osso na região central da falha óssea (figura 01).

A análise referente à taxa de osso neoformado demonstrou que quando foi ministrada a ração comercial, a taxa de osso neoformado foi maior em ratos selvagens (grupo W) do que nos camundongos LDLr^{-/-} (grupo L). Perante o consumo de dieta hiperlipídica foi observado maior taxa de osso neoformado nos animais do grupo WH quando comparado aos animais do grupo LH. Os camundongos selvagens alimentados com a ração comercial, contendo pequena quantidade de lipídios, apresentaram maior quantidade de osso neoformado na falha óssea (Tabela 01).

Os camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta comercial (grupo L) apresentaram maior taxa de osso neoformado que os camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica (grupo LH) (Tabela 01).

Os grupos W e WS, alimentados com dieta comercial, apresentaram taxa de osso neoformado estatisticamente igual e superior à formação óssea nas falhas dos animais dos grupos WH e WHS, alimentados com dieta hiperlipídica. Os camundongos do grupo WHS apresentaram volume de osso neoformado superior a dos camundongos do grupo WH. Os camundongos do grupo L e LS apresentaram menor volume de osso quando comparado aos camundongos dos grupos W e WS. A neoformação óssea do grupo LH foi menor que os todos os demais grupos. Quando comparada a média de osso neoformado dos animais do grupo LHS e LH, os animais tratados com sinvastatina apresentaram maior volume de osso. Quando os camundongos foram alimentados com ração hiperlipídica, a taxa de osso neoformado foi maior nos camundongos que consumiram sinvastatina (Tabela 01).

Os grupos formados por camundongos selvagens (W, WH, WS, WHS) apresentaram a taxa de comprimento linear (%) maior do que os grupos dos camundongos LDLr-/- (L, LH, LS, LHS). A taxa do comprimento linear do osso neoformado dos animais dos grupos W e L, alimentados com ração comercial, foi superior a dos animais do grupo WH e LH, alimentados com dieta hiperlipídica. Os camundongos dos grupos WHS, LS e LHS apresentaram a mesma taxa de comprimento linear. A taxa de formação óssea foi estatisticamente igual nos animais W e WS. Quando alimentados com dieta hiperlipídica os camundongos do grupo WH e WHS apresentam taxas de comprimentos lineares iguais (Tabela 01).

A análise referente à área de osso regenerado demonstrou que independente da ração consumida, do uso ou não uso da sinvastatina, os camundongos selvagens apresentaram a maior área de osso regenerado. Os camundongos selvagens alimentados com ração comercial que não receberam sinvastatina (grupo W) apresentaram área de regeneração óssea maior do que os camundongos selvagens alimentados com ração comercial que receberam sinvastatina (grupo

WS). Os camundongos dos grupos WH e WHS apresentaram mesma área de osso regenerado (Tabela 01).

Os camundongos dos grupos L, LH, LS e LHS apresentaram áreas de osso regenerado estatisticamente iguais (Tabela 01).

DISCUSSÃO

A engenharia genética na década de 90 desenvolveu modelos de camundongos transgênicos capazes de desenvolver hiperlipidemia e lesões cardiovasculares avançadas em contraste com as discretas lesões observadas em camundongos selvagens alimentados com dietas aterogênicas (Breslow, 1996). Os camundongos *knockout* para o receptor de LDL podem desenvolver lesões que compartilham aspectos semelhantes às lesões humanas avançadas (Calara *et al.*, 2001; Johnson e Jackson, 2001; Song *et al.*, 2001), principalmente quando alimentados com dieta hiperlipídica. Quando alimentados por esta dieta os camundongos LDLr^{-/-} apresentam níveis elevados de colesterol total, de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicérides. Os níveis plasmáticos do colesterol total nestes camundongos são 35 vezes maiores que nos animais selvagens (Ishibashi *et al.*, 1993). Estudos recentes mostraram que camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica por 15 dias apresentaram aterosclerose, aumento de 4,7 e 1,2 vezes na concentração plasmática de colesterol e triglicérides, respectivamente, em relação aos camundongos LDLr^{-/-} com dieta padrão (Krieger *et al.*, 2006). Desta forma os camundongos LDLr^{-/-} utilizado no presente trabalho é um bom modelo para estudos de doenças ósseas relacionadas com a hiperlipidemia genética ou induzida por fatores ambientais, tais como a dieta hiperlipídica.

