



RBO
REVISTA BRASILEIRA DE ORTOPEDIA

www.rbo.org.br/



Artigo Original

Avaliação da sinvastatina no processo de consolidação de fraturas em tíbias de ratos

José Wanderley Vasconcelos,^{1*} Leopoldina Milanez da Silva Leite,²
Gerusa de Arruda Vasconcelos,³ Igor Marcelo Souto Maior Araujo,⁴
Letácio Santos Garcia Ferro⁵

¹Doutor em Cirurgia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro, Professor Associado da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luís, MA, Brasil.

²Doutora em Fisiopatologia Clínica e Experimental pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Professora da UFMA, São Luís, MA, Brasil.

³Enfermeira, Mestre em Ciências da Saúde pela UFMA, São Luís, MA, Brasil.

⁴Graduado em Medicina pela UFMA, São Luís, MA, Brasil.

⁵Graduado em Medicina pela UFMA, São Luís, MA, Brasil.

Trabalho feito no Laboratório da Liga Acadêmica de Cirurgia Experimental do Maranhão (LabLacema) da UFMA, São Luís, MA, Brasil.

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 21 de maio de 2012

Aprovado em 3 de outubro de 2012

Palavras-chave:

Sinvastatina

Fraturas da tíbia

Ratos

Consolidação da fratura

R E S U M O

Objetivo: Avaliar a ação da sinvastatina no processo de consolidação de fraturas em tíbia de ratos. **Métodos:** Foram submetidos à fratura diafisária dos ossos da perna 36 ratos e divididos em Grupo Estatina (GE) e Grupo Controle (GC), sendo subdivididos em três subgrupos de acordo com o dia pós-fratura (7, 14 e 28 dias) para avaliar a consolidação óssea da tíbia. No GE foi administrada por gavagem uma solução de sinvastatina até a eutanásia. Já no GC foi administrada solução salina pela mesma via do GE. Não foi usada imobilização. Após a eutanásia foram feitas a amputação do membro no terço distal do fêmur e uma avaliação clínica, radiológica e histológica. Na avaliação clínica foi feito teste para a mobilidade do foco de fratura. As peças foram radiografadas e avaliadas quanto ao diâmetro do calo. O exame histológico foi feito com cortes de 5 micrômetros de espessura e corados com hematoxilina-eosina, tricrômio de Masson e alcian blue pH 2,5. O nível de significância dos testes para excluir a hipótese de nulidade foi de 5%. **Resultados:** Os animais GE apresentaram maior estabilidade do foco de fratura e maior área de calo, estatisticamente significantes. Não ocorreram alterações significativas no estudo histológico. **Conclusão:** A sinvastatina acelera o processo de consolidação pelo aumento do calo ósseo, mas não altera a histologia do tecido ósseo neoformado.

© 2013 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Publicado pela Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

*Autor para correspondência: Av. dos Holandeses, quadra 19, Residencial Monet, apt. 1202, Olho D'Água, CEP 65 065-180, São Luís, MA, Brasil. Tel.: (98) 3248-6319 e 8119-0794.

E-mail: jwanderortop@gmail.com

Evaluation of simvastatin in the process of fracture healing in tibiae of rats

A B S T R A C T

Keywords:

Simvastatin
Tibial fractures
Rats
Fracture healing

Objective: Evaluate the effects of simvastatin in the process of fracture healing in rat tibia. **Methods:** Thirty-six rats were subjected to diaphyseal fracture of the leg bones and divided in the statin group (GE) and control group (GC), being subdivided into three subgroups according to days post-fracture (7th, 14th and 28th day) to assess bone healing. In GE was administered by gavage a solution of simvastatin to the sacrifice. In the control group was administered saline by the same route of SG. Immobilization was not used. After the sacrifice was made to limb amputation in the distal femur and conducted the clinical, radiological and histological analysis. Clinical evaluation was made as to the mobility of the fracture. Then the samples were radiographed and evaluated for callus diameter. Histological examination was performed with cuts of 5 micrometers and stained with hematoxylin-eosin, Masson's trichrome and Alcian blue pH 2.5. The level of significance to exclude the null hypothesis was 5%. **Results:** All GE animals showed greater stability of the fracture and higher callus area. There were no significant changes in the histological study. **Conclusion:** Simvastatin accelerates the consolidation process by increasing the callus, but does not alter the histology of the newly formed bone.

