

# Efeitos da sinvastatina sobre propriedades biomecânicas de ossos de ratas ovariectomizadas

## *Effects of simvastatin on bones biomechanical properties in ovariectomized rats*

Robéria Mota da Silva<sup>1</sup>; Francisco da Cunha Pinheiro Neto<sup>1</sup>; Dornival Bertoncello<sup>2</sup>

### RESUMO

**Objetivo:** este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da sinvastatina sobre parâmetros biomecânicos do tecido ósseo de ratas ovariectomizadas, enfatizando a avaliação da resistência óssea. **Material e Métodos:** foram utilizadas ratas Wistar de quatro meses de idade, submetidas previamente à ovariectomia (ovx). Os animais foram divididos em quatro grupos: 1) intactas, 2) intactas + sinvastatina, 3) ovx + sinvastatina, 4) ovx + salina. A sinvastatina, na dose de 5 mg/kg/dia, foi administrada por gavagem, seis dias/semana durante oito semanas. A salina foi administrada na dose de 0,1 mL/100g. Foram analisados peso corporal, rigidez óssea, propriedades físicas do osso e propriedades biomecânicas do fêmur pelo teste de flexão de três pontos. **Resultados:** houve diferenças significativas para carga máxima (em Newtons) entre os grupos ovx + sinvastatina (115,08±2,49) e intactas + sinvastatina (114,67±2,22) quando comparados ao grupo das intactas (89,68±3,06) e entre os grupos das ovx + sinvastatina e ovx + salina (95,5±1,22). Em relação à rigidez óssea (N/mm), os grupos ovx + sinvastatina (87,88±8,48) e intactas + sinvastatina (91,56±6,30) apresentaram valores significativamente mais altos do que o grupo intactas (61,93±5,87). O grupo ovx + sinvastatina (145,00±2,49) apresentou maior ganho de massa corporal (g) quando comparado ao grupo das ratas intactas (113,00±3,06) e ao grupo ovx + salina (120,33±1,21). **Conclusão:** infere-se, assim, que a sinvastatina protegeu o tecido ósseo dos animais quanto à perda de resistência provocada pela osteopenia.

**Palavras-chave:** Osso e Ossos/efeitos de drogas; Osteopatias Metabólicas; Sinvastatina; Ovariectomia.

### ABSTRACT

**Objective:** the aim of this study was the evaluation of the simvastatin effect on the bone tissue biomechanical parameters in ovariectomized rats, emphasizing the evaluation of the bone resistance. **Material and Methods:** four month Wistar rats previously submitted to ovariectomy (ovx) were used. The animals have been divided into four groups: 1) intact, 2) intact + simvastatin, 3) ovx + simvastatin, 4) ovx + saline. A 5 mg/kg/day simvastatin dose has been given through gavage, six days a week for eight weeks. 0,1 mL/100g saline dose has been given. Corporal weight, bone rigidity, bone physical properties and femur biomechanical properties were analyzed through the three-point-flexion test. **Results:** There was significant differences for the maximum load (in Newtons) between the groups ovx + simvastatin (115,08±2,49) and intact + simvastatin (114,67±2,22) in comparison with the group intact ones (89,68±3,06) and between the groups ovx + simvastatin and ovx + saline (95,5±1,22). Regarding bone rigidity (N/mm), the groups ovx + simvastatin (87,88±8,48) and intact + simvastatin (91,56±6,30) have presented values significantly higher than those of the intact ones group (61,93±5,87). The group ovx + simvastatin (145,00±2,49) put on higher corporal mass (g) comparing with the intact rats group (113,00±3,06) and with the ovx + saline (120,33±1,21) group. **Conclusion:** thus it

<sup>1</sup> Fisioterapeuta, UNIUBE

<sup>2</sup> Doutor em Ciências Fisiológicas, UNIUBE

Endereço para correspondência:  
Universidade de Uberaba/UNIUBE  
Rua: Pernambuco, 725 apto 302  
Bairro: Santa Maria  
CEP 38050-420  
Uberaba – MG  
E-mail: dornival.bertoncello@uniube.br

