

Thais Mara Manfrin

IMUNOMARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS
OPG, RANK E RANKL EM DENTES
REIMPLANTADOS DE RATO.

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia do Câmpus de Araçatuba –
Unesp, para a obtenção do Grau de “Doutor
em Odontologia” – Área de Clínica Integrada

Orientador: Prof. Adj. Wilson Roberto Poi
Co-orientadora: Prof. Voluntária Dra. Roberta Okamoto

ARAÇATUBA – SP

- 2007 -

Dados Curriculares

- NASCIMENTO** : 06.06.1977 – São Caetano do Sul/SP
- FILIAÇÃO.....** : Antonio José Manfrin
Cléria Aparecida Lourenço Manfrin
- 1997/2000.....** : Curso de Graduação na Faculdade de Odontologia de Araçatuba -UNESP
- 2002.....** : Estagiária do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
- 2003/2004.....** : Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
- 2005.....** : Professora da Disciplina de Cirurgia da Fundação Municipal de Educação e Cultura de Santa Fé do Sul (FUNEC)
- 2005/2007.....** : Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Clínica Integrada, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

Dedicatória

"É, só eu sei quanto amor eu guardei
Sem saber
Que era só pra você

É, só tinha de ser com você
Havia de ser pra você
Se não era mais uma dor
Se não não seria o amor
Aquele que a gente não vê
Amor que chegou para dar
O que ninguém deu pra você

É, você que é feito de azul
Me deixa morar nesse azul
Me deixa encontrar minha paz
Você que é bonito demais
Se ao menos pudesse saber
Que eu sempre fui só de você
Você sempre foi só de mim..."

Ao meu marido Kiko, com todo meu amor.

Agradecimentos Especiais

À Deus - pela oportunidade da vida e do aprendizado diário. Agradeço pelas pessoas especiais que coloca em meu caminho.

À minha família: meus pais Cléria e Antonio, e irmãos Marcos e Márcio. Simplesmente essenciais na minha vida.

Ao Meu Orientador Wilson Roberto Poi

Obrigada pela paciência, compreensão e apoio em todas as etapas. Obrigada pela confiança e liberdade. Nossa parceria começou muito cedo, desde 1999. Desde então, só posso agradecer todas as oportunidades que me foram proporcionadas, crescimento pessoal e profissional, além de contribuição decisiva na minha formação. Não posso deixar de dizer que trabalhar com você é muito prazeroso, bem como compartilhar sua amizade.

Todo o meu carinho e admiração.

À Minha Co-orientadora Roberta Okamoto

Alguém muito jovem que é apaixonada pelo que faz.

Sempre disponível e prestativa, paciente e minuciosa.

Acima de tudo, muito humana.

Tenho plena certeza que você colherá ainda muitos frutos na sua vida profissional.

Aos professores da Disciplina de Clínica Integrada:

Sônia Regina Panzarini, Celso Koozi Sonoda, Denise Pedrini,

José Carlos Monteiro de Castro, Daniela Atili Brandini.

Obrigada pela acolhida carinhosa, sabedoria e disposição para o ensino. Sempre me senti orientada de cada um de vocês.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, na pessoa de seu diretor, Prof Tit Pedro Felício Estrada Barnebé pelas condições oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho.

Às amigas Carolina Chiantelli Cláudio Coutinho, Eloá Luvizuto e Thalysa Ribeiro Neves da Cruz. Meus agradecimentos pela colaboração durante a realização da parte experimental e laboratorial deste trabalho.

Às minhas companheiras de república e de curso: Livia Guimarães Zina, Melaine de Almeida Lawall, Márcia Regina Negri, Cláudia Letícia Vendrami, Thaís da Silveira Rodrigues. Partilhamos muitos bons momentos juntas!!!! Obrigada por toda ajuda e apoio, sempre!

À Isabel Cristina Lui Poi, por toda ajuda e pela sua amizade.

À Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) e funcionários do Biotério da FOA – UNESP.

À disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial, professores: Tetuo Okamoto, Michel Saad Neto, Idelmo Rangel Garcia Júnior, Oswaldo Magro Filho, Alessandra Araneza, Cristiane Mara Ruiz de Sousa Fattah.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP: Cleide Lemos Caldaszilla, Glaucio José de Carvalho, Maria Dirce C. Boatto, Gilmar Martins de Oliveira, Bernadete Maria Nunes Kimura e Antônia.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – Unesp: Marina, Valéria e Diogo, que sempre nos auxiliam com boa vontade.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba – Unesp: Helena, Ana Cláudia, Isabel, Izamar, Cláudio, Ivone, Cláudia, Luzia, Patrícia, Maria Cláudia, Marina e Marta pelo carinho, atenção com que nos atendem e disponibilidade durante o curso.

Aos colegas do Curso de pós-graduação pela amizade e companheirismo durante esta jornada: Leandro Carvalho Cardoso, Jéssica Lemos Guilinelli, Thallita Pereira Queiroz,

Sheila Mônica Damásio, Edmar Ferreira da Silva, José Carlos Monteiro de Castro, Célia Tomiko Hamata Matida, Mara Antônio, Lithiene Ribeiro Castilho, Albanir Gabriel Borrasca, Camila Benez Ricieri, Francislei Ávila de Souza, Flávia Priscila Pereira, Marcos Heidy Guskuma, André Dotto Sottovia, Paulo Almeida Júnior, Paulo Domingos Ribeiro Júnior, Eleonor Álvaro Garbin, Liliane Scheidegger da Silva Zanete.

Aos ex-colegas do Curso de pós-graduação pela amizade e ensinamentos: Ana Paula Farnezi Bassi, Daniela Ponzoni, e Vanessa Cristina Mendes

Aos amigos Siguimi Tanigute e Raquel Arantes pela amizade, ensinamentos e incentivo na minha carreira profissional.

À CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo auxílio financeiro que viabilizou a realização desse trabalho de pesquisa.

Aos animais utilizados neste experimento, que contribuíram com suas vidas para a realização deste trabalho.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Epígrafe

" Sei que meu trabalho é uma gota no oceano, mas sem ele, o oceano seria menor. "

Madre Teresa de Calcutá

Sumária

Lista de Abreviaturas	15
Lista de Figuras	16
Resumo	18
Abstract	21
1. Introdução	24
2. Proposição	28
3. Material e Método	30
4. Resultados	36
5. Discussão	41
6. Conclusão	46
7. Referências	48
8. Figuras	55
Anexos	63

Lista de Abreviaturas

Osteoprotegerina	OPG
Ativador do Receptor Nuclear Kappa-B	RANK
Ligante do Ativador Nuclear Kappa-B	RANKL
Tampão fosfato de sódio	PBS
Micrometros	μm
Microlitros	μl

Lista de Figuras

Figura 1 -	Grupo Controle – Ratos em que o reimplante dentário não foi realizado.	57
Figura 2 -	Grupo I – Reimplante imediato (10 dias)	58
Figura 3 -	Grupo II – Reimplante tardio sem tratamento (10 dias)	59
Figura 4 -	Grupo III – Reimplante tardio com tratamento (10 dias)	60
Figura 5 -	Grupo I – Reimplante imediato (60 dias)	61
Figura 6 -	Grupo II – Reimplante tardio sem tratamento (60 dias)	62
Figura 7 -	Grupo III – Reimplante tardio com tratamento (60 dias)	63

Resumo

MANFRIN, TM. Imunomarcção das proteínas OPG, RANK e RANKL em dentes reimplantados de rato, [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2007

O sistema OPG, RANK e RANKL é uma das mais importantes descobertas da biologia óssea. Essas proteínas regulam as atividades celulares na remodelação do tecido ósseo e na literatura há diversas investigações nos tecidos dentários. No entanto, no reimplante dentário, ainda não foram encontrados relatos. Foi objetivo deste trabalho, avaliar a imunomarcção das proteínas OPG, RANK e RANKL em dentes reimplantados de rato. Um grupo controle foi formado com quatro ratos no qual o reimplante dentário não foi realizado. Vinte e quatro ratos (*Rattus norvegicus, albinus*) tiveram seu incisivo superior extraído e depois reimplantado formando os seguintes grupos: grupo I – reimplante imediato; grupo II - reimplante tardio sem tratamento e grupo III - reimplante tardio com tratamento endodôntico (ressecção da papila dentária e preenchimento do canal com pasta de hidróxido de cálcio) e tratamento da superfície radicular (raspagem mecânica do ligamento periodontal necrosado e imersão em solução de flúor fosfato acidulado de sódio a 2,5%). Ao final dos períodos experimentais (10 e 60 dias) os ratos foram eutanasiados. Foram obtidos cortes longitudinais parafinados com 6µm de espessura. Os cortes foram submetidos à reação

imunoistoquímica mediante a utilização de anticorpos primários para OPG, RANK e RANKL. Os resultados mostraram que a imunomarcacão de OPG e RANKL ocorreu em todos os grupos e períodos estudados, muito embora RANKL não tenha sido observada no grupo reimplante imediato aos 60 dias. RANK foi observada somente aos 10 dias de todos os grupos no qual o reimplante foi realizado. A análise qualitativa dos resultados demonstrou que o sistema OPG, RANK e RANKL apresentou marcação evidente no reimplante tardio, sugerindo a efetiva participação no início do processo de reabsorção radicular, uma vez que aos 60 dias a imunomarcacão foi discreta.

Palavras chave: imunoistoquímica, osteoprotegerina, RANK, RANKL, reabsorção da raiz, reimplante dentário.

Abstract

MANFRIN TM. A immunolabeling study of OPG, RANK and RANKL in replanted teeth in rats, [thesis] Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2007.

The OPG, RANK and RANKL system is one of the most important discoveries in bone biology. These proteins are key regulators of bone remodeling and in the literature there are several studies of tooth resorption. However, in tooth replantation, reports have not been found. The purpose of this study was to determine the immunolabeling of OPG, RANK and RANKL in replanted teeth in rats, using immunohistochemistry methodology. A control group (no replanted teeth) was formed by four rats. Twenty-four rats (*Rattus norvegicus*, *albinus*) were submitted to the extraction of their upper right incisors. The replantation was performed according to the groups below: group I – immediate replantation; group II – delay replantation without treatment and group III – delay replantation with endodontic treatment (extirpation of papilla and the root canal filled with calcium hydroxide) and root surface treatment (periodontal ligament was removed with scalpel and teeth were immersed in 2% acidulated phosphate sodium fluoride). The animals were euthanized at the end of the experimental periods (10 and 60 days). Longitudinal 6µm slices embedded in paraffin were obtained. The slices were submitted to immunohistochemistry reaction by means of the primary antibodies for OPG, RANK and RANKL

proteins. The results showed the expression of OPG in all groups and periods. RANKL expression was observed in all groups, except in the immediate replanted teeth group (60 days). RANK expression was observed only at 10 days in all groups which replantation was performed. The qualitative analysis of our findings indicated that the system OPG, RANK and RANKL presented strong expression in delayed replantation, suggesting effective participation at the beginning of root resorption, since at 60 days the immunostained cells were discreet.

Keywords: immunohistochemistry, osteoprotegerin, RANK, RANKL, root resorption, tooth replantation.

1 Introdução

Na Odontologia, as reabsorções dentárias representam um capítulo presente na rotina dos cirurgiões-dentistas.

As reabsorções em dentes permanentes são consideradas patológicas, como na reabsorção por movimentação ortodôntica; na doença periodontal avançada; reabsorção causada por cistos, neoplasias e dentes inclusos; reabsorção radicular interna e radicular externa. (1) Muito embora para cada tipo seja preconizado um tratamento específico, as seqüelas resultantes das reabsorções dentárias estão normalmente associadas à reabsorção dos tecidos duros: ósseo ou dentário.