© 2013 Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

Diversos estudos têm indicado que as estatinas atuam na remodelação e formação do tecido ósseo, sendo uma substância osteoindutora.

Mundy et al.¹ relataram que as estatinas têm efeitos anabólicos sobre o osso, por meio de estudos em roedores, estimulando a formação de tecido ósseo. As estatinas atuam reforçando a expressão da proteína morfogenética do osso do tipo 2 (*protein-2 morphogenic, BMP-2*) nos osteoblastos. Maritz et al.,² ao tentar reproduzir as experiências de Mundy et al.,¹ não encontraram o efeito esperado pelas estatinas. Pelo contrário, referiram um efeito inibitório na formação e um aumento da reabsorção óssea pela simvastatina.

Diversas investigações clínicas reexaminaram séries de estudos por meio de experimentos observacionais e de coorte, na tentativa de avaliar o efeito das estatinas no metabolismo ósseo, no risco de fraturas e na consolidação óssea.

Staal et al.³ referiram que as estatinas atuam inibindo a via do mevalonato. O mevalonato é o precursor para formação dos esteroides e dos isoprenoides de esteroides. Esses estão envolvidos na biogênese da membrana celular, na reprodução do DNA e na glicosilação de proteínas de diversas células. As estatinas inibem a atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA), reduzindo a síntese do colesterol, que é requerida para a conversão de HMG-CoA ao mevalonato, sendo a mesma via de atuação dos bifosfonatos. Ao atuar na diminuição da síntese do mevalonato, interferem na proliferação e nas atividades de células.

Baek et al.⁴ estudaram o efeito da simvastatina na proliferação e diferenciação de células do estroma da medula óssea em meio de cultura. Os autores isolaram células mononucleares e cultivaram uma linhagem osteoblástica da medula óssea de voluntários saudáveis. No primeiro meio de cultura, a simvastatina diminuiu o tamanho médio da colônia

que dá forma às unidades fibroblásticas (CFU-Fs) e realçou a calcificação da matriz. Essas células foram subcultivadas e a atividade da fosfatase alcalina de cada grupo foi mensurada de acordo com o tempo. A simvastatina aumentou a atividade da fosfatase alcalina de maneira dose-dependente e o efeito foi mais evidente nos primeiros períodos da cultura. O estudo concluiu que a simvastatina tem efeito estimulatório na formação óssea por meio da diferenciação osteoblástica.

Pesquisadores do estudo *The Heart Protection* não relataram nenhuma diferença no tratamento hospitalar do mesmo tipo de fraturas causadas por acidentes automobilístico entre o grupo que fez uso de simvastatina (40 mg/dia) e o grupo placebo.⁵

Em razão desses trabalhos, o efeito das estatinas no metabolismo ósseo tem gerado resultados contraditórios.⁶ Além disso, a ação desse fármaco nas fraturas, na densidade mineral e na remodelação óssea nos seres humanos é incerta. Assim, abriu-se um caminho para novas pesquisas, necessitando de mais estudos observacionais, clínicos, randomizados e experimentais com o uso de estatinas em doses apropriadas.

O objetivo deste artigo foi avaliar o efeito das estatinas na consolidação de fraturas em ratos.

Metodologia

Foram usados 36 ratos (*Rattus norvegicus albinus, Rodentia mammalia*) da linhagem Wistar, adultos, machos, com idade de 45 a 65 dias, pesando cerca de 200 a 300 g, que permaneceram alojados no Laboratório da Liga Acadêmica de Cirurgia Experimental do Maranhão (LabLacema), em caixas de polipropileno (0,15 m²), com no máximo cinco animais cada. Este trabalho seguiu normas da Nômina Anatômica Veterinária,⁷ os princípios éticos em experimentação animal (Cobea) e teve aprovação pelo Comitê de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão.

Cada animal foi anestesiado com ketamina na dose de 75 mg/kg e xylazina na dose 8 mg/kg intramuscular na região

glútea esquerda. Fez-se antisepsia da pata direita com solução degermante e antisepsia à base de iodo.

Para obter a fratura da tíbia, foi usado um alicate de três pontos de pressão, segundo técnica preconizada por Otto et al.⁸ Os ratos permaneceram alojados nas suas respectivas caixas sem qualquer tipo de imobilização ou restrição de apoio ao membro fraturado.