*is inferred that the simvastatin has protected the animals bone tissue concerning resistance loss due to osteopenia.*

*Key words: Bone and Bones/drug effect; Bone Diseases, Metabolic; Simvastatin; Ovariectomy.*

## INTRODUÇÃO

A osteoporose corresponde hoje à mais frequente das doenças osteometabólicas, sendo considerada um problema mundial de saúde pública.<sup>1</sup> Estima-se que em todo o mundo 200 milhões de pessoas sejam atingidos por essa afecção e tal situação tem tendência a se agravar nos próximos anos, devido ao aumento da expectativa de vida.<sup>2</sup> Portanto, os custos assistenciais tornam-se cada vez mais impraticáveis, principalmente para países em desenvolvimento, sendo indispensável os investimentos em pesquisa que possam resultar em estratégias para prevenir ou amenizar o quadro.<sup>2,3</sup>

Algumas mulheres, no período da menopausa, apresentam perda de massa óssea em decorrência da redução do estrógeno. A diminuição de massa óssea consiste na osteopenia sem que haja, no entanto, comprometimento da arquitetura óssea.<sup>4,5</sup> Essa perda pode variar de 1 a 5% ao ano, caracterizando a osteoporose pós-menopausa.<sup>6</sup> Existem vários fatores relacionados ao surgimento da osteoporose, os genéticos são responsáveis por quase 80% dessa alteração de massa óssea. Outros fatores que também estão relacionados à diminuição acentuada de massa óssea são os nutricionais, ambientais, desordens hormonais e a falta de atividade física regular.<sup>7,8</sup>

A osteoporose torna o osso menos resistente a diferentes estímulos relacionados a cargas, devido à diminuição na quantidade de tecido, o que leva a amplos canais internos de reabsorção. Porém, a concentração de cálcio é normal na matriz orgânica. Essa situação decorre de três fatores principais: diminuição na formação óssea; aumento na reabsorção do osso formado; ou a combinação desses dois fatores.<sup>2</sup>

A fisiopatologia dessa afecção osteometabólica envolve a diminuição de fatores de crescimento, como o IGF-1 (fator de crescimento insulina-dependente) e a prostaglandina E2 (PGE2), além de citocinas. Há especulações quanto à interleucina 6 (IL-6) ser a citocina de maior relevância quando se tem uma disfunção gonadal, sendo a IL-1, IL-11 e o fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) também responsá-

veis por essa perda causada pela deficiência estrogênica. Porém, ao contrário da IL-6, essas citocinas não são suprimidas pelos hormônios esteroidais.<sup>9</sup>

Recentemente, tem-se discutido a ação das estatinas sobre o tecido ósseo.<sup>10,11</sup> A literatura já comprova a atuação dessa substância no controle da hipertensão<sup>12</sup> e regulação dos níveis séricos de colesterol.<sup>13,14</sup> Esse fármaco tem como mecanismo de ação a inibição da enzima HMG-CoA redutase, que catalisa a conversão da HMG-CoA a ácido mevalônico, precursor do colesterol. A inibição dessa enzima leva à diminuição da síntese hepática de colesterol, resultando em aumento da produção de receptores de LDL na superfície dos hepatócitos, aumentando, assim, a depuração de LDL. As estatinas são bem absorvidas e extraídas pelo fígado, seu local de ação, onde são metabolizadas para sua forma ativa, o ácido graxo B-hidroxi.<sup>15</sup>

A terapêutica mais comumente utilizada no tratamento da osteoporose é a reposição hormonal associada a algumas medidas gerais, como ingestão de cálcio e atividade física. Devido ao fato de estudos recentes indicarem efeitos da sinvastatina no metabolismo do tecido ósseo, o objetivo deste trabalho foi verificar possíveis efeitos da sinvastatina em prevenir a perda de resistência óssea em ratas ovariectomizadas, a partir de teste biomecânico.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 40 ratas *wistar* com quatro meses de idade, massa corporal de 170-200 g no início do experimento, provenientes do Biotério Central da Universidade de Uberaba, Uberaba, MG, Brasil.