Os dados da análise morfométrica da falha óssea demonstraram que o grupo formado pelos camundongos selvagens alimentados com dieta padrão para roedores (ração comercial

contendo pequena quantidade de lipídios) apresentou a maior taxa de formação óssea na falha enquanto os camundongos LDLr^{-/-} alimentados com dieta hiperlipídica, que apresentaram a menor.

Estudo de Krieger *et al.* (2007) demonstrou que ratos hiperlipidêmicos apresentaram número elevado de osteoclóstos, inibição da atividade osteoblásticas e redução do processo de remodelagem óssea. Deste modo o equilíbrio entre a reabsorção óssea realizada por osteoclastos e deposição de osso novo pelos osteoblastos pode ser interferida perante níveis elevados colesterol total e LDL (Luegmary *et al.* (2004). Os camundongos LDLr^{-/-} mesmo alimentados com dieta comercial apresentaram neoformação óssea menor que os camundongos selvagens alimentados com a mesma dieta. O volume de osso neoformado é ainda menor quando os camundongos LDLr^{-/-} são alimentados com dieta hiperlipídica. Estes dados indicam que a hiperlipidemia genética apresentada pelos camundongos LDLr^{-/-} é um fator limitante da osteogênese.

As estatinas são capazes de reduzir a morbidade e mortalidade cardiovascular, principalmente através de seu efeito hipocolesterolêmico, reduzindo os níveis de colesterol total e LDL (Lupattelli *et al.*, 2004; Braga Júnior *et al.*, 2002). Além de agir sobre o tecido ósseo de forma benéfica, sendo indicada no tratamento da osteoporose (Chen *et al.*, 2010, Yaturu, 2003), pois minimizam os riscos de fraturas ósseas (Sugiyama *et al.*, 2000; Schlienger e Meier, 2003), aumentam a densidade mineral óssea (Sugazaki *et al.*, 2010) e aumentam a atividade osteoblástica (Bauer, 2007). Com relação aos efeitos da sinvastatina, nossos resultados corroboraram com as conclusões desses últimos autores, uma vez que os camundongos selvagens alimentados com a dieta comercial e tratados com sinvastatina apresentaram maior osteogênese que os animais alimentados com a dieta hiperlipídica.

As estatinas são consideradas estimuladoras da osteogênese em humanos e em modelos animais (Wilkie et al., 2000). Seu efeito bloqueador da formação de placas ateroscleróticas permite vascularização adequada ao local de fraturas ósseas e o suprimento sanguíneo é fundamental para a neoformação óssea (Horiuchi e Maeda, 2006). Além deste efeito as estatinas estão associadas ao aumento dos níveis de vitamina D, minimizando riscos de fraturas e acelerando a formação óssea pós-lesão. Os camundongos utilizados no presente estudo usuários de sinvastatina, independente do modelo animais (selvagem ou LDLr-/-), mesmo alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram maior formação óssea que os camundongos não usuários da sinvastatina.

Lupattelli et al. (2004) observaram que mulheres hipocolesterolêmicas submetidas a doses diárias de 40mg de sinvastatina via oral, apresentaram densidade mineral óssea superior quando comparadas a pacientes que não consumiam a droga. Whang et al. (2000) e Wilkie et al. (2000), com modelo animal, também constataram aumento significativo da formação óssea após osteotomias. Mundy et al. (1999) observaram que, após receberem sinvastatina oral, os ratos apresentavam atividade osteoblástica mais intensa e aumento da expressão da proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2), com consequente aumento do volume do osso trabecular. Wang et al. (2007) detectaram o aumento na consolidação óssea de fratura em tíbia de ratas ooforectomizadas que receberam aplicação sinvastatina (10mg/Kg/dia) sob o local da lesão óssea.