Particularmente no reimplante dentário, identificar o padrão das reabsorções radiculares não têm sido uma tarefa fácil. É necessário realizar o diagnóstico precoce, tratamento adequado, acompanhamento clínico e radiográfico periódico, aliados ao entendimento dos fenômenos biológicos. (2)

O tipo de reabsorção radicular instalada (reabsorção de superfície, inflamatória, anquilose e reabsorção por substituição) está diretamente relacionado com a integridade da camada de cimento, viabilidade das células do ligamento periodontal e a condição da polpa, além da intensidade do trauma e a natureza do estímulo desenvolvido. (3-5) Uma série de fatores locais e sistêmicos interage determinando se o balanço final deste processo será em favor do reparo por regeneração ou cicatrização. (6)

Uma das hipóteses apresentadas para a ativação dos clastos é a ação de três proteínas celulares intimamente ligadas à dinâmica dos processos de remodelação do tecido ósseo. (7-9) Estas proteínas pertencem à família do Fator de Necrose Tumoral (TNF) e são conhecidas como:

- **OPG (Osteoprotegerina).** A OPG, molécula de superfície sintetizada por osteoblastos e por células do estroma é uma proteína solúvel circulante e tem como maior ação biológica inibir a diferenciação de osteoclastos a partir da ligação com RANKL. (10-15)
- **RANK (Ativador do receptor nuclear kappa-B).** Este receptor localiza-se nos precursores hematopoiéticos de osteoclastos (monócitos e macrófagos), em osteoclastos, linfócitos T e B, células dendríticas e fibroblastos. (12-16)
- **RANKL (Ligante do ativador nuclear kappa-B).** (12,16) É uma proteína trans-membrana expressa primariamente em tecidos linfóides e células de linhagem T. Pode ser encontrada em osteoblastos maduros e células do estroma, bem como na forma solúvel. O maior papel de RANKL no tecido ósseo é estimulação da osteoclasia a partir do contato célula-célula. A reabsorção óssea é ativada com a ligação de RANK à RANKL. (12, 14-16)

Diversos estudos têm demonstrado a participação dessas proteínas na reabsorção dos tecidos dentários. (16-24) Recentemente têm sido sugerido que a reabsorção fisiológica dos dentes decíduos é um fenômeno regulado pelos mesmos mecanismos observados no processo de remodelação do tecido ósseo. (16-18) Fukushima et al. (17) verificaram, nas células do ligamento periodontal

de dentes decíduos humanos em processo de reabsorção, expressão aumentada de RANKL e níveis baixos de OPG. Em contraste, em dentes permanentes ou decíduos (com cronologia anterior ao processo de exfoliação) houve abundante expressão de OPG, mas nenhuma de RANKL.

Em condições patológicas, Kumomoto & Ooya (19) verificaram a expressão de RANKL e OPG predominante em células do estroma de ameloblastomas humanos benignos ou malignos sugerindo a participação destas moléculas na patogênese das lesões ósseas, que também parecem ter participação nos cistos periapicais e granulomas. (20) Na movimentação dentária induzida (21,22) a administração local de OPG em ratos inibe a osteoclasia e a movimentação dentária, resultando numa melhor quantidade óssea durante a ancoragem ortodôntica. Um outro estudo revelou altos níveis de RANKL e baixos níveis de OPG no fluido do sulco gengival coletado de pacientes submetidos à movimentação ortodôntica, sobretudo nas primeiras 24 horas (23). Na investigação de pacientes com periodontite, Crotti et al. (24) observaram a expressão de RANKL em linfócitos e macrófagos, enquanto OPG estava associada com células endoteliais.

No reimplante dentário não foram encontrados na literatura relatos da observância dessas proteínas sinalizadoras da remodelação óssea. Diante dessas considerações e buscando melhor entendimento desses fenômenos, é oportuno o estudo da expressão destas proteínas no reimplante dentário.

2 Proposição

O objetivo deste trabalho foi avaliar a imunomarcagem das proteínas OPG, RANK e RANKL em dentes reimplantados de rato.

3 Material e Método

Previamente à sua realização, a metodologia empregada neste trabalho foi submetida ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP) – Protocolo no.50/05. (Anexo A)

1. Animais

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados 28 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*), machos, adultos, com peso entre 200 g e 250 g, aproximadamente. Os animais foram alimentados com ração sólida triturada (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. - Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) durante todo o experimento e água a vontade, exceto no período das doze horas antecedentes ao ato cirúrgico. A etapa cirúrgica foi realizada sob anestesia geral, administrando por via intramuscular a combinação de cloridrato de xilazina (Coopazine® - Coopers Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil) na dosagem de 0,03 ml para cada 100 g de peso corporal, promovendo o relaxamento muscular. Na seqüência, o cloridrato de ketamina (Vetaset® - Fort Dodge Animal Health, Iowa, USA) foi utilizado na dosagem de 0,07 ml para cada 100 g de peso corporal para a indução anestésica. Após a anestesia do animal, foi realizada a anti-sepsia da porção anterior da maxila com polivinilpirrolidona iodada (PVPI Tópico 10%, Riodeine®, Riodeine Indústria

Química e Farmacêutica Rio Química, Ltda, São José do Rio Preto, SP, Brasil) e em seguida, foi realizada a sindesmotomia, luxação e extração do incisivo superior direito com o auxílio de instrumental especialmente adaptado. (25) A seguir, foram formados três Grupos com oito animais cada um, enquanto o grupo controle foi formado com apenas quatro ratos. O reimplante dentário foi realizado de acordo com as propostas de tratamento para cada um dos Grupos descritos abaixo:

- Grupo Controle – ratos em que o reimplante dentário não foi realizado;
- Grupo I – o reimplante foi realizado imediatamente após a extração dentária;
- Grupo II – o reimplante foi realizado após 60 minutos (reimplante tardio) da exodontia;
- Grupo III - o reimplante foi realizado após 60 minutos (reimplante tardio) da exodontia com tratamento.

Nos Grupos II e III os dentes foram mantidos em meio seco, presos pela coroa dental, em uma lâmina de cera utilidade, por 60 minutos. Finalizado o período extra-alveolar, os dentes do grupo II foram reimplantados e os dentes do Grupo III foram submetidos à remoção da papila dentária e do órgão do esmalte com auxílio de lâmina de bisturi nº 15 (Embramac Exp. E Imp., Campinas, SP, Brasil). O início da terapia endodôntica consistiu na pulpectomia, por via retrógrada, empregando-se lima tipo Hedstron nº 35 (Sybron Kerr, Glendora, Califórnia, USA) ligeiramente curvada. O canal radicular foi irrigado e aspirado, respectivamente com soro fisiológico (Ariston Ind. Quím. e Farm. Ltda, São Paulo, SP, Brasil) e seringa descartável acoplada a agulha 25X6.

Os dentes tiveram a superfície radicular raspada com lâmina de bisturi nº 15 (Embramac Exp.e Imp., Campinas, SP, Brasil) para a remoção mecânica do remanescente do ligamento periodontal. A lâmina foi conduzida perpendicularmente no sentido coroa ápice, apenas uma vez em todo o sentido lingual. (26) Os dentes foram imersos em 20 ml de solução de flúor fosfato acidulado de sódio a 2%, pH 5,5 (Farmácia Aphoticário – Araçatuba, SP, Brasil) por 20 minutos. Após o tratamento da superfície radicular, o conteúdo dos canais radiculares foram aspirados com seringa descartável acoplada em agulha 25X6, secos com cone de papel (Dentisply Ind e Com Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil) e preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio acondicionada em tubete anestésico (5ml de propilenoglicol, 5 g de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 2 g de óxido de zinco, 0,015 g de colofônia – Disciplina de Endodontia de Araçatuba) por via retrógrada, com o auxílio de uma seringa carpule e agulha longa pré-curvada, após a remoção do bisel (G27 – Terumo Corporation, Tóquio, Japão).

Os alvéolos dos Grupos II e III foram irrigados com soro fisiológico previamente ao reimplante dentário. Todos os animais submetidos ao procedimento cirúrgico receberam dose única de 20.000 U.I. de Penicilina G Benzatina (Fort Dodge Animal Health, Iowa, USA), por via intra-muscular. Os períodos experimentais estabelecidos foram de 10 e 60 dias.

2. Imunoistoquímica

Decorridos 10 e 60 dias do reimplante, os ratos (quatro para cada período experimental, por grupo) foram eutanasiados por sobredosagem anestésica (Aos 10 dias os ratos do Grupo Controle também foram eutanasiados). A maxila

direita foi separada da esquerda na linha mediana com auxílio de uma lâmina de bisturi no. 15 (Embramac Exp.E Imp., Campinas, SP, Brasil). Um corte com tesoura reta na porção distal do 3º molar possibilitou a obtenção da área da maxila contendo o dente reimplantado. As peças obtidas foram fixadas em solução de formalina a 10% por 24 horas e descalcificadas em solução de EDTA 4,13% (Ácido Etileno Diamino Tetracético - pH 7,0, Merck®, Darmstadt, Alemanha) por um período de três meses. Após a descalcificação, foram embebidas em parafina e submetidas a cortes longitudinais de 6µm de espessura.

As lâminas foram preparadas para o processamento imunoistoquímico (Anexo B) previamente à adição dos anticorpos. Como anticorpos primários foram utilizados a Osteoprotegerina – OPG (goat anti OPG polyclonal antibody – Santa Cruz Biotechnology® – SC 21038, Califórnia, USA), a RANK (goat anti RANK polyclonal antibody – Santa Cruz Biotechnology® – SC 7626, Califórnia, USA) e a RANKL (goat anti RANKL polyclonal antibody – Santa Cruz Biotechnology® – SC 7627, Califórnia, USA). O anticorpo secundário utilizado foi o biotinilado anti-cabras, produzido em coelhos (Pierce Biotechnology®, Illinois, USA).

O sinal da reação imunoistoquímica foi amplificado com o sistema avidina-biotina (Kit DAKO, Glostrup, Dinamarca) e a reação foi revelada utilizando a diaminobenzidina (DAB, DAKO Co., Califórnia, USA) como cromógeno. A coloração foi obtida com a hematoxilina de Harris (Merck®, Darmstadt, Alemanha).

Para todos os grupos foram realizados controles imunoistoquímicos. A lâmina passa por todo o processamento convencional, mas somente o anticorpo

secundário é adicionado. O objetivo é avaliar a efetividade e especificidade das reações de OPG, RANK e RANKL. Assim, funciona como uma contra-prova: se houver marcação no controle, provavelmente a imunomarcação das outras proteínas são inespecíficas. Não havendo marcação no controle, as marcações das demais proteínas são consideradas específicas.

3. Análise qualitativa

As análises foram realizadas qualitativamente em microscópio de luz. Somente a face lingual da raiz foi considerada, já que o rato apresenta ligamento periodontal apenas nesta face. Observou-se as características do ligamento periodontal, osso alveolar, cemento, dentina, além da ocorrência de reabsorção inflamatória, anquilose e reabsorção por substituição. O padrão de imunomarcação de cada proteína (OPG, RANK e RANKL) foi observado para cada grupo e período estudado. Dividiu-se a extensão da superfície radicular na lâmina em três terços demarcados (Anexo C). O terço médio foi escolhido para a análise, em virtude da interferência do ato cirúrgico no terço cervical e apical, respectivamente, pelo uso do fórceps na exodontia e lâmina de bisturi na remoção da papila dentária. Em seguida, para a captura da imagem, utilizou-se o microscópio óptico com objetiva de aumento 20X Leica Aristoplan Microsystems (Leitz, Bensheim, Alemanha) acoplado a uma câmera de captação da imagem (Leica DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Switzerland) conectada a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box, Leica Imaging Manager – IM 50 Demo software).

4 Resultados

Grupo Controle – ratos em que o reimplante dentário não foi realizado

Estruturas dentárias preservadas. A camada de cimento está disposta ao longo da dentina, enquanto as células do ligamento periodontal apresentam-se agrupadas paralelamente ao cimento. Osteócitos no interior do tecido ósseo e osteoblastos na superfície (face periodontal) do osso alveolar.

Controle: Negativo para as imunomarcações. Áreas coradas em marrom são inespecíficas (Figura 1A).

OPG: Imunomarcação de OPG no cimento (mudança discreta da coloração da linha basófila) e no ligamento periodontal. Vê-se ainda discreta marcação nos osteócitos no tecido ósseo alveolar (Figura 1B).

RANK: Imunomarcações inespecíficas ou ausentes de RANK (Figura 1C).

RANKL: Imunomarcação discreta de RANKL no ligamento periodontal e no tecido ósseo, marcando algumas células (Figura 1D).

GRUPO I – Reimplante Imediato – 10 dias

Padrão histológico semelhante ao do Grupo Controle – ratos em que o reimplante dentário não foi realizado.

Controle: Negativo para as imunomarcações (Figura 2A).

OPG: Imunomarcação discreta no ligamento periodontal, osteócitos no interior do tecido ósseo (Figura 2B).

RANK: Imunomarcacão de RANK no cimento (mudança da coloração da linha basófila) e em algumas células do ligamento periodontal (Figura 2C).

RANKL: Imunomarcacão de RANKL no cimento (mudança da coloração da linha basófila) e em algumas células do ligamento periodontal (Figura 2D).

GRUPO II – Reimplante tardio sem tratamento – 10 dias

Este grupo apresenta imunomarcacão evidente. O cimento e a dentina não estão íntegros em toda a sua extensão, havendo algumas áreas reabsorção radicular, sugestivas de reabsorção inflamatória.

Controle: Negativo para as imunomarcacões (Figura 3A).

OPG: Imunomarcacão intensa de OPG tanto no ligamento periodontal quanto no tecido ósseo (Figura 3B).

RANK: Imunomarcacão de RANK tanto no ligamento periodontal quanto no tecido ósseo (Figura 3C).

RANKL: Imunomarcacão bem definida de RANKL no tecido ósseo (Figura 3D).