Para a realização do trabalho, conforme as normas do comitê de ética em pesquisa institucional, foram seguidos todos os princípios propostos por alguns autores<sup>16</sup> e ratificados pela UNESCO, em 1978, que elaborou a Declaração dos Direitos dos Animais. O experimento norteou-se de acordo com todos os cuidados necessários para evitar o sofrimento de cada animal.<sup>17</sup>

Os animais inicialmente foram divididos nos seguintes grupos, cada um contendo 10 ratas: 1) intactas (int); 2) intactas tratadas com sinvastatina (int + sinv); 3) ovariectomizadas tratadas com sinvastatina (ovx + sinv); 4) ovariectomizadas tratadas com

salina (ovx + salina). A ovariectomia foi realizada conforme técnica descrita por Zarrow *et al.*<sup>18</sup>.

Os tratamentos foram iniciados 24 horas após a castração. Foram realizados precocemente devido ao objetivo de se avaliar a prevenção à osteoporose. A sinvastatina foi administrada na dose de 5,0 mg/kg de peso corporal, diariamente, por gavagem, uma vez ao dia.<sup>19,20</sup> A salina foi administrada na dose de 0,1 mL/100 g de massa corporal. Os animais foram pesados diariamente para cálculo da solução a ser injetada, de acordo com o peso de cada um deles. Os tratamentos se estenderam por oito semanas (seis dias por semana), período em que os animais tiveram comida (ração comercial) e água à vontade e permaneceram no biotério em ambiente controlado quanto à temperatura e luminosidade. Conforme dados da literatura, após esse período de oito semanas é possível verificar significativa perda de massa óssea.<sup>21-23</sup>

Ao final do experimento, os animais foram sacrificados utilizando-se éter etílico. Foram retirados os fêmures, dissecados e mantidos em salina a 0,9% e -20° C. Os ossos foram descongelados à temperatura ambiente 12 horas antes de se iniciarem as análises.

Para avaliação dos efeitos biomecânicos da sinvastatina, foi realizado o teste biomecânico de flexão de três pontos no fêmur direito. Os ensaios mecânicos foram feitos numa máquina de ensaio universal pertencente ao Laboratório de Pesquisa em Materiais Odontológicos da Universidade de Uberaba, à temperatura ambiente, conforme técnica já descrita na literatura.<sup>24,25</sup> As extremidades do fêmur ficaram apoiadas em dois roletes com diâmetro de 3,0 mm, suportados por apoios distanciados de 21,0 mm.

A força foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido pósterio-anterior, no meio da distância entre os dois apoios, por uma haste cilíndrica com um rolete fixado na sua extremidade, em velocidade constante de 0,5 cm/min até o momento da ruptura do osso. Considerou-se, para análise, a carga máxima suportada. Foi utilizada a célula de carga de capacidade máxima de 50 kgf. Foram registrados os valores de carga máxima obtidos durante o teste. A partir do gráfico, procurou-se relacionar a carga com a deformação óssea (em mm) para a verificação da rigidez óssea (N/mm), que representa a capacidade do osso de resistir a uma carga considerando-se sua superfície.

Após o teste biomecânico de flexão, utilizando-se o Princípio de Arquimedes, foi verificado o volume ósseo como parâmetro físico do osso, para cálculo da densidade mineral óssea. A partir de pesagens com o osso imerso em água e livre (em balança eletrônica), chegou-se ao volume ósseo. O osso foi, então, mantido na mufla a 800° para obtenção da cinza. O peso da cinza foi relacionado com o volume para obtenção da densidade mineral.<sup>26</sup> A fórmula utilizada foi a seguinte: densidade mineral óssea = peso da cinza ÷ volume ósseo (g/mm<sup>3</sup>).