O processo de reparo ósseo requer a interação de fatores de crescimento, proteínas da matriz extracelular, osteoblastos e células osteoprogenitoras (Aalami et al., 2004). Desta forma a hiperlipidemia pode interferir nesta interação, restringindo a neoformação óssea. Com relação ao reparo de falhas ósseas na calvária, fatores como o periósteo, a dura-mater, o tempo pós-operatório e a idade contribuem para a cicatrização em defeitos produzidos em camundongos (Aalami et al., 2004). Embora não tenha ocorrido preenchimento total da falha óssea em nenhum

dos camundongos do presente estudo, o osso neoformado nas bordas da lesão foi suficiente para concluirmos que a hiperlipidemia interferiu negativamente no reparo da falha óssea produzida no parietal do camundongo LDLr^{-/-}, enquanto o tratamento com sinvastatina contribuiu para a formação de maior volume de osso neoformado para o interior do defeito.

REFERENCIAS

- AALAMI OO, NACAMULI RP, LENTON KA, COWAN CM, FANG TD, FONG KD, SHI YY, SONG HM, SAHAR DE, LONGAKER MT. 2004. Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults. *Plast Reconstr Surg.* 1;114(3):713-20.
- ARSLANIAN-ENGOREN C. J. 2011. Women's Risk Factors and Screening for Coronary Heart Disease. *Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* doi: 10.1111/j.1552-6909.2011.01234.x.
- BAUER, D.C. Statins and bone: basic science confirmed but clinical studies conflicting. Disponível em: <http://www.medscape.com/viewarticle/41925>> Acesso em 10/08/2007.
- BRAGA JÚNIOR, JWR; SOUZA, AWS; NORONHA, LK; FURIA, JK; SZEJNFELD, VL. 2002. Estatinas e densidade mineral óssea: mitos e verdades. *Rev. bras. reumatol.* 42(2):111-114
- BRESLOW JL (1996) Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272:685-688.
- BRUCKERT E, ROSENBAUM D. 2011. Lowering LDL-cholesterol through diet: potential role in the statin era. *Curr Opin Lipidol.* 22(1):43-8.
- CALARA, F; SILVESTRE, M; CASANADA, F. et al. 2001. Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice. *J Pathol.* 195:257-63.
- CAVALCANTI, P. P. 2010. Experimental Designs: um pacote R para análise de experimentos. 2010. 90p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2010.
- CHEN SH, CHOU FF, KO JY. 2010. The use of simvastatin with aromasin in an ovariectomized rat model: effects on the skeletal system *Chang Gung Med J.* 33(5):509-14.
- FARWELL WR, SCRANTON RE, LAWLER, EV, et al. 2008. The association between statins and cancer incidence in a veterans population. *Journal of the National Cancer Institute.* 100(2):134-139.
- GLUECK CJ; FREIBERG RA; FONTAINE RN. et al. 2001. Hypofibrinolysis, thrombophilia, osteonecrosis. *Clin orthoped.* 386:19-33.
- GOSAIN AK, SONG L, YU P, MEHRARA BJ, MAEDA CYBS, Gold LI, Longaker MT. 2000. Osteogenesis in Cranial Defects: Reassessment of the Concept of Critical Size and the Expression of TGF-[beta] Isoforms. *Plastic & Reconstructive Surgery.* 106(2): 360-371.
- GRAHAM LS, TINTUT Y, PARHAMI F, KITCHEN CM, IVANOV Y, TETRADIS S, EFFROS RB. 2010. Bone density and hyperlipidemia: the T-lymphocyte connection. *J Bone Miner Res.* 25(11):2460-9.
- HORIUCHI N; MAEDA T. 2006. Statins and bone metabolism. *Oral Dis.* 12(2):85-101.