GRUPO III – Reimplante tardio com tratamento – 10 dias

A camada de cimento (linha basófila) está íntegra e disposta ao longo da dentina. O espaço do ligamento periodontal está preenchido por um tecido conjuntivo que parece se reorganizar em direção à superfície radicular. Osteócitos no interior do tecido ósseo e osteoblastos na superfície (face periodontal) do osso alveolar.

Controle: Negativo para as imunomarcacões (Figura 4A).

OPG: Imunomarcacão de OPG no tecido ósseo (Figura 4B).

RANK: Imunomarcacão de RANK no tecido ósseo (Figura 4C).

RANKL: Imunomarcacão de RANKL no tecido ósseo (Figura 4D).

GRUPO I – Reimplante Imediato – 60 DIAS

Camada de dentina e cimento preservadas. Muitas células no ligamento periodontal. As fibras do ligamento periodontal parecem estar bem inseridas. Osteócitos no interior do tecido ósseo e osteoblastos na superfície (face periodontal) do osso alveolar.

Controle: Negativo para as imunomarcacões (Figura 5A).

OPG: Imunomarcacão no cimento, ligamento periodontal e tecido ósseo (Figura 5B).

RANK: Imunomarcacões inespecíficas ou ausentes de RANK (Figura 5C).

RANKL: Imunomarcacões inespecíficas ou ausentes de RANKL (Figura 5D).

GRUPO II – Reimplante tardio sem tratamento – 60 dias

Este grupo apresenta imunomarcacão evidente. O cimento e a dentina apresentam áreas de reabsorção inflamatória, áreas onde o tecido ósseo encontra-se em contato direto com o cimento (anquilose) e áreas onde houve a substituição das estruturas dentárias por tecido ósseo, caracterizando a reabsorção por substituição.

Controle: Negativo para as imunomarcacões (Figura 6A).

OPG: Imunomarcacão no tecido ósseo (Figura 6B).

RANK: Imunomarcacões inespecíficas ou ausentes de RANK (Figura 6C).

RANKL: Tecido ósseo bem marcado com RANKL (Figura 6D).

GRUPO III – Reimplante tardio com tratamento - 60 dias

Este grupo é marcado pela anquilose e reabsorção por substituição. Na maioria dos espécimes, não se verifica integridade da camada de cimento ou dentina. Verifica-se a anquilose em áreas em que há o contato direto do cimento com o tecido ósseo, e substituição das estruturas dentárias (cimento, dentina) por tecido ósseo (reabsorção por substituição).

Controle: Negativo para as imunomarcações (Figura 7A).

OPG: Imunomarcação discreta de OPG no tecido ósseo (Figura 7B).

RANK: Imunomarcações inespecíficas ou ausentes de RANK (Figura 7C).

RANKL: Imunomarcações dispersas no tecido ósseo e em algumas células do tecido conjuntivo preenchendo o espaço do ligamento periodontal (Figura 7D).

5 Discussão

As reabsorções radiculares são complicações possivelmente esperadas após a realização do reimplante dentário. Achados clínicos e radiográficos (2, 5) podem ser utilizados na prática clínica para diagnosticar o padrão das reabsorções, bem como tratá-las quando oportuno. No entanto, como os eventos celulares observados histologicamente ocorrem muito antes de termos evidências clínicas ou radiográficas, o entendimento dos fenômenos biológicos é necessário para o planejamento de procedimentos clínicos adequados.

Neste trabalho o reimplante dentário foi realizado de acordo com os protocolos de atendimento para dentes avulsionados permanentes disponíveis na literatura.(28-30) Reconhecidamente, o tempo extra-alveolar é um dos fatores determinantes no prognóstico do reimplante dentário. (31, 32)

Partindo deste pressuposto, os melhores resultados podem ser atribuídos ao grupo em que foi realizado o reimplante imediato, já que nos períodos estudados não foi constatada a presença de reabsorções radiculares. O padrão histológico apresentado pelo Grupo I aos 10 dias é semelhante ao observado no Grupo Controle (ratos em que o reimplante dentário não foi realizado), o que é referência da situação de normalidade. Com relação às imunomarcações, no Grupo Controle há marcações de OPG e RANKL. Neste grupo, parece haver um equilíbrio das interações celulares, uma vez que no tecido ósseo o balanço

entre a expressão de OPG e RANKL é um importante determinante da massa óssea e integridade do esqueleto. (33)

Em contrapartida, no Grupo I aos 10 dias, além da presença de OPG e RANKL, há imunomarcações de RANK. Os estudos que descrevem a expressão da proteína RANK citam marcações específicas dessa proteína em pré-osteoclastos e fibroblastos. (12-16) Como o ligamento periodontal é ricamente vascularizado e propicia o imediato desencadeamento do processo inflamatório, cujo exudato e infiltrado determinam a presença de vários mediadores, (1) a sinalização destas proteínas pode indicar a reorganização desse tecido frente ao rompimento das fibras periodontais ocasionado pela avulsão dentária.

No Grupo I aos 60 dias, há predominância da marcação de OPG no cemento, ligamento periodontal e tecido ósseo, enquanto não se verifica imunomarcações de RANK e RANKL. Comparativamente ao Grupo Controle, a ausência completa de RANKL sugere uma situação de desequilíbrio metabólico, muito embora histologicamente observou-se estruturas dentárias preservadas e com aspecto de normalidade.

O tipo de tratamento a ser indicado no reimplante depende, além do tempo extra-alveolar, de outros fatores como meio de conservação, (31, 32) manipulação do dente avulsionado, (28-30) ou ainda rizogênese completa ou incompleta. (34, 35) Didaticamente, o reimplante pode ser classificado como mediato ou tardio quando são realizados após 60 minutos da avulsão. (28-30) Assim, nestes casos, uma série de medidas como tratamento da superfície radicular, (26, 36) tratamento endodôntico, (34, 35) contenção (37, 38) e ajuste oclusal, (39) entre outras, devem ser tomadas a fim de se controlar a reabsorção

radicular inflamatória (35, 40) ou protelar a ocorrência da anquilose e reabsorção por substituição. (41, 42) Certamente, além das classificações e protocolos disponíveis, deve-se aliar o bom senso separando o reimplante em favorável ou desfavorável. (39)

Com relação às imunomarcações no reimplante tardio (sem e com tratamento), verifica-se uma constante aos 10 dias. Observa-se a marcação intensa das três proteínas, indicando que este é o período de maior atividade metabólica. Neste período observamos a expressão marcante de RANK, que teoricamente se expressa predominantemente em clastos. (12-16) Portanto, no reimplante tardio, a imunomarcação de RANK parece sinalizar o início do processo de reabsorção radicular.

No reimplante tardio, aos 60 dias, as reabsorções radiculares podem ser observadas claramente. No grupo em que o tratamento endodôntico não foi realizado observou-se predominância da reabsorção radicular inflamatória, uma vez que essa terapia é indicada no controle e tratamento deste tipo de reabsorção. (4, 5, 35, 40) Por sua vez, a anquilose e reabsorção por substituição são situações aguardadas nos grupos em que o reimplante tardio foi realizado. (41, 42) Contudo, no reimplante tardio sem tratamento a destruição das estruturas dentárias é ainda maior. Claramente, o Grupo II (aos 10 e 60 dias) foi o que apresentou imunomarcação mais evidente.

Aos 60 dias, não se observou a imunomarcação de RANK nos Grupos II e III e comparativamente com os grupos dos 10 dias, houve significativa diminuição da marcação de OPG e RANKL. Aparentemente, neste período há uma tendência para a estagnação da fase ativa das reabsorções radiculares.

Então, por que os dentes continuam sendo reabsorvidos ao longo dos anos? A partir da análise dos resultados, sugere-se que a participação do sistema OPG, RANK e RANKL está relacionada ao início do processo de reabsorção, enquanto que a manutenção deste processo pode estar relacionada à ação de outros sinalizadores.

A proposta do sistema OPG, RANK e RANKL no reimplante dentário foi baseada em evidências dessas proteínas nos tecidos dentários em condições fisiológicas (16-18) e patológicas. (19-24) No presente trabalho, a imunomarcagem destas proteínas reforça essa hipótese, a despeito das limitações da metodologia empregada. Para melhor traçar o perfil de cada proteína nos grupos estudados, seria ideal acrescentar um período experimental intermediário entre 10 e 60 dias. Ainda, novos estudos devem ser realizados com o intuito de se quantificar essas proteínas, aliando os resultados à análise descritiva.

Considerando a ação destas proteínas no metabolismo ósseo e as suas investigações nos tecidos dentários, o sistema OPG-RANK-RANKL pode ser um dos diversos reguladores das reabsorções radiculares no reimplante dentário, contribuindo para este complexo processo.

6 Conclusão

O sistema OPG, RANK e RANKL apresentou imunomarcção evidente no reimplante tardio, sugerindo a sua efetiva participação no início do processo de reabsorção radicular, uma vez que aos 60 dias a imunomarcção foi discreta.

7 Referências

- 1 Consolaro, A. Dental resorptions in the clinic specialties. 2 rd edn. Maringá: Dental Press; 447p. 2002.
- 2 Manfrin TM, Poi WR, Panzarini SR, Sonoda CK, Coradazzi LF, Giovanini EL. Information for the diagnosis and treatment of root resorption due to tooth replantation. Quint Int, Manuscript ID: Q150488, 2007.
- 3 Trope M. Luxation injuries and external root resorption etiology, treatment and prognosis. J Calif Dent Assoc 2000; 28: 860-6.
- 4 Trope M. Root resorption of dental and traumatic origin: classification based on etiology. Pract Periodontics Aesthet Dent 1998; 10: 515-22.
- 5 Andreasen JO, Andreasen FM, editors. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth. Copenhagen: Munksgard; 1994. p.587-633.
- 6 Silva TA, Rosa AL, Lara VS. Dentin matrix proteins and soluble factors: intrinsic regulatory signals for healing and resorption of dental and periodontal tissues? Oral Dis 2004; 10: 63-74.
- 7 Schwartz EM, O Kneefe RJ. Breakthought in boné: the molecule mechanism of osteoclast/osteoblast coupling revealed. Current Opnion in Orthopaedics 2000; 11(5): 329-35.

- 8 Hofbauer LC, Heufelder AE. The role of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 253-59.
- 9 Buckley KA, Fraser WD. Receptor activator for nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin: regulators of bone physiology and immune responses/potential therapeutic agents and biochemical markers. *Ann Clin Biochem* 2002; 39: 551-56.
- 10 Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93: 153-76.
- 11 Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-19.
- 12 Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 2001; 142: 5050-55.
- 13 Aubin JE, Bonny E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int* 2000; 11: 905-13.
- 14 Stejskal D, Bartek J, Patorková R, Ruzicka V, Oral I, Horalic D. Osteoprotegerin, RANK, RANKL. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Cze Repub* 2001; 145: 61-4.
- 15 Stejskal D, Zurek M, Bartek J, Jedelsky L, Ruzicka V. Osteoprotegerin and bone density. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Cze Repub* 2001; 145: 75-6.

- 16 Lossdörfer S, Götz W, Jäger A. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. *Calcif Tissue Int* 2002; 71: 45-52.
- 17 Fukushima H, Kajiya H, Takada K, Okamoto F, Okabe K. Expression and role of RANKL in periodontal ligament cells during physiological root-resorption in human deciduous teeth. *Eur J Oral Sci* 2003; 111: 346-52.
- 18 Rani CS, MacDougall M. Dental cells express factors that regulate bone resorption. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000; 3: 145-52.
- 19 Kumamoto H, Ooya K. Expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP), osteoclast differentiation factor (ODF)/receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF)/osteoprotegerin (OPG) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 46-52.
- 20 Menezes R, Bramante CM, da Silva Paiva KB, Letra A, Carneiro E, Fernando Zambuzzi W et al. Receptor activator NFkappa-B-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102: 404-9.
- 21 Dunn MD, Park CH, Kostenuik PJ, Kapila S, Giannobile WV. Local delivery of osteoprotegerin inhibits mechanically mediated bone modeling in orthodontic tooth movement. *Bone* 2007; 41: 446-55.
- 22 Kanzaki H, Chiba M, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M and Mitani H. Local OPG gene transfer to periodontal tissue inhibits

- orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 2004; 83: 920-25.
- 23 Nishijima Y, Yamaguchi M, Kojima T, Aihara N, Nakajima R, Kasai K. Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells in vitro. *Orthod Craniofac Res* 2006; 9: 63-70.
 - 24 Crotti T, Smith MD, Hirsh R, Soukoulis S, Weedon H, Capone M et al. Receptor activator NFkappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *J Period Res* 2003; 38: 380-7.
 - 25 Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats. *Rev Fac Odont Araçatuba* 1973; 2(2): 153-69.
 - 26 Esper HR, Panzarini SR, Poi WR, Sonoda CK, Casatti C. Mechanical removal of necrotic of periodontal ligament by either Robinson bristle with pumice or scalpel blade. Histomorphometric analysis and scanning electron microscopy. *Dent Traumatol* 2007, 23: 333-9.
 - 28 Flores MT, Andreasen JO, Bakland LK, Feiglin B, Gutmann JL, Oikarinen K, et al. Guidelines for the evaluation and management of traumatic dental injuries. *Dent Traumatol* 2001; 17: 193-8.
 - 29 Flores MT, Andersson L, Andreasen JO, Bakland LK, Malmgren B, Barnett F, et al. Guidelines for the management of traumatic dental injuries. II. Avulsion of permanent teeth. *Dental Traumatol* 2007, 23: 130-6.