Foram distribuídos por sorteio em dois grupos de 18, que foram chamados de Grupo Estatina (GE) e Grupo Controle (GC). Cada grupo foi subdividido em três subgrupos (SGE e SGC) e classificados com partículas números correspondentes ao período de dias entre o procedimento cirúrgico e a eutanásia, quais sejam:

SGE-07 e SGC-07: (eutanásia no sétimo dia) cinco ratos em cada subgrupo;

SGE-14 e SGC-14: (eutanásia no 14º dia) cinco ratos em cada subgrupo;

SGE-28 e SGC-28: (eutanásia no 28º dia) oito ratos em cada subgrupo.

Esses intervalos entre a produção das fraturas e a eutanásia dos animais seguiram modelo experimental proposto por Padula et al.⁹

Cada rato foi pesado e identificado em sua caixa com listas feitas com caneta de CD na cauda do animal. O rato identificado como R1 teve como marcação uma listra transversal, R2 teve duas listras transversais, R3 teve três listras transversais, R4 teve uma listra longitudinal e R5 não teve marcação, sendo feito apenas o estresse com caneta sem tinta. Nas caixas do SGE-28 e SGC-28 havia quatro animais em quatro caixas (duas em cada subgrupo), perfazendo 16 animais, identificados de R1 a R4.

Os ratos do Grupo GE foram submetidos à gavagem via oral com solução de sinvastatina 12 horas após a fratura e repetida a cada 24 horas, na dose de 20 mg/kg. No Grupo GC foi feita gavagem com placebo. A gavagem foi feita diariamente até a data da eutanásia dos animais.

A eutanásia foi feita, após a pesagem dos animais, com administração de dose letal intraperitoneal de barbitúrico após a indução anestésica com halotano, finalizando com dose letal de cloreto de potássio. Foi feita a amputação da pata no terço médio do fêmur para estudo do calo ósseo.

Procedeu-se à retirada da pele que envolvia a musculatura da tíbia, sem que houvesse danos ao grupo muscular.

A avaliação clínica foi feita quanto à mobilidade do foco de fratura. Atribuiu-se grau 0 à fratura consolidada, grau 1 ao padrão intermediário de movimentação e grau 2 quando ocorreu mobilidade franca.¹⁰ Todos os examinadores foram definidos por sorteio e não tiveram conhecimento do grupo a ser examinado. Após a avaliação clínica quanto à mobilidade do foco da fratura, a peça cirúrgica foi fixada em formol a 10%.

A avaliação da área do calo ósseo foi feita por meio da análise das radiografias digitais no programa Auto CAD® 2007 (Fig. 1), delimitando-se toda a área de calo e sua medida em mm².

No estudo histológico as tíbias fraturadas, com envoltório de partes moles, foram descalcificadas durante 12 a 15 horas e posteriormente desidratadas, clarificadas e incluídas em parafina. Foram feitos cortes de 5 micrômetros de espessura,



Fig. 1 - Uso do Autocad® para cálculo da área do calo.

Quadro 1 - Classificação histomorfológica proposta por Allen et al. para estágio de consolidação óssea.

| | |
|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Grau 4 | Completa união óssea |
| Grau 3 | União óssea incompleta devido à presença de pequena quantidade de cartilagem no calo |
| Grau 2 | Visibilização de uma ponte de cartilagem hialina bem formada, unindo os fragmentos principais (união cartilaginosa completa) |
| Grau 1 | União cartilaginosa incompleta, com retenção de elementos fibrosos na placa condral |
| Grau 0 | Ausência ou atraso no reparo da fratura, caracterizado pela presença de cartilagem entre os fragmentos e restos de hematoma ou outro fluido (pseudoartrose) |

sagitalmente ao plano da fratura, com uso de micrótomo. Esses cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE), tricrômio de Masson (TM) e alcian blue pH 2,5 (AB). A HE e o TM foram usados para estudo da celularidade, da matriz extracelular, enquanto o AB mostrou os proteoglicanos ácidos sulfatados e não sulfatados, que refletem a atividade condrogênica. Todas as lâminas foram analisadas por microscopia de luz. O estágio de consolidação óssea foi determinado segundo sistema de classificação proposto por Allen et al.¹¹ (Quadro 1).

Foram aplicadas as técnicas da estatística descritiva, permitindo, assim, uma análise exploratória por meio das estimativas de parâmetros (média, desvio padrão e mediana) de todas as variáveis investigadas na pesquisa. Posteriormente, avaliou-se a consolidação óssea por meio da variável dependente (área óssea) em relação às seguintes variáveis independentes (dias e grupo).