- ISHIBASHI, S; BROWN, MS; GOLDSTEIN, JL; et al. 1993. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest.* 92(2):883–893.
- JOHNSON, JL; JACKSON, CL. 2001. Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse. *Atherosclerosis.* 154:399-406.
- JUNQUEIRA ULC, JUNQUEIRA SMML. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia* – São Paulo Editora Santos, 1983.
- KASSIM SH, LI H, VANDENBERGHE LH, HINDERER C, BELL P, MARCHADIER D, WILSON A, CROMLEY D, REDON V, YU H, WILSON JM, RADER DJ. 2010. Gene therapy in a humanized mouse model of familial hypercholesterolemia leads to marked regression of atherosclerosis. *PLoS One.* 5(10):e13424.
- KRIEGER MH, SANTOS KFR, SHISHIDO SM, ET al. 2006. Antiatherogenic effects of S-nitroso-N-acetylcysteine in hypercholesterolemic LDL receptor knockout mice. *Nitric Oxide.* 14:12-20.
- KRIEGER MH, STEIMETZ T, GUGLIELMOTTI MB, GIGLIO M (2007) Effect of experimental hypercholesterolemia on mandibular bone remodeling. International Association for Dental Research. Unilever Hatton Awards. Available at: <http://iadr.confex.com/iadr/2006Brisb/preliminaryprogram/abstract_82934.htm>.
- LUEGMAYR E, GLANTSCHNIG H, WESOŁOWSKI GA, GENTILE MA, FISHER JE, RODAN GA, RESZKA AA (2004) Osteoclast formation, survival and morphology are highly dependent on exogenous cholesterol/lipoproteins. *Cell Death Differ* 11:S108-118.
- LUISETTO G, CAMOZZI VJ. 2009. Statins, fracture risk, and bone remodeling. *Endocrinol Invest.* 32(4 Suppl):32-7.
- LUPATTELLI, G., SCARPONI, AM, VAUDO, G. et al. 2004. Simvastatin increases bone mineral density in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Metabolism.* 53(6):744–748.
- LWIN-MM-KHIN, TASSANEE S, ORANUT P, CHAWEEWON B. 2011. Risk factors for hypertension among rural Thais. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 42(1):208-17.
- MUNDY, G; GARRETT, R; HARRIS, S. et al. 1999. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science,* 286:1946-51.
- POWELL C, CHANG C, NAGUWA SM, CHEEMA G, GERSHWIN ME. 2010. Steroid induced osteonecrosis: An analysis of steroid dosing risk. *Autoimmun Rev.* 9(11):721-43.
- R Development Core Team (2011). *R: A language and environment for statistical computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- RANG HP, DALE JM, RITTER JM. 2006. *Rang and Dale's Pharmacology.* 6ed. Nova Iorque: Churchill/Livingstone.
- SBC – Sociedade Brasileira de Cardiologia. Consenso Brasileiro Sobre Dislipidemias. Disponível em <<http://publicacoes.cardiol.br/consenso/1994/6301/63010014.pdf>> Acesso em 10/12/2007.
- SCHLIENGER, R.G.; MEIER, C.R. 2003. HMG-CoA reductase inhibitors in osteoporosis: do they reduce the risk of fracture? *Drugs Aging.* 20:321-36.
- STAAL, A, FRITH, JC, FRENCH, MH. et al. 2003. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *Journal of Bone and Mineral Research,* 18 (1):88–96.

- SONG, L; LEUNG, C; SCHINDLER, C. 2001. Lymphocytes are important in early atherosclerosis. *J Clin Invest.* 108:251-59.
- SUGAZAKI M, HIROTANI H, ECHIGO S, TAKEYAMA S, SHINODA H. 2010. Effects of mevastatin on grafted bone in MRL/MpJ mice. *Connect Tissue Res.* 51(2):105-12.
- SUGIYAMA, M, KODAMA, T, KONISHI, K. et al. 2000. Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein – 2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 271(3):688-92.
- WANG JW, XU SW, YANG DS, LV RK. 2007. Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat. *Osteoporosis international.* 18(12):1641-1650.
- WILKIE, D.; BOWMAN, C.; LYGA, A. 2000. Cerivastatin increases cortical bone formation in OVX rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15: S549.
- YAMADA N. 2011. Atherosclerosis from the point of view of hypothesis to evidence based medicine. *Nippon Rinsho.* 69(1):7-12.
- YATURU, S. 2003. Skeletal effects of statins. *Endocr Pract.* 9(4):315-20.

Tabela 01. Taxa de osso neoformado (TON - %), Taxa do comprimento linear (TCL - %) e Área de osso regenerado (AOR- μm^2) na falha óssea produzida no osso parietal direito dos camundongos do grupo W, WH, WS, WHS, L, LH, LS e LHS.