Após a obtenção dos resultados referentes à densidade mineral e ao teste de flexão do fêmur direito, esses dados foram relacionados entre si a fim de se verificar a qualidade óssea, expressa pela força máxima normalizada, descrita por Søggaard *et al.*<sup>27</sup>

Para a análise estatística dos resultados, foram utilizados o teste One-Way ANOVA para verificação de variância e o teste Tukey-Kramer para comparações entre grupos, considerando-se  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Conforme apresentado na Tabela 1, verifica-se que houve diferenças significativas para carga máxima, entre os grupos ovx + sinv e int + sinv quando comparados cada qual ao grupo de ratas intactas. Também houve diferença significativa entre os grupos ovx + sinv e ovx + salina.

**Tabela 1** - Valores da carga máxima, deformação e rigidez ósseas para diferentes grupos experimentais (Média ±EPM)

	Carga Máxima (N)	Deformação (mm <sup>3</sup> )	Rigidez (N/mm <sup>3</sup> )
intactas	89,68 ± 3,06	1,17 ± 0,07	61,93 ± 5,87
int+sinv	114,82 ± 2,22 <sup>B</sup>	1,01 ± 0,08	91,56 ± 6,30 <sup>B</sup>
ovx+sinv	115,08 ± 2,49 <sup>B</sup>	1,07 ± 0,10	87,88 ± 8,48 <sup>B</sup>
ovx+sal	95,5 ± 1,22 <sup>A</sup>	1,21 ± 0,09	64,61 ± 5,38

<sup>A</sup>  $p < 0,05$  vs ovx + sinv;

<sup>B</sup>  $p < 0,05$  vs intactas

Não houve diferença significativa entre os grupos quanto à deformação do osso. Em relação à rigidez óssea, os grupos ovx + sinv e int + sinv apresentaram valores significativamente mais altos do que o grupo intactas. Não houve diferença significativa para esse parâmetro entre os grupos ovx + salina e ovx + sinv.

A Tabela 2 apresenta valores médios de ganho de massa corporal, densidade mineral óssea e força normalizada dos diferentes grupos.

**Tabela 2** - Ganho de massa corporal, densidade mineral óssea e força máxima normalizada para diferentes grupos experimentais (Média ±EPM)

	Ganho de massa Corporal (g)	Densidade Mineral (mm <sup>3</sup> )	Força Máxima Normalizada (N/mm <sup>3</sup> )
intactas	113,00 ± 3,06	691,55 ± 26,80	0,131 ± 0,009
int+sinv	144,67 ± 2,22 <sup>B</sup>	769,08 ± 15,75	0,149 ± 0,002 <sup>B</sup>
ovx+sinv	145,00 ± 2,49 <sup>B</sup>	725,20 ± 17,70	0,160 ± 0,006 <sup>B</sup>
ovx+sal	120,33 ± 1,21 <sup>A</sup>	664,82 ± 20,62	0,144 ± 0,007

<sup>A</sup> p<0,05 vs ovx + sinv;

<sup>B</sup> p<0,05 vs intactas

Quanto ao ganho de massa corporal, o grupo de animais ovx + sinv apresentou valores significativamente mais altos do que os referentes ao grupo intactas e ao grupo de ratas ovx + sal. Houve diferença também entre o grupo int + sinv e intactas. Não houve diferenças entre os grupos no que se refere à densidade mineral óssea. Os grupos ovx + sinv e int + sinv apresentaram força máxima normalizada significativamente maior do que o grupo intactas. Não houve diferenças significativas para este parâmetro em relação ao grupo ovx + salina.

## DISCUSSÃO

De acordo com os resultados, os animais submetidos à ovariectomia e que fizeram uso da sinvastatina apresentaram mais altos valores de carga máxima suportada no teste biomecânico de flexão de três pontos. Embora não significativo, o valor de densidade mineral também foi mais altos para os grupos que receberam sinvastatina, comparados aos grupos intactas e ao tratado com salina. Isso demonstra que a sinvastatina apresentou efeitos positivos, prevenindo a diminuição de resistência óssea conseqüente à osteopenia provocada pela ovariectomia.