Considerando que o tamanho amostral é pequeno e que esses não apresentam uma distribuição normal, foi feito o teste não paramétrico de Mann Whitney. Para análise dos dados histológicos foi feita avaliação quantitativa pelo teste exato de Fisher. Em todos os testes o nível de significância para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5%.

Resultados

Todos os animais aceitaram bem a dieta e se locomoveram após a fratura. Apresentaram claudicação do membro fraturado em uma média de seis a oito dias, não apresentando diferença

entre o Grupo Estatina (GE) e o Grupo Controle (GC). Nenhum animal apresentou ferida operatória no sítio da fratura.

Análise clínica

Quanto à mobilidade do foco da fratura, após sete dias o SGC-07 apresentou quatro animais com mobilidade intermediária (grau 1) e um com mobilidade franca (grau 2), enquanto o SGE-07 apresentou os cinco animais com mobilidade intermediária (grau 1).

No subgrupo que foi avaliado 14 dias após a fratura, o SGC-14 teve quatro animais sem mobilidade (grau 0) e um com mobilidade intermediária (grau 1) e o SGE-14 apresentou todos os cinco animais com mobilidade grau 0.

Todos os animais que foram avaliados 28 dias após a fratura tiveram mobilidade grau 0 ao exame.

Análise radiológica

Todos os animais dos subgrupos cuja eutanásia foi feita no sétimo dia apresentaram fratura da tíbia e fíbula, demonstrando que a fratura fechada foi feita de modo padronizado. A presença de calo ósseo radiológico não foi encontrada em nenhum rato nesse período.

Entre os subgrupos cuja eutanásia ocorreu no 14° e 20° dia o calo ósseo e pontes ósseas foram visualizados em todos os ratos. No SGE-14 a área do calo apresentou valor médio de 66,65 mm², enquanto que o SGC-14 apresentou como média 55,29 mm². O subgrupo SGE-28 também apresentou média de área de calo maior do que o SGC-28, com valores, respectivamente, de 67,46 mm² e 56,09 mm² (Fig. 2). Portanto, o grupo sinvastatina apresentou média de calo ósseo maior do que o Grupo Controle tanto na avaliação de 14 e 28 dias quanto na avaliação global.

Houve diferença significativa em relação à área do calo ($p = 0,043$), sendo que o grupo da estatina teve, em média, uma área maior (67,1 mm²) do que o Grupo Controle (55,4 mm²).

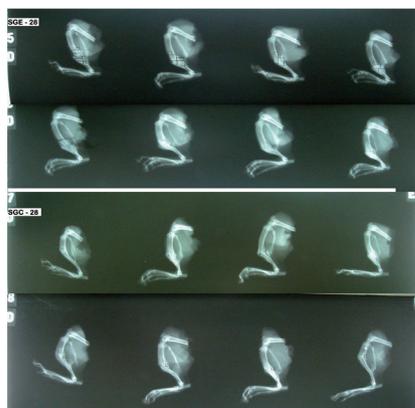


Fig. 2 - Radiografias dos subgrupos SGE e SGC no 28º oitavo dia.

Análise histológica

Todos os ratos tiveram sua análise histológica avaliada pelo patologista responsável, de forma aleatória, sem acesso ou conhecimento sobre o Grupo Controle, os grupos e os dias da respectiva eutanásia de cada subgrupo.

No SGC-07 foram evidenciados elementos do tecido conjuntivo fibroso, ausência ou pequena área focal de tecido ósseo, com calo ósseo observado em três animais no grau 1 e dois no grau 0. Enquanto que no SGE-07 observou-se tecido conjuntivo fibroso e tecido cartilaginoso, com a periferia do calo composta por elementos do tecido ósseo maduro e imaturo. Em quatro animais evidenciou-se calo ósseo no grau 1 e em um grau 0.

No SGC-14 observaram-se quatro ratos com presença de tecido conjuntivo fibroso e elementos da condrogênese em todos eles. Foi evidenciado calo ósseo no grau 1 em quatro desses animais e grau 2 em apenas um. O SGE-14 teve três ratos classificados como grau 2 e dois ratos classificados no grau 1 e tecido ósseo presente na periferia do calo (Figs. 3 e 4).

No SGC-28 encontrou-se uma variação maior quanto à classificação de Allen. Nesse subgrupo um teve calo ósseo evidente grau 4, quatro grau 3, dois grau 2 e um grau 1. No SGE-28 foi observado em seis animais calo ósseo no grau 3 (Fig. 5) e em dois, grau 1. Em todos os animais desse subgrupo de 28 dias encontrou-se tecido ósseo, com a presença de osteócitos e osteoblastos.