- 30 Trope M. Clinical management of the avulsed tooth: present strategies and future directions. *Dent Traumatol* 2002; 18: 1-11.
- 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 Pohl Y, Fillipi 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.
- 33 Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther* 2007; 9(Suppl 1): S1. Review.
- 34 Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent teeth. 2. Factors related to pulpal healing. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11: 59-68.
- 35 Pohl Y, Fillipi A, Kirschner H. Results after replantation of avulsed permanent teeth. I. Endodontic considerations. *Dent Traumatol* 2005; 21: 80-92.
- 36 Lam K, Sae-Lim V. The effect of Emdogain gel on periodontal healing in replanted monkeys's teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 100-7.
- 37 Oikarinen K. Tooth splinting: a review of the literature and consideration of the versatility of a wire-composite splint. *Endod Dent Traumatol* 1989; 6: 237-50.
- 38 Von Arx T, Fillipi A, Buser D. Splinting of traumatized teeth with a

- new device: TTS (Titanium Trauma Splint). *Dent Traumatol* 2001; 17: 180-4.
- 39 Manfrin TM, Boaventura RS, Poi WR, Panzarini SR, Sonoda CK, Massa Sundefeld ML. Analysis of procedures used in tooth avulsion by 100 dental surgeons. *Dent Traumatol* 2007; 23(4): 203-210.
- 40 Sae-Lim V, Wang CY, Trope M. Effect of systemic tetracycline and amoxicillin on inflammatory root resorption of replanted dog teeth. *Endod Dent Traumatol* 1998; 14: 216-20.
- 41 Andersson L, Bodin I, Sorensen S. Progression of root resorption following replantation of human teeth after extended extraoral storage. *Endod Dent Traumatol* 1989; 5: 38-47.
- 42 Hammarström L, Blomlöf L, Lindskog S. Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. *Endod Dent Traumatol* 1989; 5: 163-75.



Figuras

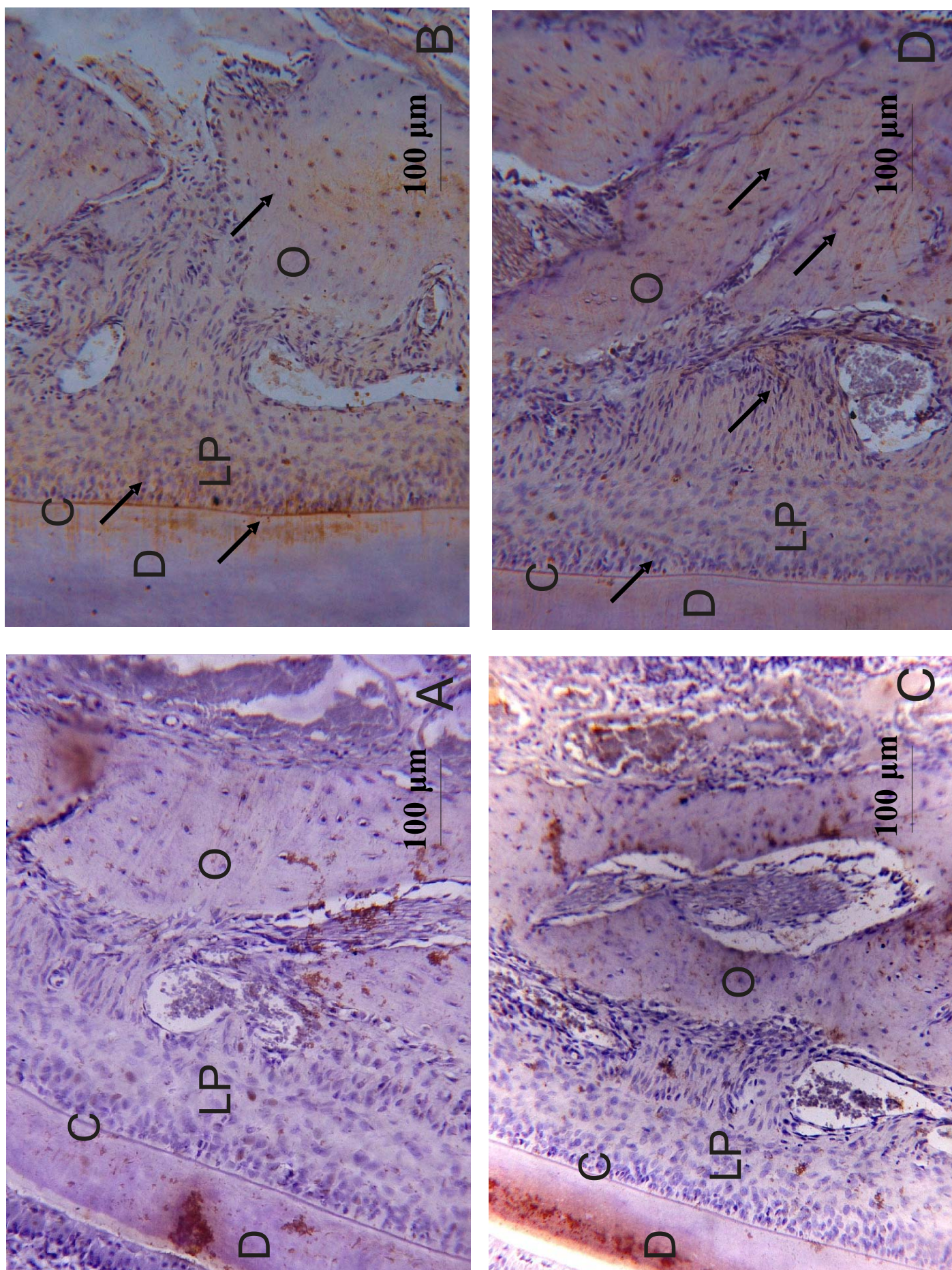


Fig 1 - Grupo Controle - ratos em que o reimplante dentário não foi realizado. A) Controle B) OPG C) RANK e D) RANKL - Terço médio - Aumento 20X. Dentina (D); Cimento (C); Ligamento Periodontal (LP); Osso alveolar (O). Imunomarcações (setas).

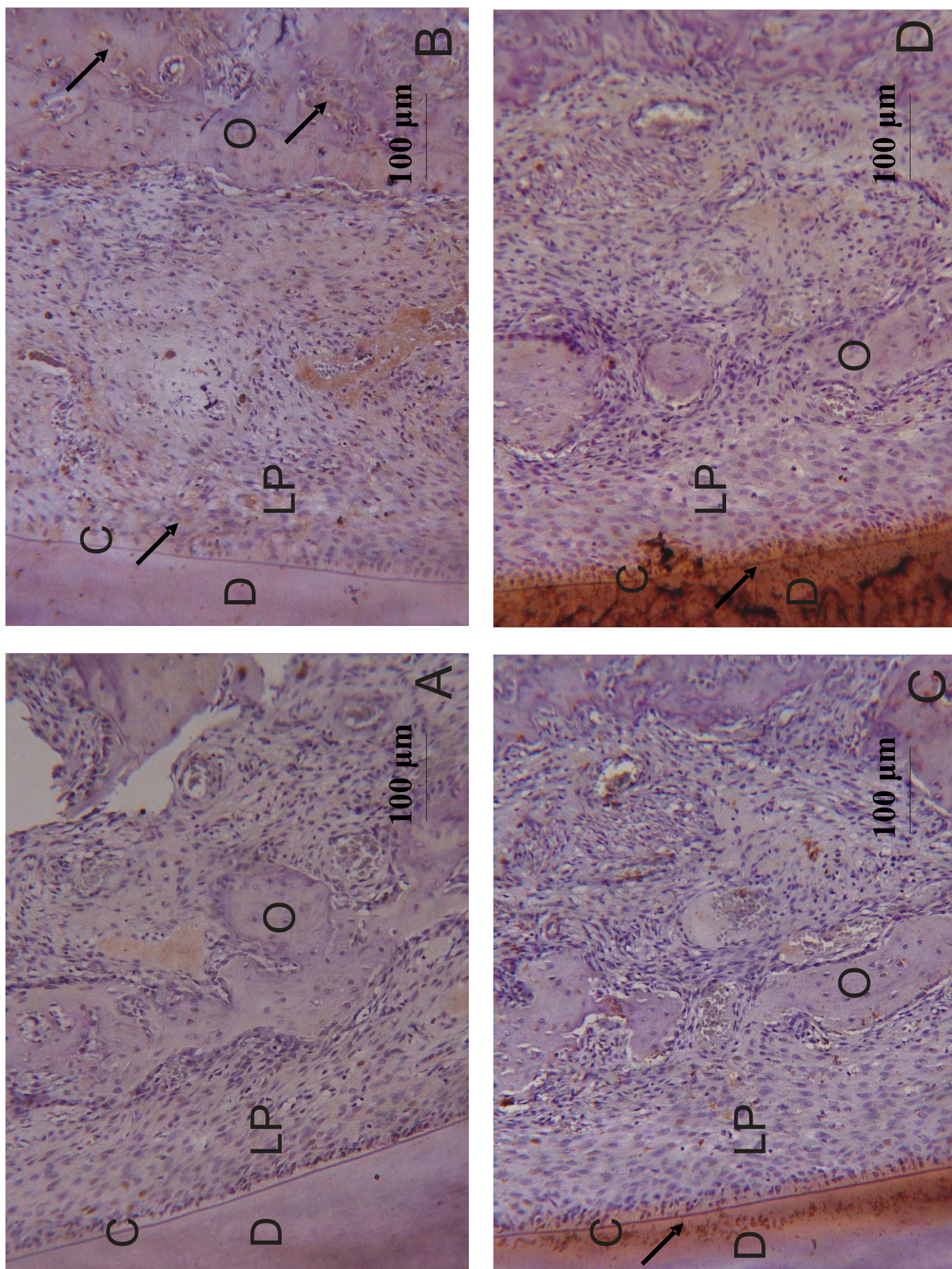


Fig 2 - Grupo I - Reimplante Imediato - 10 dias - A) Controle B) OPG C) RANK e D) RANKL - Terço médio - Aumento 20X. Dentina (D); Cimento (C); Ligamento Periodontal (LP); Osso alveolar (O). Imunomarcações (setas).

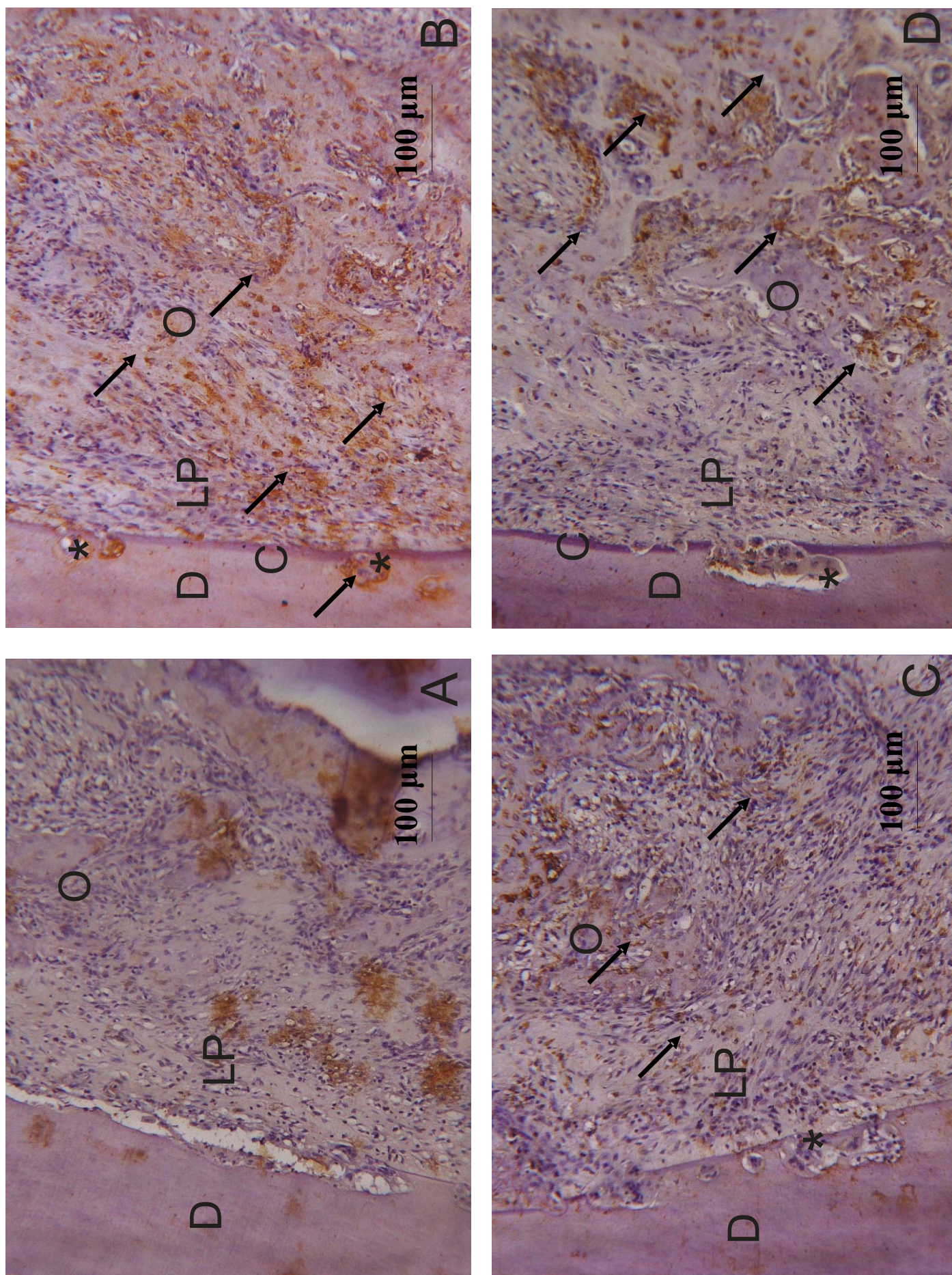


Fig 3 - Grupo II - Reimplante tardio sem tratamento - 10 dias - A) Controle B) OPG C) RANK e D) RANKL - Terço médio - Aumento 20X. Dentina (D); Cimento (C); Ligamento Periodontal (LP); Osso alveolar (O). Imunomarcações (setas). Reabsorções radiculares representadas por asteriscos. (*)

