

Vanessa Ferreira da Silva

**Efeito da ovariectomia e da reposição hormonal no reimplante dentário
imediate: análise histomorfométrica e imunoistoquímica em ratas**

2015

Vanessa Ferreira da Silva

**Efeito da ovariectomia e da reposição hormonal no reimplante dentário
imediate: análise histomorfométrica e imunoistoquímica em ratas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de mestre em Odontologia – ÁREA de Clínica Integrada.

Orientadora: Profa. Adj. Sônia Regina Panzarini

Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti

Araçatuba – São Paulo

2015

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S586e Silva, Vanessa Ferreira da.
Efeito da ovariectomia e da reposição hormonal no reimplante dentário imediato: análise histomorfométrica e imunoistoquímica em ratas / Vanessa Ferreira da Silva. – Araçatuba, 2015
101 f. : il. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Sônia Regina Panzarini
Coorientador: Prof. Cláudio Aparecido Casatti

1. Reimplante dentário 2. Ovariectomia 3. Estradiol
4. Ensaio de imunoabsorção enzimática I. Título

Black D2
CDD 617.6

Dados Curriculares

Vanessa Ferreira da Silva

Nascimento: 10/06/1988

Filiação: Clementino Ferreira da Silva
Luzia Aparecida Bueno da Silva

2007- 2012 **Graduação em Odontologia**

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Filho, UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

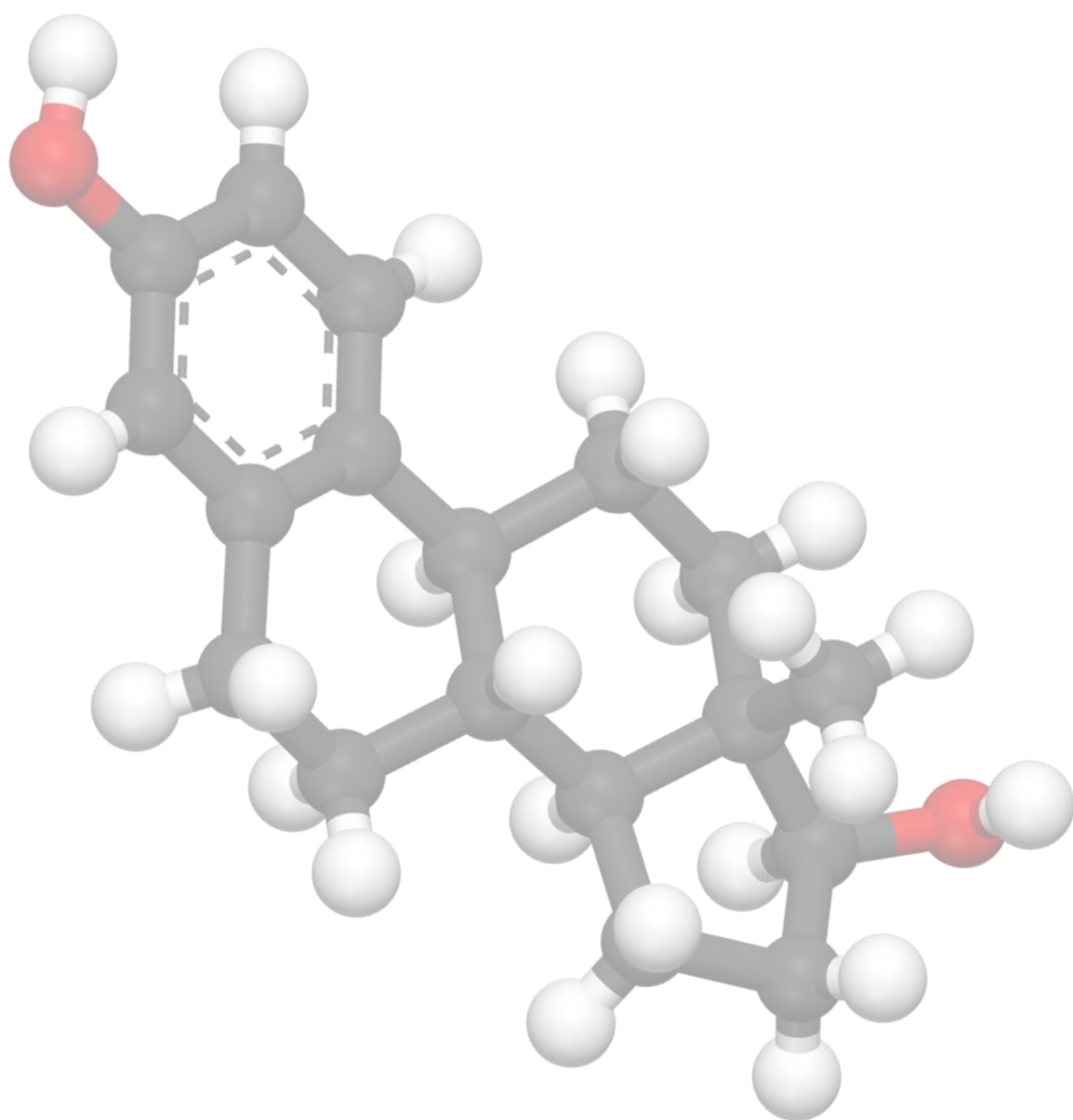
2013- atual **Mestrado em Odontologia- Área de**

Concentração: Clínica Integrada

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Filho, UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

2015- atual **Especialização em Endodontia**

Faculdade Redentor, Itaperuna, Rio de Janeiro,
Brasil.



Dedicat3ria

Dedicatória

A Deus,

Nesse momento de suma importância em minha vida seria indigno se atribuísse os benefícios ao meu próprio mérito ou ao acaso dos acontecimentos.

Agradeço a Ele a oportunidade de vivenciar essa experiência que resultou em imensos aprendizados; Por toda força, calma, sabedoria e me por abençoar com o convívio de pessoas iluminadas durante a realização desse trabalho.

*Aos meus pais, Clementino e Luzia,
Que são os maiores exemplos da minha vida e que com
muito amor e compreensão sempre estiveram ao meu
lado, me escutando, aconselhando e apoiando minhas
decisões. Proporcionaram momentos de tranquilidade e
segurança para a conclusão desse trabalho. Obrigada
por serem minha base, minha referência, e por todos os
valores de vida que me ensinaram e continuam a
ensinar. Obrigada por possibilitarem- que eu vivesse esse
momento e assim dar mais um passo para alcançar meus
sonhos. Tenho muito orgulho e agradeço a Deus todos os
dias por ter vocês como pais.*

Amo vocês!

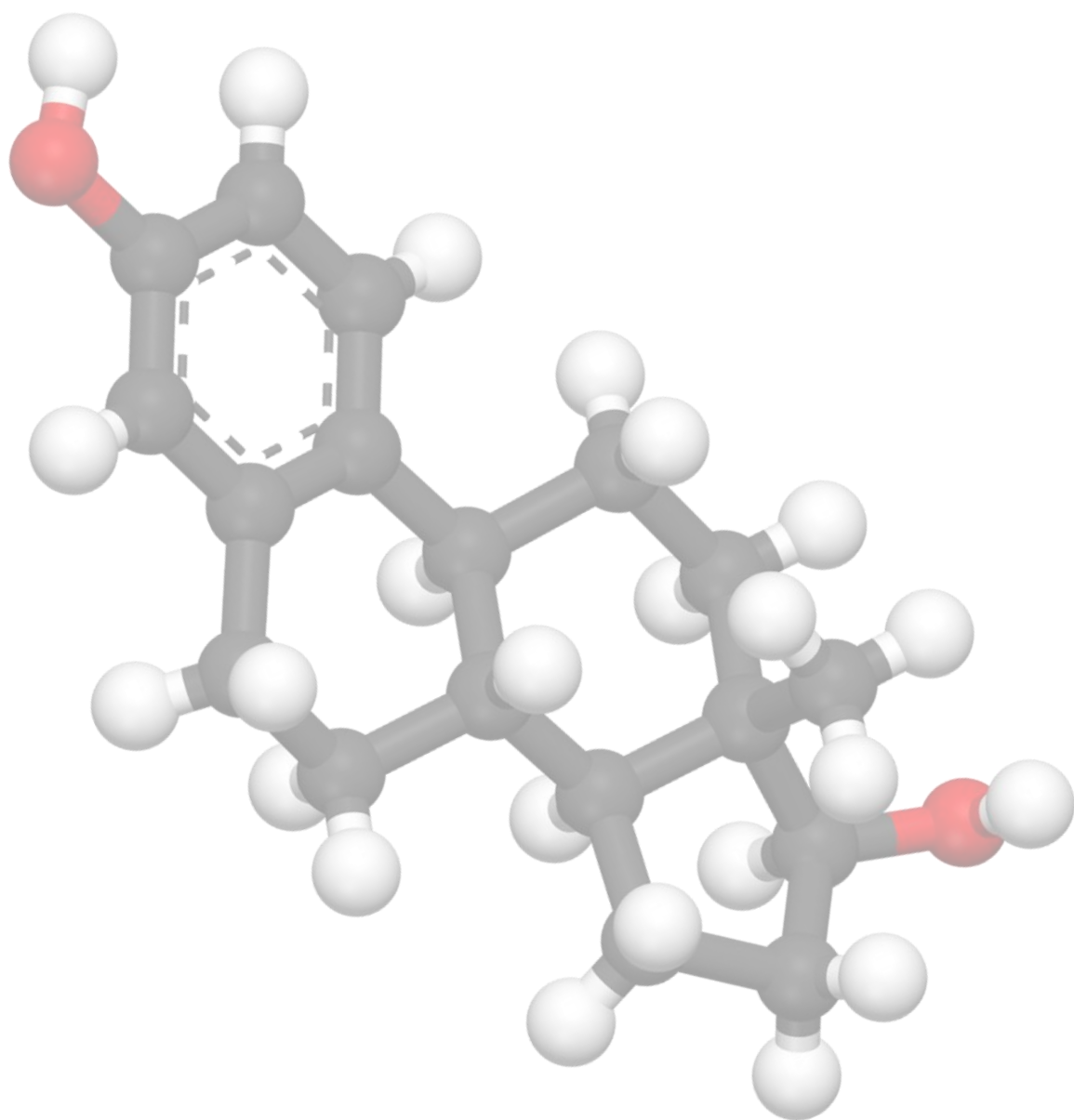
À minha prima Jaqueline

*Que é uma irmã para mim e pela qual tenho imensa
admiração, orgulho e respeito. Obrigada por toda
cumplicidade, amizade e força que me sempre me deu;
sem sombra de dúvida ajudou a construir o que sou hoje.
Obrigada por fazer parte da minha vida!*

Ao meu noivo Jandyr (Jajá)

Que imensamente me incentivou e me apoiou durante toda a execução desse trabalho. Por seu carinho, companheirismo, atenção e paciência. Obrigada pelos ensinamentos para o meu crescimento tanto como pessoa quanto na área acadêmica. Você é uma pessoa brilhante e compartilhar com você minha vida, em especial esse momento, me faz ainda mais feliz.

Obrigada por tudo!



*Agradecimentos
Especiais*

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora,

Prof.^a Dra. Sônia Regina Panzarini que com dedicação, persistência, paciência e empenho para o ensino tornou concreta a realização desse trabalho. Admirável não apenas como profissional, mas também pelo exemplo de pessoa; amável, amiga e humilde. Sempre presente com sua serenidade, sabedoria e um jeitinho único de dar força e motivar cada um de seus alunos. Obrigada professora por todos os ensinamentos, por me dar início na vida acadêmica, incentivar em todos os aspectos da vida e me fazer crer cada vez mais em mim mesma. Sou imensamente grata!

Ao meu co-orientador,

Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti que não mediu esforços para a exceção dessa pesquisa e muito me ensinou, contribuindo para o meu desenvolvimento científico e intelectual. Pesquisador brilhante e pessoa genial. Obrigada por permitir conviver com você durante o desenvolvimento desse trabalho e pelo meu amadurecimento e aprendizado na pesquisa!

Aos professores da Disciplina de Clínica Integrada, Celso Sonoda, Denise Pedrini, Wilson Poí, Daniela Brandini, José Carlos Monteiro de Castro e Eloa Luvizuto pelos conhecimentos e experiências transmitidas, acolhimento, confiança e companheirismo. Sou feliz por conviver com uma equipe tão brilhante e solidária e pela oportunidade de aprender com vocês tantos ensinamentos clínicos. Carrego comigo a importância do trabalho em equipe e a formação teórica, clínica e humanista que proporcionaram e me fizeram crescer como pessoa e profissional. Obrigada!

À Prof.^a Dra. Rita Cássia Menegati Dornelles pelos ensinamentos e sugestões para a realização de parte deste trabalho. Não posso deixar de agradecê-la, e estender esse agradecimento também ao aluno Samuel Moraes por toda atenção que me deram sempre que precisei e por me mostrar tanto amor e dedicação à pesquisa. Muito obrigada!

Ao laboratório de Farmacologia/Unesp- Campus de Araçatuba, em nome da Prof.^a Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira e dos alunos Carluci Beltran e Víctor Balera, que possibilitou análise de alguns dados do projeto.

Ao departamento de Ciências Básicas, principalmente em nome do Prof. Cláudio Casatti, Edilson Ervolino, Roberta Okamoto e aos funcionários André, Sandra e Eliseide pelo suporte e ajuda para a realização desse projeto. Aos alunos desse departamento, Kelly, Gestter, e Jaqueline que sempre se disponibilizaram a me ajudar e fizeram os momentos de trabalho muito mais divertidos e prazerosos. Muito obrigada!

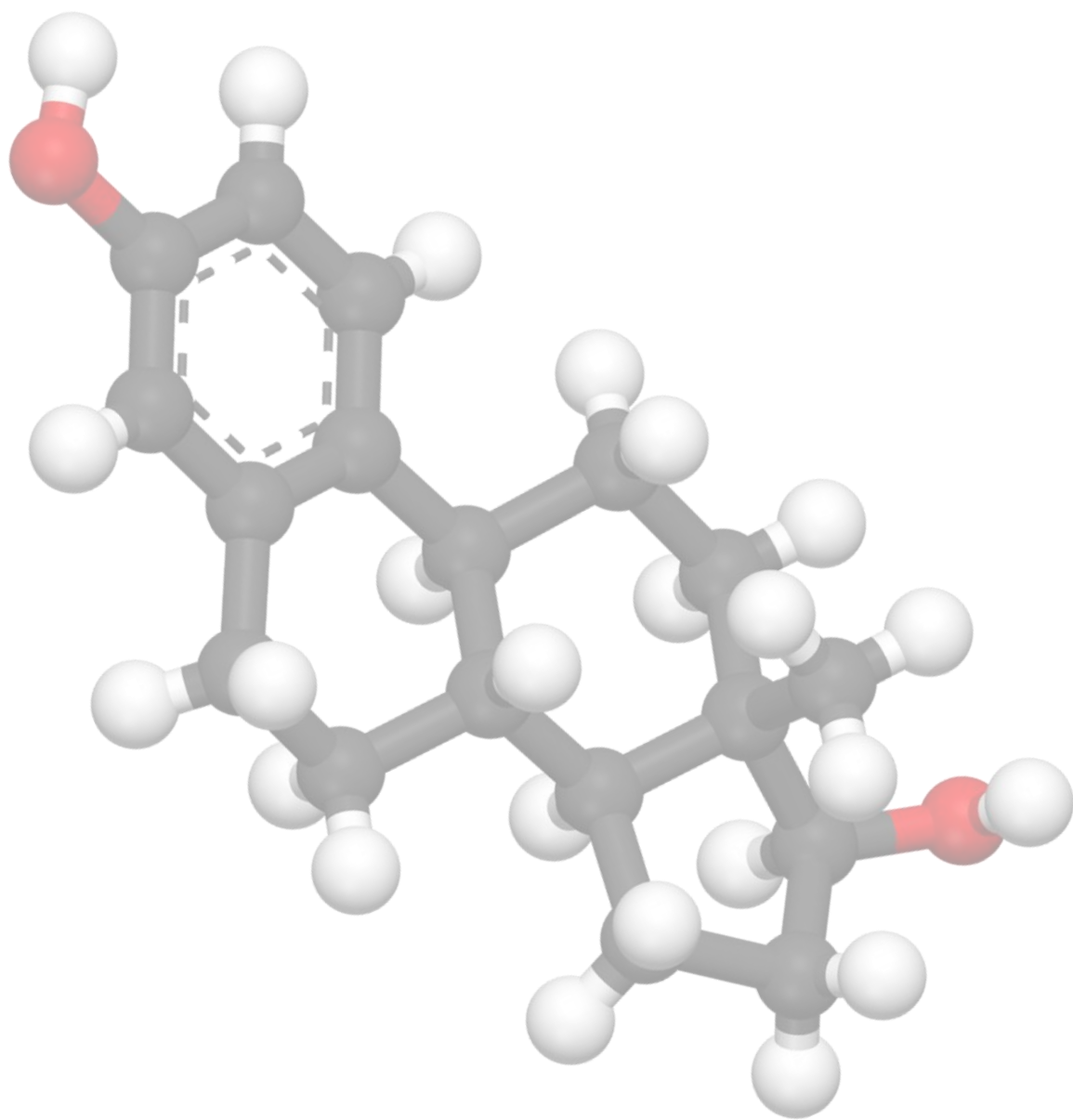
As alunas de pós-graduação do Departamento de Clínica Integrada: Melyna Marques de Almeida, Marina Fuzette Amaral e Elizane Hamanaka. Pessoas brilhantes e dedicadas, que demonstram extremo respeito e carinho pela odontologia.

À Melyna Marques de Almeida e a Lamís Meorin Nogueira pelo apoio, amizade, carinho e paciência que vocês sempre tiveram comigo. Vocês são iluminadas e sou grata por ter convívio e aprendido com vocês. Obrigada por terem feito meus dias melhores!

Ao aluno Vinícius Escórsio Silva pela amizade e ajuda no desenvolvimento deste projeto. Aluno de extrema responsabilidade e competência. Obrigada pela oportunidade de trabalharmos juntos para que essa pesquisa fosse concretizada Vini!

Ao Sr. Odair Vicente que tornou todas as clínicas mais acolhedoras e sempre me incentivou a ir em busca dos sonhos. Obrigada por todas as palavras de incentivo e pelos chás feitos com tanto carinho. Obrigada pela ajuda na realização esse trabalho e na minha formação pessoal Sr. Dadá!

Aos alunos da Pós-Graduação do Programa de Odontologia com os quais tive o prazer de realizar algumas disciplinas. Foram momentos de aprendizado e apoio mútuo. Obrigada por terem contribuído, cada um a sua maneira, para minha formação. Em especial ao meu amigo Maurício Fabiano que sempre se mostrou disposto a me ajudar em todos os momentos. Você fez os meus dias muitos mais divertidos e poder contar com você foi muito importante para mim e meu deu forças nesses dois anos. Obrigada por sua amizade Maurís!



Agradecimientos

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba-UNESP, nas pessoas da Diretora Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhia e do Vice-Diretor Prof. Dr. Wilson Roberto Poi por proporcionar a realização desta pesquisa.

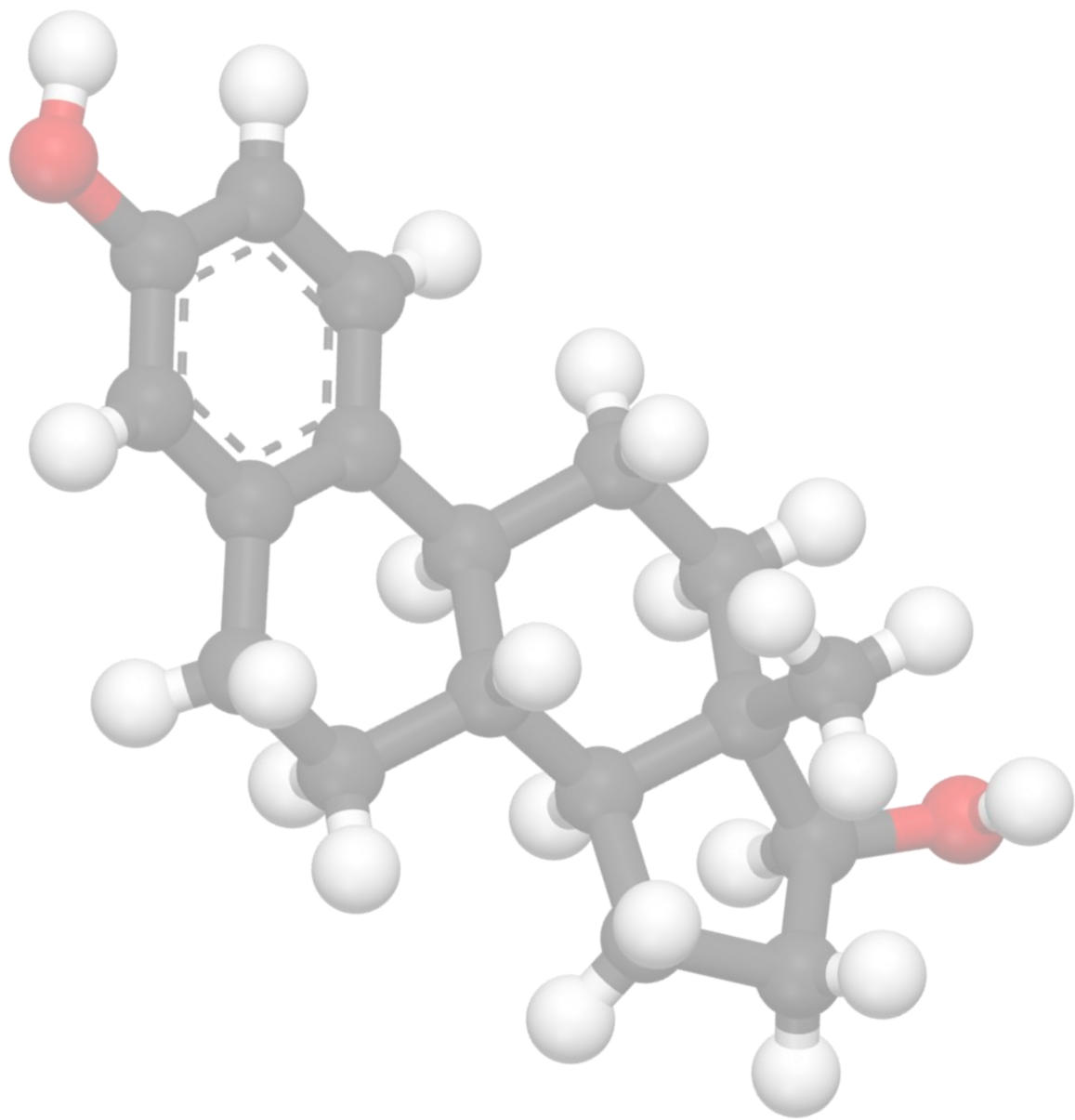
À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia UNESP - Araçatuba, Profa. Dra. Maria José Hitomi Nagata pelo acolhimento para o desenvolvimento deste trabalho.