Na avaliação quantitativa foi usado o teste exato de Fisher, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

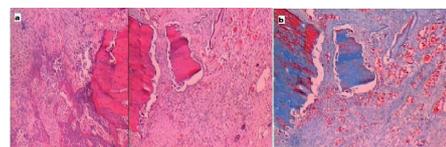


Fig. 3 - Fotomicrografias de cortes de animais dos subgrupos de 14 dias, grau 1, SGE-14. (a) Presença de numerosos vasos neoformados em tecido conjuntivo fibroso com presença de formação de tecido ósseo imaturo. H&E x4. (b) Com TM.

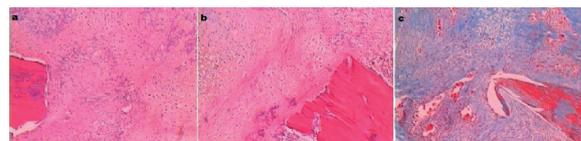


Fig. 4 - Fotomicrografias de cortes de animais dos subgrupos de 14 dias, grau 2. (A) SGC-14. Extremidade óssea com tecido cartilaginoso maduro em união completa. HE x4. (B) SGE-14. Extremidade com tecido cartilaginoso maduro, formando ponte hialina completa. HE x4. (C) SGE-14. Extremidade oposita com neoformação vascular. TM x4.

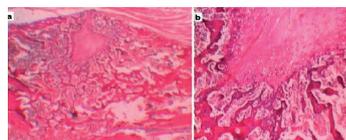


Fig. 5 - Fotomicrografia de cortes de animal do SGE-28, grau 3. Formação de tecido ósseo incompleto pela presença de tecido cartilaginoso em área focal. (a-lupa) e (b - x4).

Discussão

O processo de consolidação óssea é influenciado por diversos fatores que vêm sendo profundamente estudados desde Hipócrates até os dias de hoje.

Neste estudo a sinvastatina foi escolhida dentre vários inibidores do HMG-CoA redutase por apresentar, bem como a atorvastatina e a cerivastatina, efeitos maiores in vitro sobre o osso do que a lovastatina e a pravastatina.³

Oxlund e Andreassen¹² verificaram que o tratamento com sinvastatina na dose 20 mg/kg por via oral impedia parcialmente a perda óssea em ratas Wistar submetidas à ovariectomia, além de aumentar a formação cortical do osso. Baseado nesses autores, usamos essa dose levando-se em conta o metabolismo da sinvastatina no fígado, para verificar o efeito no tecido ósseo.

Alguns autores, como Skoglund et al.,¹³ usaram doses bem maiores da droga, de 120 mg/kg, para demonstrar os efeitos das estatinas na consolidação óssea em animais. Concluíram que os animais apresentaram apenas aumento da área do calo ósseo, apontando que a sinvastatina atua no mecanismo de mobilização de células envolvidas no processo de reparo da fratura, portanto, no início de reparo, levando ao aumento do tamanho do calo ósseo.

Em nosso estudo observamos também o aumento da área de calo ósseo, corroborando a afirmação desses autores.¹³ A aceleração do processo de consolidação no Grupo Estatina pode ter ocorrido no SGE-07, o que não pode ser visto em nosso trabalho porque o calo é radiotransparente nessa fase da radiografia. Por sua vez, tanto o SGE-14 quanto o SGE-28 apresentaram maior área de calo ósseo, demonstrando aceleração no processo de consolidação.

No entanto, no estudo de Skoglund et al.,¹³ o calo dos ratos tratados com sinvastatina por 14 dias obteve melhores resultados do que os nossos, com uma área transversal 53% maior do que o controle. Porém, com 21 dias de tratamento, a consolidação das fraturas não apresentava diferenças entre o Grupo Controle e sinvastatina. Em nosso estudo o SGE-28 apresentou tamanho de calo ósseo maior do que o controle, estando em desacordo com os autores acima.

Os achados de Maritz et al.² de que as estatinas elevam a taxa do metabolismo ósseo, aumentando tanto a formação quanto a reabsorção óssea, parecem favorecer a consolidação óssea quando usamos estatinas.