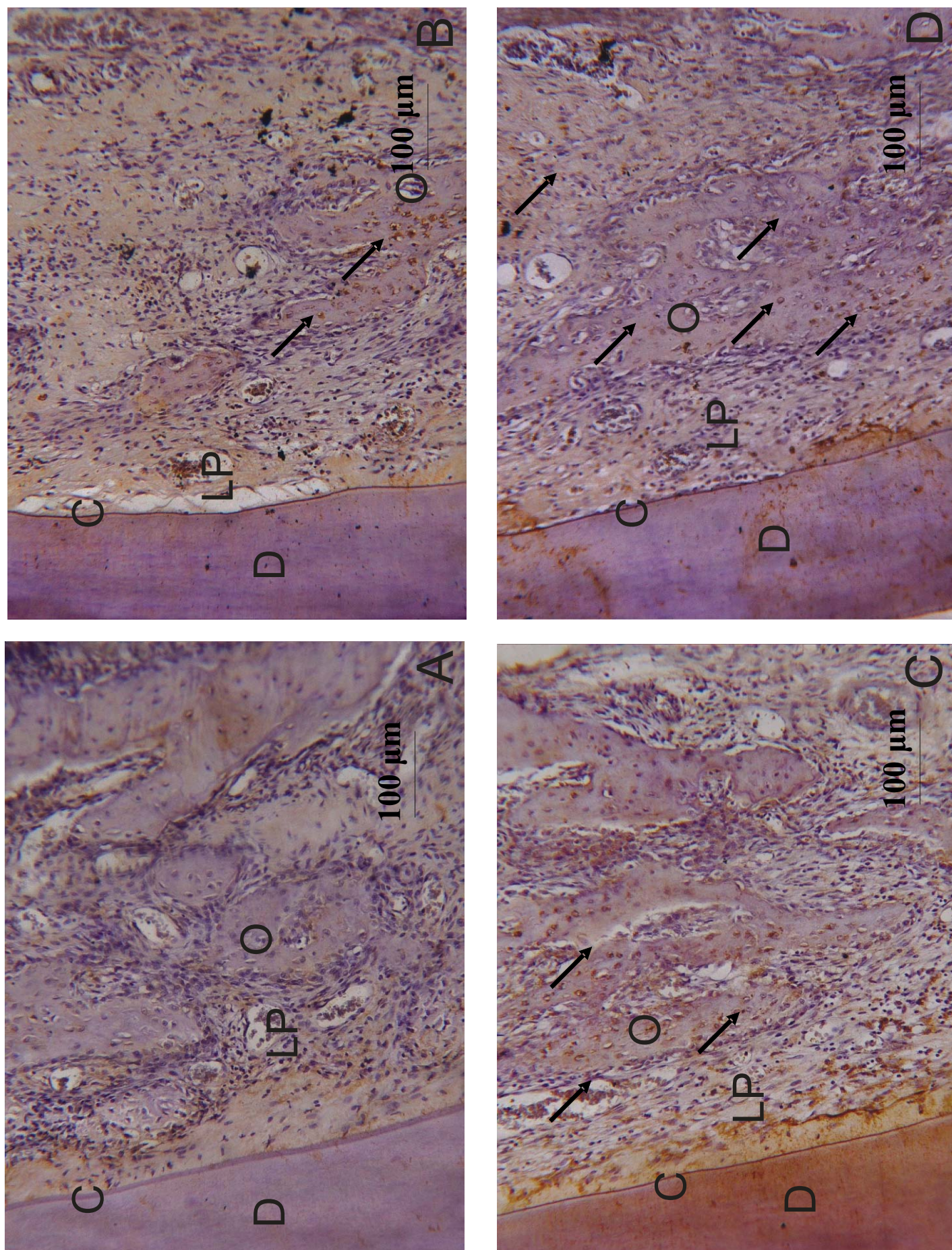


Fig 4 - Grupo III - Reimplante tardio com tratamento - 10 dias - A) Controle B) OPG C) RANK e D) RANKL - Terço médio - Aumento 20X. Dentina (D); Cimento (C); Ligamento Periodontal (LP); Osso alveolar (O). Imunomarcações (setas).

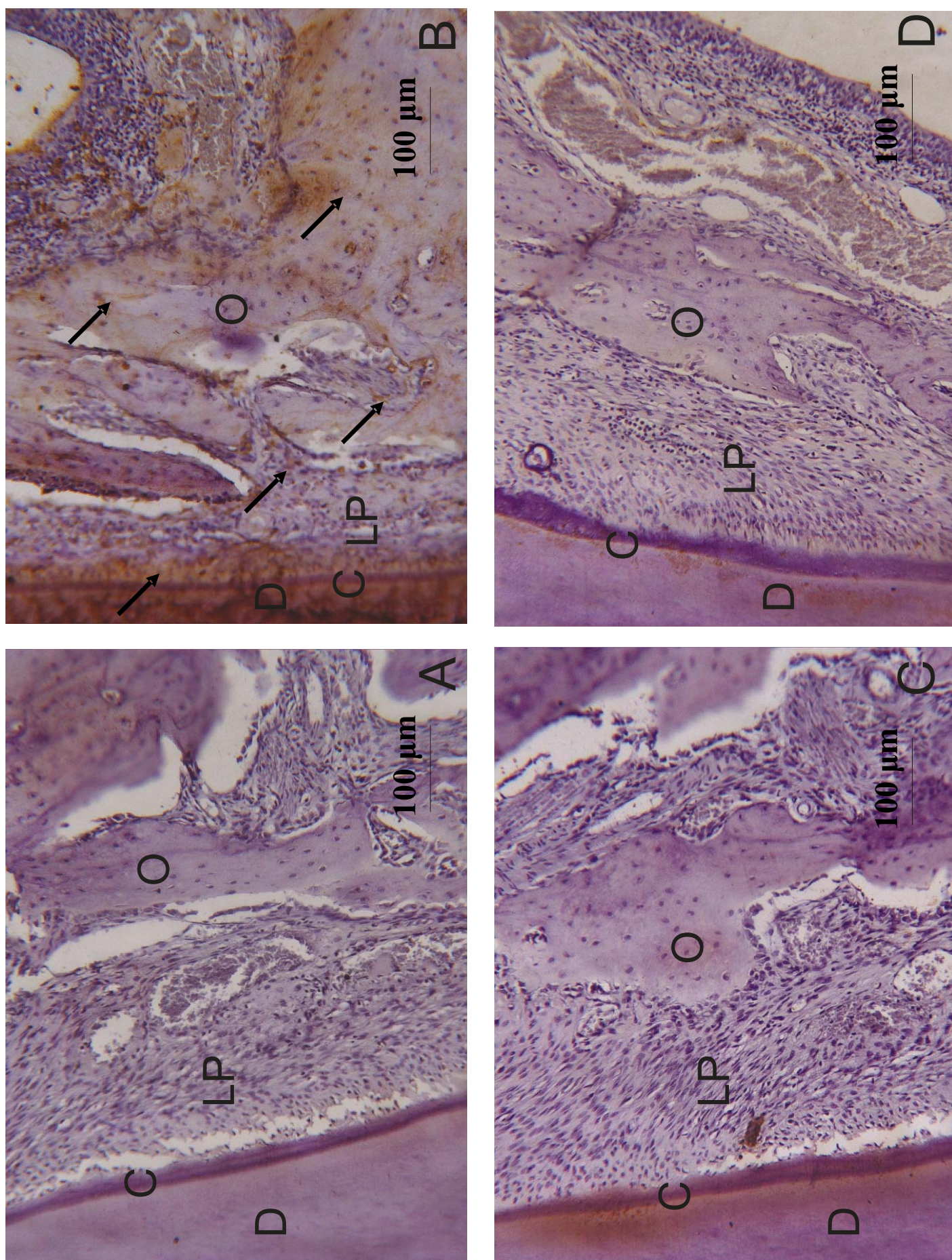


Fig 5 - Grupo I - Reimplante Imediato - 60 dias - A) Controle B) OPG C) RANK e D) RANKL - Terço médio - Aumento 20X. Dentina (D); Cimento (C); Ligamento Periodontal (LP); Osso alveolar (O). Imunomarcações (setas).

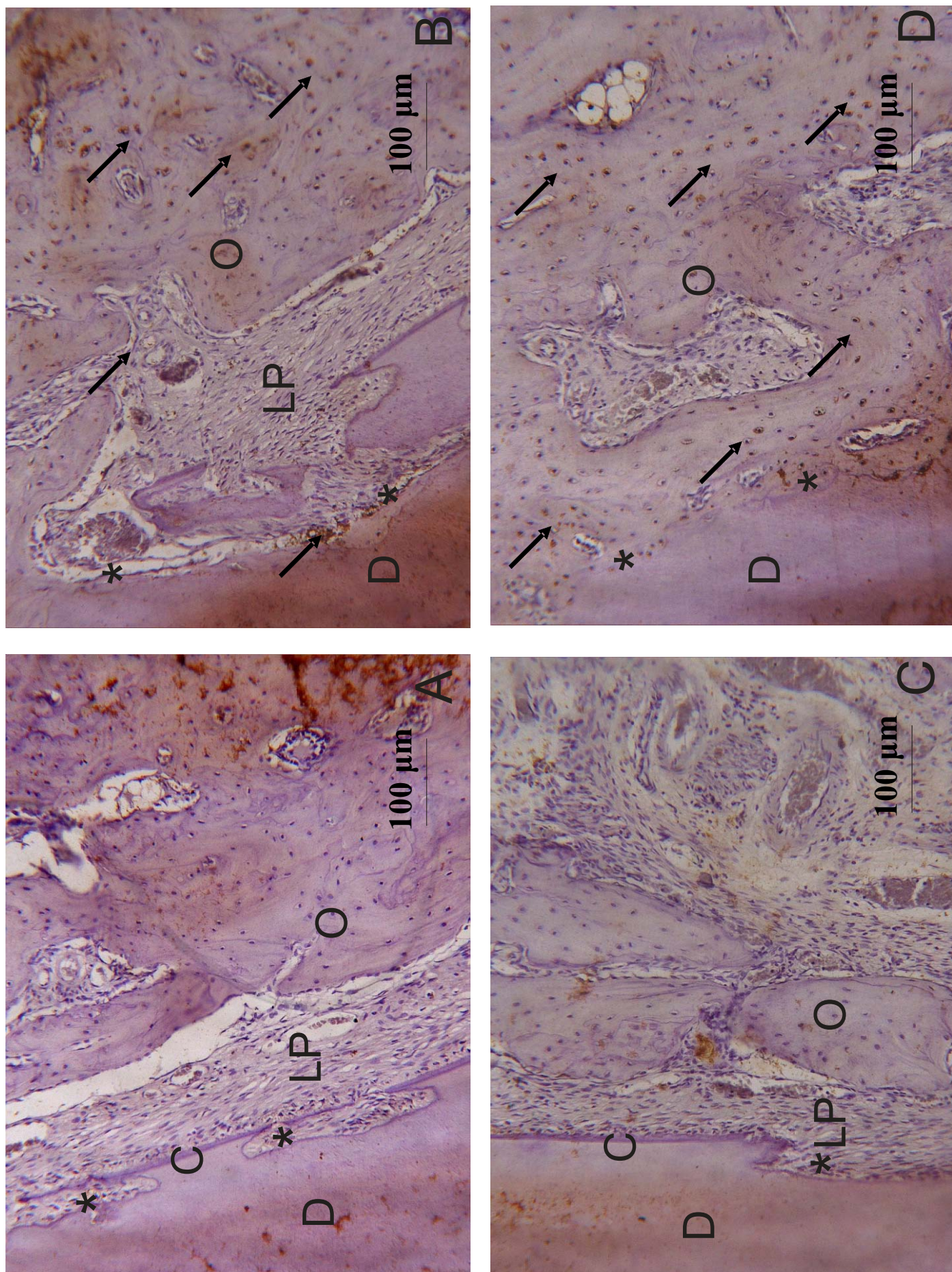


Fig 6- Grupo II - Reimplante tardio sem tratamento - 60 dias - A) Controle B) OPG C) RANK e D) RANKL - Terço médio - Aumento 20X. Dentina (D); Cimento (C); Ligamento Periodontal (LP); Osso alveolar (O). Imunomarcações (setas). Reabsorções radiculares representadas por asteriscos. (*)

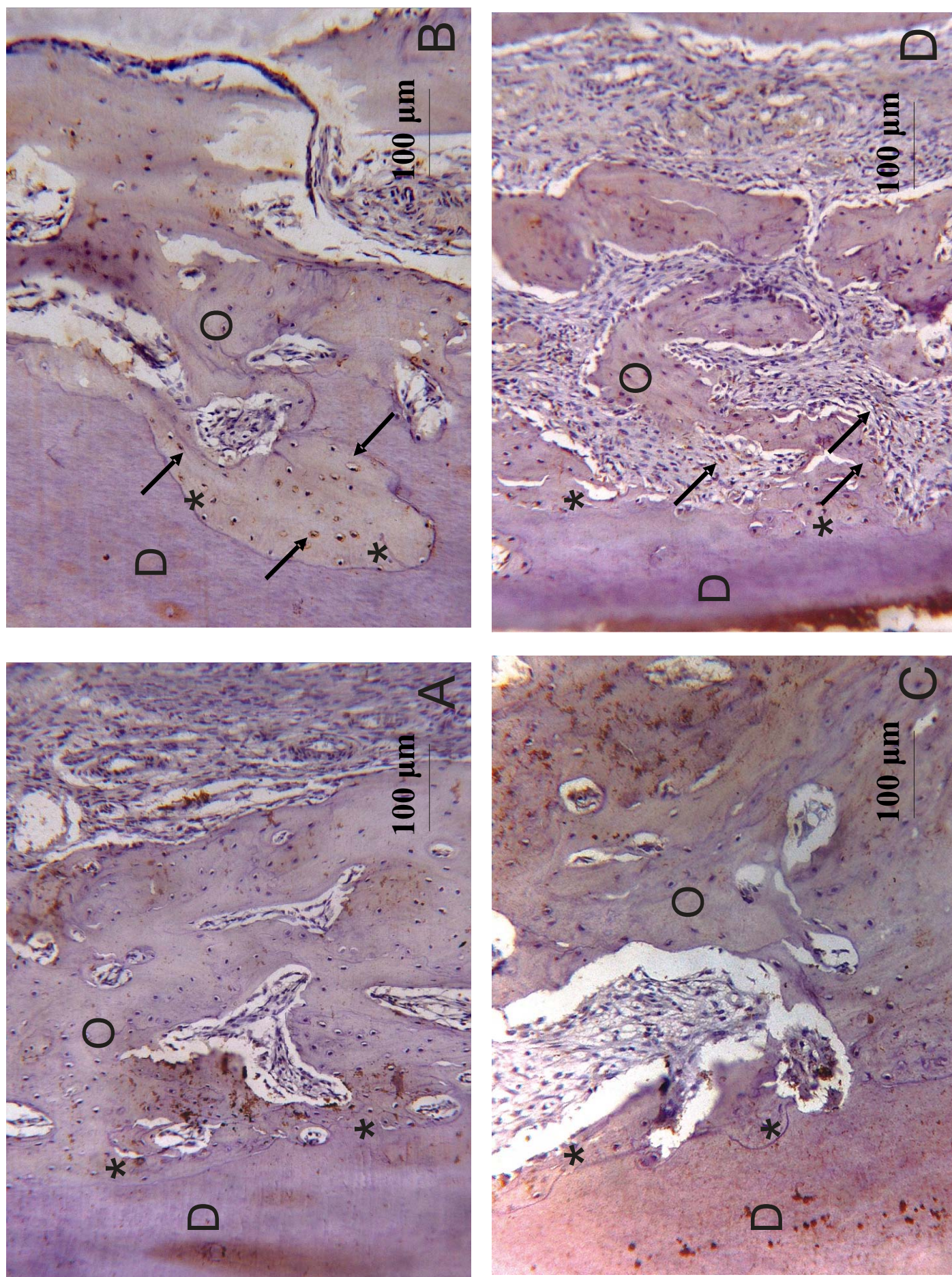


Fig 7 - Grupo III - Reimplante tardio com tratamento - 60 dias - A) Controle B) OPG C) RANK e D) RANKL - Terço médio - Aumento 20X. Dentina (D); Ligamento Periodontal (LP); Osso alveolar (O). Imunomarcações (setas). Reabsorções radiculares representadas por asteriscos. (*)



Anexas

ANEXO A - Autorização do Comitê de Ética em Pesquisa - FOA -UNESP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba

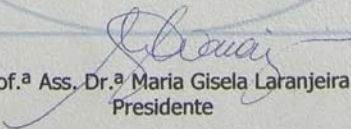


COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS OPG, RANK E RANKL EM DENTES REIMPLANTADOS DE RATOS" sob responsabilidade de WILSON ROBERTO POI, THAÍS MARA MANFRIM E ROBERTA OKAMOTO está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em reunião de 26 de abril de 2005, de acordo com o protocolo nº 50/05.

Araçatuba, 26 de abril de 2005.



Prof.ª Ass. Dr.ª Maria Gisela Laranjeira
Presidente

ANEXO B – PROTOCOLO DE IMUNOÍSTOQUÍMICA – TÉCNICA DA IMUNOPEROXIDASE (www.erviegas.com.br)

1º dia: começar os 2 dias no mesmo horário

- a- colocar as lâminas na estufa a 60° por 15 minutos para amolecer a parafina
- b- colocar as lâminas na grade:
 - 1- Passar no Xilol 1, 2, 3 (5 minutos cada)
 - 2- Passar no Álcool absoluto 1, 2, 3 (2 minutos cada)
 - 3- Passar no Álcool 70% por 2 minutos (hidrata)
 - 4- Lavar em PBS: 3 banhos de 1,5 minutos cada (5 minutos no total)

PBS com Triton – para lavar (pode usar os mesmos frascos, só lavar com água corrente entre as trocas)

PBS sem Triton – para diluir o anticorpo

- c- H₂O₂ a 30% (20mL) em 180mL de PBS sem Triton (a solução final fica a 3%). Fazer esta solução e deixar e deixar as lâminas por 45 minutos, no escuro, para não perder a ação (diminuir a atividade da peroxidase). Para deixar no escuro, cobrir com um tupperware de cor opaca.
- d- Lavar com PBS + Triton por 5 minutos – 3 banhos de 1,5 minuto
- e- Tampão citrato (preparar na hora). Não precisa ser no escuro. Aquecer antes, até atingir 95-100°. Então colocar as lâminas e deixar por 20 minutos. Depois deixar 20 minutos esfriando na bancada.
- f- Não lavar as lâminas aqui. Ir para a etapa do leite mólico.
- g- Colocar as lâminas no leite mólico desnatado. Preparar na hora. O leite tem muita avidina que consome a biotina endógena. **Preparo:** Misturar 8g de leite em pó com 200mL de H₂O destilada. Agitar sem medir o pH e deixar as lâminas por 20 minutos.
- h- Não lavar, só secar com papel filtro. Delimitar com caneta, o corte.
- i- Pipetar em cima do corte 50 ou 100µL de anticorpo primário. **Preparo do PBS.BSA a 0,1%:** Para obtermos BSA 0,1%, coloca-se 0,1 g de BSA em 100 mL de PSB sem Triton. Então para 30mL de PBS sem Triton coloco 0,03g de BSA. **Diluição do anticorpo primário com PBS.BSA 0,1%:** Começo sempre da menor concentração:
 - 1:50
 - 1:100

- 1:200
- 1:400
- 1:500 (padronizar)

Um exemplo: 1:50 = 10 μ L de anticorpo + 490 μ L PBS.BSA 0,1%. Isto corresponde a 20 μ L de anticorpo primário + 980 μ L de PBS.BSA 0,1%.

Para fazer este cálculo faço o seguinte: 1:50 = 1000:50 = 20 μ L. Esta será a quantidade de anticorpo para o restante de PBS.BSA. Ou seja, o que falta para completar 1mL (980 μ L). Depois de feito isso, calculo o total de lâminas e quanto de cada anticorpo vou pipetar nos cortes, para saber qto de anticorpo diluído vou precisar (ex: se para cada corte gasto 50 μ L, qdo tiver 10 cortes, gastarei 500 μ L).

- j- Repousar em geladeira (ou ambiente) por 18hs, dentro de um suporte fechado com tampa.

2º dia: começar os 2 dias no mesmo horário

Observações: Controles + e -. Lavar sempre em potes separados para não contaminar com anticorpo as lâminas que estão sem anticorpo.

- Para cada reação (independente do número de lâminas e cortes) eu corro 3 lâminas separadas. Ex: 10 lâminas minhas que serão o controle positivo, ou seja, receberão anticorpo. Mais: 1 lâmina minha sem anticorpo (controle negativo), uma lâmina com tumor e anticorpo (controle positivo) e uma lâmina com tumor e sem anticorpo (controle negativo).

- a- Lavar as lâminas em PBS com Triton por 5 minutos (2,5 minutos cada)
- b- Secar as lâminas com papel filtro ou lenço de papel e colocar no porta lâminas
- c- Pipetar o anticorpo secundário já diluído = 50 μ L. A diluição vem descrita na bula.
- d- Deixar 1 hora em temperatura ambiente. Depois lavar por 5 minutos em PBS + Triton (3 vezes de 1,5 minuto, com total de 5 minutos).
- e- Depois de 15 minutos (faltando 45 minutos para completar 1 hora) já preparo o complexo. **Preparo do complexo para 20 lâminas:** Ver no kit. Geralmente são 3 soluções A + B + C (anticorpo). Pegar 10 μ L A + 10 μ L B + 1680 μ L de PBS.BSA. Pipetar o complexo sobre os cortes e deixar

por 45 minutos. A quantidade de pipetagem é a mesma para os cortes. Desde o início ao fim.

- f- Lavar 5 minutos em PBS + Triton. Não secar.
- g- Aplicar a DAB (1mL de substrato + 1 gota de DAB) para 20 lâminas. Fica cor de laranja. Esta deve ser preparada na hora. Aplicar 50 µL de cromógeno na “câmara escura” por 5 minutos.
- h- Lavar em H₂O destilada – colocar em cuba com água para paralisar a reação e pode corar imediatamente.
- i- Corar só com Hematoxilina sem Eosina, pela técnica convencional com os tempos normais para HE. Após a Hematoxilina, lava por 10 mins em água corrente, depois já passa pelos álcoois e xilol, e monta as lâminas.

Reconstituição do anticorpo secundário: Coloco 1mL de água destilada. Para calcular quanto dele uso (diluição), vejo na bula que recomenda: 2-10 µL/mL.

Se pretendo usar 1:200, vou analisar se está dentro da faixa recomendada.

Pego a quantidade total de pó que reconstitui (1,5mg) e divido pela diluição que quero: 200. Então, $1,5\text{mg}:200 = 0,0075\text{mg}$ em 1mL. Ou seja, 7,5 µg/mL.

PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TAMPÃO PARA IMUNO:

Tampão Fosfato Salino (PBS) – pH 7.2 a 7.4

1 Litro de água destilada

1,38g NaH₂PO₄.H₂O (fosfato monobásico de sódio monohidrato)

6,96g K₂HPO₄

7,2g NaCl (cloreto de sódio)

Conferir o pH

Para facilitar, preparar concentrado 10 vezes e diluir no momento do uso.

PBS + Triton

Para cada litro de PBS, adicionar 1mL de triton

H₂O₂ 3%

180mL de PBS sem triton

20mL de H₂O₂ 30% (estoque)

Tampão Fosfato-Citrato – pH 6.0

200mL de água destilada

1,42g de fosfato dibásico de sódio anidro

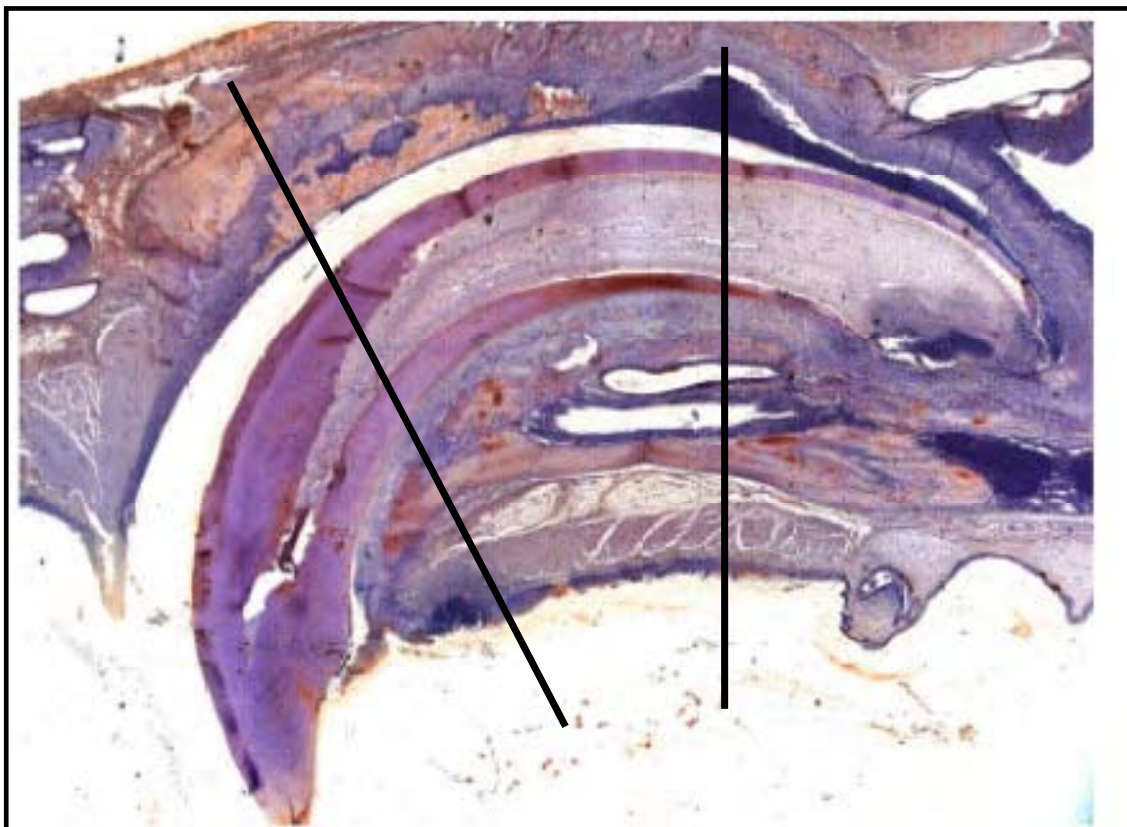
0,96g de ácido cítrico

Conferir o pH

Este tampão deve começar a ser aquecido enquanto as lâminas estiverem na água oxigenada, para que no momento da incubação a solução tenha atingido a temperatura ideal.

Todas as soluções, exceto o PBS, devem ser preparadas no momento do uso. Os reagentes podem ser previamente pesados e armazenados na quantidade certa.

ANEXO C – Demarcação do terço médio no dente de rato para análise dos resultados.



ANEXO D – Ilustração do Material e Método

	
Fig. 1 – Aferição do peso do animal.	Fig. 2 – Anestesia intra-muscular.
	
Fig. 3– Anti-sepsia com polivinilpirrolidona iodada.	Fig. 4– Sindesmotomia e luxação do incisivo superior direito.
	
Fig. 5 – Extração do incisivo superior direito.	Fig. 6 Dente extraído.



Fig. 7 – Dentes extraídos fixados em cera utilidade.



Fig. 8- Remoção da papila dentária e do órgão do esmalte com auxílio de lâmina de bisturi no. 15.



Fig. 9 - Pulpectomia, por via retrógrada, com lima tipo Hedstron no. 35.



Fig. 10 – Irrigação do canal radicular com soro fisiológico.



Fig. 11- Remoção mecânica do ligamento periodontal remanescente com lâmina no.15.



Fig.12 – Dente imerso em solução de fluoreto de sódio fosfato acidulado a 2%.



Fig. 13 – Irrigação com soro fisiológico.



Fig. 14 – Secagem do canal radicular com cone de papel absorvente.



Fig.15– Pasta de hidróxido de cálcio em tubete e propilenoglicol em tubete.



Fig.16 – Preenchimento do canal radicular com pasta de hidróxido de cálcio.



Fig.17– Reimplante Dentário



Fig.18 – Antibiótico utilizado.

ANEXO E – Normas para publicação

ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

Jornal Multidisciplinar de Ciência Oral e Craniofacial

Submissões

Solicitam-se aos autores submeter o artigo original e as figuras online via Gerente Editorial [substitua por EES]. O EES é um serviço disponibilizado pela web para submissão e revisão dos artigos. Os autores podem submeter os manuscritos e acompanhar o progresso da avaliação para publicação. Revisores podem fazer download dos artigos e enviar suas opiniões para o editor. Os editores podem gerenciar toda a submissão, revisão, ou processo de publicação.

Por favor registre neste endereço: <http://ees.elsevier.com/aob>

Editores-chefe:

Dr G R Holland and Professor P M Speight

c/o Libby Calvert, Administrative Editor, *Archives of Oral Biology*, Elsevier, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK. Tel: +44 (0)1865 843418; fax: +44 (0)1865 843992; Email: AOB@elsevier.com.

A submissão de um artigo implica que este manuscrito não tenha sido publicado previamente, ou considerado para publicação em outro lugar, e se aceito não deverá ser publicado em nenhum lugar sem o consentimento informado do autor, em inglês ou qualquer outro idioma. Cada artigo deve vir acompanhado por uma declaração assinada pelo autor correspondente de que o manuscrito foi lido e aprovado pelos demais autores. Autores devem fornecer detalhes de artigos correlatos em submissão ou recentemente publicados em outro lugar.

Se há relatos no artigo de experimentos ou observações em animais ou em humanos um parágrafo deve ser incluído na carta de submissão indicando que o protocolo foi examinado e aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição.

Convidamos os autores a sugerir três ou mais nomes adequados para revisão. O endereço completo e e-mail devem ser incluídos. Os editores podem ou não, utilizar as sugestões dos revisores.

Padrões Científicos

O objetivo dos editores e revisores é manter um alto padrão de comunicação científica. Normalmente os artigos são acessados por dois revisores selecionados pelo Editor, e as decisões com relação à aceitação da revista são baseadas nas orientações dos revisores. Quando apropriado, as considerações dos revisores são encaminhadas aos autores para apreciação. Os autores podem ocasionalmente considerar as sugestões dos revisores mal concebidas, mas se o texto foi mal entendido pelos revisores provavelmente será mal entendido pelos leitores também.

Tipo de Contribuições

Artigos originais e artigos de revisão são bem-vindos. Não haverá diferença com base na extensão do artigo, ou seja, comunicação longa ou curta. Todas as submissões devem ser revisadas. Revisões podem ser submetidas em esboço antes da submissão do artigo completo.

Preparo do Artigo

Os artigos devem ser concisos tanto quanto for possível e, em vista da característica internacional da revista, o uso do inglês pode apresentar dificuldades aos leitores cujo primeiro idioma não é o inglês. As ortografias podem ser usadas em inglês britânico ou americano, mas devem ser consistentes com o artigo. Os autores devem expressar seus próprios achados no tempo passado e usar tempo presente quando a referência citada é feita a um conhecimento existente, ou onde o autor está declarando o que é conhecido ou concluído. Artigos originais devem seguir o seguinte padrão: Introdução, Materiais e Métodos, Resultados ou Achados, Discussão.

Autores poderão receber bastante assistência consultando o livro: Edward J. Huth, *Scientific Style and Format* (Sixth Edition). The Council of Biology Editors Manual for Authors, Editors and Publishers, Cambridge.

Os Editores reservam o direito de revisar a linguagem dos artigos sob os interesses dos padrões de clareza e concisão da revista.

Geral

Manuscritos devem estar em formato Word for Windows (preferencialmente no formato Word), espaço duplo com margens largas e tamanho de fonte 12 ou 10 pt. Para submissões em disco rígido (disquete, CD), boa qualidade das impressões são necessárias. O autor para correspondência deve ser identificado (incluindo um número de fax e endereço de e-mail). Os endereços completos para

correspondência dos co-autores devem ser fornecidos. Por favor verifique o estilo corrente do jornal, particularmente o estilo de referência (norma Vancouver), e evite excessiva estilização do layout, a maioria dos códigos serão removidos ou substituídos durante o processamento do seu artigo. Em adição, não use opções do word como separação de sílabas automática, texto justificado, colunas duplas ou numeração automática dos parágrafos (especialmente para referências numeradas). Os editores reservam o direito de adequar o texto a determinados padrões de estilo e uniformidade. Os autores devem guardar cópias de todas as versões do manuscrito submetidas à revista. Os autores são especialmente solicitados para serem vigilantes sobre o processo de submissão da versão correta do manuscrito durante os vários estágios do processo editorial.

Texto

Siga esta ordem quando digitar o manuscrito: Título, Autores, Afiliações, Resumo, Palavras-chave, Texto principal, Agradecimentos, Apêndice, Referências, Currículos, Legendas e então Tabelas. Não insira figuras ou tabelas dentro do texto. O autor para correspondência deve ser identificado com um asterisco e nota de rodapé. Todas as outras notas de rodapé devem ser identificadas (exceto notas de rodapé para as tabelas) devem ser identificadas com números arábicos superscritos.

Página do Título

Como os títulos freqüentemente permanecem sozinhos nos índices, revistas bibliográficas, etc., e a indexação dos artigos estão, de uma maneira geral, se tornando computadorizada a partir de palavras-chave no título, é importante que os títulos sejam concisos e informativos tanto quanto possível. Assim, a espécie animal a qual as observações se referem devem sempre ser dadas e é indicado o tipo de método em que as observações são baseadas, por exemplo, químico, bacteriológico, microscopia eletrônica ou histoquímica, etc. Um “título rápido” com não mais de 40 letras e espaços deve ser fornecido. Um índice de palavras-chave deve ser fornecido para cada artigo.

Resumos estruturados

O artigo deve ter como prefácio um resumo com objetivo de dar uma idéia do trabalho inteiro em miniatura. Resumos não devem ser mais longos que 250 palavras e devem ser estruturados de acordo com os manuais publicados no Journal of the American Medical Association (JAMA 1995;273: 27-34). Em resumo, o resumo deve ser dividido em seções incluindo os seguintes itens: (1) Objetivo; (2) Tipo –se o trabalho é laboratorial ou de campo, seleção de pacientes, detalhes da intervenção, medidas de resultados, etc.; se é pesquisa laboratorial incluir detalhes do método; (3) Resultados; (4) Conclusões.

Recebimento/Datas da Aceitação

A data de recebimento será adicionada a todos os artigos quando forem recebidas pelo Editor. A data de aceite será também adicionada quando os artigos forem recebidos no escritório de publicação.

Introdução

Deve ser uma declaração sucinta do problema investigado dentro do contexto com uma breve revisão da literatura relevante.

A literatura diretamente relevante para qualquer inferência ou argumentos apresentados na discussão deve em geral ser reservada para esta seção. A introdução deve ser concluída com a razão da realização do trabalho, mas não deverá revelar o que foi feito ou os achados.

Materiais e Métodos

Detalhe suficiente deve ser fornecido aqui a fim de que outro pesquisador possa repetir exatamente os procedimentos. Quando os materiais e métodos forem exatamente iguais a um artigo prévio, não é necessário repetir todos os detalhes, mas deve haver informação o suficiente para que o leitor compreenda o que foi feito sem ter que consultar o trabalho anterior. Solicita-se aos autores esclarecer que as condições do experimento animal foram humanas; por exemplo, o tipo da anestesia e sacrifício deve ser especificado. Na experimentação em humanos, os autores devem falar brevemente que os pacientes receberam consentimento informado e esclarecido, e preferencialmente. O trabalho deve ter sido aprovado por um comitê de ética apropriado.

Resultados ou achados

Devem ser claros e concisos. Deve-se tomar cuidado para evitar delinear inferências que pertencem à discussão. Os dados devem ser apresentados em formulários como histogramas ou tabelas, mas em vista da questão de espaço, a apresentação do mesmo dado em mais de um formulário é inaceitável.

É geralmente necessário analisar os resultados numéricos estatisticamente. Uma declaração dos números, seu valor médio e algumas medidas apropriadas da sua variabilidade são geralmente suficientes. O método de análise seguido deve ser indicado. A declaração da diferença entre os valores médios de dois grupos de dados é estatisticamente significativa, deve fornecer o nível provável colocado como significativo pelo pesquisador e indicar o teste estatístico usado. Não é suficiente citar o uso de um pacote estatístico sem nomear os testes utilizados.

Discussão

Esta seção apresenta inferências delineadas a partir dos resultados: estes devem ser recapitulados somente para tornar o argumento claro.

Agradecimentos

Quando for apropriado.

Referências:

Todos os manuscritos devem usar a norma 'Vancouver' para as referências, as quais devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que são citadas pela primeira vez no texto e listadas ao final do artigo.

Para referências de revistas, todos os autores devem ser incluídos quando forem seis ou menos (os seis primeiros seguidos "et al." quando houver sete ou mais) acompanhados pelo título do artigo, nome do jornal abreviado de acordo com os padrões British Standard 4148: 1975, ano, volume, e primeira e última páginas.

Exemplo:

1. Dezan CC, Nicolau J, Souza DN, Walter LRF. Flow rate, amylase activity, and protein and sialic acid concentrations of saliva from children aged 18, 30 and 42 months attending a baby clinic.

Arch. Oral Biol 2002; **47**: 423-427

Para referências de livros, os autor(es) devem ser seguidos pelo título do capítulo (se apropriado), editor (aplicável ou não), título do livro, local de publicação, editora, ano e número de páginas. Por exemplo:

2. Gorlin RJ, Pindborg JJ, Cohen MM Jr. Syndromes of the Head and Neck, 2nd Edition. New York: McGraw-Hill, 1976.

Artigos no decurso da publicação não devem ser inscritas nas referências se o artigo foi aceito por uma revista, e então acrescentar no texto e na lista de referências com as palavras "In press" acompanhado do nome do jornal.

Unidades e Símbolos

Em geral, *Archives of Oral Biology* irá usar as unidades e símbolos do recomendado sistema internacional de medidas (SI). O uso do litro, geralmente melhor escrito por extenso, ao invés de SI dm³ e ml³ no lugar de SI cm, continuará sendo aceito. Para detalhes dos símbolos SI, os autores podem consultar o: Symbols, Signs and Abbreviations (1969) by the Royal Society of Metric and Decimal Systems in Council of Biology Editors Style Manual (1978) 4th edn, publicado pela Council of Biology Editors Inc. Unidades da atividade enzimática devem ser claramente definidas, preferencialmente usando unidades do sistema SI. A força centrífuga deve ser descrita em múltiplos de g, ao invés de rev/min.

Unidades e abreviações

Os *Archives of Oral Biology* é um jornal com um grupo de leitores multidisciplinar, abreviações, exceto aquelas compreendidas universalmente como mm, g, min. u.v., w/v e aquelas listadas abaixo devem ser evitadas se possível. Exemplos de abreviações podem talvez serem usadas sem definição:

ADP,

AMP,

ATP

DEAE-cellulose

DNA,

RNA

EDTA

EMG

tris

Outras abreviações usadas para melhorar a legibilidade devem estar listadas como nota de rodapé na página do título.

Símbolos químicos devem ser usados para elementos, grupos e compostos simples, mas o uso excessivo deve ser evitado. Abreviações diferentes das citadas acima não devem ser usadas nos títulos.

Nomenclatura das bactérias. Os organismos devem ser citados pelos seus nomes científicos de acordo com o sistema binômio. Quando mencionado pela primeira vez deve ser o nome completo deve ser digitado, sublinhado e grifado em itálico. Depois o gênero deve ser abreviado para a sua letra inicial, exemplo: '*S. aureus*' e não '*Staph. aureus*'. Se a abreviação pode causar confusão ou tornar o significado pretendido não claro, os nomes completos dos micróbios devem ser citados por extenso. Somente aqueles nomes que foram incluídos na Lista Aprovada de Nomes Bacteriológicos, *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420 e aqueles que foram validados e publicados no *Int J Syst Bacteriol* since 1 January 1980 possuem nomenclatura reconhecida. Se há uma boa razão para usar um nome que não está na nomenclatura, estes nomes devem estar entre aspas e uma justificativa apropriada deve ser feita no texto. (por exemplo veja em *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 547-556). Quando o gene sozinho é

usado como substantivo ou adjetivo, use letra minúscula (caixa baixa) sem ser sublinhada, por exemplo, 'organismos eram estafilococcus' e 'infecção por estreptococcus'. Se o gênero for citado especificamente (sublinhe) por exemplo 'organismos do gênero Estafilococcus'. Para gênero no plural, use caixa baixa, por exemplo 'salmonellae'; plurais podem ser anglicizados. Para nomes triviais, use caixa baixa, por exemplo 'meningococcus'.

Números, medidas e estatísticas. Números de um a nove são digitados por extenso a não ser que eles representem medidas (unless they are measurements) (e.g. 5mL). Números maiores que nove são digitados por extenso quando iniciarem uma frase, ou quando exigirem clareza. Números acima ou igual a 10 000 possuem um espaço, não uma vírgula. Um ponto decimal é precedido por um número ou cifra e.g. '0.5'. Pontos decimais em colunas devem ser alinhados verticalmente. Datas são geralmente digitadas completamente: 14 April 1949. Medidas devem ser expressas pelo SI ou unidades não-métricas.

Use 10 ml/h ao invés de -1 (or per).

Abreviações. Use letras maiúsculas para: MIC, MBC, WBC, RBC, DNA, RNA, Grupo A, B etc. para antigênicos ou outros grupos, PHLS, CDSC, CDC, WHO, CSF, MSU, EMU, CSU. Use cfu, pfu, mm, m, min, h, in, ft, g, kg, mL, L, im, iv, iu, P(probabilidade). Use sp. e spp. (espécies, singular e plural). Use pigmentação de Gram e bacilo Gram-negativo. Use in-vitro (adjetivo) mas in vitro (advérbio), post-mortem (com hífen - adjetivo) mas post mortem (sem hífen - advérbio). Ortografia. Use ortografia britânica: Haemophilus, haematology, paediatrics, leucocyte, leukaemia, bacteraemia, sulphonamides, aetiology; but note neutropenia, fetal. Por favor note que o jornal usa ortografia britânica (UK 'z' spelling - e.g., colonizes).

Drogas. Estas devem ser citadas pelos seus nomes aprovados e não pelos nomes comerciais, para orientação veja o Formulário Nacional Britânico

Nomes Comerciais

Tanto quanto possível, nomes próprios devem ser usados ao invés dos nomes comerciais. Onde é desejável indicar uma marca particular de preparações, o nome comercial e fonte devem ser indicado em dentro de parênteses depois nome próprio, por exemplo Testicular hyaluronidase (Testovase, Bovine Enterprises Ltd, 327 Farm Road, London E23)

Ilustrações

Na submissão inicial online e na fase de revisão, os autores são obrigados a providenciar versões eletrônicas das figuras. Quando o artigo for aceito, os autores tem que estar preparados para fornecer todas as ilustrações em versão eletrônica e fotográfica, (apropriado para reprodução, o que pode incluir redução, sem retoques).

A ferramenta de controle de qualidade de arte está agora disponível aos usuários do sistema de submissão online. Para ajudar os autores a enviarem ilustrações de alta qualidade logo no início do processo, esta ferramenta checka a arte submetida e outros tipos de contra as exigências delineadas nas instruções aos autores disponíveis no endereço www.elsevier.com/arkworkinstructions. A ferramenta de controle de qualidade checka a arte das figuras quando elas são enviadas pela primeira vez. Cada arquivo/figura é checado somente uma vez, então somente novos arquivos submetidos serão checados.

Geral: Informação relacionada aos formatos da revista para a Arte e Ilustrações podem ser encontradas no endereço www.elsevier.com/authors. Fotografias, cartas e diagramas devem ser nomeados como Figuras(s) e devem ser numeradas consecutivamente em ordem em que são citadas no texto. Elas devem acompanhar o manuscrito e não serem incluídas dentro do texto. Todas as cópias das ilustrações devem ser marcadas claramente no verso da figura com o número da mesma e nome do autor. Todas as figures devem possuir legenda. As legendas podem ser resumidas em um arquivo separado.

Desenhos: Todas as letras, linhas de gráficos e pontos nos gráficos podem ser largas o suficiente e em negrito para permitir a reprodução quando o diagram for reduzido para um tamanho adequado para a inclusão no jornal. (Dye-line) impresses ou xérox não são adequadas para reprodução. Não use nenhum tipo de sombra nas ilustrações modificadas no computador.

Fotografias: Fotografias originais devem ser fornecidas da maneira como serão reproduzidas (por exemplo: em preto e branco ou colorida). Se necessário, uma escala deve marcar a fotografia. Por favor note que xérox das fotografias não serão aceitas.

Cores: Certas ilustrações serão aprovadas para publicação coloridas mas somente se na opinião do Editor, seja conveniente que as figures não apareçam monocromáticas.

Por favor observe que se as figures forem fornecidas em cores, elas irão automaticamente estar disponíveis online em cores sem carga (taxa) (at no extra charge), mesmo se a versão da impressão é monocromática

Tabelas: Tabelas devem ser numeradas consecutivamente e devem possuir uma legenda adequada, sendo digitadas em um arquivo separado do texto. Notas de rodapé devem ser digitadas abaixo da

tabela e devem ser citadas por letras minúsculas superscritas. Linhas verticais não devem ser usadas. Tabelas não devem duplicar resultados presentes em qualquer lugar do manuscrito. (por exemplo, em gráficos).

Aceitação

Após a aceitação do trabalho, poderemos solicitar aos autores providenciar versões eletrônicas ou em CD (disquete) do artigo e das figuras. A cópia eletrônica, no disquete, CD-ROM ou ZIP, deve corresponder exatamente ao artigo, assim sempre manteremos um backup do arquivo eletrônico para referência e por segurança. Detalhes completos da submissão e formatos podem ser obtidos no endereço www.elsevier.com/authors.

Submissões em disco rígido

Os autores devem submeter uma cópia eletrônica da versão final do artigo. A cópia eletrônica deve corresponder exatamente ao conteúdo do disco rígido. Sempre mantenha uma cópia backup do arquivo eletrônico para referência e segurança. Detalhes completos da submissão e formatos podem ser obtidos nos Serviços para os Autores em Elsevier.

Provas

As provas serão enviadas ao autor (o primeiro autor nomeado se nenhum outro for identificado como autor para correspondência) em PDF quando possível e deve ser devolvido dentro de 48 horas do recebimento, preferencialmente por e-mail. Correções podem estar restritas a erros de digitação; qualquer outras alterações feitas serão cobradas dos autores. Qualquer questões devem ser respondidas por completo. A Elsevier fará tudo que for possível para publicar seu artigo corrigido o mais rápido possível. Portanto, é importante garantir que todas as suas correções foram encaminhadas a nós via e-mail ou fax. Correções adicionais subsequentes não serão possível, então por favor certifique-se que a sua primeira comunicação está completa. Se preferir enviar suas correções pelo correio, por favor responda para os seguinte endereço: Log-in Department, Elsevier, Stover Court, Bampfylde Street, Exeter, Devon EX1 2AH, UK.

Offprints

Vinte cópias serão fornecidas livres de cobrança. Cópias da edição poderão ser pedidas numa taxa especial usando o formulário enviado para o autor para correspondência após o manuscrito ter sido aceito. Pedidos realizados tardiamente (após a publicação) para Twenty-five offprints will be supplied free of charge. Offprints and copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted. Orders placed late (after publication) for reimpressões irão incorrer em cobrança adicional de 50%.

Direitos Autorais

Todos os autores devem assinar o acordo de “Transferência de Direitos Autorais” antes que o artigo possa ser publicado. Esse acordo de transferência habilita a Elsevier Ltd na proteção dos direitos autorais do material para os autores, mas não renuncia aos direitos de propriedade dos autores. A transferência dos direitos cobre a exclusividade de reproduzir e distribuir o artigo, incluindo reimpressões, reproduções fotográficas, microfilmes, ou qualquer outra forma de reprodução de natureza similar e traduções.

Inclui o direito de adaptar o artigo para uso em conjunção com sistemas de computadores e programas, incluindo reprodução da publicação em máquinas de forma legível e incorporação em sistemas de recuperação. Autores são responsáveis pela obtenção dos direitos autorais para reproduzir qualquer figura para as quais existem direitos autorais.

Informações para os autores

Para informações relacionadas à submissão dos artigos (incluindo submissão eletrônica quando disponível) por favor visite o site www.elsevier.com/authors. Este website fornece informações na submissão dos artigos bem como guia detalhado da arte (figures), orientações, informação dos direitos autorais, perguntas mais freqüentes e mais.

Detalhes de contato para questões após a aceitação de um artigo, especialmente aqueles relacionado às provas, serão fornecidos após registro do artigo para publicação.

Autorizo a reprodução deste trabalho.
Araçatuba, 10 de dezembro de 2007.

Thais Mara Manfrin