Os animais que fizeram uso da sinvastatina, ovariectomizados e intactos, apresentaram mais

capacidade de resistir a uma carga, o que ficou demonstrado pela maior rigidez óssea, comparada à de outros grupos. O fato de não haver diferença para carga máxima e deformação, que determinam a rigidez, entre os grupos ovx + sinv e int + sinv, pode ser devido ao curto tempo de tratamento ou à baixa dose, não suficientes para promover alterações significativas. No entanto, apesar de também não haver diferença significativa para força máxima normalizada entre esses grupos, verifica-se que o grupo ovx + sinv apresenta valores mais altos desse parâmetro, o que indica boa relação entre a carga suportada e a densidade mineral óssea. Trata-se de um indicativo da qualidade do osso, conforme descrito por Søggaard *et al.*<sup>27</sup>.

Os resultados mostraram que a sinvastatina, medicação atualmente utilizada para a redução dos níveis de colesterol em humanos, apresenta possíveis efeitos protetores para a perda de massa óssea que ocorre em casos de osteopenia em ratas, como verificado aqui a partir da análise da resistência óssea, que reflete o conteúdo mineral ósseo.

Um outro estudo similar a este foi realizado por Oxlund e Andreassen<sup>28</sup>. Os autores trataram ratas de quatro meses de idade, ovariectomizadas, com 20 mg/kg de sinvastatina, duas vezes ao dia, durante três meses. Concluíram que a sinvastatina induziu moderado crescimento do osso cortical de estrutura lamelar normal e da superfície periosteal, respeitando os limites regionais de formação óssea, em análises de tíbia e vértebra. Embora os autores tenham utilizado técnicas morfológicas e bioquímicas para análise de formação óssea cortical e trabecular, as propriedades biomecânicas do fêmur pelo teste de flexão de três pontos não foram avaliadas. No presente estudo, os resultados obtidos foram com dosagem de 5 mg/kg. Em um período menor de tratamento (oito semanas), verificou-se que uma dose menor é suficiente para interferir na qualidade do osso. Provavelmente, esse mecanismo de adaptação do osso cortical, sugerido pelos autores anteriormente citados, tenha permitido mais resistência à carga máxima imposta durante o teste biomecânico de flexão.

Em um outro trabalho,<sup>29</sup> os autores perceberam que a sinvastatina promoveu osteogênese ao redor de implantes (fixadores) de titânio. Ela potencializou e melhorou a integração óssea natural, aumentando os valores da relação de contato ósseo e a densidade do osso.

No entanto, um estudo realizado por Yao *et al.*<sup>30</sup> mostrou que a sinvastatina não apresentou resultados positivos, protetores para o osso, em ratas cuja perda de massa óssea ultrapassava 60 dias de duração. No presente estudo, o tratamento ocorreu durante o processo de perda de massa óssea, que se verifica após a ovariectomia. Portanto, a ação seria no sentido de prevenção da perda, antes que já houvesse ocorrida a espoliação.

Staal *et al.*<sup>31</sup> verificaram, *in vitro*, que as estatinas inibem a reabsorção óssea, apesar de não encontrarem o mesmo resultado para cerivastatina em ratos. Pytlik *et al.*<sup>32</sup> mostraram que a sinvastatina administrada nas doses de 3 e 6 mg duas vezes ao dia em ratas ovariectomizadas intensificou a formação óssea e diminuiu o processo de reposição óssea induzida pela ovariectomia com maior atividade no grupo que recebeu 6 mg/kg. Esta dosagem é próxima da utilizada no presente estudo, em que se procurou padronizar dose menor a partir dos dados da literatura.