Também concordamos com os achados de Tsubone et al.¹⁴ quanto à capacidade das estatinas de promover formação óssea e melhorar o processo de consolidação. Esses autores estudaram a cerivastatina no transplante ósseo em tibia de ratos, encontrando como resultado aumento na formação de novo tecido ósseo e aumento da união óssea, por meio de análises histológicas.

Como já foi descrito, o mecanismo de indução da consolidação óssea desencadeado pela sinvastatina é mediado pelo aumento na produção de BMP-2. Portanto, é possível comparar os resultados de estudos que usam BMP-2 rh no processo de consolidação e as estatinas.¹⁵

Stein et al.¹⁵ estudaram os efeitos da rhBMP-2 na consolidação de fraturas instáveis e estáveis de tíbias de coelhos, administradas em partículas bioerodíveis, colágeno gel ou por injeção. Quando a rhBMP-2 foi injetada, o calo de fraturas mecanicamente instáveis desenvolveu-se mais rapidamente. Do mesmo modo que nosso trabalho com estatinas, esses autores concluíram que, embora a BMP-2 acelere a taxa de desenvolvimento do calo e união cortical, ela não afeta a quantidade de osso e cartilagem produzida. No nosso estudo, não houve diferença estatística significativa quanto à classificação histomorfológica quando 7,

14 e 28 foram comparados. Porém, há determinadas variações no grau histológico nos diferentes subgrupos.

Conclusão

A sinvastatina promoveu maior estabilidade clínica do foco de fratura e aumento do tamanho do calo ósseo após 14 e 28 dias de fratura, sendo essa diferença estatisticamente significativa. Mostrou também uma diferença quanto à análise histológica do calo, porém estatisticamente insignificante.

Conflitos de interesse

Os autores declaram inexistência de conflitos de interesse na feita deste estudo.

REFERÊNCIAS

- Mundy G, Garret R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*. 1999;286(5446):1946-9.
- Maritz FJ, Conradie MM, Hulley PA, Gopal R, Hough S. Effect of statins on bone mineral density and bone histomorphometry in rodents. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(10):1636-41.
- Staal A, Frith JC, French MH, Swartz J, Güngör T, Harrity TW et al. The ability of statins to inhibit bone resorption is directly related to their inhibitory effect on HMG-CoA reductase activity. *J Bone Miner Res*. 2003;18(1):88-96.
- Baek KH, Lee WY, Oh KW, Tae HJ, Lee JM, Lee EJ et al. The effect of simvastatin on the proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. *J Korean Med Sci*. 2005;20(3):438-44.
- Rosenson RS, Tangney CC, Langman CB, Parker TS, Levine DM, Gordon BR. Short-term reduction in bone markers with high-dose simvastatin. *Osteoporos Int*. 2005;16(10):1272-6.
- Rizzo M, Rini GB. Statins, fracture risk, and bone remodeling: what is true? *Am J Med Sci*. 2006;332(2):55-60.
- International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. *Nomina Anatomica Veterinaria*. Columbia: Editorial Committee Hannover, 1983.
- Otto TE, Patka P, Haarman HJ. Closed fracture healing: a rat model. *Eur Surg Res*. 1995;27(4):277-84.
- Padula EOC, Andrade ML, Giordano V, Ramalho MV. Aspectos morfológicos do processo de consolidação de fratura em ratos diabéticos. *Rev Bras Ortop*. 2003;38(3):127-36.
- Pozenato LC, Santana PJ, Guarniero J, Oliveira LAA, Domingues BL. Efeitos da ipriflavona sobre a consolidação de fraturas em ratas com desnutrição protéica: trabalho experimental. *Rev Bras Ortop*. 2004;39(7):390-7.
- Allen HL, Wase A, Bear WT. Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta Orthop Scand*. 1980;51(4):595-600.
- Oxlund H, Andreassen TT. Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone loss while increasing cortical bone formation. *Bone*. 2004;34(4):609-18.
- Skoglund B, Forslund C, Aspenberg P. Simvastatin improves fracture healing in mice. *J Bone Miner Res*. 2002;17:2004-2008.
- Tsubone T, Shigetomi M, Ihara K, Ikeda K, Merida L, Ohno T et al. Hypertrophy of vascularized bone isograft in rats treated with cyclosporine A. *Calcif Tissue Int*. 2003;73(4):393-9.
- Stein D, Lee Y, Schmid MJ, Killpack B, Genrich Ma, Narayana N et al. Local simvastatin effects on mandibular bone growth and inflammation. *J Periodontol*. 2005;76(11):1861-70.