As funcionárias da secretaria de Pós-graduação, Valéria, Cristiane e Lillian pela atenção, presteza e simpatia concedida.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-Unesp.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Renato, Paulo Roberto Gratão e Marco pela atenção e disponibilidade durante a realização desse trabalho.

Aos colegas do curso de pós-graduação e alunos de graduação pela amizade e companheirismo, e que de maneira direta ou indireta, contribuíram para meu crescimento e à realização deste trabalho.



Resumo

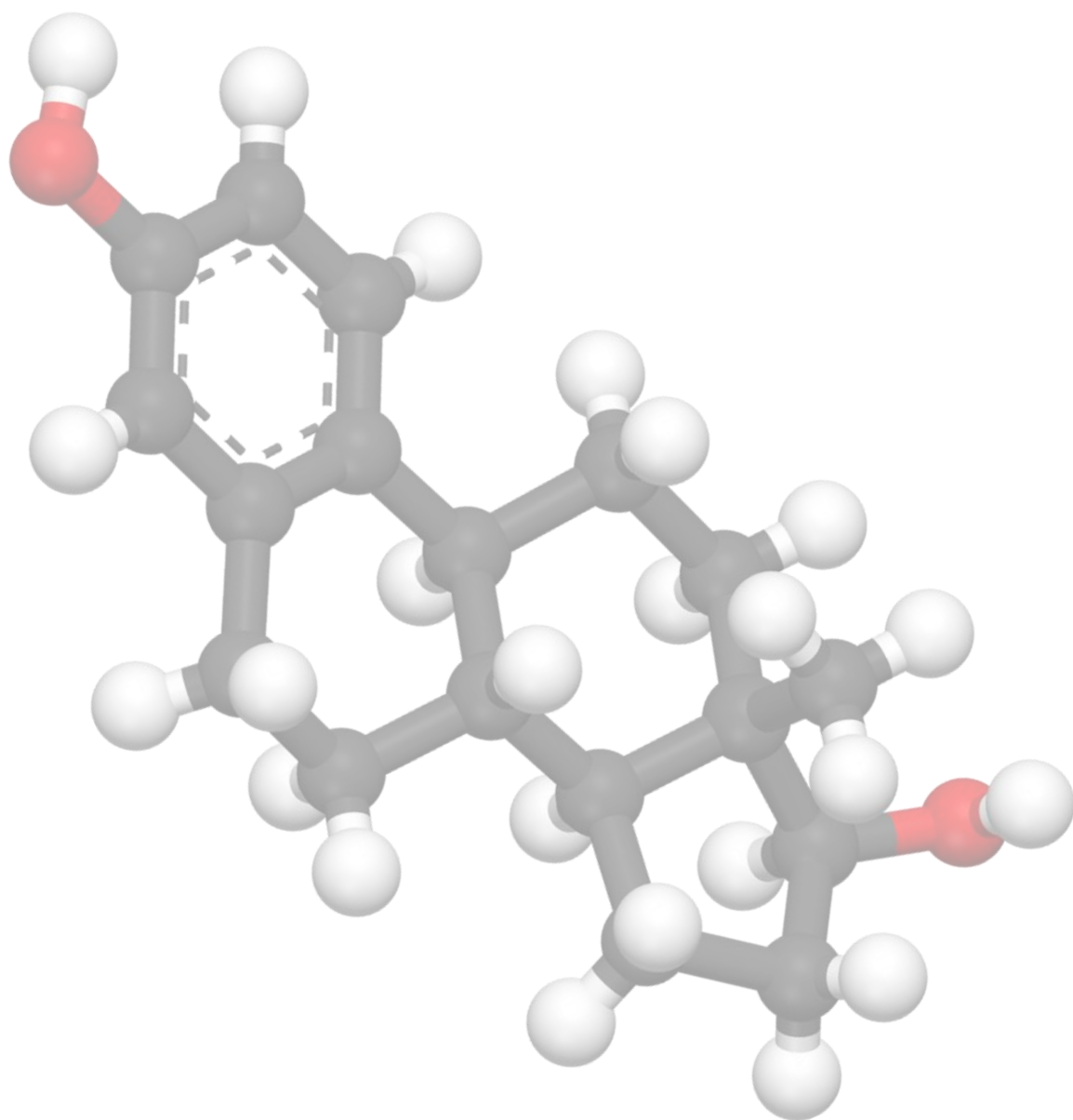
RESUMO

Silva VF. Efeito da ovariectomia e da reposição hormonal no reimplante dentário imediato: análise histomorfométrica e imunoistoquímica em ratas. (Dissertação). Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2015.

A deficiência de estrógeno é uma condição sistêmica com a qual o cirurgião dentista pode se deparar na clínica e aparece durante a menopausa e após ovariectomia. Essa condição pode ocasionar o desenvolvimento da osteopenia e da osteoporose causando um desequilíbrio entre os processos de formação/absorção óssea. Considerando a escassez da literatura no estudo do reimplante dentário em indivíduos com deficiência de estrógeno e que são submetidos a tratamento de reposição hormonal, o objetivo do estudo foi analisar o efeito da ovariectomia e da terapia de reposição hormonal com 17- β estradiol no processo de reparo do reimplante dentário imediato por meio da análise histomorfométrica e imunoistoquímica. Ratas foram submetidas ao estudo do ciclo estral e após esse procedimento foram selecionados para o estudo sessenta animais que apresentaram ciclo regular. Os animais foram submetidos à cirurgia de exposição e/ou remoção dos ovários constituindo os grupos: Sham, ovariectomizados (OVX) e OVX com reposição hormonal (OVX/E2). No 8º dia foram implantados no dorso dos animais pellets subcutâneos com óleo de milho (grupo OVX) e com 17- β estradiol (grupo OVX/E2). Os pellets foram mantidos por 60 dias. No 1º dia de tratamento (grupo 60 dias) e no 45º dia (grupo 15 dias) após o início do tratamento os animais foram submetidos à exodontia e reimplante dentário imediato. Os animais sofreram eutanásia por meio de perfusão 60 dias após o início do tratamento de reposição hormonal. Nesse momento foi realizada a coleta de sangue para a dosagem do estradiol. O nível de estradiol no plasma foi elevado no grupo OVX/E2, baixo no OVX e flutuante no grupo

Sham de acordo com as distintas fases do ciclo estral no momento da coleta. O ligamento periodontal apresentou-se inserido no osso e na raiz em grande parte da superfície radicular nos três grupos aos 15 dias, porém existia a presença de áreas de reabsorção ativa e inativa. Aos 60 dias as áreas de reabsorção radicular estavam presentes e a espessura do ligamento periodontal diminuída pela aposição óssea. O tecido pulpar apresentou significativo processo de ossificação em alguns espécimes nos três grupos experimentais. Foi observado diferença estatística entre os grupos Sham 15 dias e OVX/E2 60 dias para o evento ligamento periodontal. A análise imunoistoquímica mostrou diferença estatisticamente significativa com relação a PCNA entre os grupos OVX 15 dias e OVX 60 dias e OVX 15 dias e OVX/E2 60 dias. Com relação a TRAP não houve diferença entre os grupos. Foi possível concluir que a ovariectomia e a terapia de reposição hormonal não alterou de modo significativo o processo de reparo do reimplante dentário imediato

Palavras chave: Reimplante Dentário, Ovariectomia, Estradiol, Ensaio de imunoadsorção enzimática.



Abstract

ABSTRACT

Silva VF. Effect of ovariectomy and estrogen replacement therapy on dental replantation: a histomorphometrical and immunohistochemical analysis in rats. (Dissertation). Araçatuba: Dentistry School of Estadual Paulista University; 2015.

Estrogen deficiency is a systemic condition that is frequently encountered by dental surgeons in the clinic and appears during menopause and after ovariectomy. This condition can lead to the development of osteopenia and osteoporosis affecting the maxillary bones by promoting bone loss of the alveolar process causing an imbalance between the processes of bone formation and resorption. Considering the shortage of literature in the study of dento-alveolar trauma in individuals with estrogen deficiency and individuals undergoing estrogen replacement therapy (E2), the aim of this study is to analyze the repair process in immediate dental replanting after ovariectomy and estrogen replacement therapy with 17- β estradiol by means of histomorphometric and immunohistochemistry analysis. Sixty female rats with regular estrous cycle were selected for the experimental study. The animals were either ovariectomized (OVX) or sham-operated and divided into three groups: Sham, OVX and OVX/E2. Pellets with corn oil (sham and OVX groups) and 17- β estradiol (OVX/E2 group) were subcutaneously implanted on the back of the animals eight days after either OVX or Sham surgery. Estrogen replacement therapy was maintained for 60 days. At the 1st (60 days group) and 45th days (15 days group) post pellets implantation, the animals were subjected to the right upper incisor extraction and immediate tooth replantation. Animals were sacrificed by perfusion at 60th day of estrogen replacement therapy. Prior to sacrifice, blood samples were collected in order to measure plasma concentration of estrogen. Plasma estradiol level was high in OVX / E2 group, low in OVX and floating in the Sham group according to the different phases of the estrous cycle at the time of

collection. Periodontal ligament was inserted into both the cementum and bone tissue in the three groups at 15th post-operative day, but there was the presence of active and inactive areas of resorption. At 60th post-operative day. Root resorption areas were presented at 60th post-operative day as well as the decreased of the thickness of the periodontal ligament by bone apposition. The pulp tissue has significant process of ossification in some specimens in the three experimental groups. It was observed statistical difference between the groups and Sham 15 days OVX / E2 60 days to the event periodontal ligament. Immunohistochemical analysis showed a statistically significant difference with PCNA between the OVX and OVX groups at 15th post-operative day, as well as between OVX and OVX / E2 60th post-operative day. Regarding TRAP staining, there was no difference among studied groups. It was concluded that ovariectomy and HRT did not change significantly the repair process of immediate tooth reimplantation.

Key words: Tooth replantation, Ovariectomy, Estradiol, Enzyme-linked immunosorbent assay.

Lista de Figuras

- Figura 1 Gráfico representativo do porcentual de animais do grupo Sham nas diferentes fases do ciclo estral (*metaestro*, *proestro*, *estro* e *diestro*) no momento da coleta de sangue. (A) Sham período 15 dias e (B) 60 dias pós-reimplante..... 47
- Figura 2 Gráfico representativo da média e erro padrão da concentração plasmática de 17β -estradiol (pg/mL) para todos os grupos experimentais [SHAM, OVX, OVX/E2] ao final do experimento independente do período pós-reimplante dentário. *, ⁺ Diferenças significativas entre os grupos (p<0.05) [análise de variância one-way (ANOVA)]..... 48
- Figura 3 Gráfico representativo da média e erro padrão da concentração plasmática de 17β -estradiol (pg/mL) para todos os grupos experimentais [SHAM, OVX, OVX/E2] ao final do experimento, separados pelos períodos pós-reimplante dentário (15 e 60 dias). *, ⁺, **, ⁺⁺ Diferenças significativas entre os grupos (p<0.05) [análise de variância one-way (ANOVA)]..... 49
- Figura 4 Fotomicrografias em campo claro de cortes histológicos transversais do incisivo superior de rato submetidos à coloração H&E, nos diferentes grupos experimentais. Observar algumas características histológicas presentes, tais como ossificação pulpar (*), inflamação pulpar (seta pequena), espessamento do ligamento periodontal (setas), anquilose (cabeça da seta). Abreviaturas: CN, cavidade nasal; D, dentina; LP, ligamento periodontal; PD, polpa dentária; AO, osso alveolar..... 54

Figura 5 Fotomicrografias em campo claro de cortes histológicos transversais do incisivo superior de rato submetidos à coloração H&E, nos diferentes grupos experimentais. Observar algumas características histológicas presentes, tais como osteogênese (A), espessura aumentada do LP (B, linha tracejada), focos de inflamação (C), anquilose (D), reabsorção radicular (E), e dentes com ossificação pulpar (F, asterisco) e reabsorção radicular (F, seta). Abreviaturas: D, dentina; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar..... 55

Figura 6 Fotomicrografias em campo claro de cortes histológicos transversais do incisivo superior de rato submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de PCNA (A) TRAP (B-C) nos diferentes grupos experimentais. Notar a presença de células com núcleos imunorreativos à PCNA e osteoclastos com imunorreatividade citosólica à TRAP, próximos a superfícies do osso alveolar ou da dentina (setas). Abreviaturas: D, dentina; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar.. 60

Figura 7 Fotomicrografias em campo claro de cortes histológicos transversais do incisivo superior de rato submetido à imuno peroxidase indireta para detecção de PCNA nos diferentes grupos experimentais. Notar presença de células com núcleos imunorreativas a PCNA, próximos do osso alveolar ou dentina (setas). Abreviaturas: D, dentina; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar..... 61

- Figura 8 Fotomicrografias em campo claro de cortes histológicos transversais do incisivo superior de rato submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de TRAP nos diferentes grupos experimentais. Notar a presença de osteoclastos imunorreativo à TRAP, próximos às superfícies do osso alveolar ou dentina (setas). Abreviaturas: D, dentina; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar..... 62
- Figura 9 Gráfico representativo dos valores da média e erro padrão do número de células imunorreativas a PCNA após o reimplante dentário imediato para os grupos Sham, OVX e OVX/E2, nos tempos pós-operatórios de 15 e 60 dias. Houve diferença estatística entre os grupos OVX 15 dias e OVX 60 dias e entre OVX 15 dias e OVX/E2 60 dias ($p < 0,01$)..... 63
- Figura 10 Gráfico representativo dos valores da média e erro padrão do número de células imunorreativas a TRAP após o reimplante dentário imediato para os grupos Sham, OVX e OVX/E2, nos tempos pós-operatórios de 15 e 60 dias. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p < 0,3$)..... 64

Lista de Tabelas

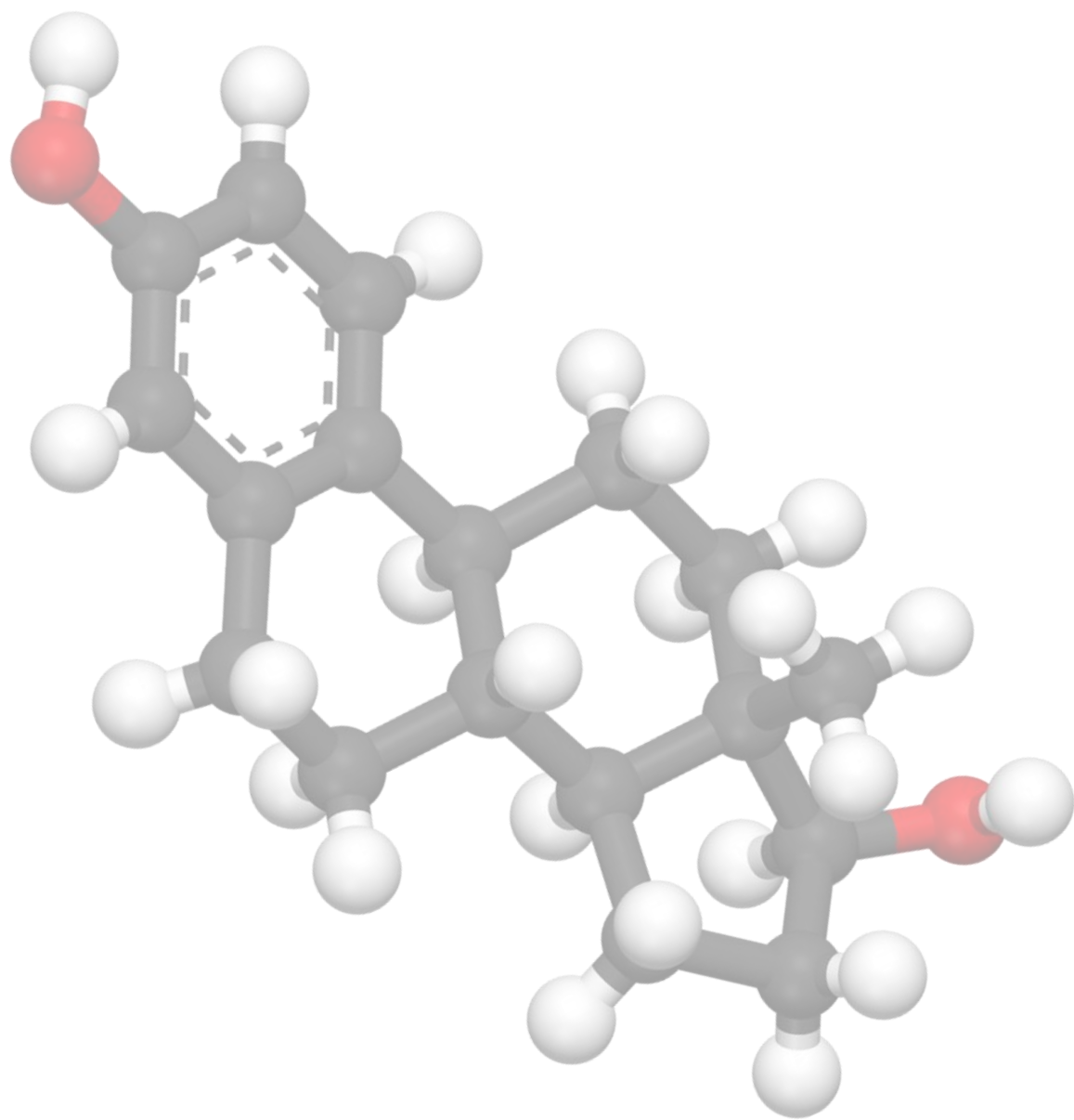
Tabela 1	Escores e análise estatística dos detalhes histomorfométricos no ligamento periodontal após o reimplante dentário imediato aos 15 e 60 dias.....	56
Tabela 2	Escores e análise estatística dos detalhes histomorfométricos na raiz dentária após o reimplante dentário imediato aos 15 e 60 dias.....	56
Tabela 3	Escores e análise estatística dos detalhes histomorfométricos no tecido ósseo após o reimplante dentário imediato aos 15 e 60 dias.....	57
Tabela 4	Escores e análise estatística dos detalhes histomorfométricos referentes à anquilose após o reimplante dentário imediato aos 15 e 60 dias.....	57
Tabela 5	Escores e análise estatística dos detalhes histomorfométrico referentes à polpa após o reimplante dentário imediato aos 15 e 60 dias.....	57

Lista de Abreviaturas

BSA- soro normal de cabra/albumina de soro bovino.
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético.
ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay
EPM- erro padrão da média.
g - Grama.
H.E. – Expressa a técnica de coloração das lâminas - Hematoxilina e Eosina.
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio.
IL-6 - Interleucina 6.
Kg - Unidade fundamental de medida de massa.
KPBS- Tampão fosfato de potássio salino
M – molar.
mg – Miligramas, equivalente à milésima parte do grama.
mg/Kg – Miligramas por quilo.
min.- Minuto.
ml – Mililitros.
mm - Milímetro, equivalente a milésima parte do metro.
mm³- milímetro cúbico.
nm- nanometro.
°C - Grau Celsius.
OPG – Osteoprotegerina.
OVX – Ovariectomia, ratas ovariectomizadas.
OVX/E2- ratas ovariectomizadas com reposição hormonal com 17β-estradiol.
PB- tampão fosfato de sódio.
PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular.
Pellets- Microesferas que permitem liberação prolongada de fármacos.
pg/ml- picograma por mililitro.
pH- potencial Hidrogeniônico.
RANKL – Receptor ativador de NF-Kappa B ligante.
RPM- rotação por minuto.
Sham – ratas controle.
TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa.
TRAP – Tartrate-Resistent Acid Phosphatase
TRH- terapia de reposição hormonal.
µg/ml – Microgramas por mililitros.
µl – microlitro.
µm- micrometro.
17β-estradiol – hormônio sexual e esteroide, o principal hormônio sexual feminino.

Sumário

INTRODUÇÃO.....	29
PROPOSIÇÃO.....	34
MATERIAL E MÉTODO.....	36
RESULTADOS.....	46
DISCUSSÃO.....	66
CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS.....	76
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba.....	84
ANEXO B – Ilustração material e método.....	85
ANEXO C – Normas do periódico “Dental Traumatology”.....	91



Introdução

INTRODUÇÃO

A deficiência de estrógeno na pós-menopausa é responsável por muitas alterações sintomáticas e assintomáticas em diferentes sistemas do organismo, como sistemas vasomotores, metabolismo ósseo, sistema cardiovascular e sistema urogenital (1).

A menopausa é a cessação permanente das menstruações como resultado da baixa função folicular ovariana ou da remoção cirúrgica dos ovários (ooforectomia ou ovariectomia) (2).

A idade média para ocorrência do climatério é de 51 anos, mas em alguns casos, ele pode acontecer precocemente decorrente de vários outros fatores como histerectomia, falência ovariana, hiperprolactinemia, hipotireoidismo, tumores hipotalâmicos e doenças autoimunes (3,4).

A ovariectomia profilática também pode ser feita durante uma histerectomia por agravo uterino benigno (mioma, endometriose, hemorragias abundantes). A prática concomitante desses dois procedimentos atinge mais de 300 mil casos anuais nos EUA e, 50% deles são realizados em mulheres com idade entre 40 e 64 anos, quando os ovários ainda exibem significativa atividade endócrina (5).