Previamente, van Staa *et al.*<sup>33</sup> descreveram que a dosagem dessa medicação, usada comumente na prática clínica para controle de hipertensão arterial, não está associada à redução dos riscos de fraturas. Um outro estudo não observou, em mulheres, efeitos da sinvastatina sobre marcadores de formação ou reabsorção óssea, durante tratamento de 12 semanas de duração.<sup>34</sup>

Ainda não está esclarecido o mecanismo de ação da estatina sobre o tecido ósseo. Maeda *et al.*<sup>35</sup> sugeriram que a estatina estimula a expressão gênica em osteoblastos. Os resultados aqui encontrados, que refletem maior resistência óssea à carga de fratura, geram a questão: a estatina teria o mesmo efeito positivo quando o processo de reabsorção óssea já está instalado?

Outro dado relevante foi o aumento de massa corporal nos animais que receberam sinvastatina. Yao *et al.*<sup>30</sup> verificaram aumento desse parâmetro em ratas ovariectomizadas tratadas com sinvastatina, nas doses variando entre 0,3 e 10,0 mg/kg, comparadas com ratas que receberam veículo. Pode ser que a dose de sinvastatina administrada não tenha apresentado efeito suficiente para a depuração de LDL, conforme indicado por Schulz<sup>36</sup>. O aumento de peso pode ter refletido em sobrecarga na matriz óssea e contribuído para o aumento de massa óssea, mineral e orgânica, tornando-a mais resistente à fratura. Possivelmente, também haveria efeito in-

direto do peso corporal no aumento da resistência óssea ou prevenção de sua diminuição.

## CONCLUSÕES

Este estudo demonstra o efeito da sinvastatina sobre parâmetros biomecânicos do tecido ósseo de ratas ovariectomizadas, enfatizando a avaliação da resistência óssea a partir do teste de flexão de três pontos. O efeito protetor encontrado é indicativo de que o fármaco tem atuação, direta ou indireta, sobre o tecido ósseo, aumentando sua resistência às cargas impostas. Mais estudos devem ser realizados para verificação do mecanismo de ação das estatinas sobre o tecido ósseo.

## Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo PAPE/UNIUBE – processo 2004-014

## REFERÊNCIAS

1. Lanna CMM, Montenegro Jr RM, Paula FJA. Fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticóide. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003; 47(1): 9-18.
2. Amadei SU, Silveira VAS, Pereira AC, Carvalho YR, Rocha RF A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol Med Lab.* 2006; 42(1): 5-12.
3. Szejnfeld VL. Osteoporose: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Sarvier; 2000.
4. Zerbini CAF. Osteoporose: uma revisão. *Jov Méd.* 1998; 2: 89-94.
5. National Institutes of Health. Consensus Development Panel on osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. *JAMA.* 2001; 285: 785-95.
6. Russo LAT. Osteoporose pós-menopausa: opções terapêuticas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2001; 45(4): 401-6.
7. Daripa M, Paula FJA, Ruffino ACB, Foss MC. Impact of congenital calcitonin deficiency due to dysgenetic hypothyroidism on bone mineral density. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37(1): 61-8.
8. Zerbini CAF, Latorre MRO, Jaime PC, Tanaka T, Pippa MGB. Bone mineral density in Brazilian men 50 years and older. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33(12): 1429-35.
9. Manalagas SC. Role of cytokines in bone resorption. *Bone.* 1996; 17(2), S: 63-7.