GRUPOS	TON (%)	TCL (%)	AOR (μm^2)
W	19 $\pm$ 0,6 ^a	19,5 $\pm$ 1,01 ^a	6570 $\pm$ 227,7 ^a
WH	16,6 $\pm$ 0,61 ^d	17,2 $\pm$ 1,05 ^c	5648 $\pm$ 181,7 ^c
WS	18,6 $\pm$ 0,62 ^a	18,7 $\pm$ 0,85 ^a	6025 $\pm$ 104,5 ^b
WHS	17 $\pm$ 0,58 ^e	18,1 $\pm$ 0,7 ^c	5570 $\pm$ 287,6 ^c
L	17,1 $\pm$ 0,48 ^b	18 $\pm$ 0,63 ^b	5096,2 $\pm$ 94,5 ^d
LH	15,6 $\pm$ 0,46 ^c	16,7 $\pm$ 0,95 ^d	4958 $\pm$ 161,1 ^d
LS	16,9 $\pm$ 0,51 ^b	17,2 $\pm$ 0,80 ^c	5083,1 $\pm$ 131,7 ^d
LHS	16,7 $\pm$ 0,43 ^f	17 $\pm$ 0,47 ^c	4885 $\pm$ 152,7 ^d

Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. Dois valores seguidos da mesma letra são iguais estatisticamente ($p > 0,05$, teste de Tukey).

Figura 01. Fotomicrografia da falha óssea produzida no osso parietal direito dos animais do grupo W, WS, WH e WHS. A seta indica o espaço entre o osso neoformado nas bordas da falha óssea; quanto maior a seta menor a formação óssea. (Hematoxilina e Eosina – 40X)