No tocante ao câncer de ovário, evidências epidemiológicas sugerem uma prevenção anual de 1.000 casos para 300 mil ovariectomias realizadas no momento de uma histerectomia eletiva em mulheres acima de 40 anos (6).

O câncer de ovário é o tumor ginecológico pouco frequente e difícil de ser diagnosticado e o de menor chance de cura. Cerca de 3/4 dos cânceres desse órgão apresentam-se em estágio avançado no momento do diagnóstico.

No Brasil há estimativa de 6.190 (data sus 2012) novos casos de câncer de ovário, e o número de óbitos atinge 2.979 (data sus 2010) (7).

Frente a todas essas causas, o número de mulheres submetidas à ovariectomia é uma realidade nos dias de hoje e assim a deficiência de estrógeno é uma condição sistêmica com a qual o cirurgião dentista pode se deparar na clínica.

A deficiência do estrógeno pode levar ao desenvolvimento da osteopenia e da osteoporose causando um desequilíbrio entre os processos de formação/absorção óssea. (8)

A osteoporose é uma doença caracterizada pela diminuição de massa óssea sem alteração da composição química do tecido ósseo (9). A etiologia da doença é complexa e multifatorial e tem sido correlacionada tanto à deficiência de estrógeno, gerada fisiologicamente durante a menopausa ou pela excisão cirúrgica dos ovários, quanto a diversos fatores de risco como: genéticos, ambientais, nutricionais (10, 11), consumo de cigarros, consumo de álcool e falta de atividade física (12). Também pode ser causada pelo hiperparatiroidismo, hipertiroidismo, doença de Cushing e tratamento com glicocorticóides (13).

A perda de massa óssea, na osteoporose, é mais comum em indivíduos idosos e é causada por um desequilíbrio entre os processos de formação/absorção, seja pela prevalência da absorção, pela redução da formação ou pela combinação das duas situações. Atinge ambos os sexos e é relativamente comum em mulheres após menopausa. Na maioria dos casos de osteoporose pós-menopausa, o problema se instala principalmente por um aumento anormal da reabsorção óssea (14).

Ao longo dos anos, pode-se observar tanto em estudos clínicos (15) quanto em estudos com experimentação em animais que a qualidade e a quantidade do tecido ósseo são reduzidas pós-menopausa (16,17), assim como se pode associar com a menopausa e a osteoporose mudanças na estrutura orofacial em mulheres senil, tais como: perda de massa de osso alveolar, diminuição da densidade mineral óssea da

crista alveolar e subcrista (18), reabsorção extensa do osso alveolar após a extração dentária, reduzindo o volume de osso trabecular, além do número de dentes perdidos (19).

A literatura tem descrito que a extensão do período de exposição aos estrogênios vai desde a menarca até a menopausa sendo esse hormônio um dos mais importantes determinantes da densidade mineral óssea (20). Portanto, a deficiência estrogênica causada pela menopausa é considerada um dos principais fatores de risco para a osteoporose em mulheres. (8).

Baseado no efeito de proteção do estrógeno no tecido ósseo, a terapia de reposição hormonal atualmente permanece entre os tratamentos mais utilizados para os sintomas da menopausa e prevenção da osteoporose. (21, 22).

O estrógeno é um hormônio que tem um importante papel no controle do metabolismo ósseo regulando a expressão de proteínas como a Osteoprotegerina (OPG) (23, 24) e RANKL (24) e citocinas pró-inflamatórias (25, 26). A sua deficiência causa a liberação de citocinas, como a IL-6 e TNF- α , que desempenham um papel destrutivo ao tecido ósseo, e têm sido relacionadas à patogênese da osteoporose (26). Outra ligação do estrógeno com a destruição do tecido ósseo está relacionado com o fato do estrógeno apresentar importante papel na destruição dos osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea (27).

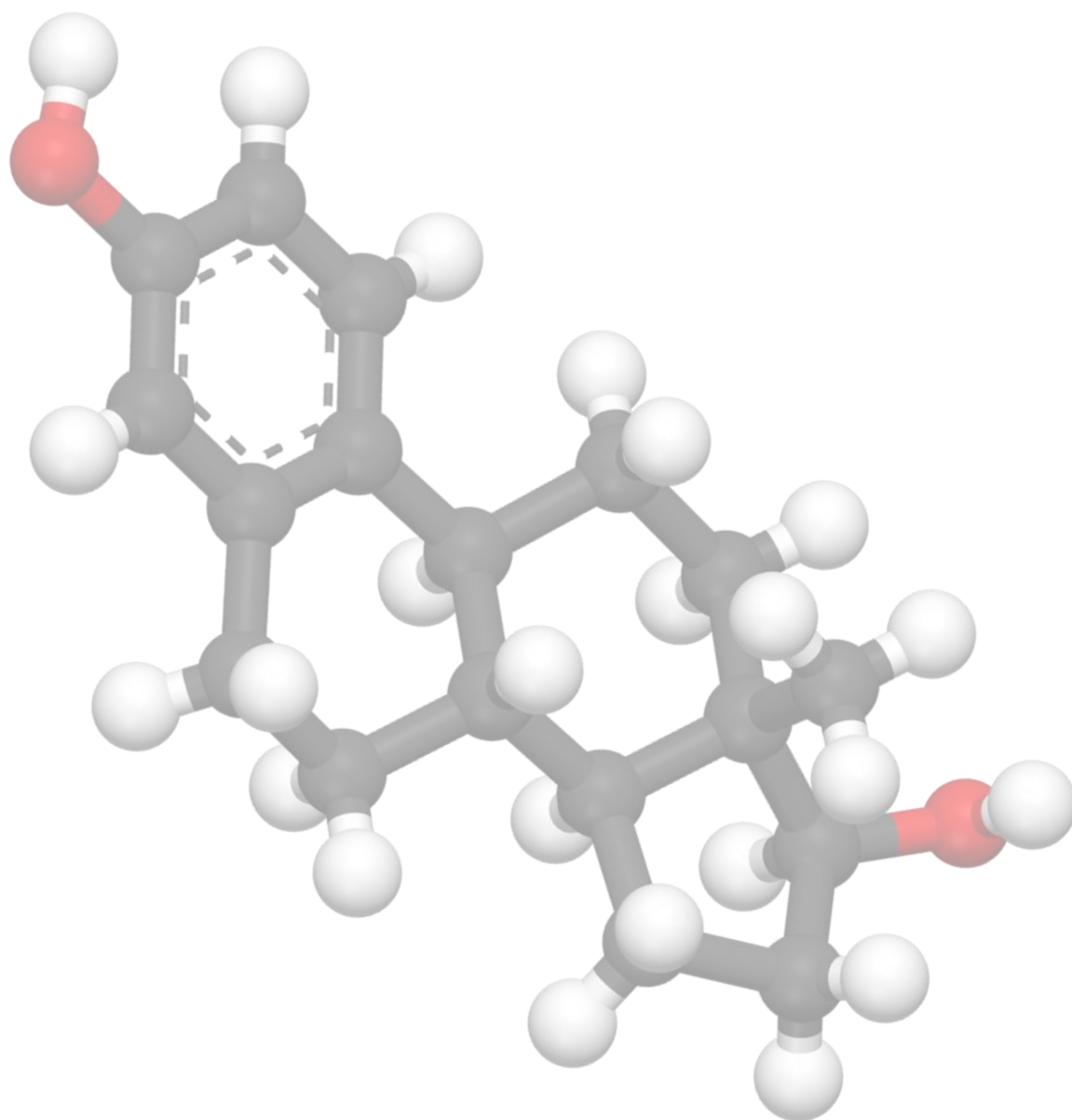
Diante do exposto o número de mulheres com deficiência de estrógeno é grande e pode abranger uma faixa etária onde esses indivíduos também podem estar sujeitos aos traumatismos dento-alveolares e dentre eles a avulsão dentária.

Frente à avulsão dentária, o procedimento ideal é o replante imediato do dente em seu alvéolo, garantindo a vitalidade do ligamento periodontal cementário promovendo assim o reparo por meio da reinserção de suas fibras (28).

O sucesso da manutenção do dente reimplantado está relacionado com a presença, tipo e velocidade do processo de reabsorção radicular (28, 29, 30) que tem uma relação direta com a viabilidade das células do ligamento periodontal que por sua vez depende de fatores locais como: o tempo extra alveolar, o meio de armazenagem, a manipulação radicular inadequada e a necrose pulpar (28, 31, 32, 33, 34, 35).

Além dos fatores locais algumas condições sistêmicas como a deficiência de estrógeno e as suas consequências também poderiam interferir nesse processo, porém ainda foram pouco pesquisadas.

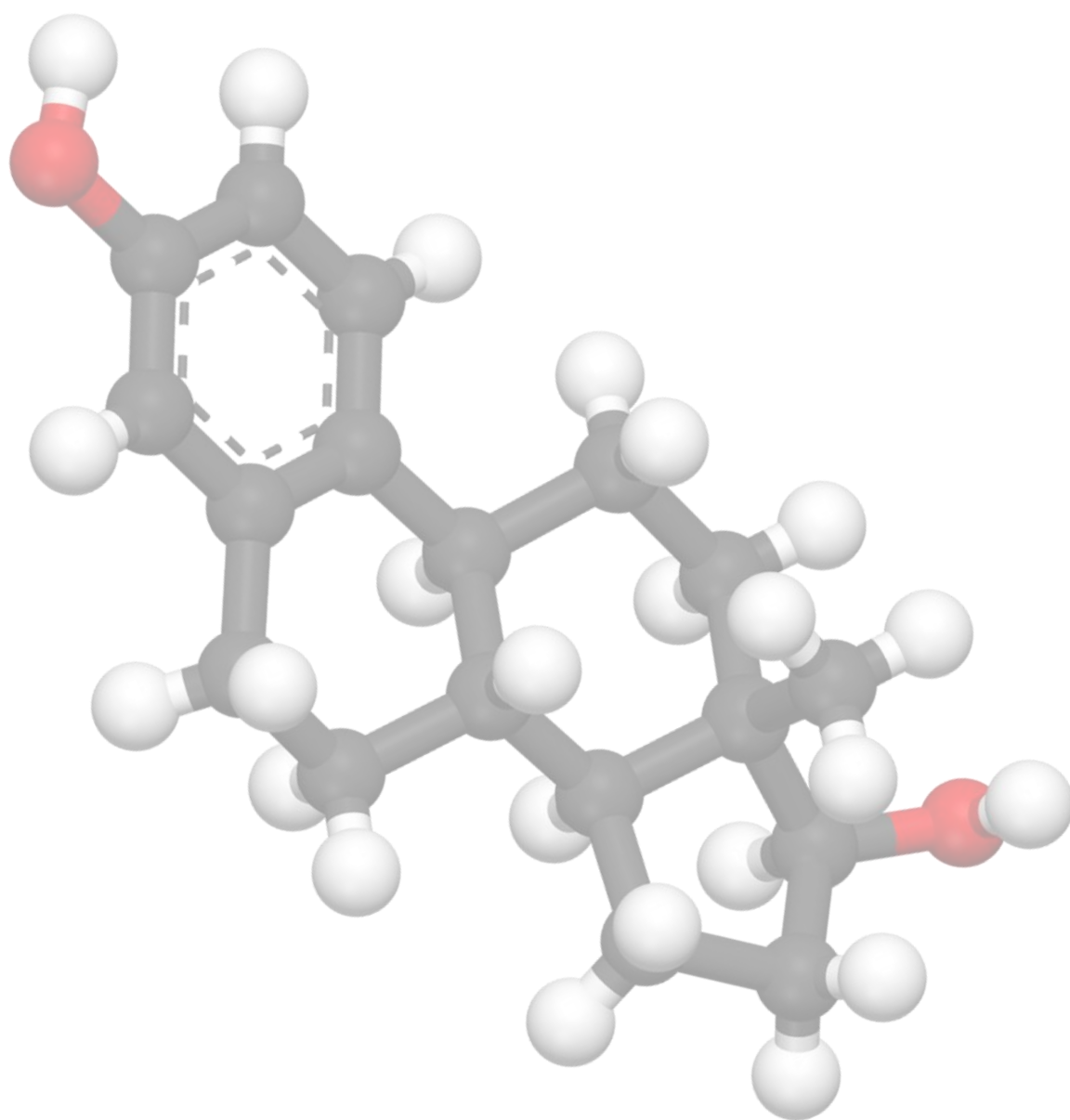
Considerando que a literatura apresenta-se muito escassa no estudo do reimplante dentário em indivíduos com deficiência de estrógeno e submetidos à reposição hormonal o estudo se justifica.



Proposição

PROPOSIÇÃO

A proposta do trabalho foi analisar efeito da ovariectomia e da reposição hormonal com 17- β estradiol no processo de reparo do reimplante dentário imediato por meio da análise histomorfométrica e imunohistoquímica em ratas.



Material e Método

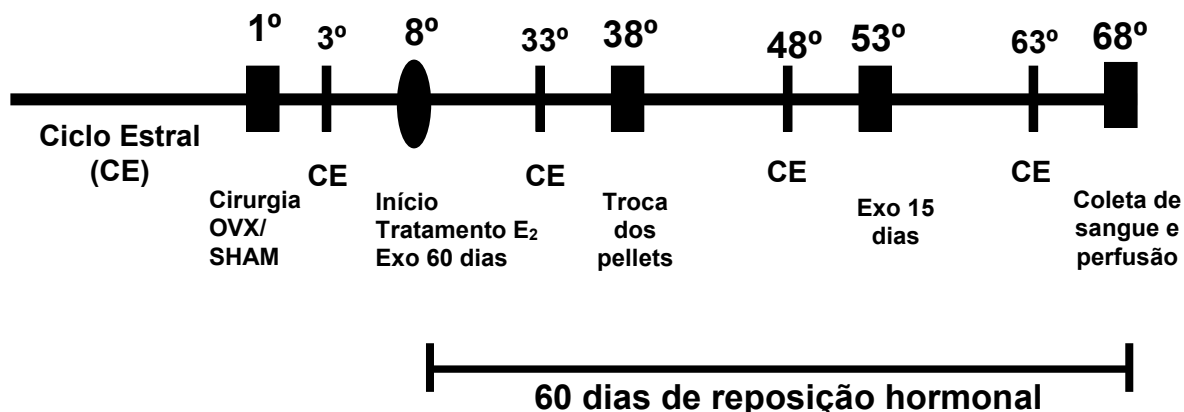
MATERIAL E MÉTODO

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP e aprovado (processo – 009289-2013, Anexo A). Todos os cuidados com os animais foram rigorosamente seguidos.

Foram selecionadas ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com idade de 4 meses, pesando aproximadamente 200 a 300g e que já tivessem tido uma cria antes do início do experimento. Os animais foram mantidos em gaiolas no biotério do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentadas com ração balanceada e água *ad libitum* (Ração ativada Produtor, Moinho Primor S/A), exceto 24 horas antes a intervenção cirúrgica.

Foi realizado estudo diário do ciclo estral pela técnica descrita por Long e Evans (1922) (36), que consiste na introdução, dentro da vagina, de 1-2 gotas de soro fisiológico que, em seguida, é aspirado e colocado numa lâmina histológica para leitura microscópica imediata.

Foram selecionadas para o experimento 60 ratas que apresentaram de 2 a 3 ciclos regulares. O ciclo estral foi repetido nas seguintes etapas para controle do experimento:



Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos e sedados com a associação de Cloridrato de Xilazina (Dopaser, Laboratório Calier do Brasil Ltda, Osasco, SP, Brasil) na dosagem de 10mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Ketamina (Doálen AgriBands Ltda, Paulínea, SP, Brasil) na dosagem de 75mg/Kg de peso corporal. As ratas do grupo Sham (20 animais) foram submetidas à cirurgia para exposição dos ovários bilateralmente e as dos grupos OVX (20 animais) e OVX/E2(20 animais) foram submetidas à ovariectomia bilateral, visando induzir os efeitos da depleção de estrógeno.

Para a exposição ou retirada dos ovários foi realizada a tricotomia bilateral do ventre do animal e a assepsia vigorosa da área com solução de digluconato de clorexidina a 0,12%. Após o isolamento da área cirúrgica, com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 10, incisões bilaterais de aproximadamente 1 cm foram realizadas, obtendo-se acesso aos ovários. Logo após a sua exposição e/ou remoção foi realizada suturas internas com fio absorvível Vicryl 4-0 (Johnson & Johnson / Ethicon, São Paulo, SP, Brasil) e externas com fio de Seda 4-0 (Johnson & Johnson / Ethicon, São Paulo, SP, Brasil). Cada animal recebeu, no pós-operatório imediato, dose única de antibiótico penicilina G benzatina por via intramuscular de 20.000UI/animal.

Foi realizado o acompanhamento do ciclo estral para a confirmação da aciclicidade nas ratas ovariectomizadas.

No 8º dia após a realização da cirurgia de remoção dos ovários quarenta animais receberam pellets (1,5 cm) confeccionados com Silastic {Dow CorningCat nº 508-006; Diâmetros: 0,058in ID (1,47mm); 0,077 in OD (1,96mm)}.

Para a confecção de cada pellet, uma das extremidades foi colada com silicone e em seguida foi adicionado volume de preenchimento aproximado de 8,4 mm³ de óleo

de milho (grupo OVX) em 20 pellets e o mesmo volume de E₂ (17β-estradiol/Sigma-Aldrich) na concentração de 300μg/mm³ (grupo OVX/E2) em outros 20 pellets. Após o preenchimento, a outra extremidade foi colada com silicone. Os pellets permaneceram em secagem por 24 horas, e após esse período, foram implantados no dorso dos animais. A terapia de reposição hormonal (TRH) foi mantida por um período de sessenta dias e os pellets foram trocados no trigésimo terceiro dia após a cirurgia de remoção dos ovários.

Em 30 animais a exodontia e o reimplante foram realizados no primeiro dia da TRH enquanto que nos outros 30 animais esses procedimentos foram realizados no 45º dia após o início da TRH.

Após sedação dos animais foi realizada a sindesmotomia, luxação e extração do incisivo superior direito que permaneceu por 5 minutos em meio ambiente sobre gaze estéril. A seguir, foi realizado a antissepsia da porção anterior da maxila com polivinilpirrolidona iodo (Riodeine – Ind. Farmac. Rioquímica Ltda, São José do Rio Preto, SP, Brasil) e o reimplante do dente.

No 60º dia após o do início da TRH todos os animais foram anestesiados para coleta de sangue para dosagem do estradiol e perfusão para obtenção das peças.

Procedimentos para Dosagem Hormonal

Foram coletados 4 ml de sangue através de punção cardíaca com um túbulo contendo heparina sódica (Vacutainer, Shandong Weigao Group Medical PolymerCo., Weihai, China). O plasma foi separado por centrifugação (3000 RPM/ 2°C/ 15 min.). Aliquotas com 500 μl de plasma foram distribuídas em eppendorfs pré- identificados. Esses eppendorfs foram estocados em freezer -80°C para posterior dosagem do 17β-estradiol (kit IBL International GMBH, Hamurg, Germany) através do ELISA.

O 17 β -estradiol foi quantificado de acordo com as instruções do fabricante (IBL International GMBH, Hamurg, Germany). As amostras foram descongeladas até atingir temperatura ambiente e homogeneizadas para o início da análise.

O suporte com as tiras foi marcado para posterior identificação das amostras, colocando nas primeiras cavidades, 25 μ l dos 7 padrões fornecidos pelo Kit (0; 25; 100; 250; 500; 1000 e 2000pg/ml). Em seguida, 25 μ l do controle 1 e 2 e das amostras foram colocados nos poços seguintes. Essa análise foi feita em duplicata para os padrões, para os controles e para as amostras.

Foi adicionado 100 μ l da solução de Conjugado de Biotina em cada poço das amostras e reagentes (padrões e controle) e 50 μ l de antissoro em cada poço, agitando a placa levemente por 5 segundos. Posteriormente, a placa foi colocada no agitador, onde ficou por 90 minutos na velocidade de 170rpm. Depois de agitado, desprezou-se o conteúdo da placa, lavando cada poço com 300 μ l de água destilada. A lavagem foi realizada 5 vezes em cada poço.

Foi adicionado 100 μ l de Solução Cromógena TMB (solução de coloração da reação) em todos os poços e colocada no agitador novamente por 10 minutos. A placa foi coberta com papel alumínio antes de ser colocada no agitador, para que a luz e o oxigênio não interferissem na reação.

Após todo esse procedimento, foi adicionado 100 μ l de solução STOP (solução de interrupção da reação, de composição ácida) em cada poço, esperando-se por aproximadamente 15 segundos para a leitura final e conseqüentemente para obtenção dos resultados.

As amostras, os controles e os padrões foram lidos em uma leitora de microplaca (Molecular Devices, modelo Spectra Max 250) a um comprimento de onda de 450nm.

Processamento Histológico

Após a perfusão, as peças obtidas foram fixados em solução de formaldeído a 4% por 24 horas na sequência foram descalcificadas em solução de EDTA a 10%, pH 7,0 (Sigma-Aldrich Sto Louis, MO, USA) e em seguida a desidratação utilizando uma sequência de álcoois. Após estas etapas, foi realizada a diafanização com xilol e posterior inclusão em parafina para obtenção de cortes semi-seriados com 5 µm de espessura no sentido transversal da raiz e montados em lâminas.