10. Jadhav SB, Jain GK. Statins and osteoporosis: new role for old drugs. *J Pharm Pharmacol.* 2006; 58: 3–18.
11. Tikiz C, Tikiz H, Taneli F, Gümüşer G, Tüzün C. Effects of simvastatin on bone mineral density and remodeling parameters in postmenopausal osteopenic subjects: 1-year follow-up study. *Clin Rheumatol.* 2005; 24(5): 447-52.
12. Praça JM, Thomaz A, Caramelli, B. Eggplant (*Solanum melongena*) extract does not alter serum lipid levels. *Arq Bras Cardiol.* 2004; 82(3): 269-76.
13. Díaz LA, Dujovne CA. Efficacy and security of the different statins in the treatment of the dyslipidemias. *Rev Asoc Méd Argent.* 1997; 110(3): 61-7.
14. Silva P. *Farmacologia.* 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.
15. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. *Farmacologia.* 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
16. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique.* London: Methuen; 1959.
17. Zimmermann M. *Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals.* Pain. 1983; 16: 109-10.
18. Zarrow MX, Yochim JM, McCarthy JL. *Experimental Endocrinology - a sourcebook of basic techniques.* New York: Academic Press; 1964.
19. Ota T, Takamura T, Ando H, Nohara E, Yamashita H, Kobayashi K. Preventive effect of cerivastatin on diabetic nephropathy through suppression of glomerular macrophage recruitment in a rat model. *Diabetology.* 2003; 46(6): 843-51.
20. Susic D, Varagic J, Ahn J, Slama M, Frohlich ED. Beneficial pleiotropic vascular effects of rosuvastatin in two hypertensive models. *J Am Coll Cardiol.* 2003; 42(6): 1091-7.
21. Vanderschueren D, Herck EV, Suiker AMH, Visser WJ, Schot LPC, Bouillon R. Bone and mineral metabolism in aged male rats: short and long term effects of androgen deficiency. *Endocrinology.* 1992; 130: 2906-16.
22. Tuukkanen J, Peng Z, Väänänen HK. Effect of running exercise on the bone loss induced by orchidectomy in the rat. *Calcifield Tissue Int.* 1994; 55: 33-7.
23. Li M, Jee WSS, Ke HZ, Tang LY, Ma YF, Liang XG, Setterberg RB. Prostaglandin E administration prevents bone loss induced by orchidectomy in rats. *J Bone Min Res.* 1995; 10: 66-73.
24. Engesaeter LB, Ekeland A, Langeland N. Methods for testing the mechanical properties of the rat femur. *Acta Orthop Scand.* 1978; 49: 512-8.
25. Peng Z, Tuukkanen H, Zhang H, Jämsä T, Väänänen HK. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. *Bone.* 1994; 15(5): 523-32.
26. Martin RB. Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats. *J Biomech.* 1990; 23(10): 1021-9.
27. SØgaard LH, Mosekilde LI, Thomsen JS, Richards A, McOsker JE. A comparison of the effects of two anabolic agents (fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in an osteopenic rat model. *Bone.* 1997; 20: 439-49.
28. Oxlund H, Andreassen TT. Simvastatin treatment partially prevents ovariectomy-induced bone loss while increasing cortical bone formation. *Bone.* 2004; 34: 609-18.
29. Ayukawa Y, Okamura A, Koyano K. Simvastatin promotes osteogenesis around titanium implants. *Eur j Clin Invest.* 2002; 32 (8): 581-9.
30. Yao W, Farmer R, Cooper R, Chmielewski PA, Tian XY, Setterberg RB, Jee WSS, Lundy MW. Simvastatin did not prevent nor restore ovariectomy-induced bone loss in adult rats. *J Musculoskeletal Neur Interac.* 2006; 6(3): 277-83.
31. Staal A, Frith JC, French MH, Swartz J, Güngör T, Harrity TW, Tamasi J, Rogers MJ, Feyen JH. 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.
32. Pytlik M, Janiec W, Misiarz-Myrta M, Gubala L. Effects of simvastatin on the development of osteopenia caused by ovariectomy in rats. *Pol J Pharmacol.* 2003; 55(1): 63-71.
33. van Staa TP, Wegman S, De Vries F, Leufkens B, Cooper C. Use of statins and risk of fractures. *JAMA.* 2001; 285(14): 1850-5.
34. Hsia J, Morse M, Levin V. Effect of simvastatin on bone markers in osteopenic women: a placebo-controlled, dose-ranging trial. *BMC Muskuloskeletal Disord.* 2002; 3: 1-5.
35. Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins augment vascular endothelial growth factor expression in osteoblastic cells via inhibition of protein prenylation. *Endocrinology.* 2003; 144(2): 681-92.
36. Schulz I. Tratamento das dislipidemias – como e quando indicar a combinação de medicamentos hipolipemiantes. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006; 50(2): 344-59.