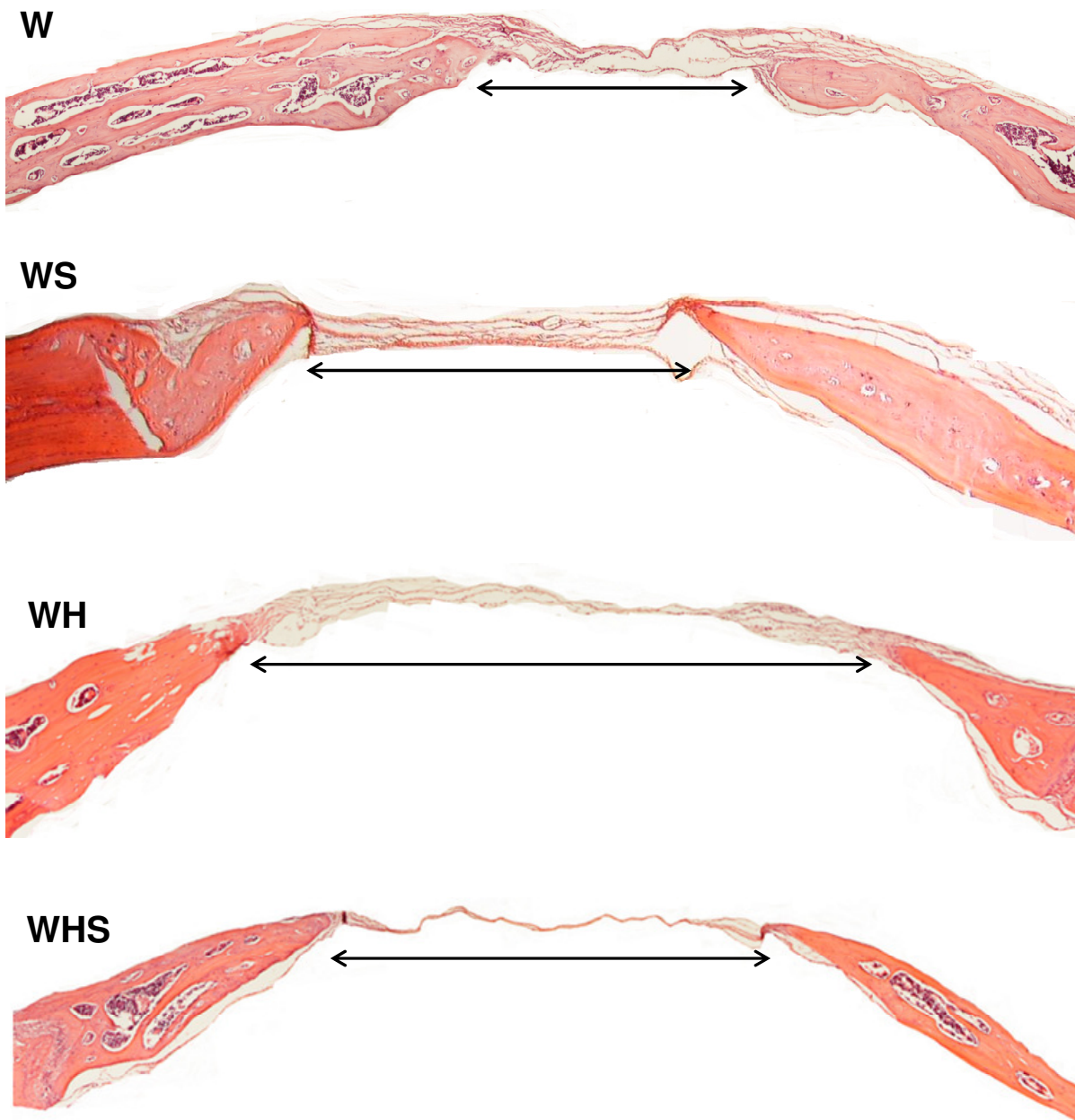
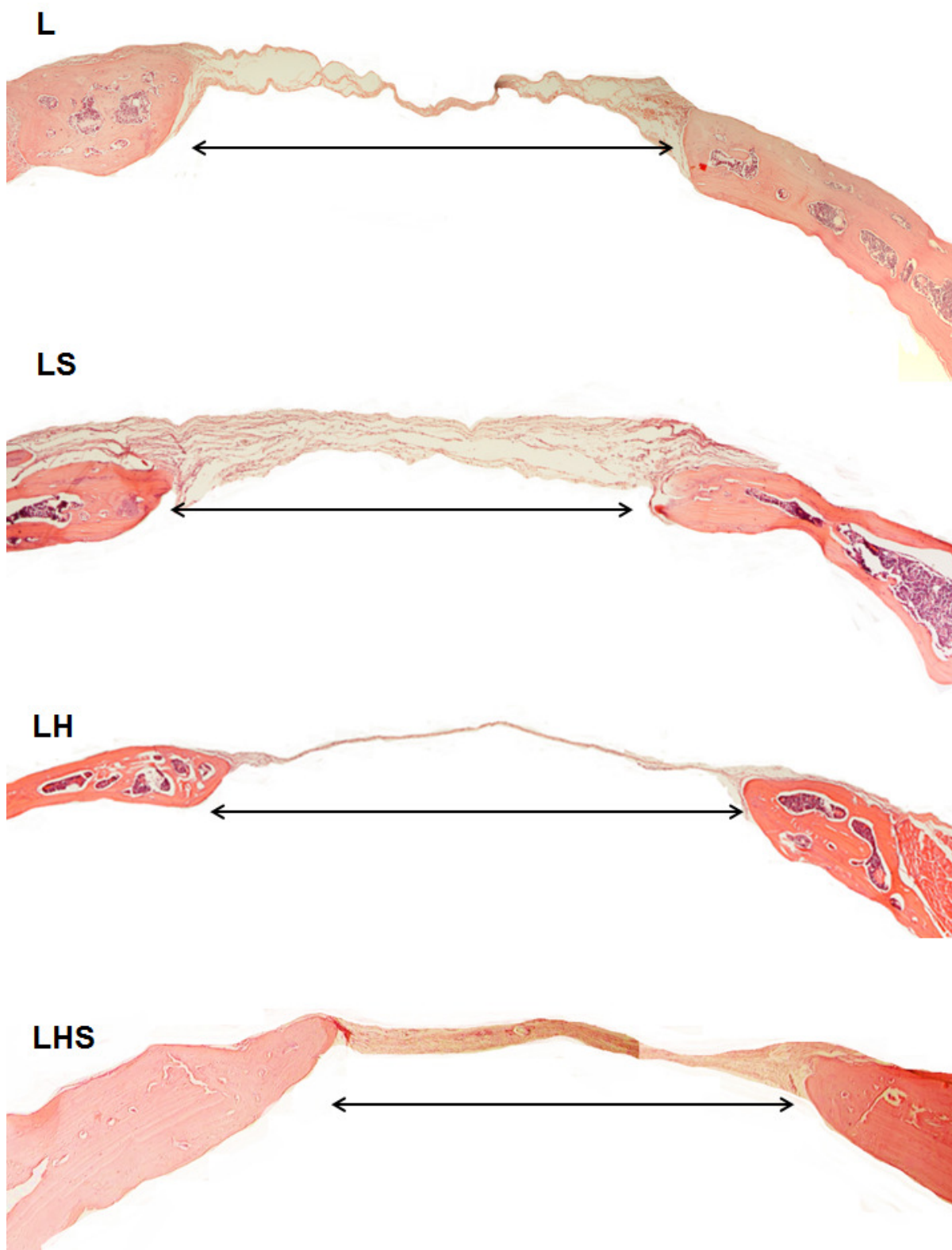