Processamento imunoistoquímico

Os cortes histológicos coletados em lâminas silanizadas foram submetidos a banhos sucessivos de xilol e reidratados. Em seguida, submetidos às seguintes etapas de lavagens e incubações sob agitação a 20 RPM, descritas resumidamente: a) duas lavagens de 10 minutos em tampão fosfato de sódio (PB), pH 7.4, 0.1M, a temperatura ambiente; b) inibição da peroxidase endógena com 0,3% de H₂O₂ por 60 minutos em metanol; c) lavagens em PB à temperatura ambiente; d) recuperação antigênica com tampão citrato pH 6.0 em panela pressurizada, durante 10 minutos; e) lavagens em PB à temperatura ambiente; f) incubação por 24 horas a temperatura ambiente, com um dos seguintes anticorpos primários monoclonais ou policlonais anti-PCNA (1:500, VP980, Vector Laboratories, CA, USA), anti-TRAP (1:500, sc7628, Santa Cruz Biotechnology, USA) diluídos em solução contendo 0,3% de triton X-100 Tween-20 (Sigma), soro normal de cabra/albumina de soro bovino - BSA (1:200, Sigma) e PB; e) duas lavagens de 10 minutos em PB a temperatura ambiente; g) incubação por 1 hora, em uma solução contendo anticorpo secundário biotilado universal obtido em suíno (LSAB kit, K0679,

Dako laboratories, USA), 0.3% de triton X-100, soro normal de cabra e PB; h) duas lavagens de 10 minutos em PB a temperatura ambiente; i) incubação por 1 hora, com o complexo avidina-biotina peroxidase (LSAB kit, K0679, Dako Laboratories, USA) em PB e temperatura ambiente; j) duas lavagens de 10 minutos em PB a temperatura ambiente; l) revelação com uma solução de incubação contendo diaminobenzidina e intensificadores (LSAB kit, K0679, Dako laboratories); bloqueio da reação com lavagens em água destilada seguido de lavagens em KPBS. Os cortes histológicos foram desidratados em soluções crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e montados com meio de montagem e lamínulas.

Análises histomorfológicas

Para a quantificação das ocorrências histomorfológicas nos períodos de 15 e 60 dias de reparo alveolar, foram atribuídos escores de 1 a 4 aos diferentes eventos abaixo listados, onde 1 corresponde ao melhor resultado e 4 ao pior, ocupando os escores 2 e 3 posições intermediárias (37).

Eventos considerados para a análise dos resultados:

✓ Ligamento Periodontal

- 1- Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em toda a extensão do ligamento;
- 2- Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em dois terços da extensão do ligamento;
- 3- Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em um terço da extensão do ligamento;
- 4- Ausência de fibras periodontais com inserção em osso e cimento.

✓ Raiz do dente

- 1- Ausência de reabsorção radicular e ou reabsorções reparadas;
- 2- Áreas de reabsorção inativa (ausência de células clásticas);
- 3- Pequenas áreas de reabsorções ativas;
- 4- Extensas áreas de reabsorção ativa.

✓ Tecido ósseo

- 1- Ausência de área de reabsorção;
- 2- Presença de área de reabsorção inativa (ausência de células clásticas);
- 3- Presença de pequenas áreas de reabsorção ativa;
- 4- Presença de extensas áreas de reabsorção ativa.

✓ Anquilose

- 1- Ausência de anquilose;
- 2- Pequenos pontos de anquilose;
- 3- Um terço da raiz está anquilosada;
- 4- Mais de um terço da raiz está anquilosada

✓ Polpa

- 1- Normal;
- 2- Presença de calcificações;
- 3- Em processo de degeneração;
- 4- Degenerada.

Análise quantitativa das imunomarcações

As marcações imunoistoquímicas das proteínas PCNA e TRAP foram analisadas qualitativamente no tecido ósseo, dentina e ligamento periodontal e quantitativamente ligamento periodontal, através de microscopia de campo claro.

Para quantificação da TRAP e PCNA, o terço médio do periodonto (face lingual) do dente incisivo superior foi selecionado e capturado por meio da objetiva de 20X e câmera digital Axiovision (Carl Zeiss, USA) e quantificadas com o auxílio do programa ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012).

O número de células imunorreativas a TRAP no ligamento periodontal foi expresso em valores absolutos médios e erro padrão médio/ $1 \times 10^5 \mu\text{m}$ e o número de células imunorreativas a PCNA no ligamento periodontal foi expresso em valores absolutos médios e erro padrão médio/ $1 \times 10^4 \mu\text{m}$ em relação à área do ligamento periodontal selecionada para quantificação.

Análise estatística

Dosagem hormonal

O teste t de student ou ANOVA com correção de Tukey foi usado para determinar a significância da diferença entre os grupos de animais normais e tratados dentro do mesmo ensaio. Os resultados das dosagens plasmáticas de 17β -estradiol são apresentados em média \pm erro padrão da média (EPM) sempre em triplicata. O nível crítico foi fixado em 5% ($p < 0,05$) para se admitir diferença de valores como estatisticamente significantes.

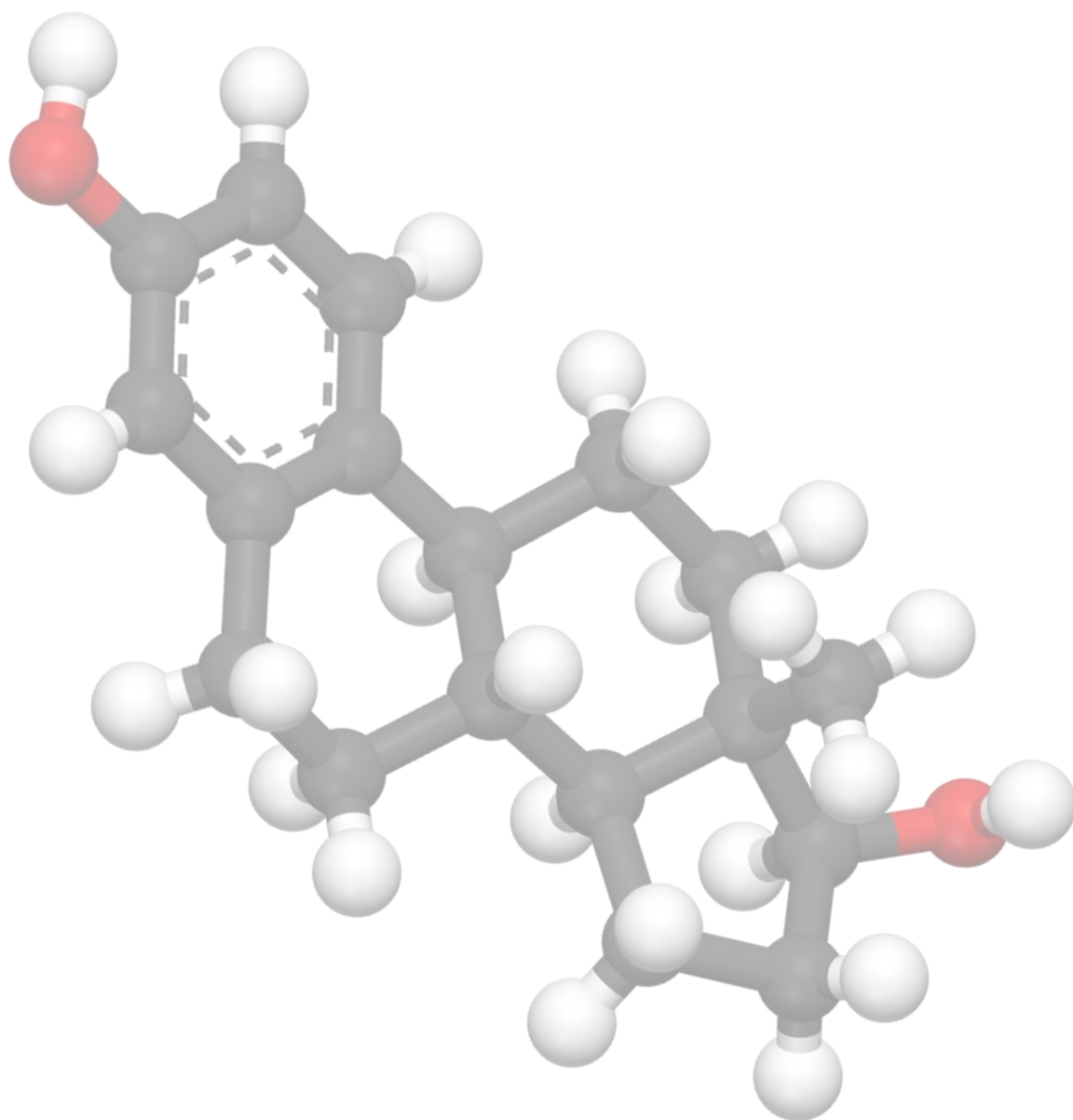
Ocorrências histomorfológicas

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade seguido pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e posteriormente submetido ao teste estatístico de Dunn. O nível de significância foi fixado em 5% ($p < 0,05$).

Imunoistoquímica

Para a análise imunoistoquímica foi realizada a quantificação das proteínas PCNA e TRAP no ligamento periodontal selecionando o terço médio do dente. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Oneaway Anova seguida pelo teste Tukey.

Em todas as análises, os grupos Sham, OVX e OVX/E2 nos períodos estudados, a diferença estatística foi considerada quando $p < 0,05$. Estas análises foram realizadas utilizando o programa GraphPadPrism® 5.



Resultados

RESULTADOS

Confirmação da deficiência de estrógeno

As avaliações do ciclo estral confirmaram o sucesso da cirurgia de ovariectomia nos animais do grupo OVX e do tratamento de reposição de estrogênio nos animais pertencentes ao grupo OVX/E2. Os animais do grupo OVX apresentaram no esfregaço a fase *diestro*, que se caracteriza por um predomínio de leucócitos e seus órgãos reprodutivos atrofiados, confirmando a redução dos níveis de estrógeno sérico neste grupo. Em contraste, os animais submetidos à cirurgia Sham apresentaram os quatro estágios regulares do ciclo estral (*estro*, *diestro*, *proestro* e *metaestro*). Pode-se observar que no momento da coleta de sangue os animais desse grupo apresentavam em fases diversas do ciclo estral (Fig.1). Finalmente, as ratas que foram ovariectomizadas e submetidas à TRH (OVX/E2) mantiveram-se na fase do *estro* (enucleados células cornificadas).

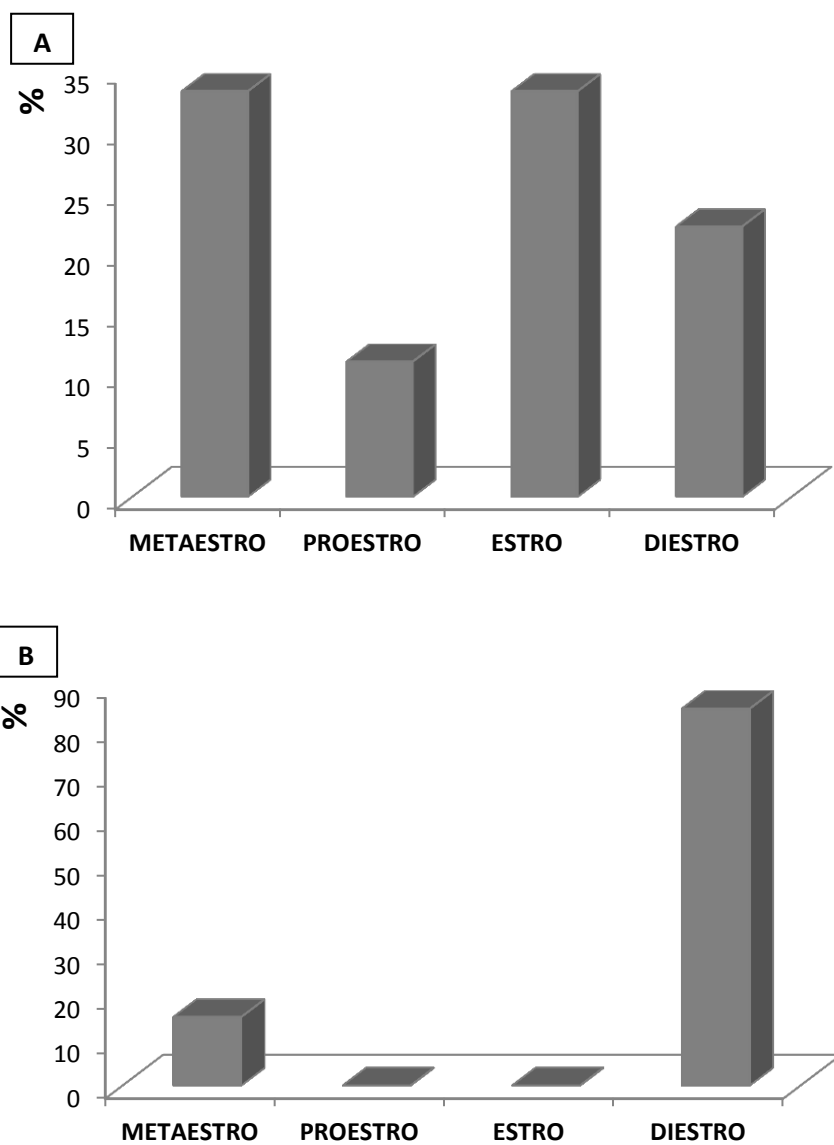


Fig. 1. Gráfico representativo do percentual de animais do grupo Sham nas diferentes fases do ciclo estral (*metaestro, proestro, estro e diestro*) no momento da coleta de sangue. (A) Sham período 15 dias e (B) 60 dias pós-reimplante.

Concentrações plasmáticas de 17β-estradiol

Concentrações plasmáticas de 17β-estradiol (\pm erro padrão), determinado no momento da eutanásia, para grupos de Sham, OVX e OVX/E2 respectivamente estão expressas na Figura 2.

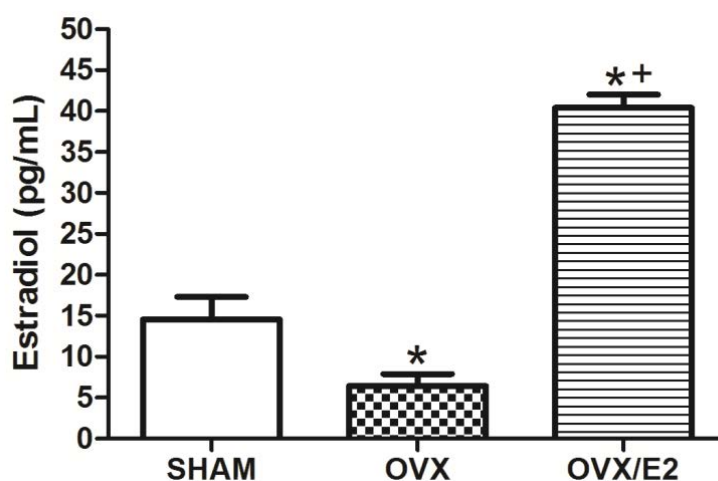


Fig. 2. Gráfico representativo da média e erro padrão da concentração plasmática de 17β- estradiol (pg/mL) para todos os grupos experimentais [SHAM, OVX, OVX/E2] ao final do experimento independente do período pós-reimplante dentário. *,⁺ Diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$) [análise de variância one-way (ANOVA)].

O nível de 17β-estradiol no plasma foi elevado no grupo OVX/E2, baixo em ratas OVX e flutuante no grupo Sham com aumentos e diminuições de acordo com o número de ratos em relação às fases distintas do ciclo estral e estão expressos na figura 3.

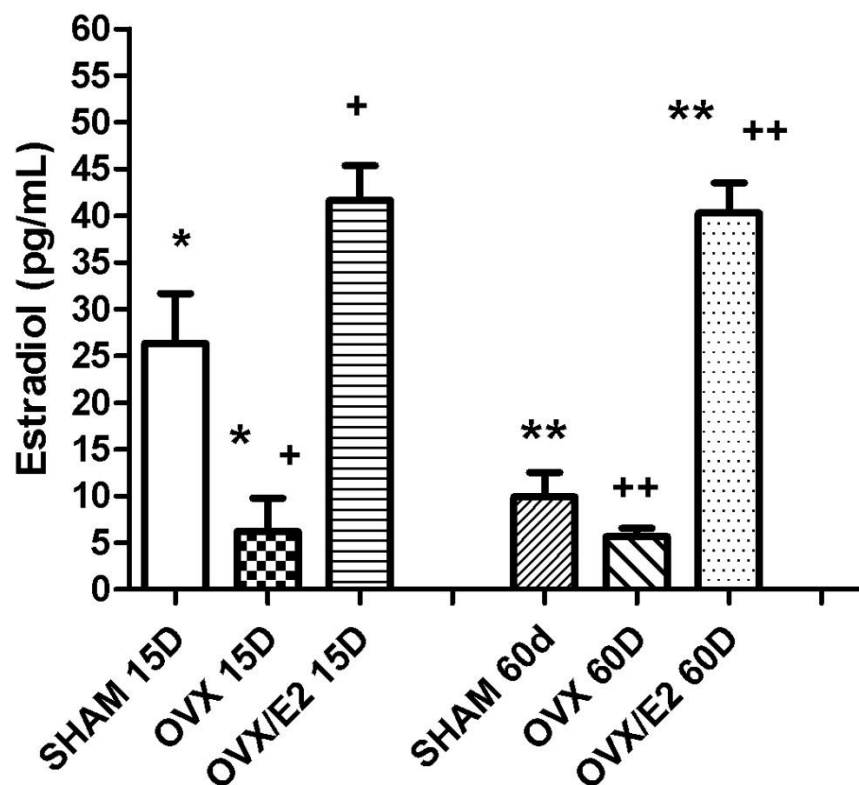


Fig. 3. Gráfico representativo da média e erro padrão da concentração plasmática de 17 β - estradiol (pg/mL) para todos os grupos experimentais [SHAM, OVX, OVX/E2] ao final do experimento, separados pelos períodos pós-reimplante dentário (15 e 60 dias). *, +, **, ++Diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$) [análise de variância one-way (ANOVA)].

Análise histomorfológica

15 dias - SHAM

Os espécimes (n=9) mostraram significantes sinais da presença de processo inflamatório agudo no periodonto, decorrente de dissipação do processo inflamatório a partir do espaço associado à face coronária do dente incisivo. Na maior parte dos casos foi possível observar uma bolsa periodontal que reduziu a área de inserção do

periodonto na raiz no segmento médio. Além desta redução de inserção do periodonto, a espessura do ligamento periodontal mostrava sinais de espessamento (Figura 4A). A superfície cementária, que se apresentou preservada, não mostrou sinais de reabsorção, com nítida inserção de fibras colágenas dentro dos padrões de normalidade (Figura 5A). Com relação à superfície do osso alveolar, relacionado com o periodonto preservado, foi verificada a presença de sinais de neoformação óssea que possivelmente tende a reduzir a espessura do ligamento periodontal (Figura 5A). O tecido pulpar mostrou sinais de degeneração por coagulação com degeneração avançada das células e da matriz extracelular em todos os animais (Figura 4A).

15 dias –OVX

Os espécimes (n=8) desse grupo apresentaram menor incidência de bolsas periodontais, portanto, a área do periodonto preservada foi significativamente maior em relação ao grupo Sham. No entanto, nas áreas preservadas do periodonto, em alguns casos persistiam alguns focos de inflamação aguda (Figura 5C). A superfície cementária mostrou áreas de reabsorção ativas e inativas e, uma adequada implantação de fibras colágenas em sua maior parte. A espessura do ligamento periodontal apresentou-se espessa (Figuras 4B e 5B). O tecido pulpar apresentou sinais de recelularização com presença de focos inflamatórios, sendo observada a presença de calcificação distrófica ou ossificação em algumas amostras (Figura 4B).

15 dias –OVX/E2

Os espécimes (n=9) indicaram menor incidência de bolsas periodontais, assim, a área do periodonto preservada foi significativamente maior em relação aos demais grupos. A superfície cementária mostrou mais frequentemente áreas de reabsorção

ativas e inativas e uma adequada implantação de fibras colágenas em sua maior parte em relação aos demais grupos experimentais neste período de tempo pós-operatório (Figura 4C). A espessura do ligamento periodontal apresentou-se menos espessa em alguns animais, com significativa neoformação organizada de trabéculas ósseas na superfície do osso alveolar, sendo mais frequentemente observada a presença de áreas de discretas de anquilose (Figura 5D). O tecido pulpar apresentou avançada recelularização com um ou outro discreto foco inflamatório, contudo não foi observado sinais de ossificação pulpar (Figura 4C).

60 dias - SHAM

Os espécimes (n=11) mostraram menor incidência de bolsas periodontais, sendo assim, a área do periodonto preservada foi significativamente maior em relação aos 15 dias. No entanto, nas áreas preservadas do periodonto dos animais sem bolsa periodontal, persistiam alguns focos de inflamação aguda. Em dois casos este segmento da raiz estava em avançado processo de degeneração em decorrência do processo ativas e inativas (Figura 5E) e uma adequada implantação de fibras colágenas em sua maior parte. A espessura do ligamento periodontal apresentou-se consideravelmente discreta em relação aos 15 dias exibindo algumas áreas de anquilose (Figura 4A'). O tecido pulpar apresentou sinais de recelularização com presença de focos inflamatórios, sendo observada a presença de calcificação distrófica ou ossificação em algumas amostras (Figura 4A' e Figura 5E).

60 dias - OVX

Os espécimes (n=5) mostraram resultados inconsistentes, sendo sem bolsa periodontal, com bolsa periodontal severa e degeneração radicular severa associada à bolsa periodontal. Portanto, a análise do periodonto restringiu-se a apenas três animais. Nestes mesmos animais, a área de periodonto com condições de normalidade, sem sinais de reabsorção externa da raiz e com adequada implantação de fibras colágenas foi observada em duas amostras (Figura 4B'). Em uma amostra, a reabsorção radicular e sua substituição por ossificação pulpar foi intensa. A superfície cementária também mostrou áreas de reabsorções ativas e inativas e, uma adequada implantação de fibras colágenas em sua maior parte em dois animais. A espessura do ligamento periodontal apresentou-se discreta, dentro dos padrões de normalidade (Figura 4B'). O tecido pulpar apresentou significativo processo de ossificação em todos os animais sem bolsa periodontal (Figura 4B').

60 dias - OVX/E2

Os espécimes (n=12) mostraram resultados mais favoráveis quanto à ausência de processos inflamatórios associados. Somente dois animais mostraram avançados estágios de degeneração radicular associado à bolsa periodontal severa, enquanto outros dois animais com bolsa periodontal ainda exibiam significativa área radicular em condições de implantação de fibras colágenas. Nos animais com ausência de processos inflamatórios, a área de periodonto com condições de normalidade, sem sinais de reabsorção externa da raiz e com adequada implantação de fibras colágenas foi observada em apenas uma amostra. Em quatro animais, o periodonto apresentou normalidade, mas exibiu algumas áreas com sinais de reabsorção ativa e inativa da raiz (Figura 5F). Por outro lado, quatro animais (n=4, 34%) exibiram também áreas de

periodonto com normalidade, intercaladas com áreas de anquiose. O tecido pulpar deste segmento dentário apresentou significativo processo de ossificação em vários animais (Figura 5C).

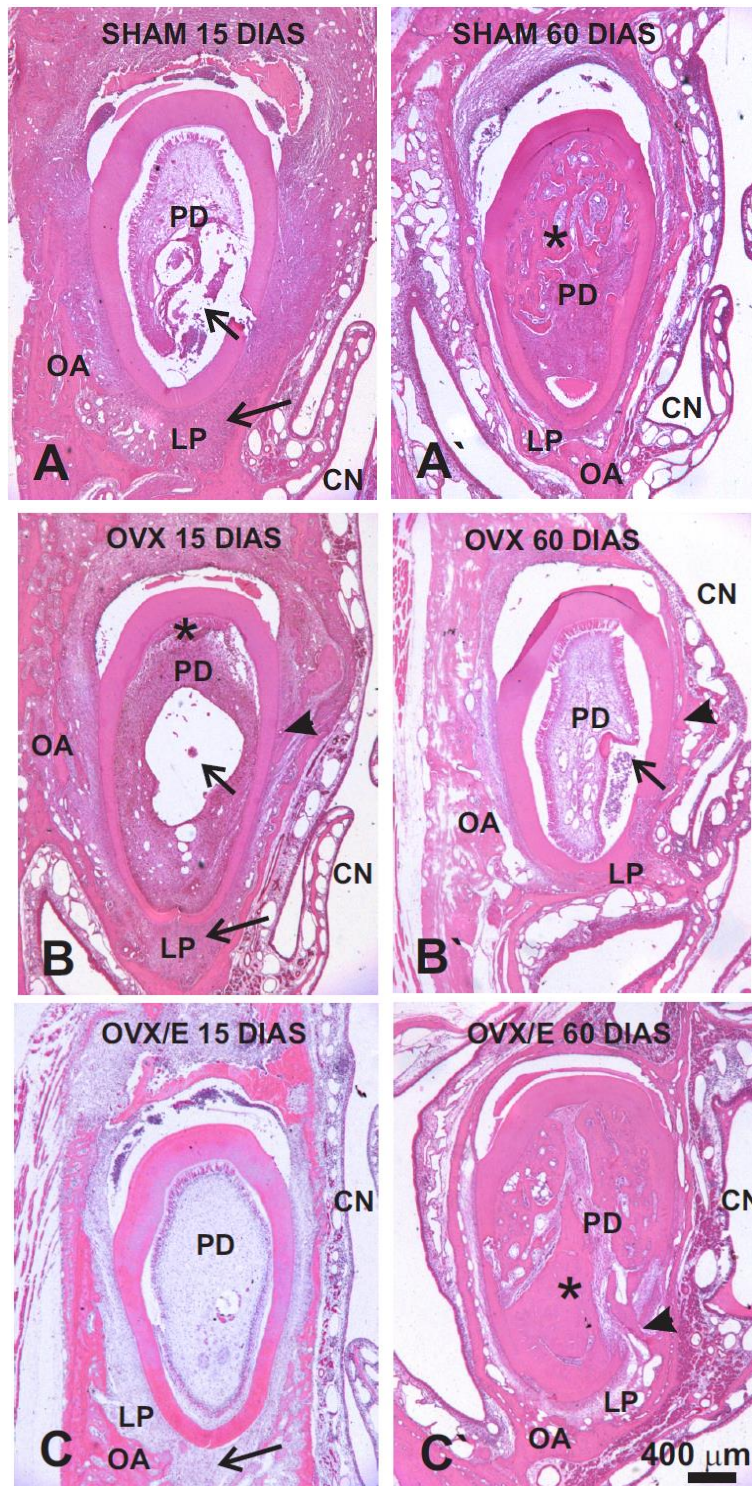


Figura 4. Fotomicrografias em campo claro de cortes histológicos transversais do incisivo superior de rato submetidos à coloração H&E, nos diferentes grupos experimentais. Observar algumas características histológicas presentes, tais como ossificação pulpar (*), inflamação pulpar (seta pequena), espessamento do ligamento periodontal (setas), anquilose (cabeça de seta). Abreviaturas: CN, cavidade nasal; D, dentina; LP, ligamento periodontal; PD, polpa dentaria; OA, osso alveolar.

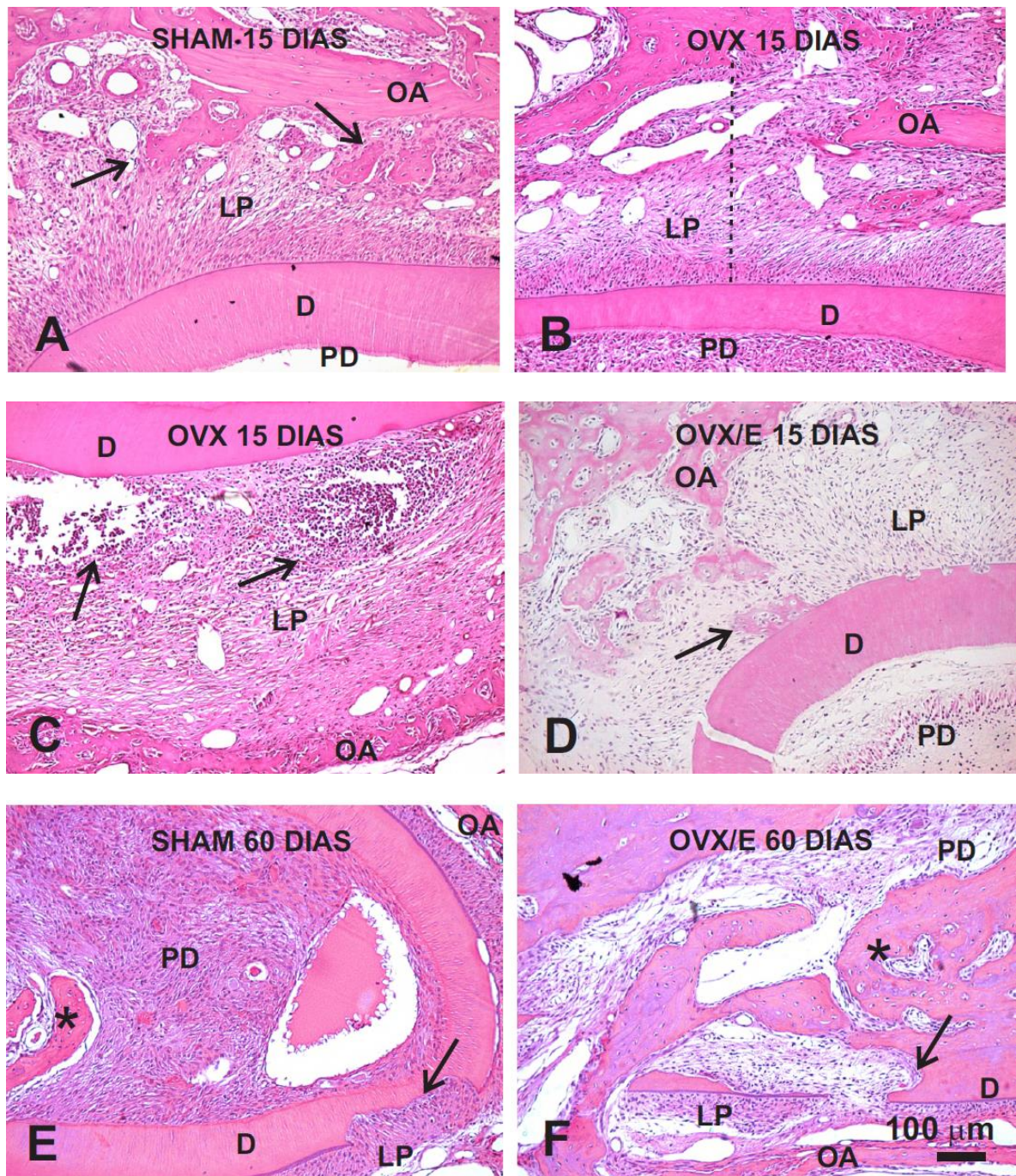


Figura 5. Fotomicrografias em campo claro de cortes histológicos transversais do incisivo superior de rato submetidos à coloração H&E, nos diferentes grupos experimentais. Observar algumas características histológicas presentes, tais como osteogênese (A), espessura aumentada do LP (B, linha tracejada), focos de inflamação (C), anquilose (D), reabsorção radicular (E), e dentes com ossificação pulpar (F, asterisco) e reabsorção radicular (F, seta). Abreviaturas: D, dentina; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar.

Os dados obtidos na análise quantitativa das ocorrências histomorfológicas foram submetidos à análise estatística e estão expressos nas tabelas 1, 2, 3, 4 e 5.

Tabela 1: Escores e análise estatística dos detalhes histomorfométricos no ligamento periodontal após o reimplante dentário imediato aos 15 e 60 dias.

<i>Ligamento Periodontal</i>						
<i>Detalhes histomorfométricos Itens avaliados/Scores</i>	<i>SHAM (15 dias)</i>	<i>OVX (15 dias)</i>	<i>OVX/E2 (15 dias)</i>	<i>SHAM (60 dias)</i>	<i>OVX (60 dias)</i>	<i>OVX/E2 (60 dias)</i>
1	1/9	2/8	4/9	1/11	3/5	8/12
2	1/9	2/8	2/9	7/11	0/5	3/12
3	2/9	2/8	2/9	3/11	2/5	1/12
4	5/9	2/8	1/9	0/11	0/5	0/12
Comparação intergrupos	a	a,b	a, b	a,b	a,b	b

Tabela 2: Escores e análise estatística dos detalhes histomorfométricos na raiz dentária após o reimplante dentário imediato aos 15 e 60 dias.

<i>Raiz Dentária</i>						
<i>Detalhes histomorfométricos Itens avaliados/Scores</i>	<i>SHAM (15 dias)</i>	<i>OVX (15 dias)</i>	<i>OVX/E2 (15 dias)</i>	<i>SHAM (60 dias)</i>	<i>OVX (60 dias)</i>	<i>OVX/E2 (60 dias)</i>
1	1/9	0/8	3/9	1/11	1/5	2/12
2	0/9	0/8	0/9	1/11	0/5	2/12
3	6/9	7/8	5/9	5/11	2/5	5/12
4	2/9	1/8	1/9	4/11	2/5	3/12
Comparação intergrupos	a	a	a	a	a	a

Tabela 3: Escores e análise estatística dos detalhes histomorfométricos no tecido ósseo após o reimplante dentário imediato aos 15 e 60 dias.

<i>Tecido Ósseo</i>						
<i>Detalhes histomorfométricos Itens avaliados/Scores</i>	<i>SHAM (15 dias)</i>	<i>OVX (15 dias)</i>	<i>OVX/E2 (15 dias)</i>	<i>SHAM (60 dias)</i>	<i>OVX (60 dias)</i>	<i>OVX/E2 (60 dias)</i>
1	0/9	0/8	0/9	0/11	0/5	5/12
2	0/9	0/8	0/9	0/11	0/5	0/12
3	9/9	8/8	8/9	11/11	5/5	7/12
4	0/9	0/8	1/9	0/11	0/5	0/12
Comparação intergrupos	a	a	a	a	a	a

Tabela 4: Escores e análise estatística dos detalhes histomorfométricos referentes à anquilose após o reimplante dentário imediato aos 15 e 60 dias.

<i>Anquilose</i>						
<i>Detalhes histomorfométricos Itens avaliados/Scores</i>	<i>SHAM (15 dias)</i>	<i>OVX (15 dias)</i>	<i>OVX/E2 (15 dias)</i>	<i>SHAM (60 dias)</i>	<i>OVX (60 dias)</i>	<i>OVX/E2 (60 dias)</i>
1	9/9	7/8	8/9	6/11	3/5	7/12
2	0/9	1/8	1/9	5/11	1/5	4/12
3	0/9	0/8	0/9	0/11	1/5	1/12
4	0/9	0/8	0/9	0/11	0/5	0/12
Comparação intergrupos	a	a	a	a	a	a

Tabela 5: Escores e análise estatística dos detalhes histomorfométricos referentes à polpa após o reimplante dentário imediato aos 15 e 60 dias.

<i>Polpa</i>						
<i>Detalhes histomorfométricos Itens avaliados/Scores</i>	<i>SHAM (15 dias)</i>	<i>OVX (15 dias)</i>	<i>OVX/E2 (15 dias)</i>	<i>SHAM (60 dias)</i>	<i>OVX (60 dias)</i>	<i>OVX/E2 (60 dias)</i>
1	2/9	4/8	3/9	0/11	0/5	0/12
2	0/9	1/8	0/9	8/11	2/5	9/12
3	1/9	1/8	4/9	0/11	1/5	0/12
4	6/9	2/8	2/9	3/11	2/5	3/12
Comparação intergrupos	a	a	a	a	a	a

Análise Imunoistoquímica

PCNA

As imunomarcações para a PCNA foram limitadas ao núcleo celular, exibindo intensidade variável, desde marcações intensas, assim como marcações discretas, que são dependentes do plano de secção do núcleo celular (Figura 6). As células imunorreativas exibiram núcleos com formato oval, próximos ao cemento e ao osso alveolar, aparentemente relacionados à diferenciação de cementoblastos e osteoblastos, respectivamente (Figura 6). Além disso, uma densa população de células imunorreativas exibiram núcleos elípticos dispersa no ligamento periodontal (parte média), supostamente relacionada a diferenciação de fibroblastos (Figura 6).

As células imunorreativas a PCNA estavam principalmente distribuídas próximo do cemento ou do osso alveolar, naqueles casos experimentais em que o ligamento periodontal apresentou tendência em se manter com espessura próxima ao normal (Figura 7D-E). Por outro lado, nos casos experimentais em que o ligamento periodontal apresentou tendência em se tornar mais espesso, as células imunorreativas estavam distribuídas em toda a extensão do ligamento periodontal (Figura 7A-C, Figura 9).

TRAP

As imunomarcações para a TRAP foram restritas a parte citosólica de células gigantes nucleadas (osteoclastos) e de células clásticas mononucleadas (Figura 6B-C). As imunomarcações para a TRAP foram frequentemente intensas, facilitando a análise qualitativa e quantitativa (Figura 6B-C e Figura 8). As células clásticas imunorreativas a TRAP estavam presentes, principalmente, na superfície do osso alveolar e em menor quantidade na superfície dentária ou cementária (Figura 6B-C e

Figura 8). Uma parcela considerável de células clásticas monucleadas imunorreativas a TRAP também estavam dispersas no ligamento periodontal, não associadas ao osso alveolar ou a superfície dentária (Figura 6C e Figura 8). Aparentemente, estas células clásticas monucleadas representam uma fração desta população celular que estavam migrando a partir dos vasos sanguíneos ou, que finalizaram o processo de reabsorção do osso alveolar ou da superfície dentária (Figura 6B-C, Figura 8, Figura 10).

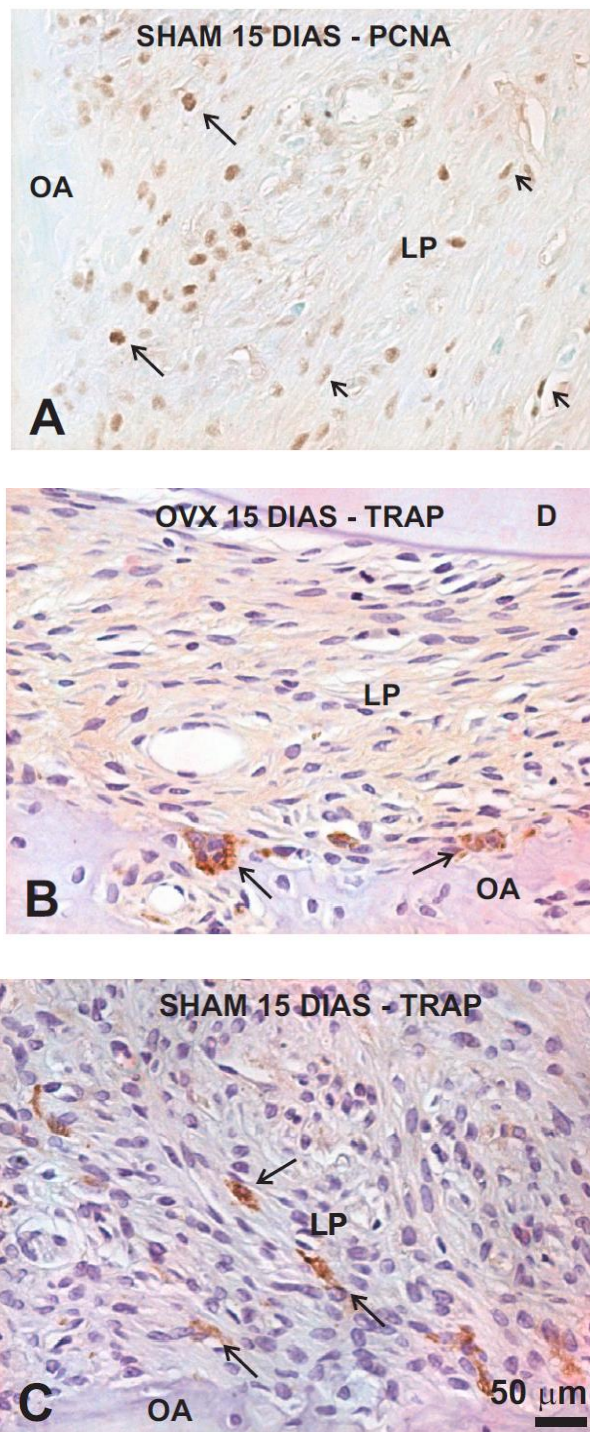


Figura 6. Fotomicrografias em campo claro de cortes histológicos transversais do incisivo superior de rato submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de PCNA (A) TRAP (B-C) nos diferentes grupos experimentais. Notar a presença de células com núcleos imunorreativos à PCNA e osteoclastos com imunorreatividade citosólica à TRAP, próximos a superfícies do osso alveolar ou da dentina (setas). Abreviaturas: D, dentina; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar.

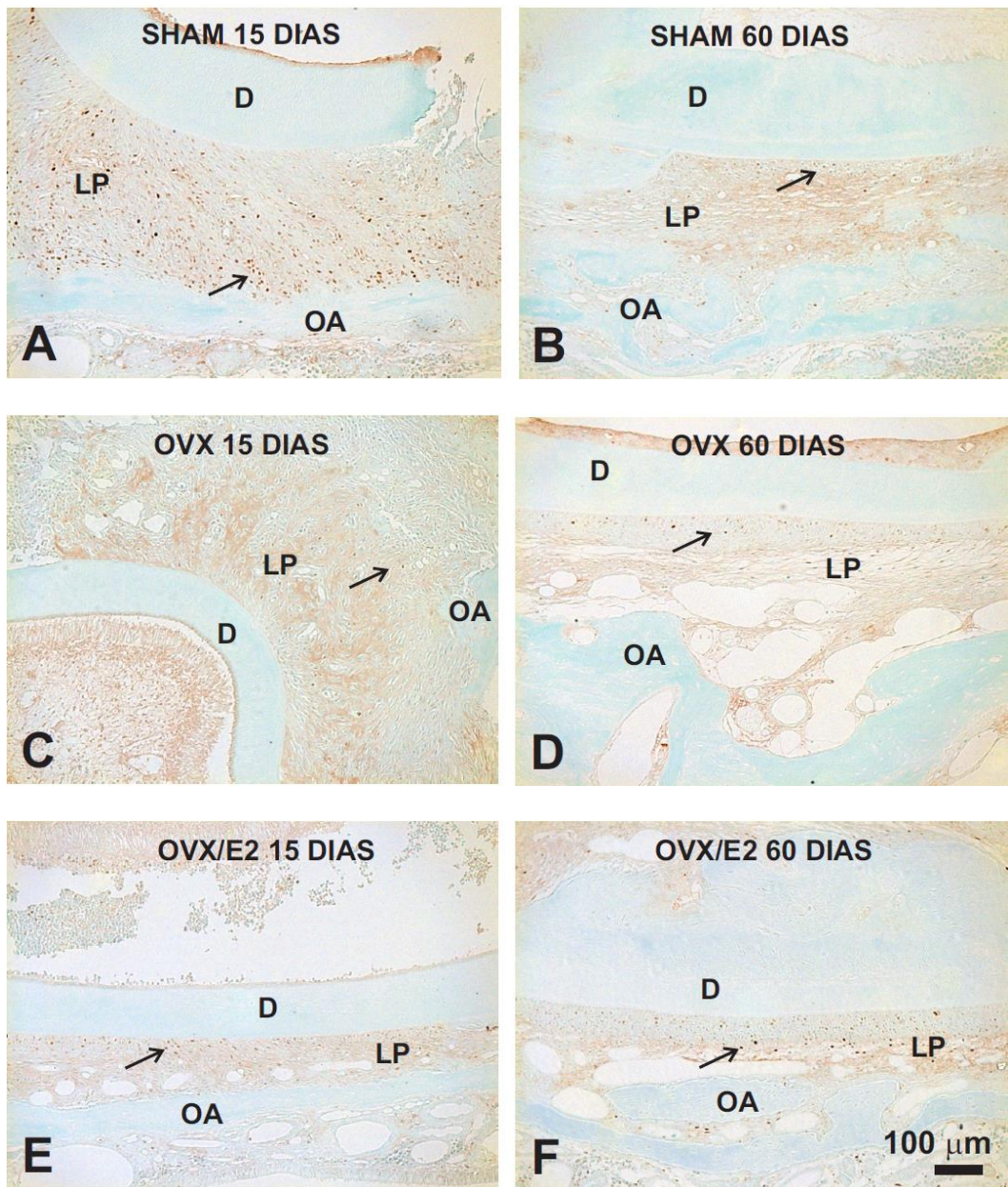


Foto 7. Fotomicrografias em campo claro de cortes histológicos transversais do incisivo superior de rato submetido à imuno peroxidase indireta para detecção de PCNA nos diferentes grupos experimentais. Notar presença de células com núcleos imunorreativos a PCNA, próximos do osso alveolar ou dentina (setas). Abreviaturas: D, dentina; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar.