Figura 02. Fotomicrografia da falha óssea produzida no osso parietal direito dos animais do grupo L, LS, LH e LHS. A seta indica o espaço entre o osso neoformado nas bordas da falha óssea; quanto maior a seta menor a formação óssea. (Hematoxilina e Eosina – 40X)



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O camundongo LDLr^{-/-} pode ser um bom modelo para estudos sobre alterações ósseas relacionadas com hiperlipidemia genética ou induzida por dieta hiperlipídica. Algumas alterações nas propriedades mecânicas e estruturais do fêmur do animal foram demonstradas no presente trabalho. Além disso, foi evidenciado redução na atividade osteogênica nos defeitos produzidos cirurgicamente no crânio. Esses resultados sugerem que em consequência da hiperlipidemia, os ossos se tornaram mais propensos a fraturas e a apresentaram maior dificuldade para o reparo.

Os achados do presente estudo também demonstraram que a hiperlipidemia causada por alteração genética comprometeu a estrutura do fêmur do camundongo LDLr^{-/-}, e esses efeitos se tornaram mais acentuados quando associada a dieta rica em gorduras. Deste modo o consumo de dieta hiperlipídica foi um fator de risco para a integridade óssea e o uso da sinvastatina foi eficaz para manter as propriedades biomecânicas do fêmur e a osteogênese nos animais tratados com dieta comercial e hiperlipídica, porém não demonstrou benefícios ósseos nos animais modificados geneticamente.

6 Apêndices

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Doutorado intitulada "EFEITOS DA HIPERLIPIDEMIA E SINVASTATINA SOBRE A MORFOLOGIA, RESISTÊNCIA MECÂNICA E CAPACIDADE OSTEOGÊNICA EM CAMUNDONGOS *KNOCKOUT* DO GENE DO RECEPTOR DE LDL (LDLr-/-)":

() não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

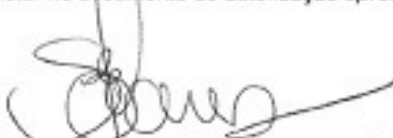
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

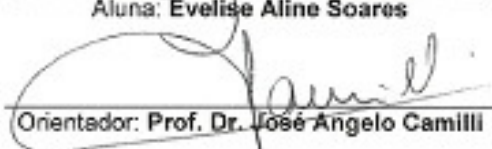
() CIBio - Comissão Interna de Biossegurança, projeto nº _____, Instituição: _____.

(X) CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto nº **23A/2010**, Instituição: Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, MG.

() CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo nº _____, Instituição: _____.

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

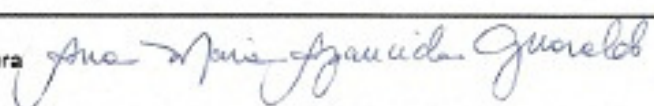

Aluna: **Evelise Aline Soares**


Orientador: **Prof. Dr. José Angelo Camilli**

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido

Carimbo e assinatura



Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

() Deferido () Indeferido

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Carimbo e assinatura