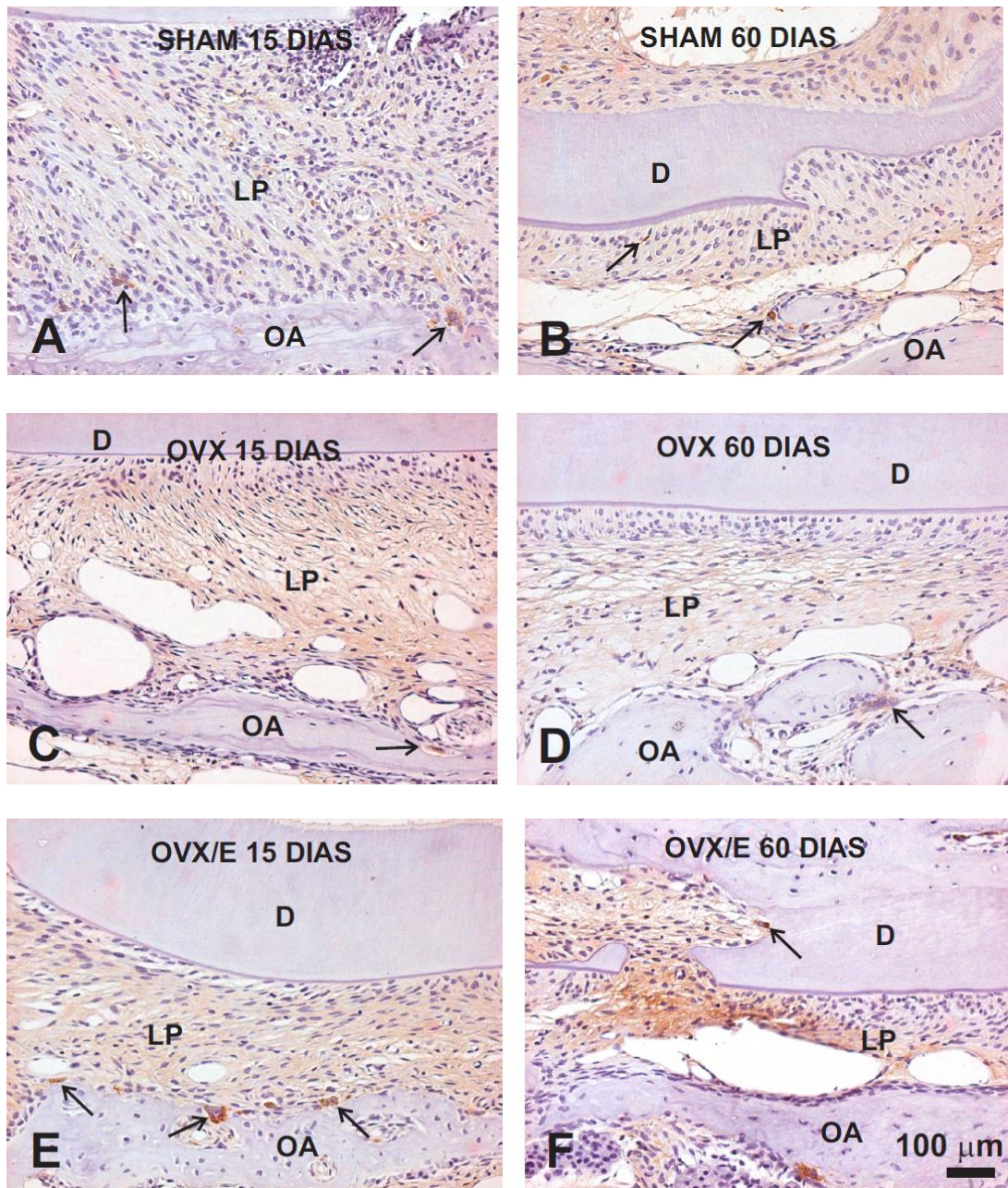


Foto 8. Fotomicrografias em campo claro de cortes histológicos transversais do incisivo superior de rato submetido à imunoperoxidase indireta para detecção de TRAP nos diferentes grupos experimentais. Notar a presença de osteoclastos imunorreativo à TRAP, próximos às superfícies do osso alveolar ou dentina (setas). Abreviaturas: D, dentina; LP, ligamento periodontal; OA, osso alveolar.

Os dados obtidos na análise quantitativa das células imunorreativas as proteínas PCNA e TRAP foram submetidos à análise estatística e estão expressos nas figuras 9 e 10 respectivamente.

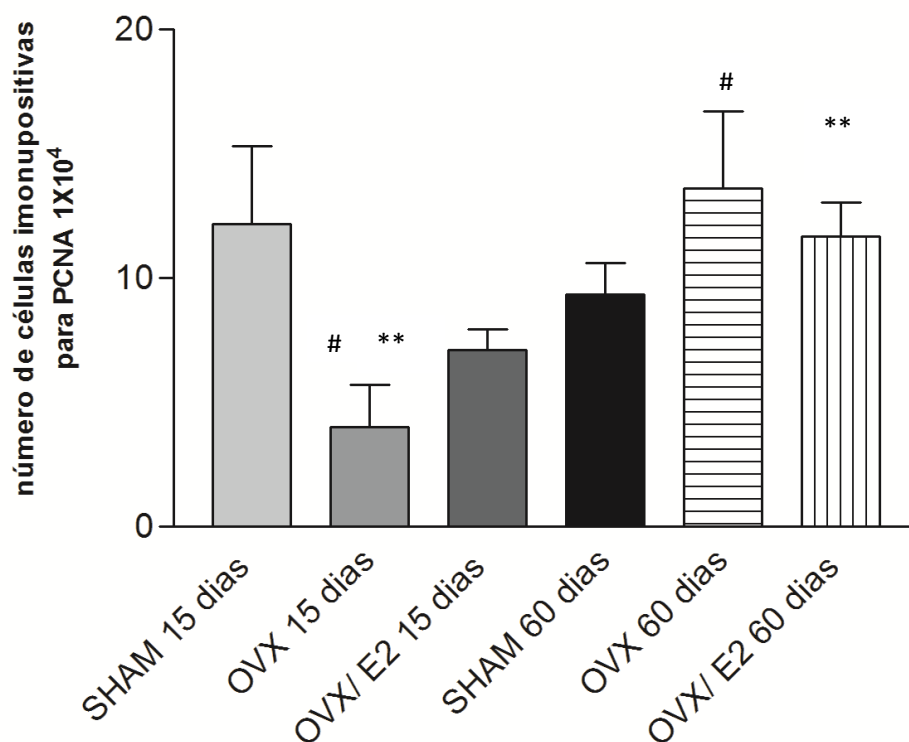


Fig. 9. Gráfico representativo dos valores da média e erro padrão do número de células imunorreativas a PCNA após o reimplante dentário imediato para os grupos Sham, OVX e OVX/E2, nos tempos pós-operatórios de 15 e 60 dias. Houve diferença estatística entre os grupos OVX 15 dias e OVX 60 dias e entre OVX 15 dias e OVX/E2 60 dias ($p < 0,01$).

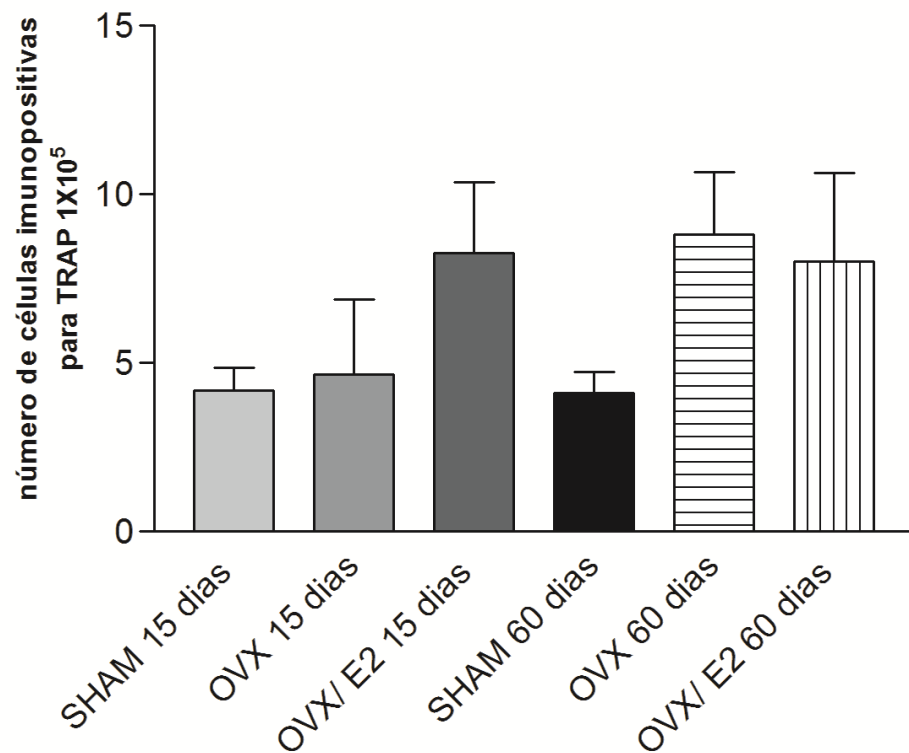
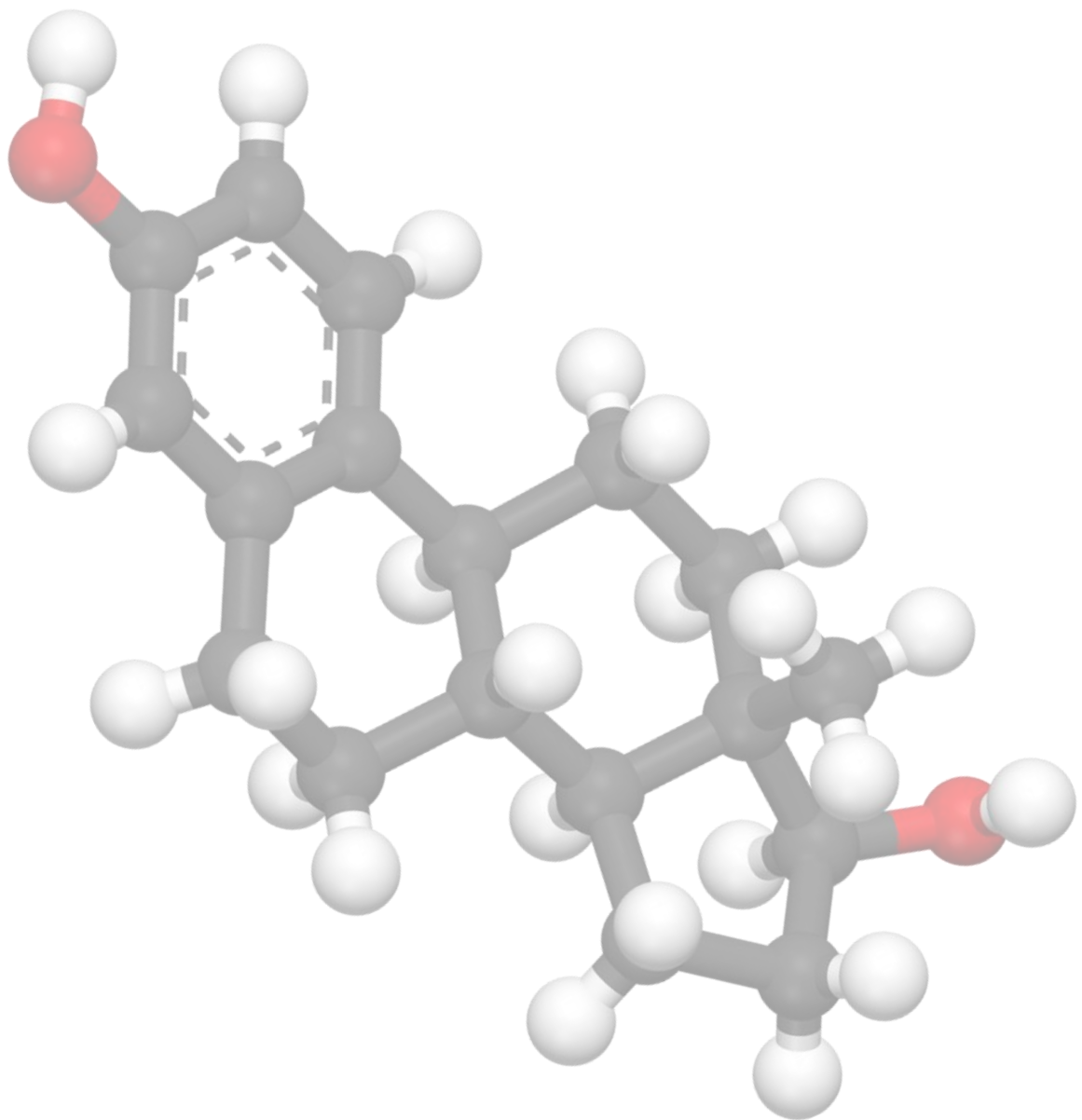


Fig. 10. Gráfico representativo dos valores da média e erro padrão do número de células imunorreativas a TRAP após o reimplante dentário imediato para os grupos Sham, OVX e OVX/E2, nos tempos pós-operatórios de 15 e 60 dias. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p < 0,3$).



Discussão

DISCUSSÃO

O estrógeno pode atuar por diversas vias e em muitos tecidos e estudos têm sido realizados com o intuito de entender esses mecanismos de ação (16,38-40).

As mudanças desencadeadas pela falta do estrógeno podem ter um impacto significativo sobre a função de muitos tecidos interferindo inclusive na atividade de citocinas pró-inflamatórias (16). A deficiência de estrógeno na pós-menopausa pode ser devido à baixa função folicular ovariana ou pela remoção cirúrgica dos ovários (2).

De acordo com o censo demográfico brasileiro de 2010 a população de mulheres no Brasil é de 97 milhões e dessas 9,4% estão na faixa etária de 50 a 74 anos (41). Considerando que a menopausa ocorre por volta dos 50 anos e que a expectativa de vida para elas é estimada em 68 anos, milhões de mulheres brasileiras viverão mais de um quarto de suas vidas nessa condição. E essa população não só viverá mais como também é mais ativa, estando, portanto sujeita a sofrer traumatismo dentário.

Uma das ações fisiológicas dos hormônios sexuais é a manutenção da massa óssea, arquitetura, e homeostase mineral em adultos. O importante papel dos hormônios gonodais no metabolismo ósseo é bem estabelecido. Apesar do reconhecimento de que a insuficiência gonodal é o fator de risco mais importante para a osteoporose, os mecanismos de ação dos esteróides sexuais no osso *in vivo* são mal compreendidos e têm recebido a atenção dos pesquisadores (42).

Os estudos em humanos têm proporcionado uma compreensão muito limitada sobre os mecanismos celulares e moleculares subjacentes que interferem na ação hormonal. Por outro lado, os estudos em animais de laboratório têm demonstrado ser extremamente útil na identificação de uma gama de ações fisiológicas dos hormônios gonodais sobre a homeostase do tecido ósseo (42).

Com base no efeito protetor do estrógeno no tecido ósseo, a terapia de reposição hormonal permanece atualmente entre os tratamentos mais utilizados (22,21). A literatura afirma que a administração de estradiol imediatamente após a OVX, é capaz de evitar a influência da deficiência de estrógeno sobre o osso alveolar (16).

Estudos *in vivo* da influência do estrógeno sobre o osso alveolar, relataram perda de massa óssea no septo alveolar inter-radicular de molares de ratas ovariectomizadas (43, 44, 45). Entretanto, as perdas do osso alveolar propriamente dito bem como do processo alveolar foram prevenidas com reposição hormonal com estradiol (16).

O mecanismo pelo qual o estrógeno exógeno inibe a reabsorção óssea deve ser similar aquele do estrógeno endógeno, isto é, mediante o controle da produção e estimulação de citocinas como a IL-1 e IL-6 (46) e moléculas como a RANKL e OPG (47) que promovem a diferenciação de osteoclastos. Assim, a administração do estradiol inibe a formação e a atividade dos osteoclastos e, possivelmente, estimula a sua desintegração, ocasionando a redução do número dessas células (48,49).

Em osso alveolar de ratas tratadas com estrógeno, observa-se diminuição do número de osteoclastos, além dos osteoclastos exibirem características típicas de apoptose (50). Portanto, em ratas tratadas com estrógeno, a apoptose deve ser responsável, pelo menos em parte, pela redução do número de osteoclastos e consequentemente pela diminuição da reabsorção óssea (51).

E sabido que algumas mulheres entram na menopausa e/ou sofrem os efeitos da deficiência de estrógeno quando ainda jovens; principalmente causada por necessidade de histerectomia, falência ovariana, hiperprolactinemia, hipotireoidismo, tumores hipotalâmicos e doenças autoimunes (3,4). Disto posto, torna-se interessante avaliar a avulsão e o reimplante dentário associado a uma condição sistêmica de deficiência de estrógeno em ratas adultas, que supostamente ainda deveriam apresentar ciclos estrais.

Neste estudo, a análise imunoistoquímica demonstrou que os animais tratados com Terapia de Reposição Hormonal (TRH) não apresentaram diferença estatisticamente significativa com relação ao número de células clásticas evidenciadas pelo marcador de TRAP, em relação ao grupo de animais ovariectomizados e Sham nos dois períodos estudados.

Estudos desenvolvidos em animais de laboratório e em humanos mostraram resultados contraditórios sobre a influência da deficiência do estrogênio na perda óssea alveolar (52,53). Um dos motivos pode ser devido ao fato de que o efeito da ovariectomia sobre o tecido ósseo é perceptível a longo prazo, geralmente levando mais de três meses para ser significativo (54, 55); embora existam relatos de aumento do “turnover” ósseo e significativa perda óssea trabecular na região da coluna vértebra em ratas ovariectomizadas, após 8 semanas (56).

Luvizuto et al., (2010) (17) também relatam que a ovariectomia reduz o processo de mineralização óssea alveolar e que a deficiência de estrogênio contribui para o atraso do processo de cicatrização alveolar.

Os resultados deste estudo mostraram que as deficiências de estrogênio causadas pela ovariectomia e a TRH não interferiram significativamente no processo de reparo do implante dentário imediato. Deste modo, não sendo possível observar diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros analisados no osso alveolar, reabsorção radicular externa, anquilose e nas características da polpa dentária.

Uma das hipóteses para explicar esses resultados pode estar relacionada à idade dos animais utilizados, que eram adultos jovens e recebiam uma dieta balanceada. Isto deve ser destacado, pois existem estudos que utilizaram animais com idade mais avançada e consideraram a possibilidade da diminuição da absorção intestinal e

reabsorção pelos túbulos renais de cálcio provavelmente devido ao declínio da função renal e/ou declínio da resposta gastrointestinal ao calcitrol (57).

Outro fator que deve-se considerar é que as forças oclusais decorrentes do comportamento roedor também podem ter uma influência atenuada no efeito esperado da ovariectomia sobre os ossos da mandíbula (58,59). A carga mecânica no processo alveolar durante a mastigação pode proteger o osso alveolar dos efeitos prejudiciais observados em outros locais do esqueleto, tais como a tíbia (55, 58) e coluna vertebral (56,60).

O peridonto de inserção composto pelo ligamento periodontal, cemento e osso alveolar desempenha um papel importante na manutenção da estabilidade mecânica dos dentes. Forças mastigatórias aplicadas aos dentes são transferidas diretamente ao osso alveolar através do ligamento periodontal estimulando a remodelação óssea. Essa remodelação óssea altera as propriedades desse tecido quando comparado a outras áreas da mandíbula que não recebem essa força (61).

HO SP et al., (2007) (62) estudaram o ligamento periodontal com relação a composição química, propriedades mecânicas das fibras colágenas na interface osso alveolar – ligamento periodontal – cemento e cemento-dentina e, concluíram que as propriedades mecânicas destas diferentes regiões são semelhantes. Os mesmos autores mencionaram em outro estudo que o alto módulo de elasticidade do cemento ligado ao osso alveolar pelo ligamento periodontal é maior quando comparado à junção cemento-dentina o que explicaria a absorção das forças mastigatórias pelo ligamento periodontal (63).

Diferenças morfológicas e embriológicas entre os locais do esqueleto também podem ter uma influência, e Mavropoulos et al. (58) relataram maior perda óssea na

tíbia quando comparada ao osso alveolar em ratas ovariectomizadas. Também foi observado que os ossos longos são mais afetados pela deficiência de estrógeno do que os ossos da cavidade oral, sendo que apenas a ovariectomia não é suficiente para causar alterações significativas no tecido ósseo dos maxilares (55, 58).

Com relação ao processo de reparo do reimplante, nos três grupos experimentais houve reinserção do ligamento periodontal no osso e no cimento e áreas de reabsorção radicular foram observadas com maior frequência no período de 60 dias de pós-operatório.

Processos inflamatórios locais podem interferir na reinserção do ligamento periodontal como a presença de bolsa periodontal. Os roedores apresentam crescimento contínuo dos incisivos e quando o dente é submetido ao trauma de avulsão e reimplante esse crescimento cessa, porém os antagonistas continuam com esse processo podendo traumatizar na região lingual levando ao aparecimento da bolsa periodontal (64). Outra possibilidade é em decorrência do trauma sofrido na região cervical durante a exodontia e o reimplante, que também poderia favorecer o aparecimento de bolsa periodontal.

Isso explicaria a diferença estatística encontrada entre o grupo Sham 15dias e o grupo OVX/E2 60 dias, com relação à organização do ligamento periodontal porque o grupo OVX/E2 foi o que apresentou menor número de espécimes com bolsa periodontal.

A reinserção do ligamento periodontal é devido à viabilidade das suas células no momento do reimplante o que possibilitou a sua regeneração em boa parte da raiz (28-31), fato evidenciado pela imunorreatividade à PCNA que indica proliferação celular, mais evidente aos 60 dias independente do grupo experimental avaliado.

A imunomarcação para a TRAP foi mais evidente no tempo de 60 dias no ligamento periodontal em células mais próximas ao tecido ósseo e com poucas marcações próximas ao cimento mostrando que houve a preservação dos cementoblastos, os quais não possuem receptores para as células clásticas e são fundamentais para a preservação radicular (28-31,65).

Quando os dentes são completamente deslocados de seus alvéolos como no caso das avulsões, o feixe vasculo-nervoso responsável pela nutrição e inervação pulpar é rompido e a reação da polpa dependerá da duração dos distúrbios circulatórios, estágio de desenvolvimento radicular e eventual contaminação bacteriana dos tecidos (28,66). A isquemia pulpar leva a uma necrose por coagulação e o tecido infartado pode ser revascularizado ou substituído por tecido mesenquimal se o processo de reparo avançar favoravelmente (67,68).

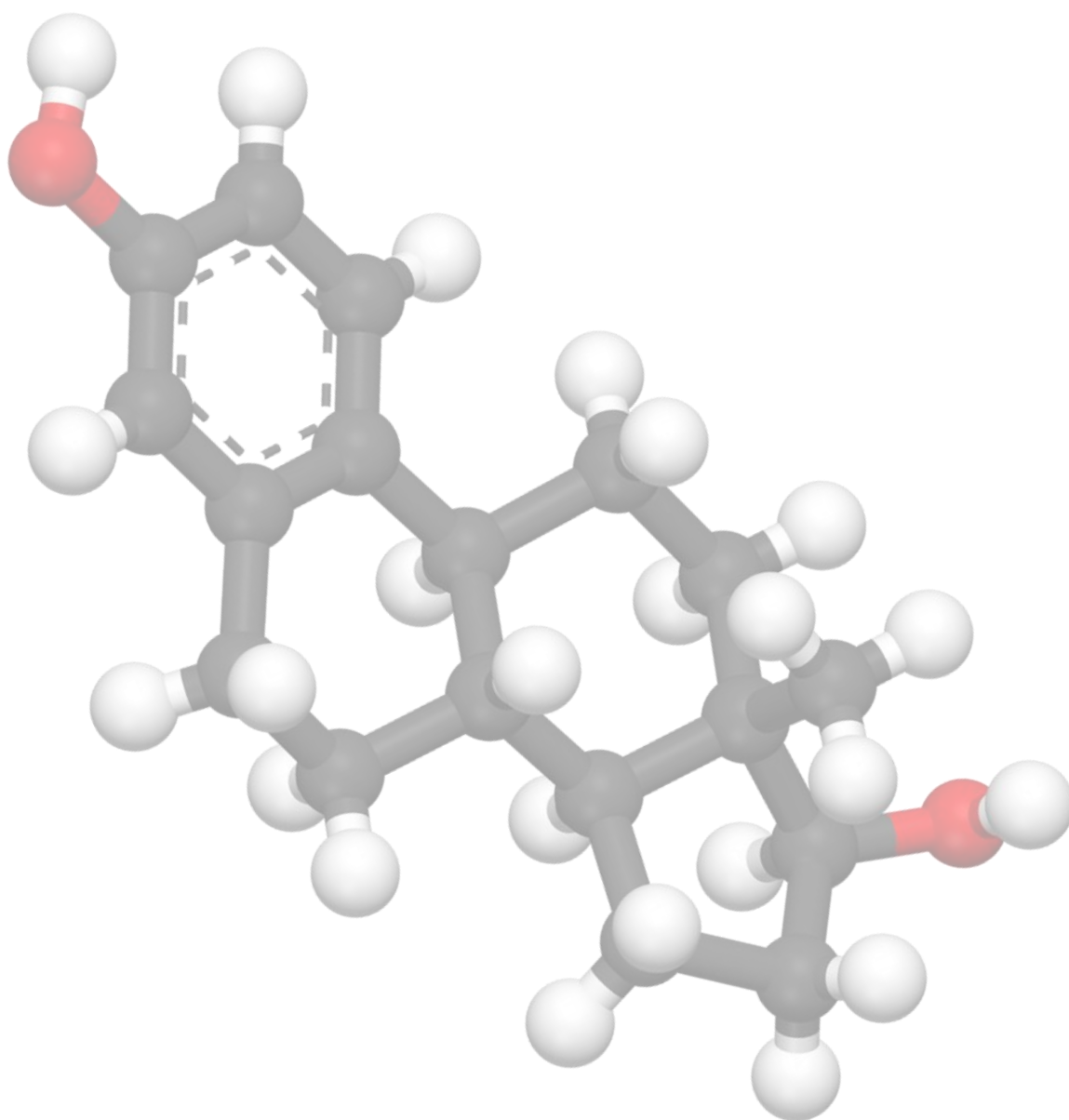
A característica geral da resposta de cicatrização da lesão pulpar é a substituição do tecido danificado por um tecido pulpar recém-formado, e varia de acordo com as células progenitoras envolvidas. Na maioria dos casos, forma-se um tecido semelhante à cimento, osso ou osteodentina (68).

Nesse estudo observou-se, em alguns espécimes dos três grupos estudados nos dois períodos de análise, que o estroma pulpar começou a ser substituído por um tecido conjuntivo bem vascularizado, a partir do fundo do alvéolo com presença de trabéculas ósseas, calcificações distróficas e camada de dentina neoformada junto à parede dentinária.

Mesmo com grande parte do ligamento periodontal viável algumas áreas podem sofrer necrose levando à perda de importantes estruturas como os cementoblastos e o pré-cimento. A substituição de cementoblastos por osteoblastos, durante o processo de

reparo, permitirá que na presença de uma concentração mais elevada de mediadores local ou sistêmico da inflamação essas células gerenciem unidades osteorremodeladoras sobre a superfície radicular fazendo com que o dente participe do processo de remodelação óssea iniciando gradualmente sua substituição por osso (65,69). O que explica o aparecimento das reabsorções radiculares externas principalmente aos 60 dias pós-operatório.

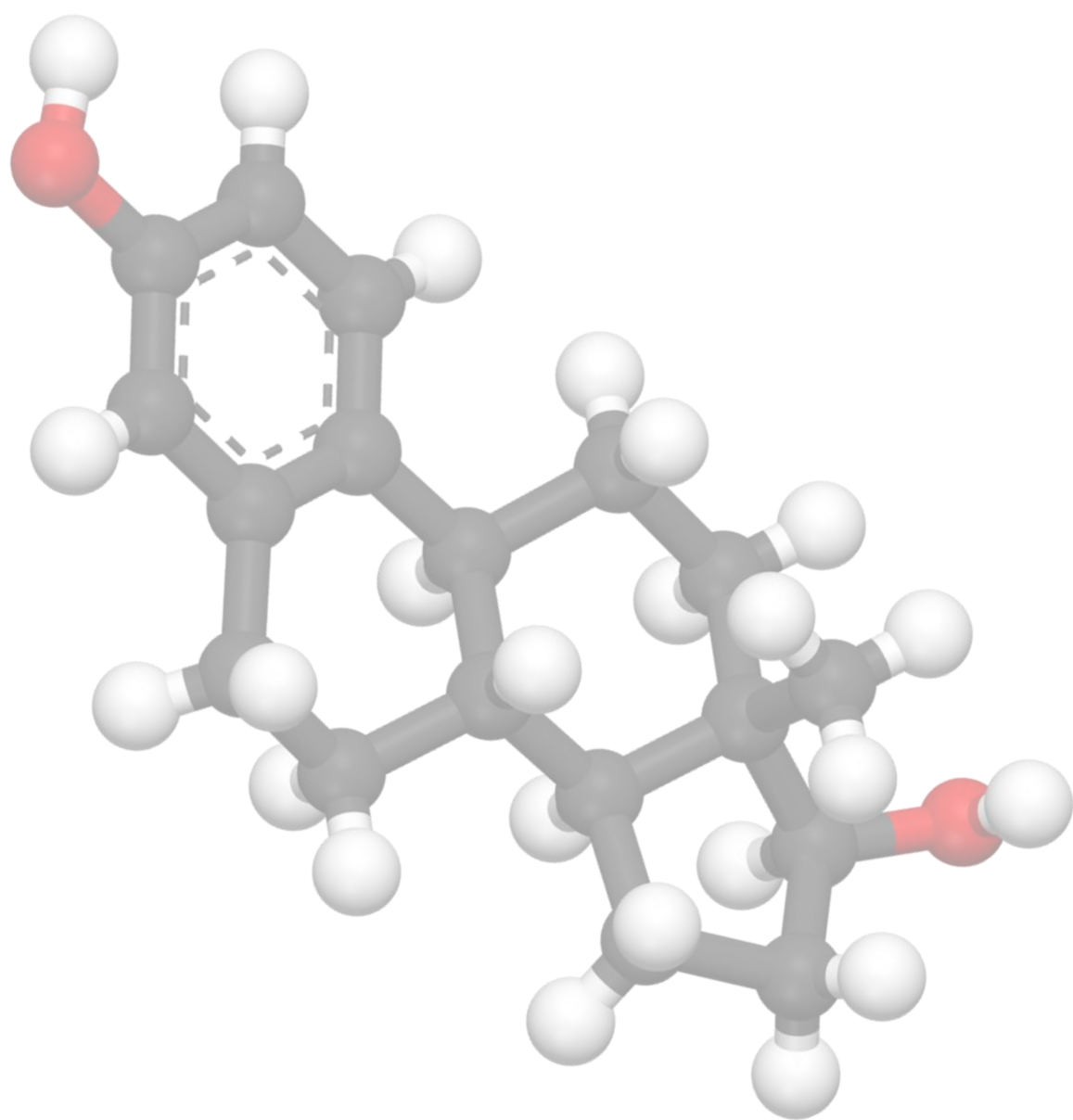
Diante do exposto observou-se neste estudo que a ovariectomia e a TRH não produziram alterações significativas nos tecidos periodontais que pudessem interferir negativamente no processo de reparo do reimplante imediato.



Conclusão

CONCLUSÃO

Após análise histomorfométrica e imunohistoquímica foi possível concluir que tanto a ovariectomia quanto a terapia de reposição hormonal não influenciaram de forma significativa no processo de reparo do reimplante dentário imediato.



Referências

REFERÊNCIAS

1. Guyton AC; Hall JE. Guyton e Hall. Tratado de Fisiologia Médica. In: Endocrinologia e Reprodução. p.1041-56 12ª Edição. Editora Elsevier.
2. Teixeira KS. Efeitos da ooforectomia e do Deidroepiandrosterona (DHEA) sobre a massa cardíaca de ratas. 2011. 18 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2011.
3. Aldrighi, J. M.; Alecrin, I. N.; Oliveira P. R.; Shinomata, H.O. Tabagismo e antecipação da idade da menopausa. Rev. Assoc. Méd. Bras.2005; 1: 51-53.
4. Giacomini, D. R. e Mella, E. A. C. Reposição Hormonal: vantagens e desvantagens. Semina: Ciências Biológicas e Saúde, Londrina. 2006; 27: 71- 92.
5. Aldrighi JM, Wolff LP, Oliveira ASVM, Aoki T. Ooforectomia profilática na histerectomia por agravo uterino benigno: evidências atuais Rev Assoc Med Bras. 2009; 55: 229-50.
6. Shoupe D, Parker WH, Broder MS, Liu Z, Farquar C, Berek JS. Elective oophorectomy for benign gynecological disorders. Menopause. 2007; 14:580-5.
7. <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/ovario>
8. Szejnfeld VL. Alterações ósseas: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento. In: Fernandes CE, editor. Menopausa: diagnóstico e tratamento. 1a ed. São Paulo: Serguimento; 2003; 49-9.
9. Albright F, Smith PH, Richardson AM. Postmenopause osteoporosis. It's clinical features. JAMA 1941; 116: 2465-2474.
10. Harrison JE. Osteoporosis. In: Tam CS, Heersche JNM, Murray TM, eds. Metabolic Bone Diseases: Cellular and Tissue Mechanisms. Boca Raton: CRC Press, 1989: 240-267.

11. Heaney RP, Recker RR, Saville PD. Menopausal changes in bone remodeling. *J Lab Clin Med* 1978; 92:964–970.
12. Vico L, Prallet B, Chappard D, Pallot-Prades B, Pupier R, Alexandre C. Contributions of chronological age, age at menarche and menopause and of anthropometric parameters to axial and peripheral bone densities. *Osteoporos Int* 1992; 2:153-158.
13. Budden FH, Bayley TA, Harrison JE, Josse RG, Murray TM, Sturtridge WC, et al. The effect of fluoride on bone histology in postmenopausal osteoporosis depends on adequate fluoride absorption and retention. *J Bone Miner Res* 1988; 3(2):127-32.
14. Jeffcoat MK and Chesnut CH 3rd. Systemic osteoporosis and oral bone loss: evidence shows increased risk factors. *J Am Dent Assoc.* 1993; 124:49-56.
15. Pai LC, Horovitz AP, Santos AO, Fonsechi- Carvasan GA, Pinto-Neto AM. Prevalência de Osteoporose em Mulheres na Pós-menopausa e Associação com Fatores Clínicos e Reprodutivos. *RBGO.* 2003; 25: 7.
16. Duarte PM, Gonçalves PF, Casati MZ, de Toledo S, Sallum EA, Nociti Jr FH. Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodont Res* 2006; 41:541–546.
17. Luvizuto ER, Dias SMD, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia Jr IR, Okamoto R, Dornelles RCM. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone* 46 (2010) 1021–1029.

18. Payne JB, Reinhardt RA, Nummikoski PV, Patil KD. Longitudinal alveolar bone loss in post menopausal osteoporotic/osteopenic women. *Osteoporosis Int* 1999; 10:34–40.
19. Grodstein F, Colditz GA, Stampfer MJ. Post-menopausal hormone use and tooth loss: a prospective study. *J Am Dent Assoc* 1996;127: 370–7.
20. Ito M, Yamada M, Hayashi K, Ohki M, Uetani M, Nakamura T. Relation of early menarche to high bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 1995;57: 11-4.
21. Burg MA, Fraser K, Gui S, Grant K, Kosch SG, Nierenberg B, et al. Treatment of menopausal symptoms in family medicine settings following the Women's Health Initiative Findings. *J Am Board Fam Med* 2006; 19:122–31
22. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000; 289: 1508–14.
23. Wang YL, Fei LS, Jin CX, Liu SY. Effect of estrogen-deficiency on expression of osteoprotegerin in alveolar bone: experiment with rats with periodontitis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2008; 88:1715-8.
24. Jabbar S, Drury J, Fordham J, Datta H, Francis R, Tuck S. Osteoprotegerin, RANKL and bone turnover in postmenopausal. *Osteoporos Int* 2009; 20:S271.
25. Shu L, Guan SM, Fu SM, Guo T, Cao M, and Ding Y. Estrogen Modulates Cytokin Expression in Human Periodontal Ligament Cells. *J Dent Res* 2008; 87:142-147.
26. Zhou Y, Fu Y, Li JP, Qi LY. The role of estrogen in osteogenetic cytokine expression in human periodontal ligament cells. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2009; 29:507-513.

27. Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med.* 1997;186: 489-95.
28. Andreasen JO. A time-related study of periodontal healing and root resorption activity after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Swed Dent J* 1980;4:101-10.
29. Pohl Y, Filippi A, Kirschner H. Results after replantation of avulsed permanent teeth. II. Periodontal healing and the role of physiologic storage and antiresorptive-regenerative therapy. *Dent Traumatol* 2005; 21:93-101.
30. Hammarström L, Blomlöf L, Lindskog S. Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:163-75.
31. Andreasen JO. Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Int J Oral Surg* 1981;10:43 -53.
32. Panzarini SR, Perri de Carvalho AC, Poi WR, Sonoda CK. Use of vitamin C in delayed tooth replantation. *Braz Dent J* 2005; 16:17-22.
33. Saad-Neto M, Carvalho ACP, Okamoto T, Callestini EA. Immediate dental replantation with root surface treatment with phosphoric acid and calcium hydroxide: histological study in rats. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 1986; 40: 314-20.
34. Sonoda CK, Poi WR, Okamoto T, Toyota E, Takeda RH. Mediate teeth reimplantation after root treatment with 1%, 2,5%, 5% and 10% sodium hypochlorite solution. *Rev Bras Odontol* 2000;57:293-6.
35. Lustosa-Pereira A, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N, Bramante CM, Bortoluzzi EA. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface

- of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rats' teeth. *Dent Traumatol* 2006;22:30-5.
36. Long JA, Evans HM. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem Univ Calif* 1922; 6:1-148.
37. Panzarini S.R, Holland R, de Souza V, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D. Mineral trioxide aggregate as a root canal filling material in reimplanted teeth. Microscopic analysis in monkeys. *Dental Traumatol* 2007;23: 265-72.
38. Cooper C. The crippling consequences of fractures and their impact on quality of life. *Am J Med* 1997; 103:12S–19S.
39. Pfeilschifter J, Kü Ditz R, Pfohl, Schatz H. Changes in Proinflammatory Cytokine Activity after Menopause. *Endocrine Reviews* 2002;23:90–119.
40. Cardoso CC., Pereira, RT, Koyama, CA, Port CS, Abdalla FMF. Effects of estrogen on muscarinic acetylcholine receptors in the rat hippocampus. *Neuroendocrinology* 2004;80: 379–386.
41. www.censo20120.ibge.gov.br
42. Rickard D. Estrogens and Progestins. In: John Bilezikian. *Principles of Bone Biology*. Elsevier, 2002. 655-676.
43. Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Periodontal Res.* 2002;37:161-5.
44. Duarte PM, Gonçalves PF, Sallum AW, Sallum EA, Casati MZ, Nociti Jr. FH. Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2004;39:107-10
45. Binte Anwar R, Tanaka M, Kohno S, Ikegame M, Watanabe N, Nowazesh Ali M, et al. Relationship between porotic changes in alveolar bone and spinal osteoporosis. *J Dent Res.* 2007;86:52-7.

46. Pacifici R. Is there a causal role for IL-1 in postmenopausal bone loss? *Calcif Tissue Int* 1992;50:295–299.
47. Girasole G, Passeri G, Pedrazzoni M, Giuliani N, Passeri M. Interleukin-6: a pathogenetic role in the postmenopausal osteoporosis? *Acta Biomed Ateneo Parmense* 1995;66:125–138.
48. Liu CC, Howard GA. Bone-cell changes in estrogen-induced bone-mass, increase in mice: dissociation of osteoclasts from bone surfaces. *Anat Rec.* 1991;229:240-50.
49. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . *Nat Med.* 1996;2:1132-6.
50. Faloni APS, Sasso-Cerri E, Katchburian E, Cerri PS. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclasts in estrogen-treated rats. *J Periodontal Res.* 2007;42:193-201.
51. Faloni A PS, Cerri PS. Mecanismos celulares e moleculares do estrógeno na reabsorção óssea. *Revista de Odontologia da UNESP.* 2007; 36(2): 181-88.
52. Dervis E (2005). Oral implications of osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100:349-56.
53. Aydim A, Kenar H, Atmaca H, Alıcı T, Gacar G, Müezzinoğlu US, et al. (2013). The Short- and Long- term Effects of Estrogen Deficiency on Apoptosis in Musculoskeletal Tissues: An Experimental Animal Model Study. *Arch Iran Med* 16:271-6.
54. Kuroda S, Mukohyama H, Hondo H, Aoki K, Ohyama T, Kasugai S. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual x-

- ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral Dis* 2003;9:24-28.
55. Teófilo JM, Azevedo ACB, Petenusci SO, Mazaro R, Lamano-Carvalho TL. Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxilla and proximal tibia of female rats. *Pesqui Odontol Bras* 2003; 17: 302-6.
56. Yoon KH, Cho DC, Yu SH, Kim KT, Sung JY. The Change of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats: Analyses of MicroCT Scan and Biochemical Markers of Bone Turnover. *J Korean Neurosurg Soc* 2012; 51:323-327.
57. Horst RL, Deluca HF, Jorgensen NA, *Metab Bone Dis Rel Res* 1:29-33, 1978.
58. Mavropoulos A, Rizzoli R, Ammann P. Different responsiveness of alveolar and tibial bone to bone loss stimuli. *J Bone Miner Res.* 2007; 22:403–410.
59. Ejiri S, Toyooka E, Tanaka M, Anwar RB, Kohno S (2006). Histological and histomorphometrical changes in rat alveolar bone following antagonistic tooth extraction and/or ovariectomy. *Arch Oral Biol* 51: 941-950.
60. Kim DG, Navalgund AR, Tee BC, Noble GJ, Hart RT, Lee HR. Increased variability of bone tissue mineral density resulting from estrogen deficiency influences creep behavior in a rat vertebral body. *Bone.* 2012 Nov;51:868-75. doi: 10.1016/j.bone.2012.08.124. Epub 2012 Aug 27.
61. Ames MS, Hong S, Lee HR, Fields HW, Johnston WM, Kim DG Estrogen deficiency increases variability of tissue mineral density of alveolar bone surrounding teeth. *Archives of Oral Biology* 2010;55:599–605.
62. Ho SP, Yu B, Yun W, Marshall GW, Ryder MI, Marshall SJ (2009). Structure, chemical composition and mechanical properties of human and rat cementum and its interface with root dentin. *Acta Biomater* 5:707-18.

63. Ho SP, Yu B, Yun W, Marshall GW, Ryder MI, Marshall SJ (2009). Structure, chemical composition and mechanical properties of human and rat cementum and its interface with root dentin. *Acta Biomater* 5:707-18.
64. Saad-Neto M, Carvalho ACP, Okamoto T, Callestini EA. Reimplante mediato de dentes com tratamento endodôntico e superfície radicular tratada com hidróxido de cálcio. Estudo histológico em ratos. *Ver. Fac. Odont. Unesp*, v.13, 1984.
65. Consolaro A. Reabsorções dentárias nas especialidades. São Paulo Dental Press, 2005. p. 123-152.
66. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM .Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 2. Factors related to pulpal healing. *Endod Dent Traumatol*. 1995;11:59-68.
67. Nishioka M, Shiiya T, Ueno K, Suda H. Tooth replantation in germ-free and conventional rats. *Endod Dent Traumatol*. 1998;14:163-73.
68. Andreasen JO. Guidelines for the evaluation and management of traumatic dental injuries. *Int Dent Traumatol*. 2001;17:193-8.
69. Consolaro A. The four mechanisms of dental resorption initiation *Dental Press J Orthod*. 2013 May-Jun;18:7-9.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba



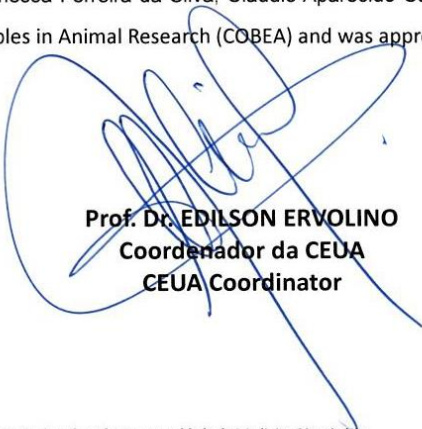
**Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)**

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Efeito da ovariectomia e da reposição hormonal em reimplante imediato: análise histomorfométrica e imunoistoquímica em ratos" sob responsabilidade da Pesquisadora **SÔNIA REGINA PANZARINI BARIONI** e colaboração de Vanessa Ferreira da Silva, Cláudio Aparecido Casatti e Celso Koogi Sonoda está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo FOA-00583-2013.

CERTIFICATE

We certify that the research "Effect of ovariectomy and hormone replacement in immediate tooth replantation: histomorphometric and immunohistochemistry analysis in rat", process number FOA-00583-2013, under responsibility of **SÔNIA REGINA PANZARINI BARIONI** and with collaboration of Vanessa Ferreira da Silva, Cláudio Aparecido Casatti and Celso Koogi Sonoda agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. EDILSON ERVOLINO
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 – Vila Mendonça
Tel (18) 3636-3234 Fax (18) 3636-3333 E-mail: eervolino@foa.unesp.br

ANEXO B- Ilustração material e método

Ciclo Estral

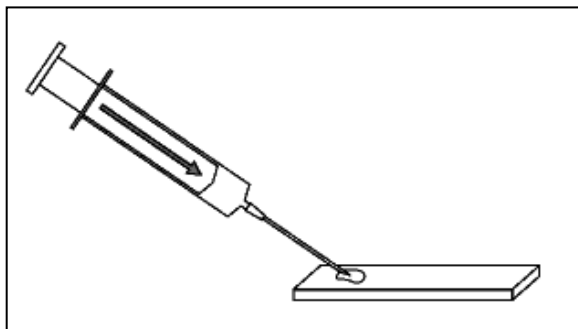
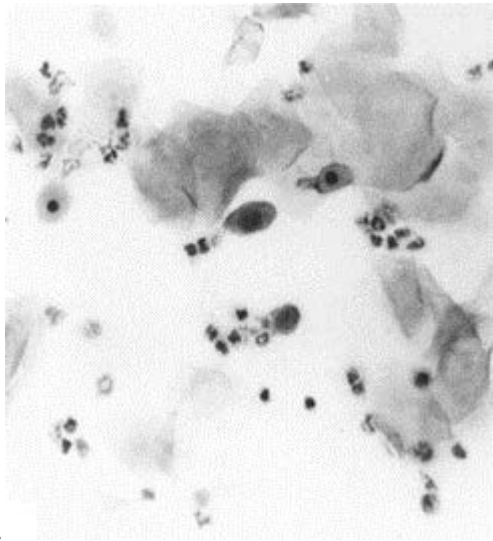


Fig. 01 – Colocação na lâmina do aspirado vaginal.



Fig.02 – Análise do estágio do ciclo estral no microscópio.

Estágios do ciclo estral



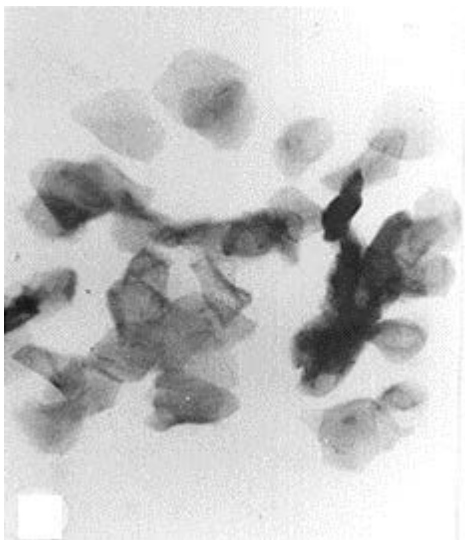
A

Fig.03 A – Presença de leucócitos e algumas células epiteliais - *Metaestro*.



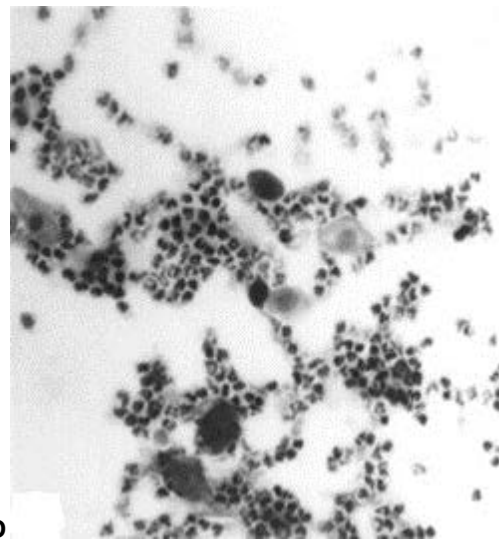
B

Fig.03 B – Células epiteliais aumentam e os leucócitos desaparecem – *Proestro*.



C

Fig.03 C – Células epiteliais queratinizadas da camada córnea – *Estro*.



D

Fig.03 D - Presença predominante de leucócitos e algumas células epiteliais nucleadas - *Diestro*

Ovariectomia



Fig.04 – Tricotomia.



Fig. 05 – Exposição do ovário.



Fig. 06 – Sutura.

Confeção dos Pellets de Estradiol



Fig. 07 17 β -Estradiol.

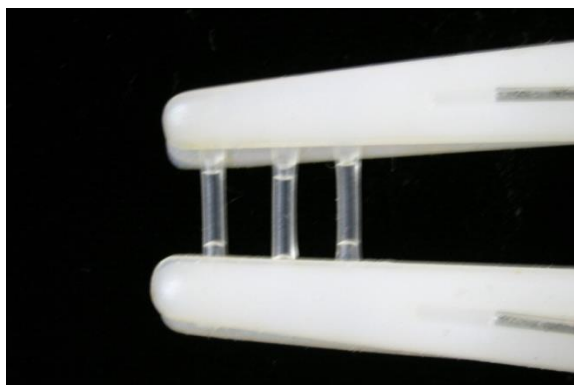


Fig. 08 – Confeção dos Pellets.

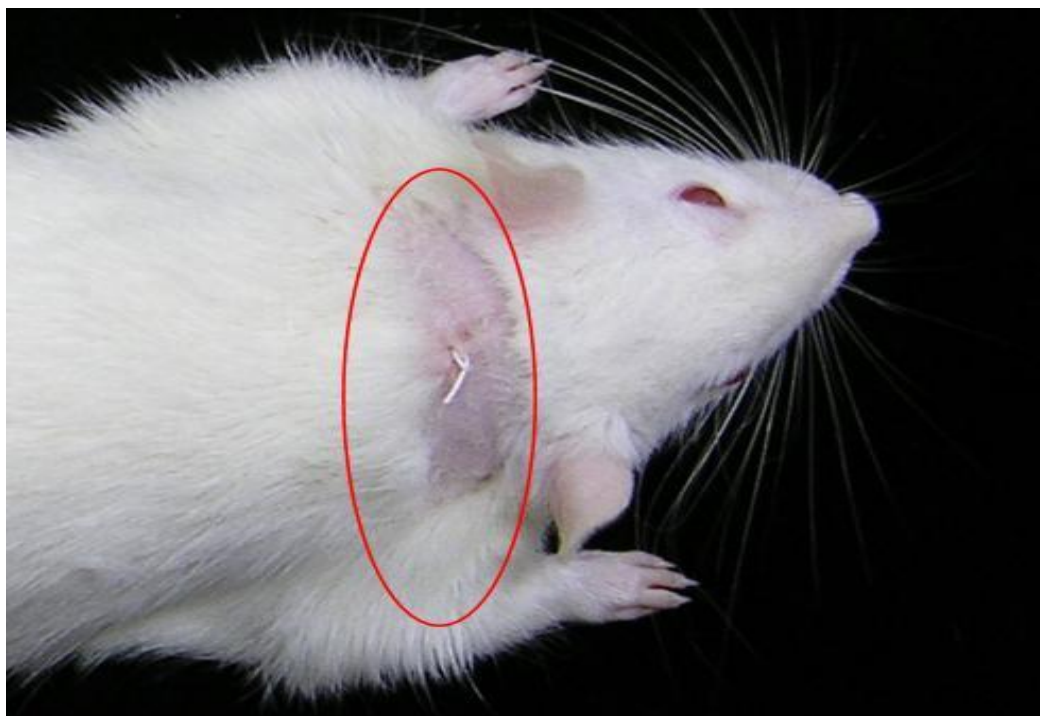


Fig.09 – Implantação do pellet no dorso do animal.

Exodontia e reimplante

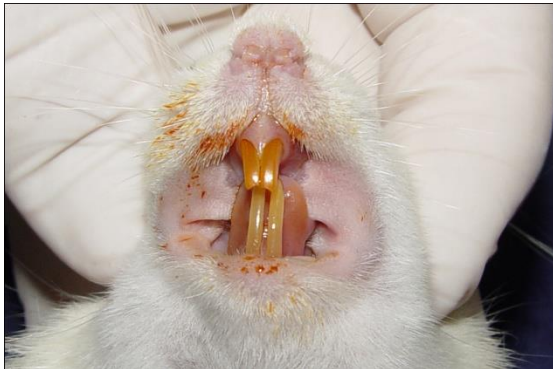


Fig. 10 – Antissepsia com povidine.

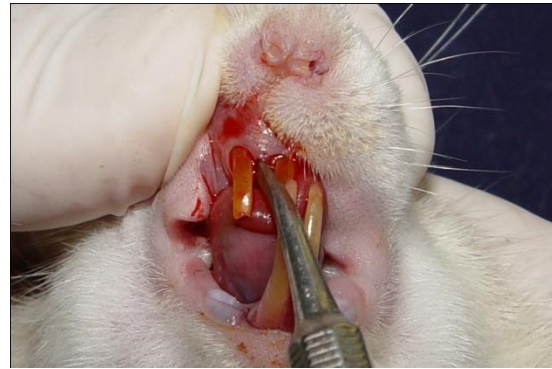


Fig. 11 – Luxação do incisivo superior direito.

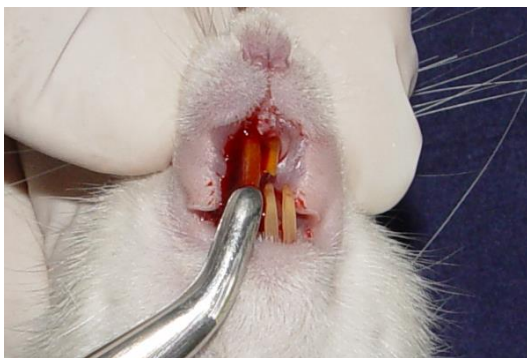


Fig. 12 – Exodontia do incisivo superior direito.



Fig. 13 – Incisivo extraído.



Fig.14 – Reimplante do incisivo superior direito.



Fig. 15 – Incisivo reimplantado.



Fig.16 – Procedimento de perfusão.



Fig. 17 – Coleta do sangue.



Fig.18 – Centrifugação do sangue coletado

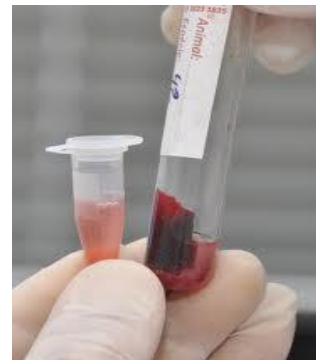


Fig. 19 – Coleta do plasma no eppendorf

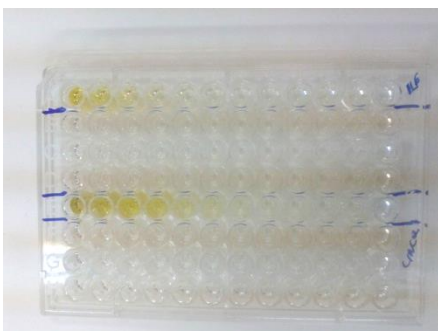


Fig. 20 – Placa de Elisa com as amostras



Fig. 21 – Leitora por espectrofotômetro.

ANEXO C - Normas do periódico “Dental Traumatology”

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Submission of Manuscripts, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance

Useful Websites: Submission Site, Articles published in Dental Traumatology, Author Services, Wiley-Blackwell’s Ethical Guidelines, Guidelines for Figures

1. GENERAL

Dental Traumatology is an international journal which aims to convey scientific and clinical progress in all areas related to adult and pediatric dental traumatology. It aims to promote communication among clinicians, educators, researchers, administrators and others interested in dental traumatology. The journal publishes original scientific articles, review articles in the form of comprehensive reviews or mini reviews of a smaller area, short communication about clinical methods and techniques and case reports. The journal focuses on the following areas related to dental trauma:

Epidemiology and Social Aspects
Tissue, Periodontal, and Endodontic Considerations
Pediatrics and Orthodontics
Oral and Maxillofacial Surgery / Transplants/ Implants
Esthetics / Restorations / Prosthetics
Prevention and Sports Dentistry

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Dental Traumatology*. Authors are encouraged to visit Wiley-Blackwell Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Dental Traumatology adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal. ALL named authors must have made an active contribution to the conception and design and/or analysis and interpretation of the data and/or the drafting of the paper and ALL must have critically reviewed its content and have

approved the final version submitted for publication. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship.

Dental Traumatology adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration (version, 2008 <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. In the online submission process we also require that all authors submitting manuscripts to *Dental Traumatology* online must answer in the affirmative to a statement 'confirming that all research has been carried out in accordance with legal requirements of the study country such as approval of ethical committees for human and/or animal research or other legislation where applicable.' Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

All manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website, e.g., www.clinicaltrials.gov.

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure

determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

2.5 Conflict of Interest

Dental Traumatology requires that sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Acknowledgements should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. The Conflict of Interest Statement should be included as a separate document uploaded under the file designation 'Title Page' to allow blinded review.

2.6 Appeal of Decision

The decision on a paper is final and cannot be appealed.

2.7 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.8 Copyright Transfer Agreement

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the [Copyright FAQs](#).

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on [Wiley Author Services](#) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this

policy and the Journal's compliant self-archiving policy please

visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Wiley-Blackwell if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.

Upon acceptance of a paper, authors are required to assign the copyright to publish their paper to Wiley-Blackwell. Assignment of the copyright is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form still has to be signed. A completed Copyright Transfer Agreement must be completed online before any manuscript can be published upon receiving notice of manuscript acceptance.

Kuthsiyya Peer Mohamed
Production Editor
John Wiley & Sons Singapore Pte Ltd
1 Fusionopolis Walk,
#07-01 Solaris South Tower,
Singapore 138628
Email: edt@wiley.com
Fax: +65 6643 8599

2.9 Online Open

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

For the full list of terms and conditions,

see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website

at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/dt>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from Editorial Assistant Karin Andersson at dtooffice@qualitynet.net.

3.1. Getting Started

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/dt>
- Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user.
- If you are creating a new account.
 - After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.
- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/dt> and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Author Centre.'

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your 'Author Centre', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- To allow double blinded review, please submit (upload) your main manuscript and title page as separate files. Please upload:
 - Your manuscript without title page under the file designation 'main document'

- Figure files under the file designation 'figures'.
- The title page, Acknowledgements and Conflict of Interest Statement where applicable, should be uploaded under the file designation 'title page'
- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing. All documents uploaded under the file designation 'title page' will not be viewable in the html and pdf format you are asked to review in the end of the submission process. The files viewable in the html and pdf format are the files available to the reviewer in the review process.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files uploaded as main manuscript documents will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The files uploaded as title page will be blinded from review and not converted into HTML and PDF. The main manuscript document file must contain the entire manuscript including abstract, text, references, tables, and figure legends, but *no* embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to *Dental Traumatology* will be reviewed by two experts in the field. *Dental Traumatology* uses double blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper and the name(s) of the author(s) will not be disclosed to the reviewers.

To allow double blinded review, please submit (upload) your main manuscript and title page as separate files.

Please upload:

- Your manuscript without title page under the file designation 'main document'
- Figure files under the file designation 'figures'
- The title page, Acknowledgements and Conflict of Interest Statement where applicable, should be uploaded under the file designation 'title page'

All documents uploaded under the file designation 'title page' will not be viewable in the html and pdf format you are asked to review in the end of the submission process. The files viewable in the html and pdf format are the files available to the reviewer in the review process.

3.5. Suggest a Reviewer

Dental Traumatology attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of a potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the journal

editor will choose one or two reviewers as well. When the review is done you will be notified under 'Manuscripts with decision' and through e-mail.

3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.7. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Center' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.9. Submission of Revised Manuscripts

To submit a revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript. Please also remember to upload your manuscript document separate from your title page.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Research Articles in all areas related to adult and pediatric dental traumatology are of interest to *Dental Traumatology*. Examples of such areas are Epidemiology and Social Aspects, Tissue, Periodontal, and Endodontic Considerations, Pediatrics and Orthodontics, Oral and Maxillofacial Surgery/ Transplants / Implants, Esthetics / Restorations / Prosthetics and Prevention and Sports Dentistry.

Review Papers: *Dental Traumatology* commissions review papers of comprehensive areas and mini reviews of small areas. The journal also welcomes uninvited reviews. Reviews should be submitted via the online submission site and are subject to peer-review.

Comprehensive Reviews should be a complete coverage of a subject discussed with the Editor in Chief prior to preparation and submission. Comprehensive review articles should include a description of search strategy of relevant literature, inclusion criteria, evaluation of papers and level of evidence.

Mini Reviews are covering a smaller area and may be written in a more free format.

Case Reports: *Dental Traumatology* accepts Case Reports but these will only be published online and will not be included in the printed version unless specifically requested by the Editor-in-Chief.

Case Reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable, but their merit needs to provide high priority for publication in the journal. They should be kept within 3-4 printed pages and need not follow the usual division into material and methods etc, but should have an abstract. The introduction should be kept short. Thereafter the case is described followed by a discussion.

Short Communications of 1-2 pages are accepted for quick publication. These papers need not follow the usual division into Material and Methods, etc., but should have an abstract. They should contain important new information to warrant publication and may reflect improvements in clinical practice such as introduction of new technology or practical approaches. They should conform to a high scientific and a high clinical practice standard.

Letters to the Editor, if of broad interest, are encouraged. They may deal with material in papers published in *Dental Traumatology* or they may raise new issues, but should have important implications.

Meetings: advance information about and reports from international meetings are welcome, but should not be submitted via the online submission site, but send directly to the journal administrator Karin Andersson at dtooffice@qualitynet.net

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: Abbreviations should be kept to a minimum, particularly those that are not standard. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used. Consult the following sources for additional abbreviations: 1) CBE Style Manual Committee.

Scientific style and format: the CBE manual for authors, editors, and publishers. 6th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1994; and 2) O'Connor M, Woodford FP. Writing scientific papers in English: an ELSE-Ciba Foundation guide for authors. Amsterdam: Elsevier-Excerpta Medica; 1975.

Font: When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation. Use double spacing when writing.

5.2. Structure

All papers submitted to *Dental Traumatology* should include: Title Page, Abstract, Main text, References and Tables, Figures, Figure Legends, Conflict of Interest Statement and Acknowledgements where appropriate. Title page, Conflict of Interest Statement and any Acknowledgements must be submitted as separate files and uploaded under the file designation Title Page to allow blinded review. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal style will be returned to the author(s).

Title Page: should be uploaded as a separate document in the submission process under the file designation 'Title Page' to allow blinded review. It should include: Full title of the manuscript, author(s) full names (Family names should be underlined) and institutional affiliations including city, country, and the name and address of the corresponding author. If the author does not want the e-mail address to be published this must be clearly indicated. The title page should also include a running title of no more than 60 characters and 3-6 keywords.

Abstract is limited to 250 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as inserted separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For original articles the abstract should be structured with the following headings: Background/Aim, Material and Methods, Results and Conclusions. For other article types, please choose headings appropriate for the article.

Main Text of Original Articles should be divided into Introduction, Material and Methods, Results and Discussion. During the editorial process reviewers and editors frequently need to refer to specific portions of the manuscript, which is difficult unless the pages are numbered. Authors should number all of the pages consecutively.

Introduction should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are inappropriate. Give only strict and pertinent references and do not include data or conclusions from the work being reported. The introduction should close with the explicit statement of the

specific aims of the investigation or hypothesis tested.

Materials and Methods must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. Describe your selection of observational or experimental participants clearly. Identify the method, apparatus and procedures in sufficient detail. Give references to established methods, including statistical methods, describe new or modify methods. Identify precisely all drugs used including generic names and route of administration.

(i) *Clinical trials* should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material. All manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website, e.g., www.clinicaltrials.gov.

(ii) *Experimental subjects*: experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration (version, 2008 <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

(iii) *Suppliers of materials* should be named and their location (town, state/county, country) included.

Results should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations. Present your results in logical sequence in the text, tables and illustrations giving the main or most important findings first. Do not duplicate data in graphs and tables.

Discussion may usually start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the Introduction or of the Results sections should be avoided. The section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Link the conclusions to the aim of the study. Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

Main Text of Review Articles comprises an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may

be added.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledgements should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors.

Conflict of Interest Statement: All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. The Conflict of Interest Statement should be included as a separate document uploaded under the file designation 'Title Page' to allow blinded review.

5.3. References

As the Journal follows the Vancouver system for biomedical manuscripts, the author is referred to the publication of the International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Int Med* 1997;126:36-47.

Number references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in texts, tables, and legends by Arabic numerals (in parentheses). Use the style of the examples below, which are based on the format used by the US National Library of Medicine in Index Medicus. For abbreviations of journals, consult the 'List of the Journals Indexed' printed annually in the January issue of Index Medicus.

We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: www.endnote.com/support/enstyles.asp. Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp