

Cassiano Costa Silva Pereira

**Análise do processo de reparo alveolar em
ratos espontaneamente hipertensos (SHR)
não tratados e tratados com losartan.
Estudo imunoistoquímico e
histomorfométrico.**

Araçatuba

2013

Cassiano Costa Silva Pereira

**Análise do processo de reparo alveolar em
ratos espontaneamente hipertensos (SHR)
não tratados e tratados com losartan.
Estudo imunoistoquímico e
histomorfométrico.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do
Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, para a obtenção do
Título de DOUTOR EM ODONTOLOGIA – área de
concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-
Maxilo-Facial.

Orientadora: Prof. Dra. Roberta Okamoto

Co-orientadora: Prof. Dra. Cristina Antoniali Silva

Araçatuba

2013

Dados Curriculares

Cassiano Costa Silva Pereira

Nascimento 03/09/1979 – Ipaussu/SP

Filiação Joaquim Silva Pereira

Alice Terezinha da Costa Pereira

2000 – 2003 Graduação em Odontologia - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

2004 – 2007 Residência em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial – Hospital Policlin – São José dos Campos/SP *filiação* ao Colégio Brasileiro de CTBMF/CFO (Especialização “Latu sensu”).

2008 – 2010 Mestrado em Odontologia - “Strictu sensu” - (Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

2008 – 2010 Especialização em Implantodontia - “Latu sensu” - FAISA – Sarandi/PR.

2010 – 2013 Doutorado em Odontologia - “Strictu sensu” - (Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

Dedicatória

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Joaquim e Alice**,

por mais essa etapa concluída, vocês foram fundamentais, assim como em toda minha caminhada. Pelo amor, paciência, carinho e dedicação de uma vida. Tudo que sou, devo a vocês. Obrigado.

A minha esposa **Patrícia**,

que me acompanha nesse longo caminho desde a graduação. Seu apoio nesse planejamento de 10 anos foi imprescindível. Cresço ao seu lado a cada dia, meu exemplo de caráter e conduta. Amor e admiração infinitos. Agradeço a Deus por ter te encontrado.

Ao meu irmão **Danilo**,

que apesar da distância sempre esteve ao meu lado. Saiba que me espelho em sua dignidade, honestidade e hombridade. Tenho orgulho de ser seu irmão.

Agradecimentos especiais

Agradecimentos especiais

À Deus,

por iluminar meu caminho e ter tornado tudo isso possível. Sou infinitamente grato pelas pessoas que o Senhor colocou em meu caminho e pelas experiências boas e ruins aos quais foram fundamentais no aprendizado. Obrigado pelas oportunidades de exercitar a humildade, fé e dignidade.

À Profa. Roberta Okamoto,

pela paciência, sabedoria e tranquilidade com que conduziu a orientação nesses 5 anos de convivência. Muitos foram os momentos difíceis no pessoal e profissional, mas saiba que isso jamais influenciou negativamente em qualquer aspecto. Aprendi muito com a Sra. e com certeza é, e será, meu exemplo de como exercer a docência. Obrigado.

Ao Prof. Idelmo,

por me acompanhar desde a Graduação e orientar de maneira tranquila, transparente e honesta pelos caminhos da Cirurgia. Considero-o mais que um mestre...és um amigo! Encerro meus trabalhos em Araçatuba, por ora, e sigo meu caminho com a certeza de que posso contar com o Sr.! Espero ter correspondido à confiança que sempre depositou em mim. Obrigado!

Ao **Prof. Élio Shinohara,**

Você é um exemplo de profissional que ama o que faz e transmite isso para quem está a sua volta! Agradeço a Deus pela oportunidade de ter sido seu estagiário no Conjunto Hospitalar do Mandaqui SUS/SP e a partir disso, termos construído essa amizade verdadeira. Você me ensinou, sem perceber, o que é humildade, respeito e caráter. Fico feliz com suas conquistas. Obrigado!

A amiga **Natália Manrique,**

Esse trabalho não seria viabilizado sem sua imensa ajuda em cada etapa de confecção. Você é uma pessoa maravilhosa que Deus colocou em meu caminho. Educada, honesta, companheira, bem humorada e estudiosa. Admiro seu empenho e lhe digo que com esse perfil “não tem como dar errado”. Com certeza coisas boas a aguardam no futuro. Obrigado!

Ao amigo **Abrahão Cavalcante,**

Pela confiança, respeito e irmandade construída nesse período de Pós-Graduação e pelos bons momentos compartilhados em Araçatuba. Torço por você parceiro e tenho certeza que construímos uma sólida amizade.

Agradecimentos

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, nas pessoas de sua Diretora Profa. Dra. Adj. **Ana Maria Pires Soubhia** e Vice-Diretor Prof. Dr. Tit. **Wilson Roberto Poi**, pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, nas pessoas de sua Coordenadora Profa. Adj. **Maria José Hitomi Nagata** e Vice-Coordenador Prof. Adj. **Celso Koogi Sonoda**.

À **FAPESP** (*Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*), pela concessão da Bolsa de Doutorado sob o **processo Nº 2010/00173-4**, tornando possível a realização desse projeto.

À **co-orientadora** dessa Tese, **Prof. Dra. Cristina Antoniali Silva**, pela cordialidade com que me recebeu no Dep. de Ciências Básicas e pela precisão e tranquilidade nas orientações. Obrigado.

Ao **Departamento de Ciências Básicas**, na pessoa do Chefe de Depto. Prof. Adj. Cláudio Aparecido Casatti que possibilitou a execução da parte experimental do presente trabalho com adendo especial às disciplinas de Farmacologia e Anatomia.

Ao **Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica**, todos os professores e funcionários que fizeram parte dos meus dias na realização de uma parte desse trabalho.

Ao Prof. Ass. Dr. Edilson Ervolino, da **Disciplina de Histologia e Embriologia**, pela ajuda nas capturas de imagens, bem como na edição das mesmas.

Aos professores da **Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial**, Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior, Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Prof. Dr. Michel Saad Neto pela contribuição em minha formação.

Ao Professor Emérito **Tetuo Okamoto**

Muito obrigado pelo treinamento nas cirurgias experimentais de exodontia de incisivos de ratos e análise de parte desse trabalho. Agradeço pela cordialidade e disponibilidade. Tenho grande admiração pelo exemplo de profissional e de dedicação à pesquisa.

Aos **Servidores do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada**, Cleide Lemes da Silva, Odair Vicente e Paulo Roberto Gratão pela disponibilidade e ajuda durante toda a pós-graduação.

Aos **Servidores do Laboratório de Cirurgia**, Maria Dirce Colli Boatto e Gilmar Martins de Oliveira pela ajuda em diversas etapas da Tese, pelo carinho, paciência, compreensão e agradáveis momentos compartilhados.

Aos **colegas de pós-graduação** em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Ellen, Leonardo, Gabriel, Lamis, Heloísa, Pedro Ivo, Jônatas, Fernando, Elisa, Pamela, Rodolpho, Marcos Heidy, Albanir, Nicolas Homsy, Marta Sallim, Thallita, Jéssica, Paulo Faria e Fernanda Boos pela convivência e amizade.

Ao amigo **Walter Gealh**, pela amizade verdadeira construída e compartilhada nos anos de pós-graduação. És alguém com quem posso contar e a recíproca é verdadeira. Obrigado pelo apoio.

Ao amigo **Igor Beneti**, pela amizade e suporte em minhas vindas a Araçatuba e pela valiosa ajuda em parte desse trabalho. Obrigado.

.

Aos funcionários da Biblioteca desta faculdade, em especial à **Ana Cláudia, Ana Paula, Cláudio, Luzia e Ivone**, que sempre me atenderam com muito profissionalismo, eficiência, paciência e simpatia.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp, **Valéria Zagatto, Cristiane Lui e Lilian Mada** por terem me orientado sempre com cordialidade, paciência e tranquilidade.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Unesp, **Sr. Camilo, Sr. João Batista e Allan** pela disponibilidade em ajudar sempre.

Aos ex-estagiários de Iniciação Científica da Disciplina de Farmacologia **Lourdes e Samuel**, que contribuíram efetivamente para a realização desse trabalho.

Aos alunos do Curso de Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pelo respeito, credibilidade e confiança depositados aos alunos da pós-graduação, permitindo-nos realizar nosso grande sonho de atividade acadêmica.

A todos os **pacientes, pais ou responsáveis**, pela confiança depositada em cada atendimento.

Aos **animais** desse experimento, meu profundo respeito.

Επίγραφε

“Muitas das coisas mais importantes do mundo foram conseguidas por pessoas que continuaram tentando quando parecia não haver mais nenhuma esperança de sucesso.”

Dale Carnegie

Resumo

Pereira CCS. Análise do processo de reparo alveolar em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) não tratados e tratados com losartan. Estudo imunoistoquímico e histomorfométrico. [Tese]. Araçatuba: Unesp – Universidade Estadual Paulista; 2013.

RESUMO

A hipertensão arterial sistêmica é uma condição clínica de etiologia multifatorial, com altos índices de complicações, como doenças cardiovasculares e renais, que tornam essa entidade um dos maiores problemas de saúde pública mundial. Sabe-se que esta patologia altera o padrão de regulação de cálcio induzindo a perda óssea. O objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente o processo de reparo alveolar em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e Wistar e o efeito do losartan, droga inibidora dos receptores AT1 da angiotensina II na dinâmica óssea. Um total de 60 ratos foram divididos em 4 grupos com 3 períodos de avaliação: A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado com losartan (30 mg/kg/dia); D:SHR tratado. Submetidos a exodontia do incisivo superior direito com eutanásia no 7º, 14º e 28º dia de pós-operatório. A análise dos mecanismos biológicos envolvidos no processo de reparo alveolar foi obtida pela histomorfometria e imunoistoquímica por meio da expressão das proteínas OPG, RANKL, TRAP e PECAM envolvidos na dinâmica do metabolismo ósseo. Os resultados foram submetidos a teste não paramétricos de Kruskal Wallis, seguido de Mann Whitney para comparação das amostras nos diferentes períodos. O grupo SHR apresentou atraso na cronologia do reparo alveolar. O losartan influenciou processo de reparo em Wistar e SHR, acarretando maior formação óssea, assim como maior espessura do trabeculado. Além disso, pode-se constatar que as referidas proteínas marcadas participam ativamente da dinâmica óssea, sofrendo ação do medicamento anti-hipertensivo proposto. Assim, sugere-se que o sistema renina-angiotensina interfere no metabolismo ósseo por meio da ação da angiotensina II.

Palavras-chave: Hipertensão, SHR, losartan, exodontia, reparo alveolar, imunoistoquímica.

Abstract

Pereira CCS. Analysis of alveolar repair process in spontaneously hypertensive rats (SHR) untreated and treated with losartan. Histomorphometric and immunohistochemical study. [Tese]. Araçatuba: Unesp – Universidade Estadual Paulista; 2013.

ABSTRACT

Hypertension is a multifactorial clinical condition, with high rates of complications, such as cardiovascular and renal disease, that make this organization one of the greatest public health problems worldwide. It is known that this disease alters the pattern of calcium regulation by inducing bone loss. The aim of this study was to comparatively evaluate the process of alveolar repair in spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar and the effect of losartan (30 mg / kg / day), a drug inhibiting the angiotensin II AT1 receptors in bone dynamics. A total of 60 rats were divided into 4 groups with 3 evaluation periods: A. Wistar; B. SHR; C. Wistar treated; D: SHR treated. The rats underwent dental extraction of the upper right incisor, was proceeded euthanasia on the 7th, 14th and 28th day after surgery. The analysis of the biological mechanisms involved in alveolar repair was obtained by histomorphometry and immunohistochemistry through the expression of OPG protein, RANKL, TRAP and PECAM dynamics involved in bone metabolism. Results were submitted to nonparametric test of Kruskal Wallis followed by Mann Whitney test for comparison of samples in different periods. The SHR was late in the chronology of alveolar repair. Losartan influenced repair process in Wistar and SHR, resulting in increased bone formation, as well as greater trabecular thickness. Moreover, it can be seen that these tagged proteins actively participate in the dynamic bone, suffering the action of the antihypertensive drug proposed. Thus, it is suggested that losartan and the renin-angiotensin interfere with bone metabolism through the action of angiotensin II.

Keywords: Hypertension, SHR, losartan, extraction, alveolar repair, immunohistochemistry.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Seqüência das etapas da exodontia	47
Figura 2 – A. Imagem histológica do terço médio de alvéolo dentário de SHR ao 28º dia pós-cirúrgico. B.Tecido ósseo corado em azul pelo software Leica Qwin Cor / RGB. (20X)	51
Figura 3 – Imagem histológica do terço médio de alvéolo dentário de Wistar ao 14º dia pós-cirúrgico. Marcação da espessura das trabéculas em verde pelo software Leica Qwin Cor / RGB. (20X)	51
Figura 4 – PAS de ratos Wistar (círculos abertos), Wistar tratado com atenolol (círculos fechados), SHR (quadrados abertos) e SHR tratado com atenolol (quadrado fechado).	55
Figura 5 – Imagens histológicas do terço médio de alvéolos em ratos. (Objetiva 16x)	59
Figura 6 – Percentual de tecido ósseo do terço médio do alvéolo dental de Wistar e SHR.	61
Figura 7 – Percentual de tecido ósseo do terço médio do alvéolo dental de Wistar e SHR tratados com losartan.	63
Figura 8 – Percentual comparativo de tecido ósseo do terço médio do alvéolo dental de Wistar, Wistar tratado, SHR e SHR tratado.	64

Figura 9 – Espessura do trabeculado ósseo do terço médio do alvéolo dental de Wistar e SHR.	66
Figura 10 – Espessura do trabeculado ósseo do terço médio do alvéolo dental de Wistar e SHR tratados com losartan.	68
Figura 11 – Comparativo da espessura do trabeculado ósseo do terço médio do alvéolo dental de Wistar, Wistar tratado, SHR e SHR tratado.	69
Figura 12 – Imunomarcacão de OPG (osteoprotegerina) correspondente a 07 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). (Objetiva 16x).	72
Figura 13 – Imunomarcacão de OPG (osteoprotegerina) correspondente a 14 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). (Objetiva 16x).	73
Figura 14 – Imunomarcacão de OPG (osteoprotegerina) correspondente a 28 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). (Objetiva 16x).	74
Figura 15 – Imunomarcacões de OPG. Escore 0 (fraco/ausente), escore 1 (leve), escore 2 (moderado), escore 3 (intenso) em todos os grupos e períodos avaliados.	75
Figura 16 – Imunomarcacão de RANKL correspondente a 07 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). (Objetiva 16x).	76

Figura 17 – Imunomarcção de RANKL correspondente a 14 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). (Objetiva 16x).	77
Figura 18 – Imunomarcção de RANKL correspondente a 28 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). (Objetiva 16x).	78
Figura 19 – Imunomarcções de RANKL. Escore 0 (fraco/ausente), escore 1 (leve), escore 2 (moderado), escore 3 (intenso) em todos os grupos e períodos avaliados.	79
Figura 20 – Imunomarcção de PECAM correspondente a 07 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). (Objetiva 16x).	80
Figura 21 – Imunomarcção de PECAM correspondente a 14 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). (Objetiva 16x).	81
Figura 22 – Imunomarcção de PECAM correspondente a 28 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). (Objetiva 16x).	82
Figura 23 – Imunomarcções de PECAM. Escore 0 (fraco/ausente), escore 1 (leve), escore 2 (moderado), escore 3 (intenso) em todos os grupos e períodos avaliados.	83

Figura 24 – Imunomarcção de TRAP correspondente a 07 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). (Objetiva 16x).	84
Figura 25 – Imunomarcção de TRAP correspondente a 14 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). (Objetiva 16x).	85
Figura 26 – Imunomarcção de TRAP correspondente a 28 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). (Objetiva 16x).	86
Figura 27 – Imunomarcções de TRAP. Escore 0 (fraco/ausente), escore 1 (leve), escore 2 (moderado), escore 3 (intenso) em todos os grupos e períodos avaliados.	87

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentual de tecido ósseo neoformado no terço médio de alvéolos dentais de ratos Wistar e SHR nos períodos de 7, 14 e 28 dias pós-cirurgia. (N=5).	61
Tabela 2 – Percentual de tecido ósseo no terço médio de alvéolos dentais de ratos Wistar tratado e SHR tratado com losartan nos períodos de 7, 14 e 28 dias pós-cirurgia. N=5.	62
Tabela 3 – Percentual de tecido ósseo neoformado no terço médio de alvéolos dentais de todos os grupos avaliados (W, SHR, WT e SHRT) em todos os períodos propostos (7, 14 e 28 dias pós-cirurgia). N=5.	63
Tabela 4 – Espessura (μ) do trabeculado ósseo no terço médio de alvéolos dentais pós-extração em ratos Wistar e SHR nos períodos de 7, 14 e 28 dias pós-cirurgia. (N=5).	65
Tabela 5 – Espessura (μ) do trabeculado ósseo no terço médio de alvéolos dentais em ratos Wistar e SHR tratados com losartan nos períodos de 7, 14 e 28 dias pós-cirurgia. N=5.	67
Tabela 6 – Espessura (μ) do trabeculado ósseo de alvéolos dentais de ratos em todos os grupos avaliados (W, SHR, WT e SHRT) em todos os períodos propostos (7, 14 e 28 dias). N=5.	68

Lista de Anexos

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA). 108

Anexo B – Normas para publicação – Revista IJOMS 109

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Por cento

cm - centímetro

DAB - Diaminobenzidina

EDTA - Ácido etileno-diamino-tetracético

Fig. - Figura

Figs - Figuras

FOA - Faculdade de Odontologia de Araçatuba

g - grama

h - hora

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HE - Hematoxilina e eosina

kg - quilograma

kvp - quilovolts pico

LTDA. - Limitada

mA - miliampères

mg - miligrama

mL - mililitro

mmHg - milímetros de mercúrio

n - tamanho da amostra

NaOH - Hidróxido de sódio

°C - Graus Celcius

OPG - Osteoprotegerina

P - Probabilidade do valor do teste

PAS - Pressão Arterial Sistólica

PBS - Tampão fosfato salina

pH - potencial hidrogeniônico

pi - pixel

PECAM – Molécula de adesão plaquetas-células endoteliais (PECAM-1)

RANKL - Receptor Ativador Nuclear Kappa- β Ligante

s - segundo

SHR - Spontaneously Hypertensive Rats

SHRT - SHR tratado

TRAP - Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente

UNESP- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

W - Wistar

WT - Wistar tratado

μm – Micrometro

JNC – Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure

IECA – Inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina

BRA II – Bloqueadores dos Receptores de Angiotensina II

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

PAS – Pressão Arterial Sistólica

Sumário

SUMÁRIO

1 Introdução	33
2 Proposição	42
3 Materiais e Métodos	44
4 Resultados	54
5 Discussão	88
6 Conclusão	95
Referências	97
Anexos	108

Introdução

INTRODUÇÃO

Mediante a presença de situações clínicas em que dentes estejam condenados, aspectos como a causa da perda dental, quantidade e qualidade do remanescente ósseo e a presença de patologias como a hipertensão arterial e osteoporose, devem ser observados com intuito de definir o momento oportuno para a reabilitação oral. O entendimento da dinâmica do processo de reparo alveolar tem sido foco de diversos estudos a fim de desvendar a relação entre os eventos ocorridos em âmbito local e sistêmico e sua relação, visando maximizar os resultados estético-funcionais das modalidades de tratamento reabilitador. Contudo, ainda persiste como grande desafio científico.

O processo de reparo alveolar é denominado como o conjunto de reações teciduais ocorridas no interior do alvéolo após a extração dental. Têm sido pesquisados vários modelos experimentais, seja em ratos (PIETROKOVSKI & MASSLER 1967; TODO, 1968; ASTRAND & CARLSSON, 1969; JOHANSEN, 1970; OKAMOTO & RUSSO, 1973), cães (CLAFLIN, 1936; HUEBSCH & HANSEN, 1969) macacos (PIETROKOVSKI & MASSLER, 1971; SIMPSON, 1960; 1969) e em humanos (AMLER et al., 1960; AMLER, 1977) levando os pesquisadores a definirem, cronologicamente, os eventos teciduais desencadeados no interior do alvéolo após a extração (CARVALHO & OKAMOTO, 1987; CARVALHO et al., 1997).

Morfologicamente são consideradas quatro fases fundamentais. Inicia-se imediatamente com o preenchimento da cavidade cirúrgica pelo coágulo sanguíneo, seguido da fase de proliferação celular, principalmente fibroblastos

e células adventícias oriundas do ligamento periodontal (1). Nas etapas seguintes, ocorre o desenvolvimento do tecido conjuntivo, marcado pela proliferação de fibroblastos e células endoteliais (2) que originarão novos capilares e a maturação desse tecido pela síntese de fibras colágenas e substância fundamental amorfa e com a diminuição da proliferação de células (3). Posteriormente nas paredes laterais e fundus alveolar, células osteoprogenitoras originam osteoblastos que depositam matriz orgânica, formando um tecido osteóide. Com a calcificação desse, forma-se concentricamente o trabeculado ósseo (4) (CARVALHO e OKAMOTO, 1978). Considera-se o reparo do alvéolo completo quando totalmente preenchido por tecido ósseo neoformado e a crista alveolar remodelada, observado ao 21º dia em ratos (HADDAD et. al. 1965), 48 º dia no cão e ao 64 º em humanos (CARVALHO et. al. 1983). Fatores sistêmicos que alterem a sequência morfológica supracitada podem interferir na qualidade do tecido ósseo neoformado (CARVALHO & OKAMOTO, 1981).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) consiste do aumento da pressão sanguínea, sistólica e/ou diastólica além dos limites definidos atualmente pelo VII JNC (2003). Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (WILLIAMS, 2010). Estima-se que a HAS atinja aproximadamente 25 % da população brasileira adulta, chegando a mais de 50% após os 60 anos e está presente em 5% das crianças e adolescentes no Brasil. A mortalidade por doença cardiovascular aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial (PA). Em 2001, cerca de 7,6 milhões de

mortes no mundo foram atribuídas à elevação da PA (54% por acidente vascular encefálico [AVE] e 47% por doença isquêmica do coração [DIC]). Sonis et al. (1995), referem que cerca de 10 a 20% dos pacientes adultos atendidos no consultório odontológico são hipertensos. Otomo-Corgel (1996) afirma que pelo menos um paciente hipertenso ao dia frequenta a clínica odontológica. A fisiopatologia da HAS é variada, contudo cerca de 95% dos pacientes são portadores da forma primária ou essencial que é em grande parte indefinida, multifatorial e altamente complexa (YE et al. 2000).

É bem conhecido que indivíduos hipertensos apresentam metabolismo anormal de cálcio resultando em concentrações inferiores desse mineral, de vitamina D, magnésio e altas concentrações de hormônio da paratireóide (PTH) (WRIGHT; RANKIN, 1982; MCCARRON et al., 1981).

Estes aspectos devem ser destacados quando se considera que muitos dos pacientes hipertensos que procuram à clínica odontológica vêm em busca de tratamentos reabilitadores implantossuportados que necessitam fundamentalmente de tecido ósseo em quantidade e qualidade satisfatórias. O efeito da HAS sobre o processo de reparo alveolar após extração dental pode ser avaliado em dois estudos experimentais encontrados na literatura. Murata et al., (1967 apud CARVALHO et al., 1983) estudaram o processo de reparo alveolar após extração de pré-molares em cães com hipertensão induzida por alteração da atividade renal e sugeriram que, neste modelo experimental, o atraso na cronologia do processo, seria diretamente proporcional à intensidade do efeito pressor. E Carvalho et al. (1983), sugeriram que a hipertensão estaria associada a um avanço na reparação tecidual observada até o sexto dia após a extração dos dentes incisivos superiores de ratos hipertensos 1 Rim-1 Clip, nos

quais a hipertensão também é induzida por redução de perfusão renal. Em ambos, o osso neoformado demonstrou-se imaturo, sugerindo alterações no metabolismo de cálcio. Para Carvalho et. al. (1983), o suprimento vascular na área em reparação pode sofrer os efeitos de uma maior pressão de perfusão, levando a um aumento na taxa metabólica no alvéolo. Este fato justifica o avanço nos tempos iniciais. No entanto, esses estudos não forneceram dados suficientes para o entendimento dos mecanismos envolvidos na HAS que interferem no processo de reparo alveolar.

Outros estudos clínicos e experimentais têm sugerido que a HAS estaria associada a efeitos prejudiciais na qualidade e densidade de tecidos ósseos (AFGHANI & GORAN, 2007; IZAWA et al., 1985; VESTERGAARD et al., 2009). Dentre eles, muitos demonstram que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentam alterações importantes de metabolismo ósseo, como aumento no turnover ósseo e redução na massa óssea cortical e trabecular (IZAWA et al., 1985; BARBAGALLO et al., 1991; WANG et al., 1993). Esse modelo experimental é um dos mais empregados para o estudo da HAS. Tais animais nascem normotensos e a partir da 8ª semana de vida desenvolvem espontaneamente ou sem uma causa pré-determinada um aumento de pressão arterial acima de 150 mmHg, que se mantém por toda a vida (OKAMOTO; AOKI, 1963).

Muitos estudos têm avaliado os mecanismos reguladores do sistema cardiovascular relacionados ao aumento da pressão sanguínea. Dentre eles destaca-se o sistema renina-angiotensina na regulação da pressão arterial e no remodelamento de vários tecidos, sendo de fundamental relevância a angiotensina II (Ang II) e sua capacidade de interferir no metabolismo ósseo

(ASABA et al., 2009) por meio de receptores localizados nos osteoblastos e osteoclastos ou através da ação no fluxo sanguíneo dos capilares da medula óssea. Existem dois principais subtipos de receptores de angiotensina, AT1 e AT2 (WHITEBREAD et al. 1989; CHIU et al. 1989), sendo que a maioria das ações é mediada pelos receptores AT1. Várias modalidades de tratamento têm sido encontradas na literatura (ELEFTERIOU et al., 2005; SATO et al., 2010; TAKEDA et al., 2002), inclusive em modelos experimentais com ratos SHR (MANRIQUE, 2010; GEALH, 2010). Dentre as drogas utilizadas atualmente, os bloqueadores dos receptores AT1 da angiotensina II (BRA II), como losartan, antagonizam a ação da angiotensina II por meio do bloqueio específico de seus receptores AT1 no músculo liso vascular e na supra-renal. Dessa forma inativam os efeitos vasoconstritores e a secreção da aldosterona da angiotensina II. Atualmente, tal medicamento ocupa lugar de destaque, pois além de eficaz, tem capacidade de proteção dos órgãos-alvo e apresenta baixa incidência de eventos adversos (SEE, 2001). São indicados no tratamento da hipertensão em populações de alto risco cardiovascular ou com comorbidades, proporcionando redução da morbidade e da mortalidade cardiovasculares (DAHLOF et al. 2002; LINDHOLM et al. 2002; JULIUS et al. 2004 e 2006; OGIHARA et al. 2008; SUZUKI e KANNO, 2005). Estudos também comprovam seu efeito benéfico em insuficiência cardíaca congestiva (COHN e TOGNONI, 2001; PFEFFER et al. 2003; KONSTAM et al. 2009) e são úteis na prevenção do acidente vascular cerebral (PAPADEMETRIOU et al. 2004; SCHRADER et al. 2003). São nefroprotetores no paciente com diabetes melito do tipo 2 com nefropatia estabelecida (BRENNER et al. 2001, LEWIS et al. 2001, MANN et al. 2008) e incipiente (PARVING et al. 2001). Metanálise recente aponta para

equivalência entre BRA II e IECA na redução de eventos coronarianos (REBOLDI et al. 2008) e superioridade dos BRA II na proteção cerebrovascular (REBOLDI et al. 2008). Contudo, pouca atenção foi dispensada sobre a influência desse medicamento sobre o metabolismo ósseo, especialmente na região maxilo-facial.

A formação de tecido ósseo resulta da síntese de matriz orgânica por células específicas, destacando-se os osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. O principal componente da matriz osteóide é o colágeno, além de proteoglicanas, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, dentre outras (KHOSLA, 2001). Cálcio e fosfato constituem os principais minerais do tecido ósseo, apresentando-se como hidroxapatita cristalina, fosfatos e carbonatos cristalinos perfazendo metade da massa óssea.

O processo contínuo de remodelação, caracterizado por reabsorção e neoformação de tecido ósseo é um dos eventos que permite a homeostasia mineral, já que envolve as alterações nas concentrações de cálcio e fosfato no líquido extracelular, sofrendo a interferência de vários fatores, que vão desde citocinas inflamatórias, como a interleucina 1 à hormônios como o paratormônio, estrógeno, calcitonina, família da vitamina D e esteróides.

Nesse contexto, destacam-se membros da família do Fator de Necrose Tumoral, as proteínas osteoprotegerina (OPG) e receptor ativador de NF-Kappa B ligante (RANKL), que apresentam envolvimento direto sobre o controle de turn over ósseo (SCHWARTZ & O'KEEFE, 2000; HOFBAUER et al., 2000; BUCKLEY & FRASER, 2002; OHAZAWA et al., 2004; LUVIZUTO et al., 2010) e podem ser utilizadas como marcadores da atividade celular dentro da biologia óssea. Assim, a RANKL apresenta-se como uma proteína liberada

pelos osteoblastos e que se liga à RANK, seu receptor localizado na superfície de pré-osteoclastos. Uma vez que ocorra a ligação RANK-RANKL, ocorre a diferenciação dos pré-osteoclastos em osteoclastos ativos e tem início o processo de reabsorção óssea (STEJSKAL et al., 2001 a e b; KHOSLA, 2001). A OPG, molécula de superfície sintetizada por osteoblastos e por células do estroma, modera a osteoclastogênese (SIMONET et al., 1997; KONG et al., 1999), atuando como receptor chamariz, ligando-se à RANKL e impedindo a sua ligação à RANK (KHOSLA, 2001; AUBIN & BONNELYE, 2000; STEJSKAL et al., 2001 a e b). O balanço entre a expressão do estimulador da osteoclastogênese (RANKL) e a inibidora (OPG) dita à quantidade de osso reabsorvido (TEITELBAUM, 2000). As células do estroma e os osteoblastos são alvos da maior parte dos agentes osteoclastogênicos aumentando a expressão de RANKL, bem como aumentando quantidade desta molécula em relação à OPG. Outra proteína que atuam como sinalizadora do turn over ósseo é a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), enzima presente nos lisossomos de osteoclastos e que quando liberada sinaliza o processo ativo de reabsorção (STEJSKAL et. al. 2001 [a]; CHRISTENSON 1997; SCHWARZ ET AL. 2000 & BEKKER ET AL. 2001).

Na dinâmica do reparo alveolar, é de fundamental importância a revascularização do leito ósseo caracterizada pela angiogênese e pelo crescimento de vasos sanguíneos colaterais (BECIT et al., 2001; AICHER et al., 2007). Tem sido demonstrado que a quantidade de células progenitoras, bem como seu potencial angiogênico está reduzido nos casos de hipertensão arterial (YOU ET AL. 2008 [a]). Em SHR, bem como em pacientes com HAS essencial, as funções endoteliais estão comprometidas e podem prejudicar a

regeneração de vasos sanguíneos (KONISHI & SU 1983; PANZA et al. 1990). Assim, a redução terapêutica da pressão arterial é o principal mecanismo que desencadeia a ativação da vasculogênese e crescimento de vasos sanguíneos (YOU et al. 2008 [b]). Nesse sentido, várias citocinas e fatores de crescimento estão envolvidos na angiogênese. A PECAM-1 (molécula de adesão plaquetas-células endoteliais) é uma glicoproteína de membrana altamente expressa em células endoteliais e em níveis moderados na superfície de plaquetas e leucócitos (NEWMANN, 1997). Está envolvida em funções vasculares incluindo a formação inicial do contato entre as células endoteliais, permeabilidade vascular, angiogênese, migração celular e migração trans-endotelial (SPRINGER, 1994; PIEDBOEUF et al., 1998).

Considerando a alta prevalência de hipertensão arterial, a importância do osso alveolar na funcionalidade do aparelho estomatognático e a controvérsia a respeito da atuação dos receptores de Ang II no metabolismo ósseo (HATTON et al. 1997; HIRUMA et al. 1997), o objetivo do estudo foi avaliar o processo de reparo alveolar em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados e não tratados com losartan por meio de análises histomorfométrica e imunoistoquímica pela expressão das proteínas OPG, RANKL, TRAP e PECAM-1.

Proposição

PROPOSIÇÃO

O objetivo do estudo foi avaliar a influência da hipertensão arterial essencial no processo de reparo alveolar, influenciado ou não por droga inibidora de receptor AT1 da Ang II, e a participação de proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo. Por meio do modelo experimental proposto, buscou-se responder aos seguintes questionamentos:

1- O processo de reparo alveolar está alterado em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)?

2- As proteínas OPG, RANKL, TRAP e PECAM relacionam-se com as alterações encontradas?

3- O tratamento com o anti-hipertensivo losartan modula as possíveis alterações encontradas?

Material e métodos

MATERIAL E MÉTODOS

O modelo experimental desenvolvido neste projeto está de acordo com os princípios éticos em experimentação animal e foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, de acordo com o protocolo nº 2008-005158 (anexo A).

MODELO EXPERIMENTAL

1. Animais

Foram utilizados 30 ratos espontaneamente hipertensos (SHR), pesando entre 180 e 230g, com idade entre 2 e 3 meses, de uma cepa mantida no Biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP. Como controle experimental, foram utilizados 30 ratos Wistar (normotensos) com peso e idade semelhantes aos animais SHR. Os ratos Wistar foram fornecidos pelo Biotério Central da FOA - UNESP. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22-24° C) com ciclo de luz (12h/luz e 12h/escuro) no Biotério do Departamento de Ciências Básicas e foram alimentados com água potável e ração *ad libitum*. Somente SHR com pressão arterial sistólica maior ou igual a 150 mmHg e ratos normotensos Wistar com pressão arterial sistólica em torno de 112 mmHg foram utilizados nos experimentos.

2. Medida de pressão arterial (PA)

O registro da pressão arterial sistólica (PAS) foi realizado pelo método indireto de pletismografia de cauda. A PAS foi aferida nos períodos pré-operatório e pós-operatório em dias determinados nos diferentes grupos experimentais.

3. Grupos

Os ratos foram divididos em quatro grupos experimentais: 1) Wistar sem tratamento 2) Wistar tratado com losartan 3) SHR sem tratamento 4) SHR tratado com losartan. Cada grupo foi composto por 5 animais em 3 diferentes tempos após a exodontia de incisivo central superior direito: 7, 14 e 28 dias.

4. Tratamento

Ratos Wistar e SHR foram tratados com o anti-hipertensivo losartan na dose de 30mg/kg/dia por via oral. O tratamento foi iniciado sete (7) dias antes da realização da exodontia e mantido após a cirurgia até os períodos determinados para o sacrifício (7, 14 e 28 dias). O losartan foi diluído em volume de água pré-determinado (50 ml de água/dia) a ser ingerido durante 24 horas (um dia) pelo animal. Os ratos controles (não tratados) receberam o mesmo volume de água sem a adição da droga.

5. Procedimento operatório e Eutanásia

Os animais foram anestesiados com administração intramuscular da associação de 50mg/kg cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas São Paulo, Brasil) e 10mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda. – Osasco, São Paulo, Brasil) e

submetidos à cirurgia para exodontia do incisivo superior direito seguindo a técnica padronizada por Okamoto e Russo (1973). As feridas cirúrgicas foram suturadas com fio cirúrgico estéril e absorvível Vycril 5-0 (poliglactina 910) Ethicon®. As etapas da cirurgia foram apresentadas em seqüência de imagens na figura 1. Os animais receberam 0,2 mL de Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte (1,7g/3mL Fort DODGE®) por via intramuscular.

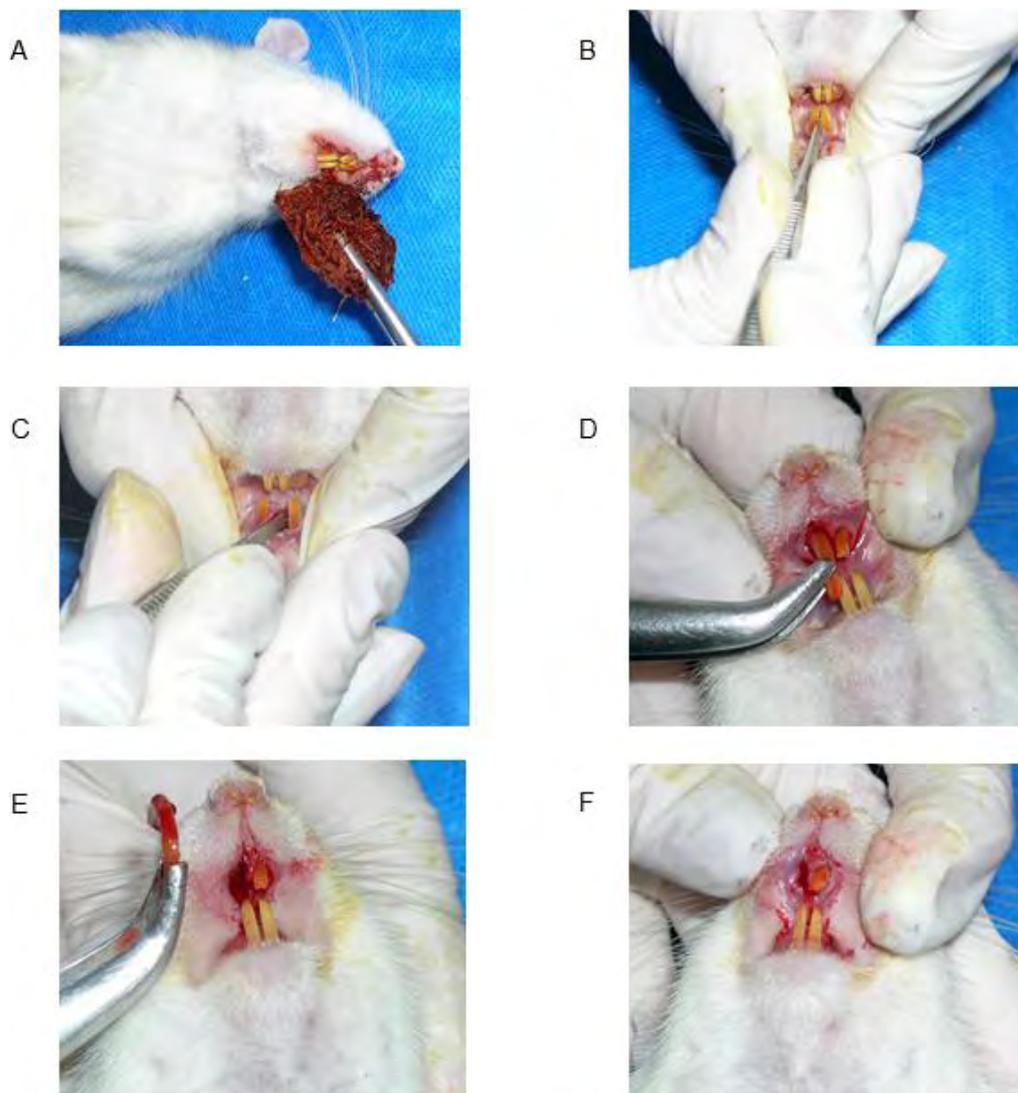


Figura 1- Seqüência das etapas da exodontia: A- anti-sepsia, B- posicionamento do instrumento, C -luxação, D e E- exodontia, F- Sutura.

Os ratos foram sacrificados em câmara saturada com halotano nos diferentes dias pós-cirúrgicos. Em seguida, a hemi-maxila direita foi separada da esquerda, por meio da incisão sagital mediana que acompanha a sutura inter-maxilar. Foram obtidas as peças dos alvéolos após cortes com tesoura reta tangenciando a face distal dos molares. As peças foram colocadas em solução de formalina tamponada 10%, pH=7, por 48 horas.

Processamento histológico

Após o período supracitado, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas e então foi iniciada a descalcificação das mesmas por meio solução de EDTA 4,13% (Preparo da solução de EDTA: em um litro de tampão fosfato, pH 7,2, diluir os solutos EDTA [41,3 g] e NaOH [4,4 g]). Foram colocadas individualmente em frascos plásticos com solução de EDTA e mantidos sob refrigeração a 4°C. A solução de EDTA foi trocada semanalmente durante todo o período de descalcificação (aproximadamente sete semanas) até que fosse identificada a descalcificação necessária. Esta identificação foi feita por método mecânico simples (penetração, sem resistência, de uma agulha anestésica odontológica na peça anatômica).

Em seguida, as peças descalcificadas passaram pelo processo de diafanização, realizado seguindo a seqüência de álcoois e xilol descrita a seguir: álcool 70% - 1 hora, álcool 80% - 1 hora, álcool 90% - 13 horas, álcool 95% - 1 hora, álcool 100% (primeira etapa) – 1 hora, álcool 100% (segunda etapa) – 1 hora, álcool 100% (terceira etapa) – 1 hora; álcool associado à xilol –

20 minutos; xilol (passo I) – 20 minutos, xilol (passo II) – 20 minutos, e na seqüência foram incluídas em parafina.

Os cortes foram feitos com uma espessura de 5 µm com navalhas de aço 18 cm (Leica) e corados em hematoxilina e eosina seguindo metodologia descrita a seguir: Inicialmente foram dissolvidos a hematoxilina (5g) em 50ml de álcool absoluto e 100g de alúmen de potássio em um litro de água destilada quente. Ambas as soluções foram misturadas entre si e, posteriormente, acrescentou-se 2,5g de óxido vermelho de mercúrio até a solução final obter coloração púrpura escura. Depois de preparada, a solução de hematoxilina 0,5% foi rapidamente resfriada e filtrada, estando, assim, própria para o uso. Para o preparo da eosina foi realizado o mesmo procedimento substituindo-se a hematoxilina por 10g de eosina, obtendo-se, ao final, uma solução de eosina a 1%. Para a coloração das lâminas com HE (hematoxilina e eosina) realizaram-se as seguintes etapas na seqüência de 1- 20:

- 1- Xilol I por 10 minutos;
- 2- Xilol II por 10 minutos;
- 3- Álcool 100% I por 1 minuto;
- 4- Álcool 100% II por 1 minuto;
- 5- Álcool 100% III por 1 minuto;
- 6- Álcool 95% por 1 minuto;
- 7- Álcool 75% por 1 minuto;
- 8- Água corrente rapidamente;
- 9- Hematoxilina por cerca de 5 minutos;
- 10- Água corrente até clarear;
- 11- Eosina por cerca de 30 segundos;

- 12- Água corrente rapidamente;
- 13- Álcool 95% I rápido;
- 14- Álcool 95% II rápido;
- 15- Álcool 100% I por 30 segundos;
- 16- Álcool 100% II por 30 segundos;
- 17- Álcool 100% III por 30 segundos;
- 18- Xilol I por 5 minutos;
- 19- Xilol II por 5 minutos;
- 20- Montagem da lâmina (1 ou 2 gotas de bálsamo "Permunt" sobre a lâmina e sobreposição da lamínula).

Análise histomorfométrica

Foram obtidos dois cortes de cada hemi-maxila dos animais. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina para a análise morfométrica do tecido ósseo em formação no terço médio do alvéolo de ratos Wistar, Wistar tratado, SHR e SHR tratado. As lâminas foram codificadas e o examinador não conhecia a procedência dos cortes histológicos. Uma área de 897,8 x 1263,7 µm foi analisada em cada região histológica do terço médio e examinada por microscopia de luz com objetiva de 20X. As imagens foram obtidas com uma câmera digital (JVC TK1270 Color Video Câmera) acoplada ao microscópio e analisadas pelo software Leica Qwin Cor / RGB (Figs.2 e 3). O percentual ósseo da área e a espessura do trabeculado foram medidos e comparados entre os grupos. Foram feitas vinte medidas diferentes das espessuras das trabéculas em cada lâmina. Posteriormente, o valor médio destas medidas foi analisado e comparado entre os grupos.

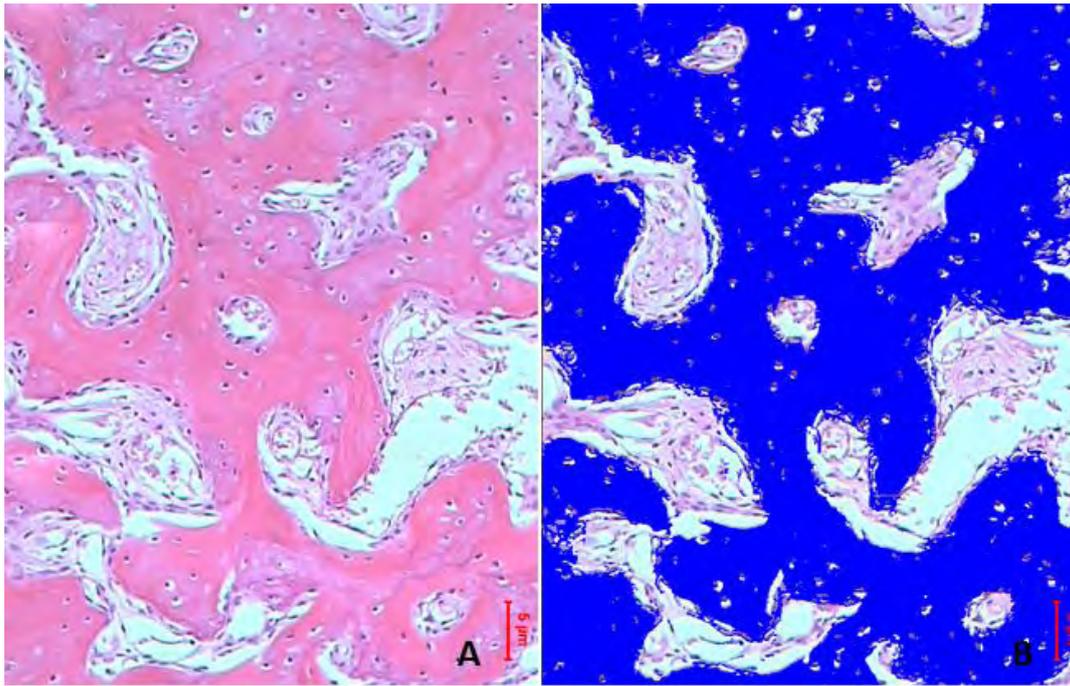


Figura 2. A. Imagem histológica do terço médio de alvéolo dentário de SHR ao 28º dia pós-cirúrgico. **B.** Matriz óssea marcada em azul pelo software Leica Qwin Cor / RGB. (20X).

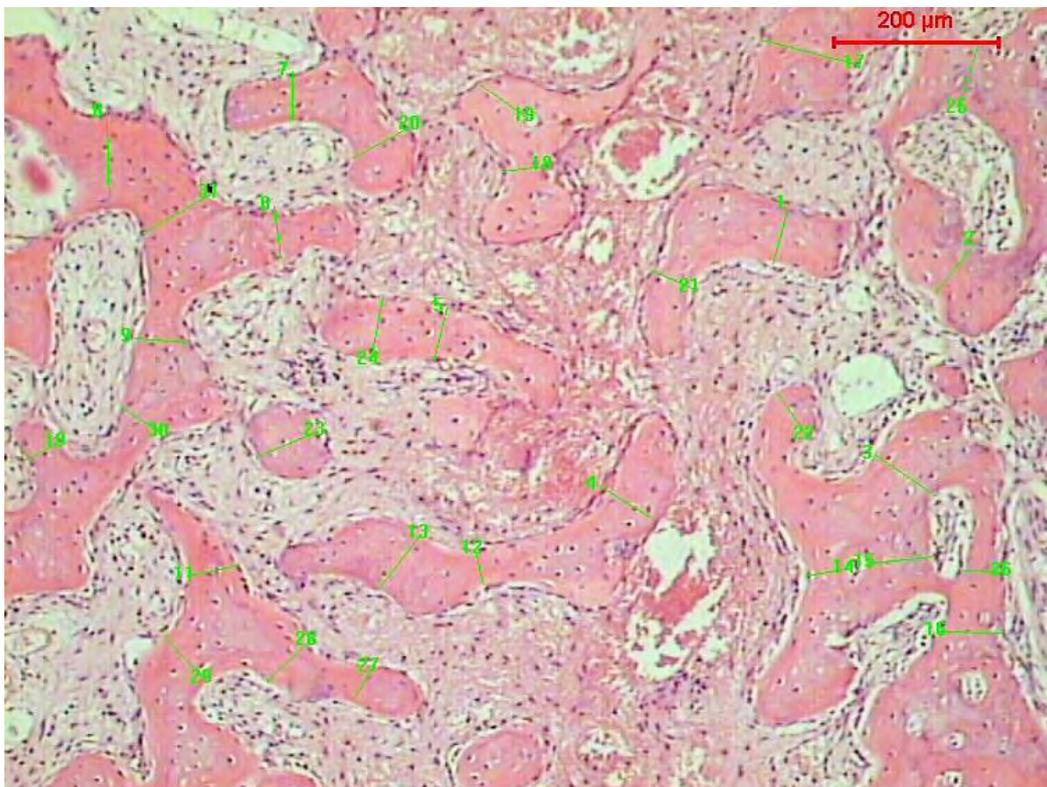


Figura 3. Imagem histológica do terço médio de alvéolo dentário de Wistar ao 14º dia pós-cirúrgico. Marcação da espessura das trabéculas em verde pelo software Leica Qwin Cor / RGB (20X).

Análise Imunoistoquímica

Para o processamento imunoistoquímico foi utilizado como anticorpo primário a osteoprotegerina (OPG, Goat (cabra) anti-opg - Santa Cruz Biotechnology, SC21038), a RANKL (Goat anti-rankl - Santa Cruz Biotechnology, SC7627), TRAP (Goat anti-trap - Santa Cruz Biotechnology, SC7626), PECAM (Goat anti-pecam - Santa Cruz Biotechnology, SC6840). Como anticorpos secundários utilizamos os anticorpos contra IgG de cabra biotinilado (anti-Goat IgG-HRP, PIERCE).

O método de detecção foi efetuado por imunoperoxidase e a 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) utilizada como cromógeno seguido pela contra-coloração nuclear com Hematoxilina de Harri's.

Os procedimentos de controle foram feitos pela omissão dos anticorpos primários (controle negativo).

Secções longitudinais de 5µm das peças anatômicas foram colocadas em lâminas histológicas e desparafinizadas de acordo com protocolo padrão. O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada 3% (Peróxido de Hidrogênio 30% H₂O₂ - MERCK) por 45 minutos. As secções sofreram recuperação antigênica por tampão citrato (pH 6,0 – 55°C) e posteriormente foram incubadas por 18h a 4°C com anticorpos primários específicos para as proteínas a serem analisadas e em concentrações previamente testadas e padronizadas. Após 18h as lâminas foram lavadas com PBS (3 banhos) e incubados com um segundo anticorpo biotinilado, por mais 1h à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas em PBS e re-incubadas com o complexo Avidina-biotina (Elite, Vector Laboratories) por 45min.

O padrão de distribuição da imunocoloração foi analisado qualitativamente, atribuindo-se os scores 0 (sem marcação), 1 (fraca/difusa), 2 (moderada) e 3 (intensa), a fim de avaliar a expressão das proteínas. A análise foi realizada em microscópio óptico convencional e os scores foram atribuídos por um único observador, previamente calibrado. As lâminas foram codificadas e o examinador desconhecia a procedência dos cortes histológicos.

Análise Estatística

A análise da evolução temporal do processo de reparo alveolar avaliando o percentual de osso neoformado na área proposta (terço médio do alvéolo) e a espessura do trabeculado ósseo foi executada pelo teste (não paramétrico) de Kruskal-Wallis para comparação de amostras independentes, seguido do teste de Mann Whitney para comparação entre os grupos em cada período específico, sendo consideradas as diferenças significativas quando $p < 0,05$. Utilizou-se o programa de estatística de domínio público (IBM SPSS Statistics 20).

Resultados

RESULTADOS

PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS)

A PAS foi aferida antes da cirurgia e nos períodos de pós-operatório de 7, 14 e 28 dias. A PAS de SHR foi maior ($p < 0,05$) que a de Wistar em todos os períodos analisados. A partir do início do tratamento com losartan, foi observada importante redução da PAS em SHR que se manteve durante todo o período de tratamento, assim SHR tratados com losartan apresentaram PAS menor ($p < 0,05$) que de SHR não tratados em todos os períodos analisados. O tratamento com losartan não alterou a PAS de ratos Wistar normotensos (Fig. 4).

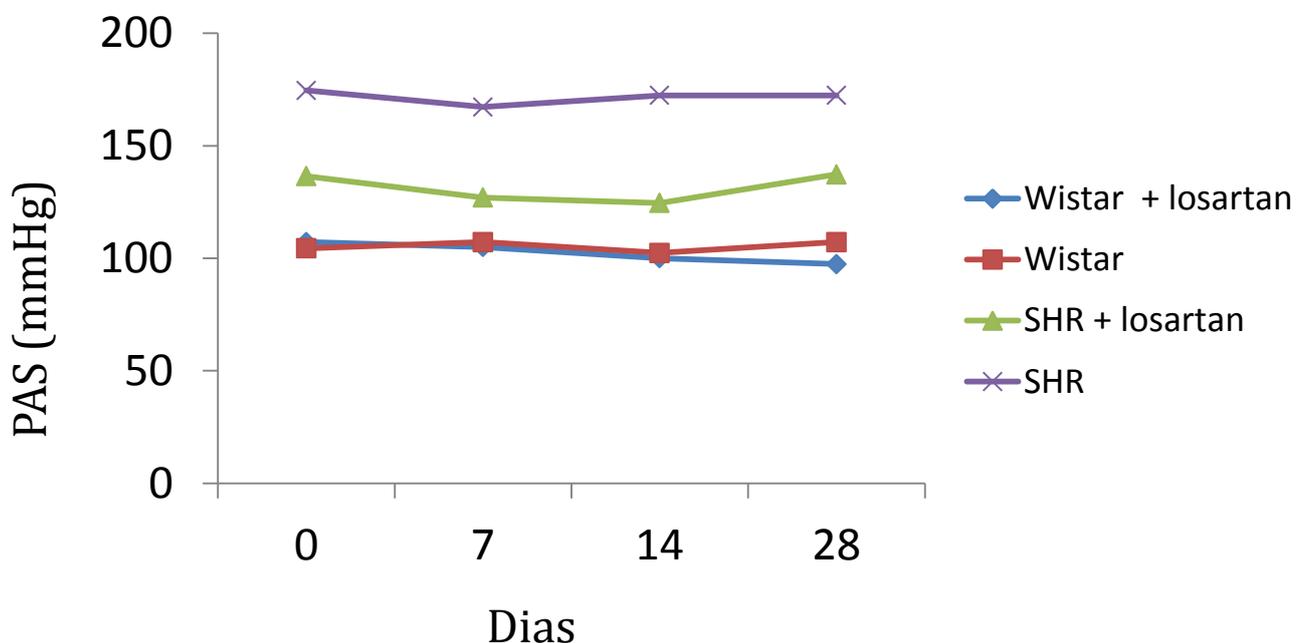


FIGURA 4. PAS de ratos Wistar (quadrado vermelho), Wistar tratado com losartan (azul), SHR (roxo) e SHR tratado com losartan (verde). Os pontos representam a média dos experimentos realizados (n=5).

Observou-se $p < 0,05$ entre SHR e outros grupos. Também $p < 0,05$ entre SHR tratados e outros grupos.

ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA

Pela análise histológica qualitativa (objetiva de 16X), as diferenças histológicas no terço médio dos alvéolos foram correlacionadas aos diferentes períodos avaliados e ao grupo experimental.

7 DIAS

Em alvéolos de ratos Wistar, foi observado que o terço médio encontrava-se ocupado por trabéculas ósseas neoformadas, em alguns pontos espessas e, em outros, delgadas (Fig. 5A).

No terço médio de alvéolos de ratos SHR, foi observada a presença de delgadas trabéculas ósseas neoformadas com osteoblastos em suas bordas (Fig. 5D). O tecido conjuntivo sem diferenciação óssea exibiu moderado número de fibroblastos e alguns macrófagos e linfócitos.

O tratamento com Losartan em ratos Wistar não alterou o processo de formação de tecido ósseo, que se manteve semelhante ao grupo Wistar. O terço médio apresentou-se com trabéculas ósseas neoformadas e delgadas, envoltas por osteoblastos em atividade. (Fig. 5G).

O tratamento com Losartan em ratos SHR mostrou o tecido ósseo em formação, com trabeculado ligeiramente mais espesso que o observado no grupo SHR. Presença de tecido conjuntivo em grande parte do alvéolo em reparação (Fig. 5J).

14 DIAS

Nos terços médio dos alvéolos de ratos Wistar, foi notada presença de trabéculas ósseas discretamente mais organizadas, ocupando regularmente o espaço avaliado (Fig. 5B). O tecido conjuntivo, sem diferenciação óssea, apresentou moderado número de fibroblastos.

Em alvéolos de SHR, foi evidenciada a presença de trabéculas ósseas, geralmente pouco organizadas (Fig. 5E) preenchendo o espaço avaliado (terço médio). O tecido conjuntivo, sem diferenciação óssea, apresentou moderado número de fibroblastos.

Os dados mostraram que, pela análise histológica, neste período já é possível verificar pequenas diferenças na disposição das trabéculas ósseas (pouco organizadas) presentes no terço médio de alvéolos de SHR.

O grupo Wistar tratado com Losartan apresentou trabeculado ósseo mais organizado e maduro com a presença de osteócitos aprisionados em seu interior (Fig 5H).

O tratamento com Losartan ao grupo SHR mostrou um padrão de formação de tecido ósseo imaturo, com trabéculas delgadas e pouco organizadas (Fig. 5L).

28 DIAS

Em Wistar, o alvéolo dental encontra-se totalmente preenchido por trabéculas ósseas bem diferenciadas (Fig. 5C), espessas e organizadas.

No terço médio alveolar de SHR, foi observada a presença de trabéculas ósseas espessas e bem regulares (Fig. 5E). Em alguns pontos, no entanto, áreas com tecido conjuntivo sem diferenciação óssea podiam ainda ser observadas.

A persistência do tecido conjuntivo sem diferenciação óssea em áreas do terço médio de alvéolos de SHR é sugestiva de atraso no reparo alveolar nesses animais em relação aos ratos Wistar.

O tratamento com Losartan no grupo Wistar mostrou um tecido ósseo organizado, com trabeculado ósseo maduro. Presença de osteócitos aprisionados no tecido ósseo reparacional (Fig. 5I).

O tratamento com Losartan no grupo SHR mostrou um tecido ósseo com maior grau de maturidade que o grupo SHR, no entanto, as trabéculas ósseas ainda se mostraram delgadas em comparação aos grupos de ratos Wistar (Fig. 5M). Presença de osteócitos aprisionados no interior do tecido ósseo.

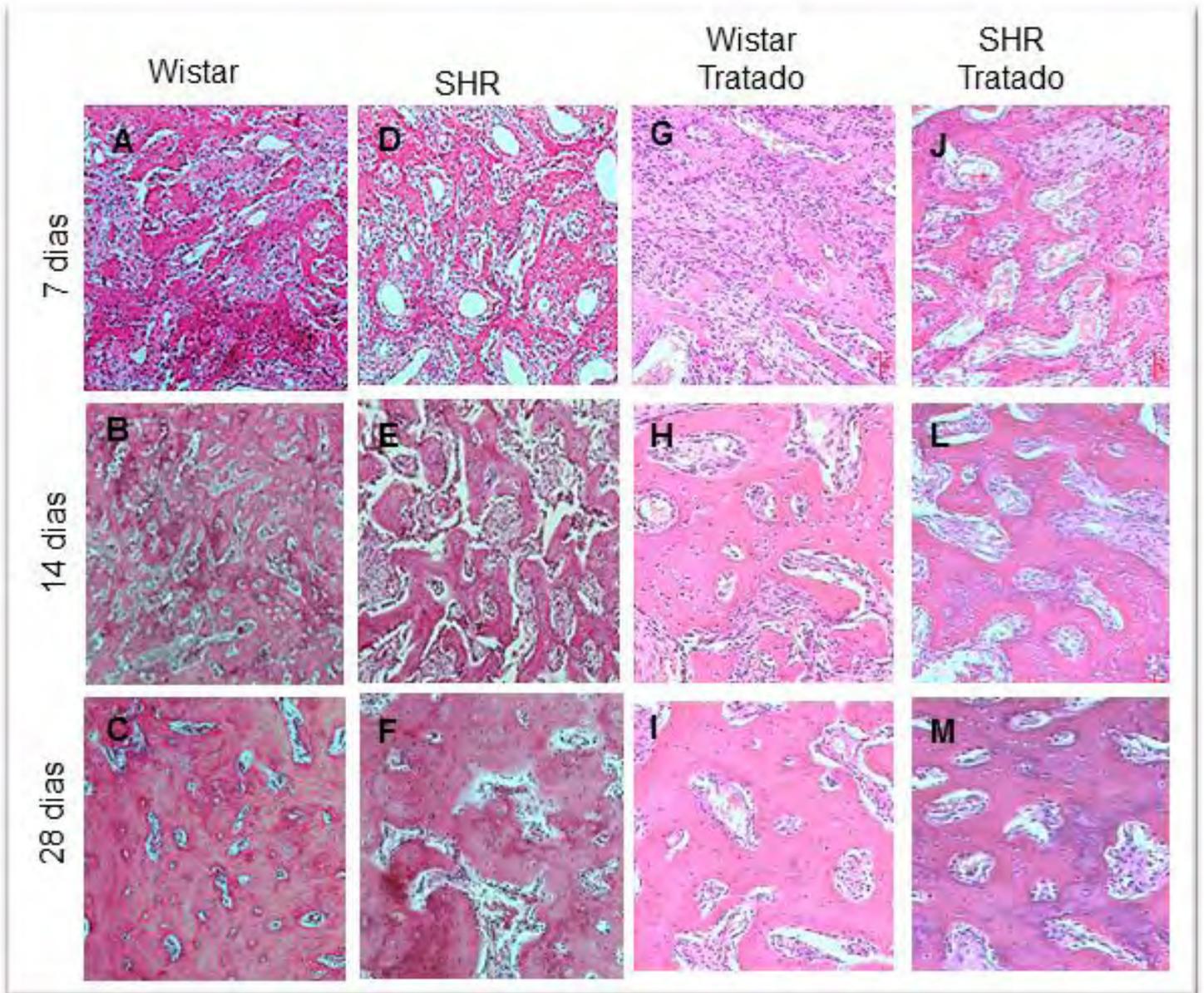


Figura 5. Imagens histológicas do terço médio do alvéolo em ratos. (Objetiva de 16X)

ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

PERCENTUAL DE TECIDO ÓSSEO NEOFORMADO

Para avaliarmos se as possíveis diferenças qualitativas detectadas pelas análises histológicas poderiam ser quantitativamente medidas, procedemos à análise histomorfométrica do terço médio alveolar dos referidos grupos. Inicialmente, relacionamos o percentual ósseo com os períodos propostos e comparamos estes valores entre os grupos de animais.

Na comparação múltipla entre os grupos expressa pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis observou-se significância estatística em todos os grupos e períodos avaliados ($p < 0,05$). Quando analisado o percentual ósseo no terço médio de alvéolos de ratos Wistar foi observado um aumento gradual desse percentual nos períodos de 7, 14 e 28 dias. Ocorreu aumento progressivo na formação óssea até o 28º dia pós-operatório, sendo estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nesse período em relação a 7 e 14 dias. Paralelamente, o percentual ósseo em SHR também expressou aumento progressivo no 7º, 14º e 28º, sendo significativo nesse último ($p < 0,05$), segundo teste de Mann Whitney. Quando comparados os valores obtidos entre os grupos Wistar e SHR, foi observado um reduzido percentual ósseo em SHR ao 7º, 14º, 28º dias (Tab.1; Fig.6). Os valores reduzidos de percentual ósseo estariam correlacionados com menores áreas de tecido ósseo formado, uma vez que foi observado no 28º dia, áreas com tecido conjuntivo sem diferenciação óssea em alvéolos de ratos SHR.

Tabela 1. Percentual de tecido ósseo neoformado no terço médio de alvéolos dentais de ratos Wistar e SHR nos períodos de 7, 14 e 28 dias pós-cirurgia. (N=5).

% TECIDO ÓSSEO		
DIAS	WISTAR	SHR
7	10,13	5,85
14	31,16	20,53
28	49,34	35,66

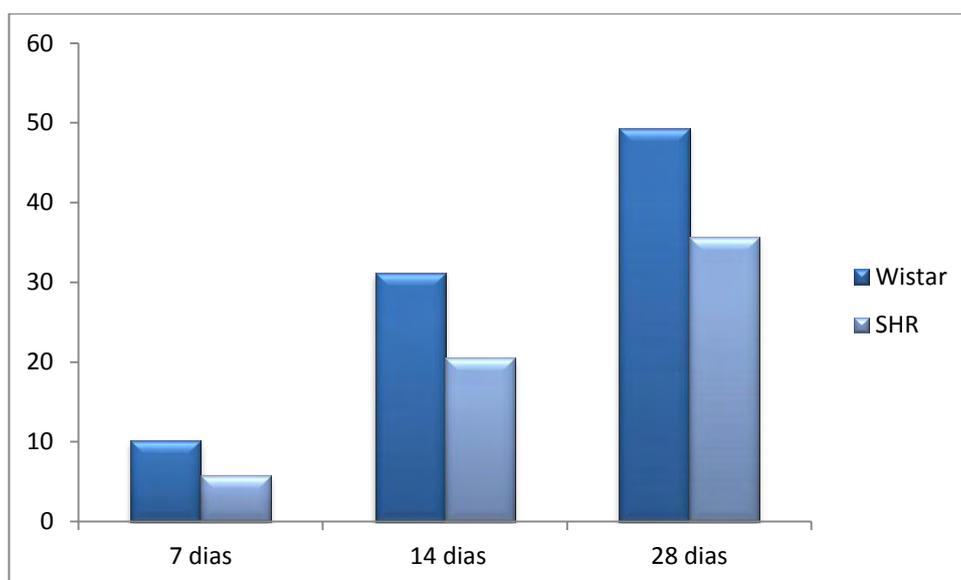


Figura 6. Percentual de tecido ósseo do terço médio do alvéolo dental de Wistar e SHR nos 3 períodos avaliados. As barras representam média dos valores obtidos em cinco diferentes alvéolos para cada período analisado. A comparação entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$), assim como no período de 28 dias em relação aos demais ($p=0,016$).

Quando analisado o percentual ósseo no terço médio de alvéolos de ratos Wistar tratado com losartan foi observado um aumento gradual deste percentual aos 14^o e 28^o dias quando comparado com o 7^o dia pós-cirúrgico. Ainda, foram observados maiores percentuais de tecido ósseo neoformado quando comparado aos grupos Wistar e SHR ($p < 0,05$ em todos os períodos de ambos os grupos).

O percentual ósseo em SHR tratado também expressou aumento gradual no 14^o e 28^o dia quando comparado ao 7^o dia pós-cirúrgico e nos três períodos avaliados pôde-se observar maior neoformação óssea quando comparado a SHR e Wistar ($p < 0,05$ em ambos).

Quando comparados os valores obtidos entre os grupos Wistar e SHR tratados com Losartan, foi observado um menor percentual ósseo em Wistar aos 14^o, 28^o dias (Tab.2; Fig.7), porém sem significância estatística ($p > 0,05$).

Tabela 2. Percentual de tecido ósseo no terço médio de alvéolos dentais de ratos Wistar tratado e SHR tratado com losartan nos períodos de 7, 14 e 28 dias pós-cirurgia. N=5.

% TECIDO ÓSSEO		
DIAS	WISTAR TRATADO	SHR TRATADO
7	21,22	21,16
14	45,88	51,00
28	61,81	69,10

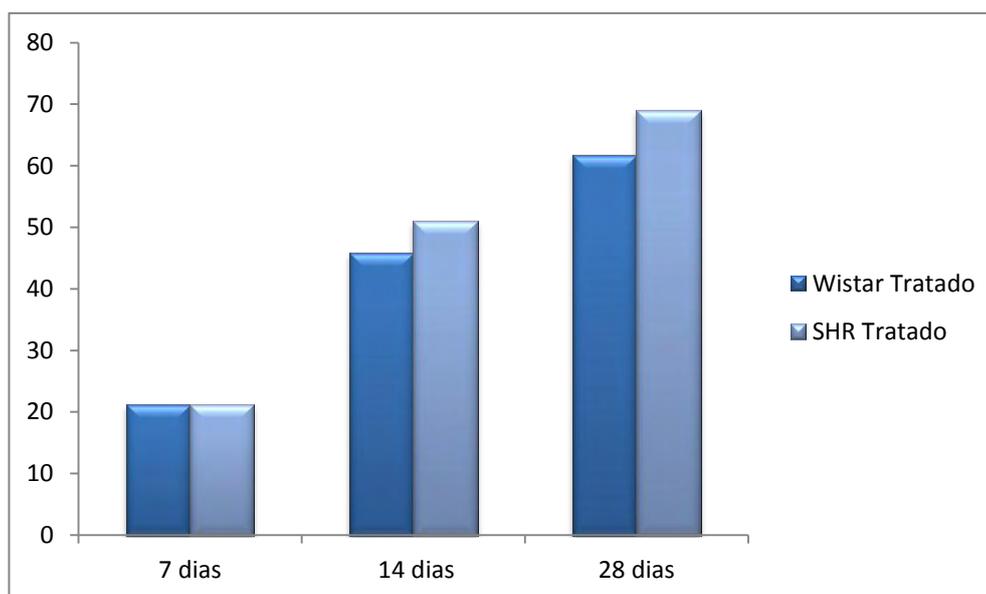


Figura 7. Percentual de tecido ósseo do terço médio do alvéolo dental de Wistar e SHR tratados com losartan. As barras representam média dos valores obtidos em cinco diferentes alvéolos para cada período analisado. A comparação entre os grupos nos referidos períodos não foi estatisticamente significante ($p > 0,05$).

Tabela 3. Percentual de tecido ósseo neoformado no terço médio de alvéolos dentais de todos os grupos avaliados (W, SHR, WT e SHRT) em todos os períodos propostos (7, 14 e 28 dias pós-cirurgia). N=5.

	% Tecido ósseo			
	Wistar	SHR	Wistar tratado	SHR Tratado
7 dias	10,13	5,84	21,22	21,16
14 dias	31,16	20,53	45,88	51,00
28 dias	49,34	35,66	61,81	69,10

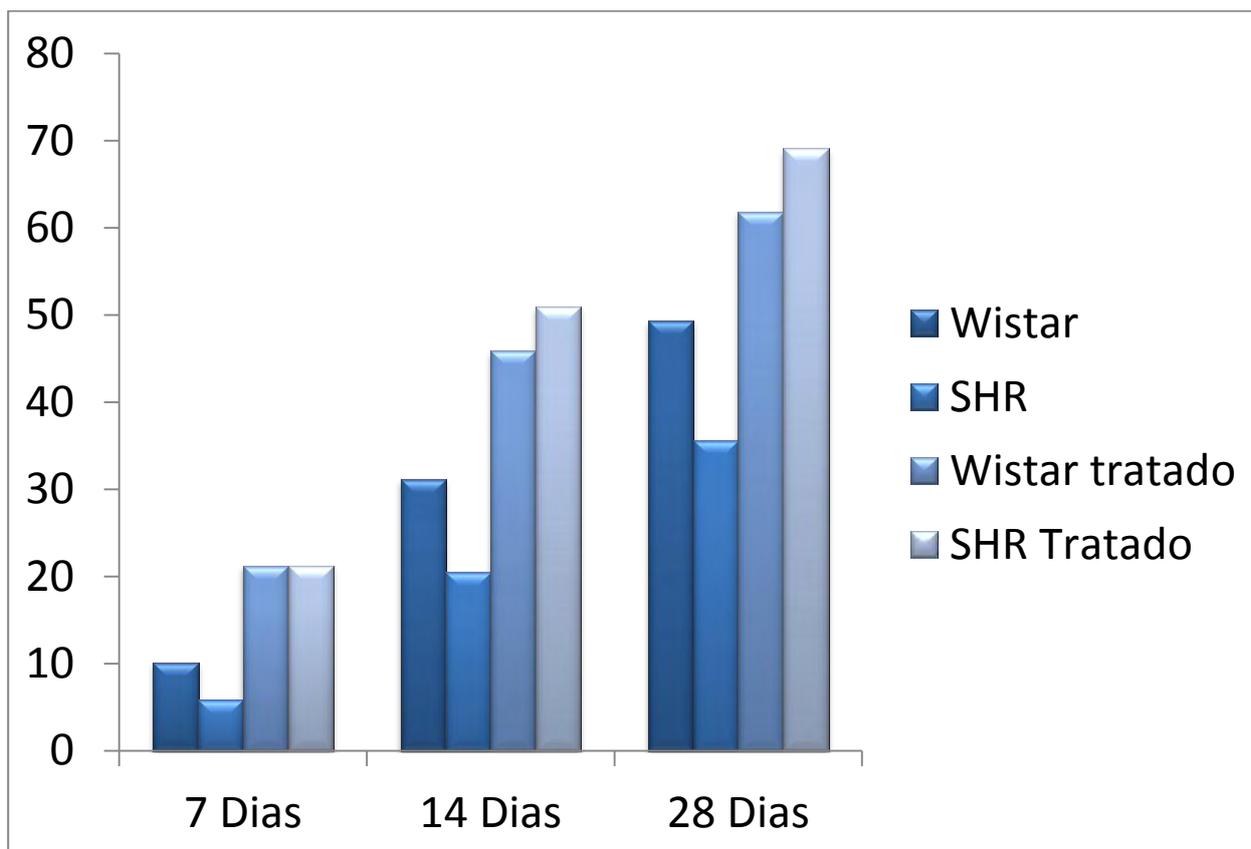


Figura 8. Percentual comparativo de tecido ósseo do terço médio do alvéolo dental de Wistar, Wistar tratado, SHR e SHR tratado. As barras representam média dos valores obtidos em cinco diferentes alvéolos para cada período analisado. A comparação múltipla de amostras independente foi significativa ($p < 0,05$). Na comparação entre as amostras (Mann Whitney) nos diferentes períodos foi notado índice de significância ($p < 0,05$) em Wistar e SHR 28 dias; Wistar e Wistar tratado em 7 e 14 dias; Wistar e SHR, SHR e Wistar e SHR e SHR tratado em todos os períodos (7^o, 14^o e 28^o). Wistar tratado comparado a SHR tratado não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

ESPESSURA DO TRABECULADO ÓSSEO

Quando analisado o trabeculado ósseo em ratos Wistar foi observado aumento gradual da espessura das trabéculas ósseas ao longo dos períodos analisados, sendo constatado aumento significativo no 28º dia quando comparado ao 7º dia pós-operatório, observando também este aumento ao 28º dia pós-cirúrgico quando comparado ao 14º dia pós-cirúrgico (Tab.4; Fig.9). Os dados demonstram que a espessura das trabéculas ósseas aumenta progressivamente com a evolução do processo de reparo alveolar em ratos Wistar, com significância estatística no período de 7 dias comparado a SHR ($p < 0,05$).

Em SHR, foi observado aumento gradual do trabeculado ósseo semelhante ao grupo Wistar. Foi observado também esse aumento nos 28º dia pós-operatório quando comparado ao 14º dia pós-cirúrgico. Sugere-se progresso no aumento da espessura das trabéculas até o 28º dia pós-cirúrgico.

Quando comparados os valores das espessuras do trabeculado ósseo formado nos alvéolos de ambos os grupos, foi observado que as trabéculas em alvéolos de SHR ao 7º dia eram menores do que em alvéolos de ratos Wistar ($p < 0,05$) (Tab.4; Fig.9), tornando-se semelhantes em espessura no 14º dia e, aos 28 dias notou-se tendência a maior espessura no grupo SHR.

Tabela 4. Espessura (μ) do trabeculado ósseo no terço médio de alvéolos dentais pós-extração em ratos Wistar e SHR nos períodos de 7, 14 e 28 dias pós-cirurgia. (N=5).

ESPESSURA DO TRABECULADO ÓSSEO		
DIAS	WISTAR	SHR
7	41,30	29,09
14	65,42	56,60
28	72,34	75,22

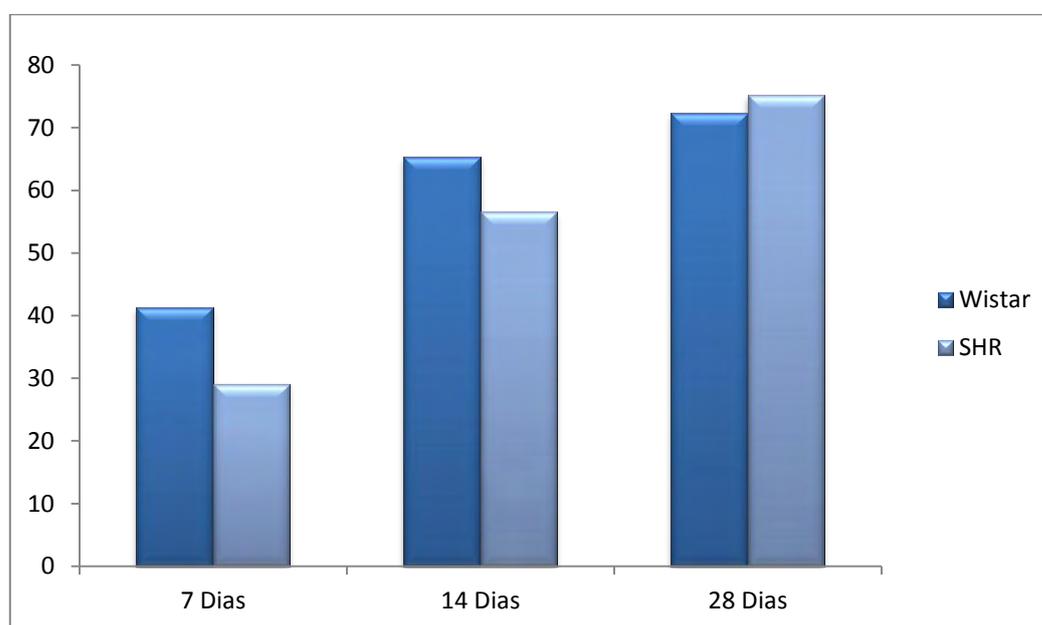


Figura 9. Espessura (μ) do trabeculado ósseo do terço médio do alvéolo dental pós-extração de ratos Wistar e SHR nos períodos de 7, 14 e 28 dias. As barras representam média dos valores obtidos em cinco diferentes alvéolos para cada período analisado. A comparação entre os grupos nos referidos períodos foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) somente no período de 7 dias (Teste de Mann Whitney). N=5.

Em relação ao trabeculado ósseo em ratos Wistar tratados com Losartan foi observado aumento da espessura das trabéculas ósseas ao longo dos períodos analisados, sendo constatado aumento significativo no 28º dia quando

comparado ao 7^o e 14^o período (Tab.5; Fig.10). Estes dados demonstram que a espessura das trabéculas ósseas aumenta progressivamente com a evolução do processo de reparo alveolar em ratos Wistar tratados com Losartan. Em SHR, foram observados resultados semelhantes com aumento marcante da espessura de trabéculas no 28^o dia.

Quando comparados os valores das espessuras do trabeculado ósseo formado nos alvéolos de ambos os grupos, foi observado que as espessuras das trabéculas em alvéolos de SHR ao 7^o e 14^o dias pós-cirúrgicos eram menores do que em alvéolos de ratos Wistar tratados (Tab.5; Fig.10) sugerindo osso imaturo. Contudo, no 28^o dia a espessura do trabeculado do grupo hipertenso tratado foi maior do que Wistar tratado, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 5. Espessura (μ) do trabeculado ósseo no terço médio de alvéolos dentais em ratos Wistar e SHR tratados com losartan nos períodos de 7, 14 e 28 dias pós-cirurgia. N=5.

ESPESSURA DO TRABECULADO ÓSSEO		
DIAS	WISTAR TRATADO	SHR TRATADO
7	39,44	33,92
14	64,76	63,12
28	110,84	140,16

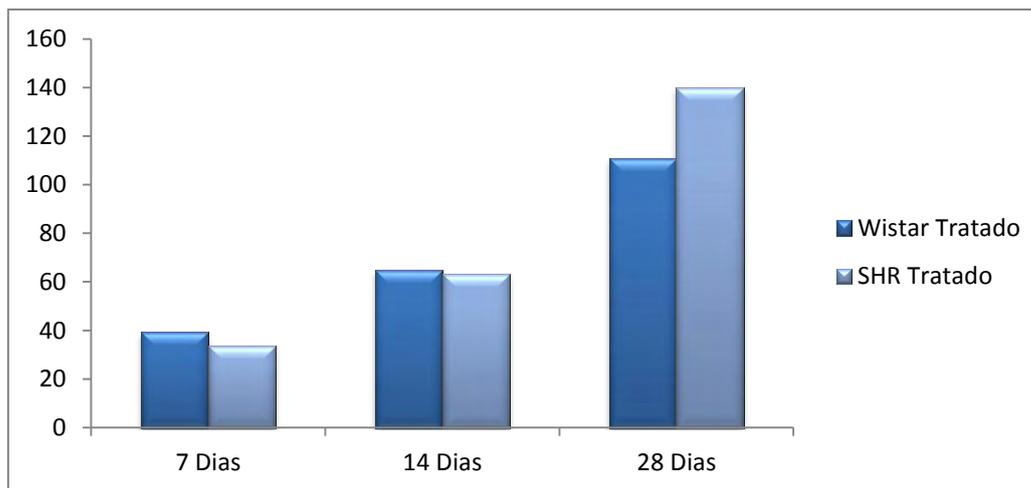


Figura 10. Espessura (μ) do trabeculado ósseo do terço médio do alvéolo dental de ratos Wistar e SHR tratados com Losartan. A comparação entre os grupos nos referidos períodos mostrou significância estatística ($p < 0,05$) no período de 28 dias (Teste de Mann Whitney).

Tabela 6. Espessura (μ) do trabeculado ósseo de alvéolos dentais de ratos em todos os grupos avaliados (W, SHR, WT e SHRT) em todos os períodos propostos (7, 14 e 28 dias). N=5.

Espessura do Trabeculado				
	Wistar	SHR	Wistar tratado	SHR Tratado
7 Dias	41,30	29,10	39,44	33,92
14 Dias	65,42	56,60	64,76	63,12
28 Dias	72,34	75,22	110,84	140,16

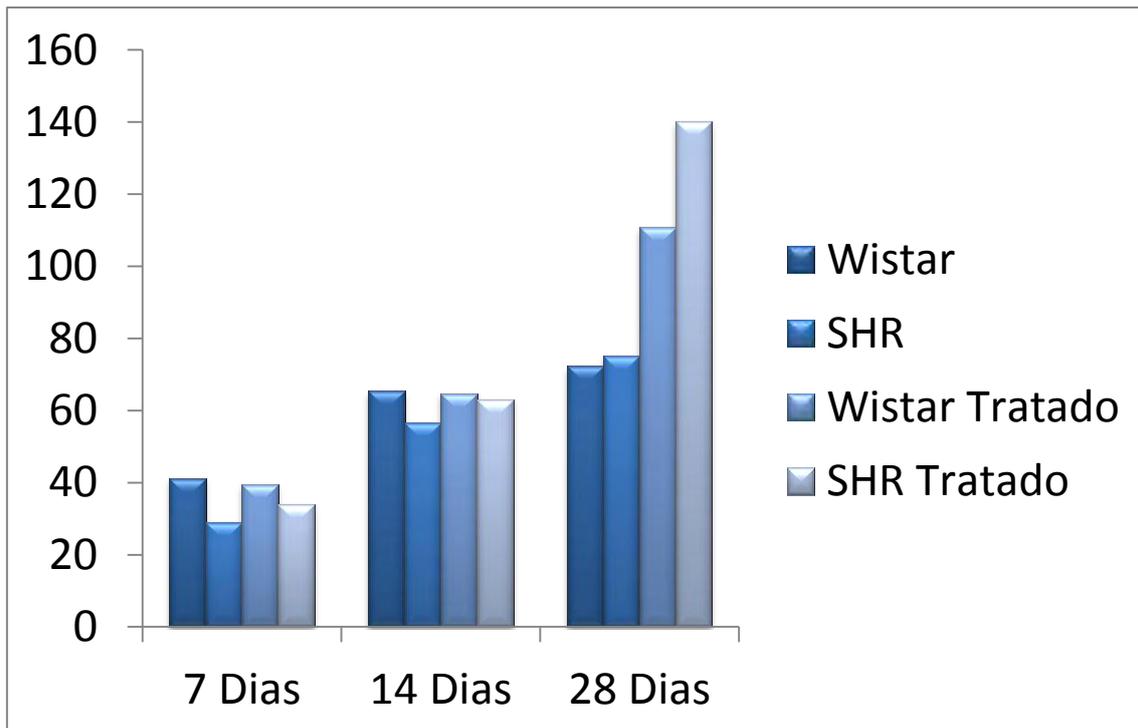


Figura 11. Espessura (μ) do Trabeculado ósseo em terço médio do alvéolo dental de ratos Wistar, Wistar tratado, SHR e SHR tratado. As barras representam média dos valores obtidos em cinco diferentes alvéolos para cada período analisado. A comparação múltipla de amostras independentes demonstrou diferença estatística na espessura do trabeculado em 7 dias (Wistar e SHR) e 28 dias (todas as demais comparações entre as amostras nos referidos períodos [estatisticamente significativa ($p > 0,05$) pelo Teste de Mann Whitney]). N=5

ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Avaliação da expressão das proteínas OPG, RANKL, TRAP e PECAM

A imunomarcção foi analisada por um único observador, previamente calibrado, a partir da atribuição de *scores* de 0 a 3 (*score* 0: sem marcação, 1: marcação fraca/difusa, 2: marcação moderada e 3: marcação intensa). Foram realizadas reações imunoistoquímicas utilizando anticorpos contra as proteínas OPG, RANKL, TRAP e PECAM, analisadas durante o processo de reparo alveolar aos 7^o, 14^o e 28^o dias pós-cirúrgicos. As análises foram realizadas em áreas do terço médio do alvéolo.

As imunomarcções para osteoprotegerina (OPG), bem como para RANKL foram observadas em osteoblastos e na matriz extracelular do tecido ósseo em formação. A OPG mostrou-se com marcações intensas durante os três períodos avaliados no grupo Wistar Losartan. O grupo Wistar apresentou marcação leve aos 7 dias, porém moderada aos 14 e 28 dias pós exodontia. No grupo de ratos hipertensos (SHR), foi observada imunomarcção intensa aos 14 dias pós exodontia, no entanto, aos 28 dias a imunomarcção manteve-se moderada. No grupo SHR tratado com losartan, as imunomarcções para osteoprotegerina mantiveram-se leves durante os três períodos experimentais.

A RANKL mostrou imunomarcção intensa aos 14 e 28 dias no grupo Wistar tratado com Losartan. No grupo Wistar, a presença de RANKL foi evidenciada de maneira moderada. Bem como aos 14 e 28 dias do grupo SHR tratado com Losartan. Vale destacar que no grupo SHR, a imunomarcção para RANKL mostrou-se leve aos 7 dias, moderada aos 14 dias e manteve-se intensa aos 28 dias.

A PECAM, proteína que marca moléculas de adesão das células endoteliais, mostrou imunomarcção positiva nos vasos em neoformação. No

grupo Wistar, aos 7 e 14 dias manteve-se leve e moderada aos 28 dias. A hipertensão no grupo SHR mostrou que a presença de novos vasos estava reduzida durante a reparação aos 7 e 14 dias e manteve-se moderada aos 28 dias após a exodontia. O tratamento com Losartan nos ratos Wistar mostrou um aumento na formação de novos vasos sanguíneos que apresentou um escore moderado aos 7 dias e se manteve intenso aos 14 e 28 dias. No grupo de ratos hipertensos e tratados com Losartan, a neoformação de vasos manteve-se leve aos 7 e 14 dias e mostrou-se moderada aos 28 dias.

A TRAP mostrou marcação positiva para osteoclastos, caracterizando o processo de reabsorção do tecido ósseo.

No grupo Wistar, foi possível observar a presença moderada de osteoclastos aos 7 e 14 dias, porém leve aos 28 dias. No grupo SHR, a imunomarcação para TRAP, caracterizando a presença de osteoclastos mostrou-se moderada aos 7 dias, intensa aos 14 dias e novamente moderada aos 28 dias. O tratamento com Losartan nos ratos Wistar e nos ratos SHR manteve a presença moderada para osteoclastos positivos para a TRAP.

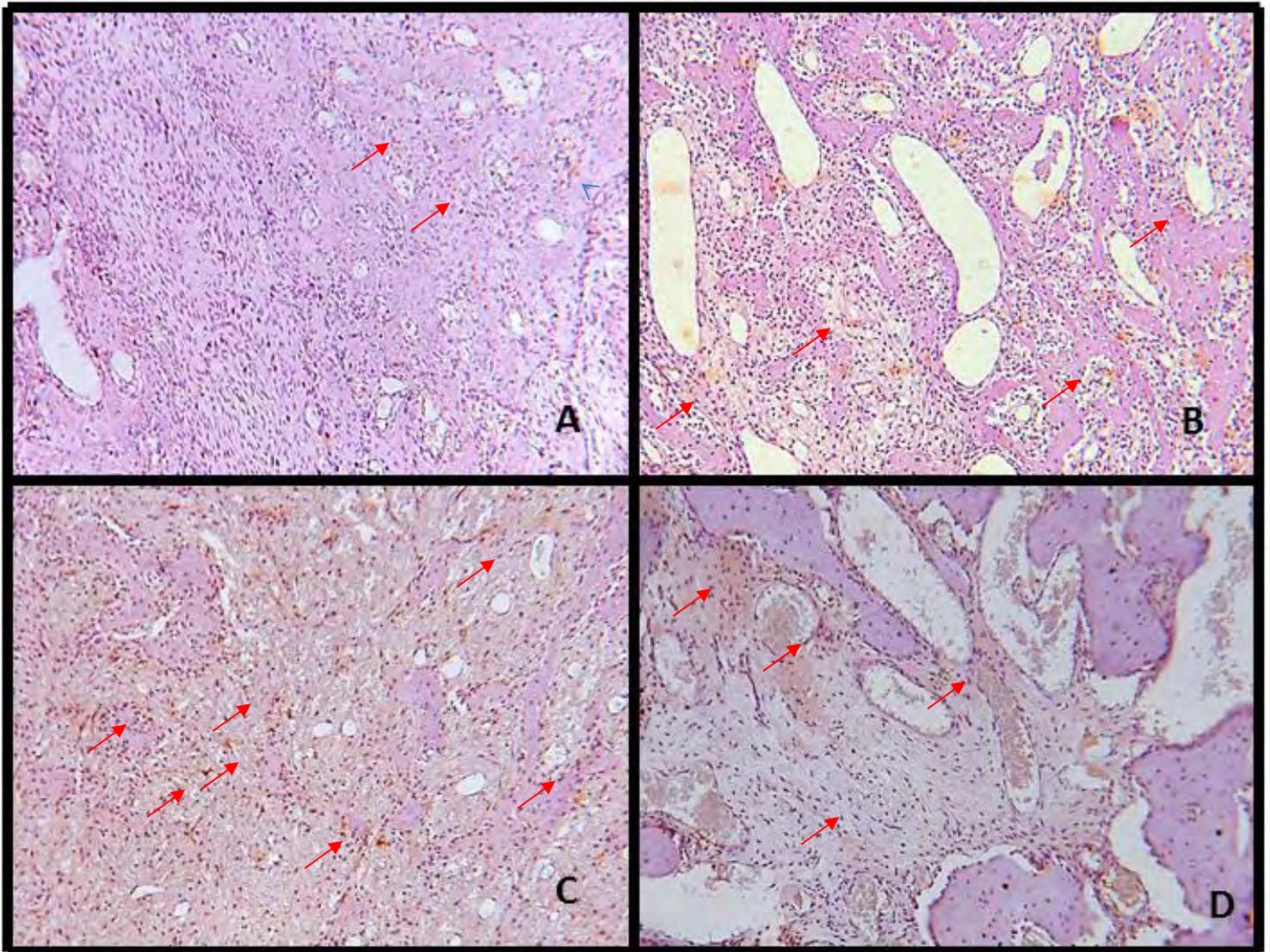


Figura 12. OPG (osteoprotegerina) correspondente a 7 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). Imunomarcações nas setas vermelhas. (Objetiva 16x).

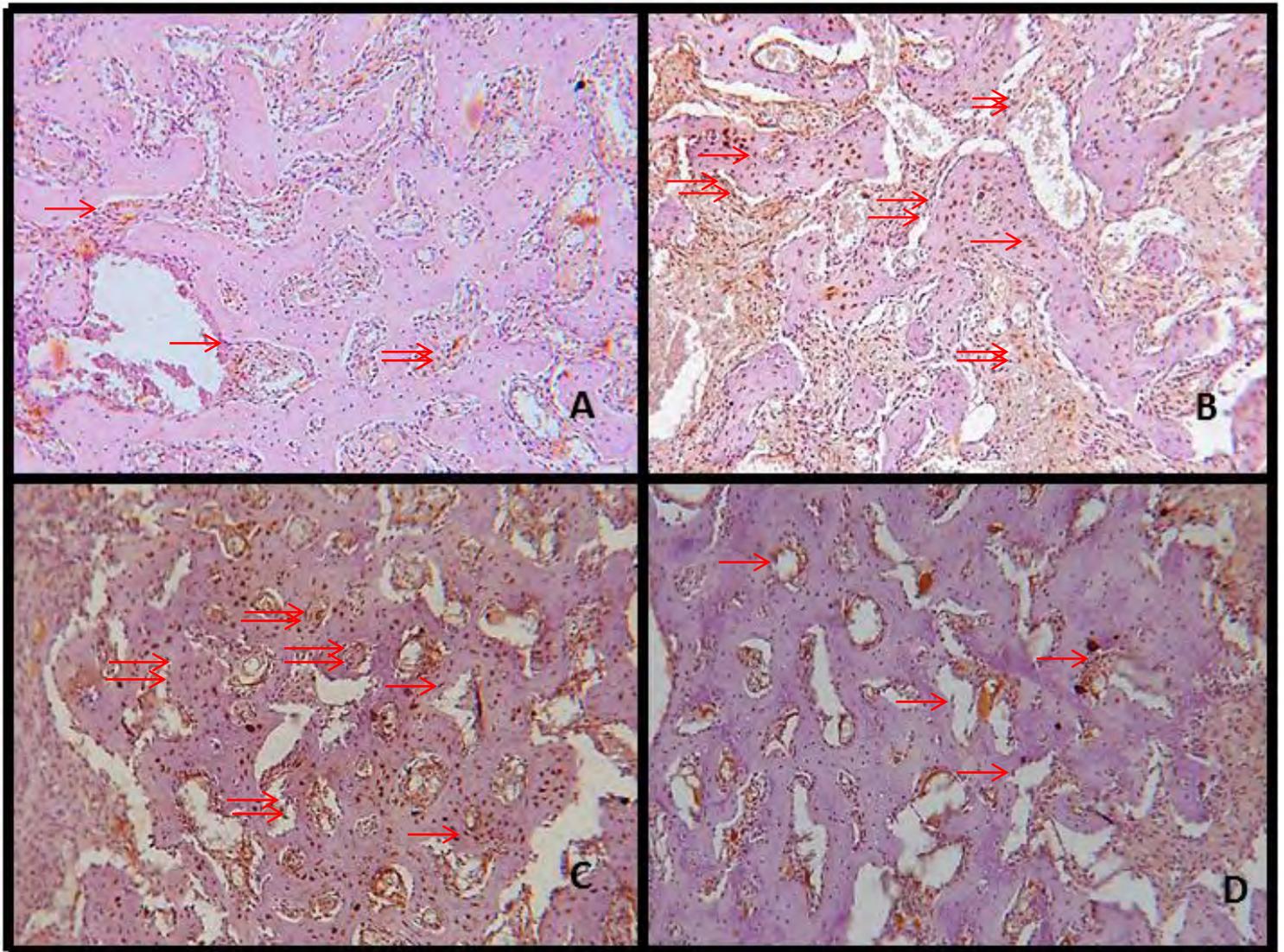


Figura 13. OPG (osteoprotegerina) correspondente a 14 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). Imunomarcações nas setas vermelhas. (Objetiva 16x).

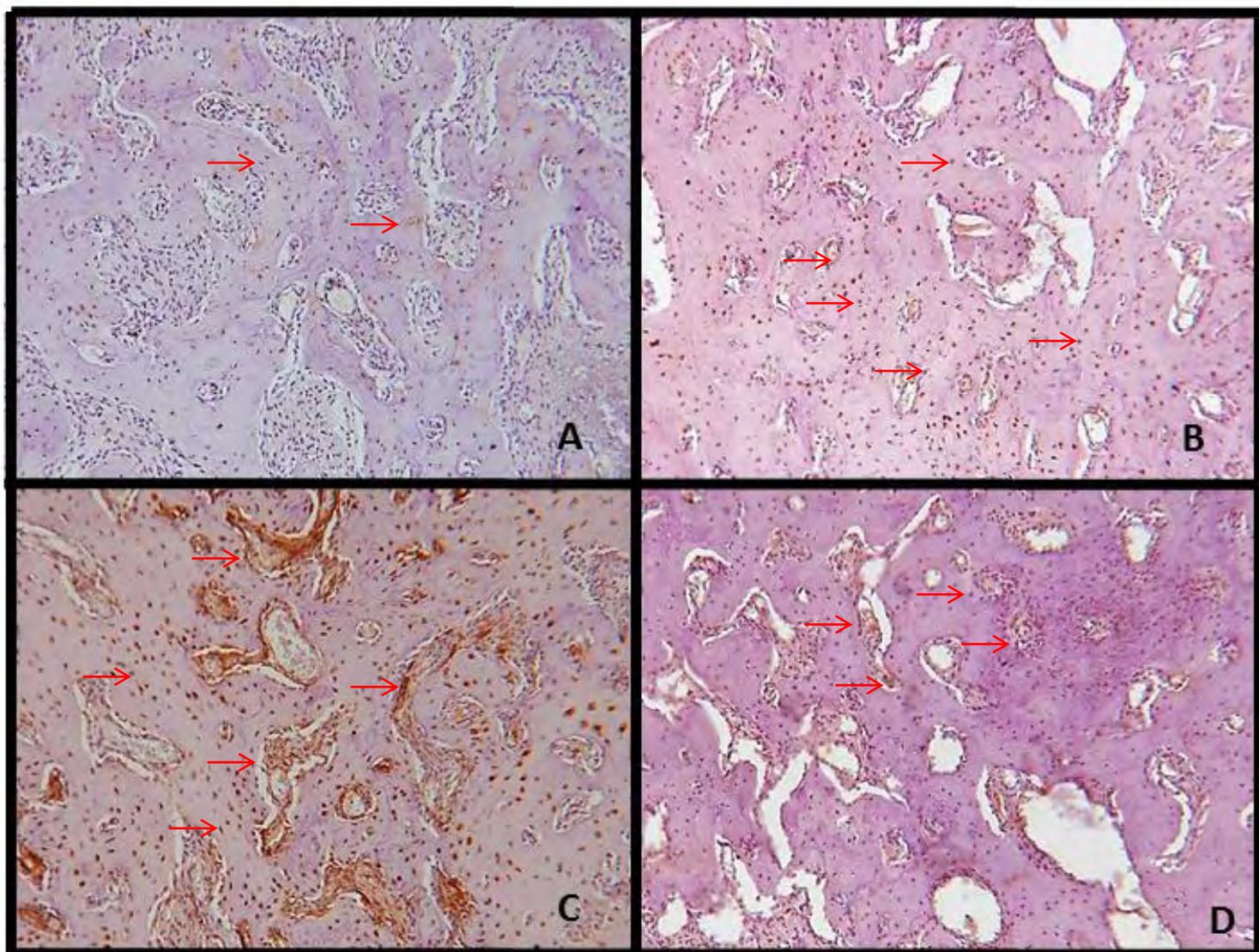


Figura 14. OPG (osteoprotegerina) correspondente a 28 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). Imunomarcações nas setas vermelhas. (Objetiva 16x)

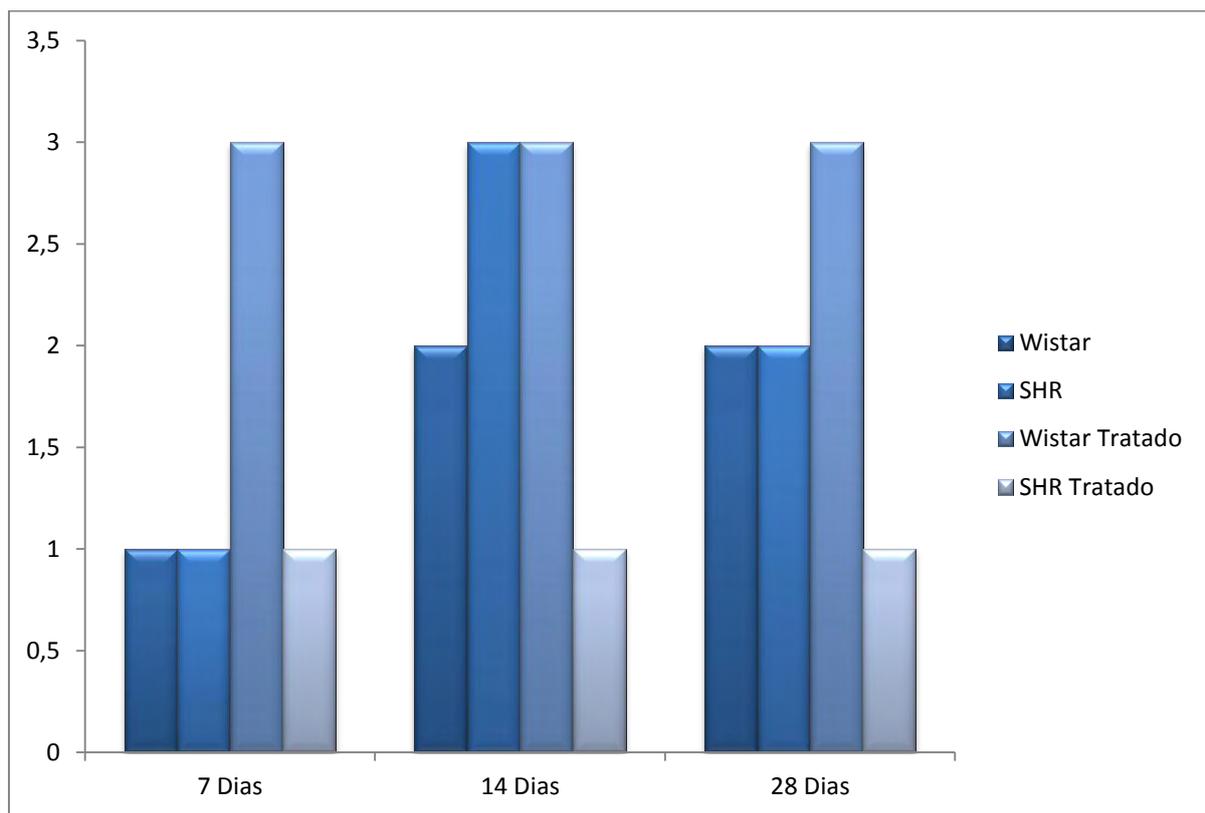


Figura 15. Imunomarcações de OPG. Escore 0 (fraco/ausente), escore 1 (leve), escore 2 (moderado), escore 3 (intenso) em todos os grupos e períodos avaliados. (N=5).

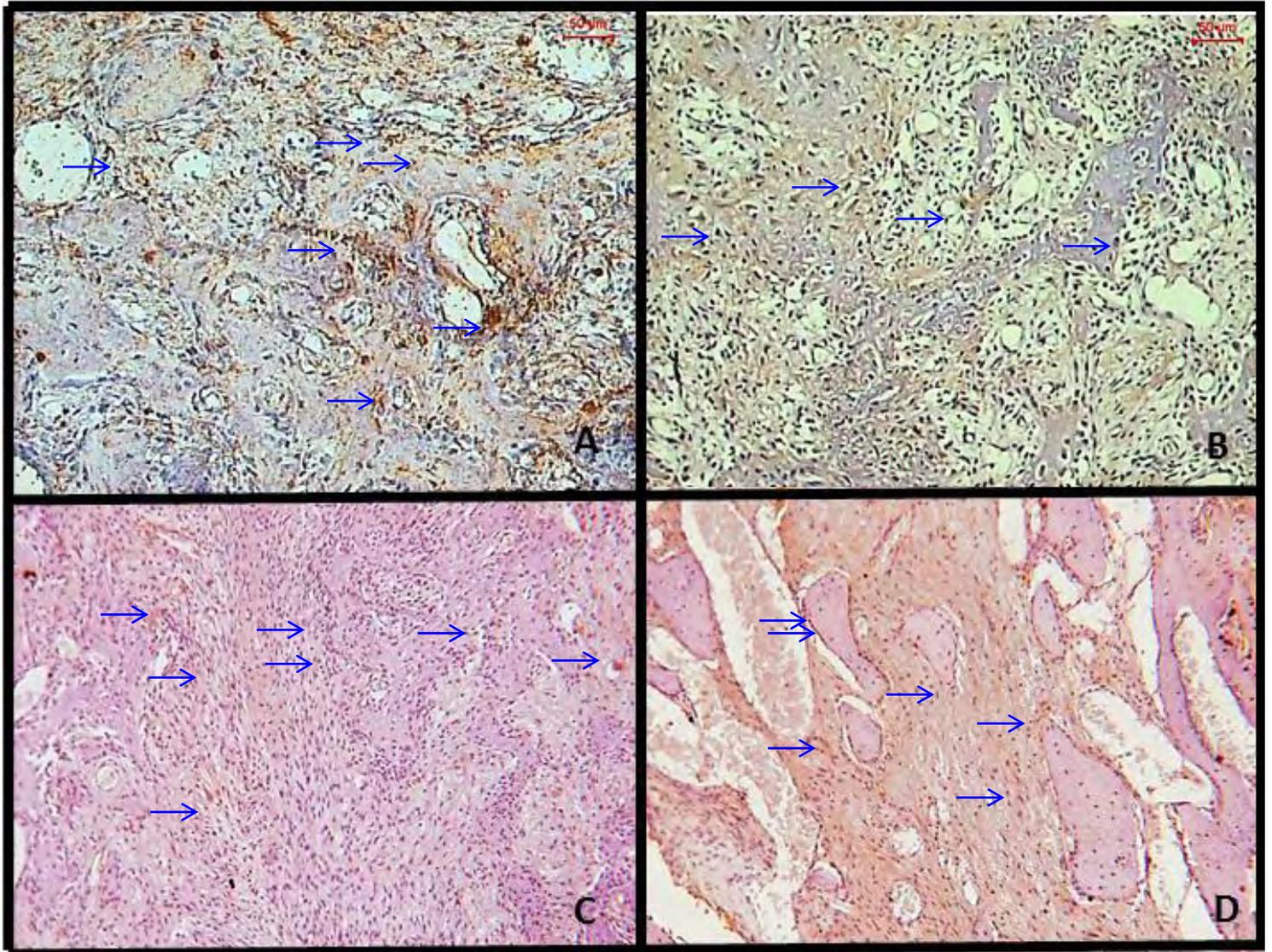


Figura 16. RANKL correspondente a 7 dias. A. Wistar; B. SHR; C.Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). Imunomarcações nas setas azuis. (Objetiva 16x).

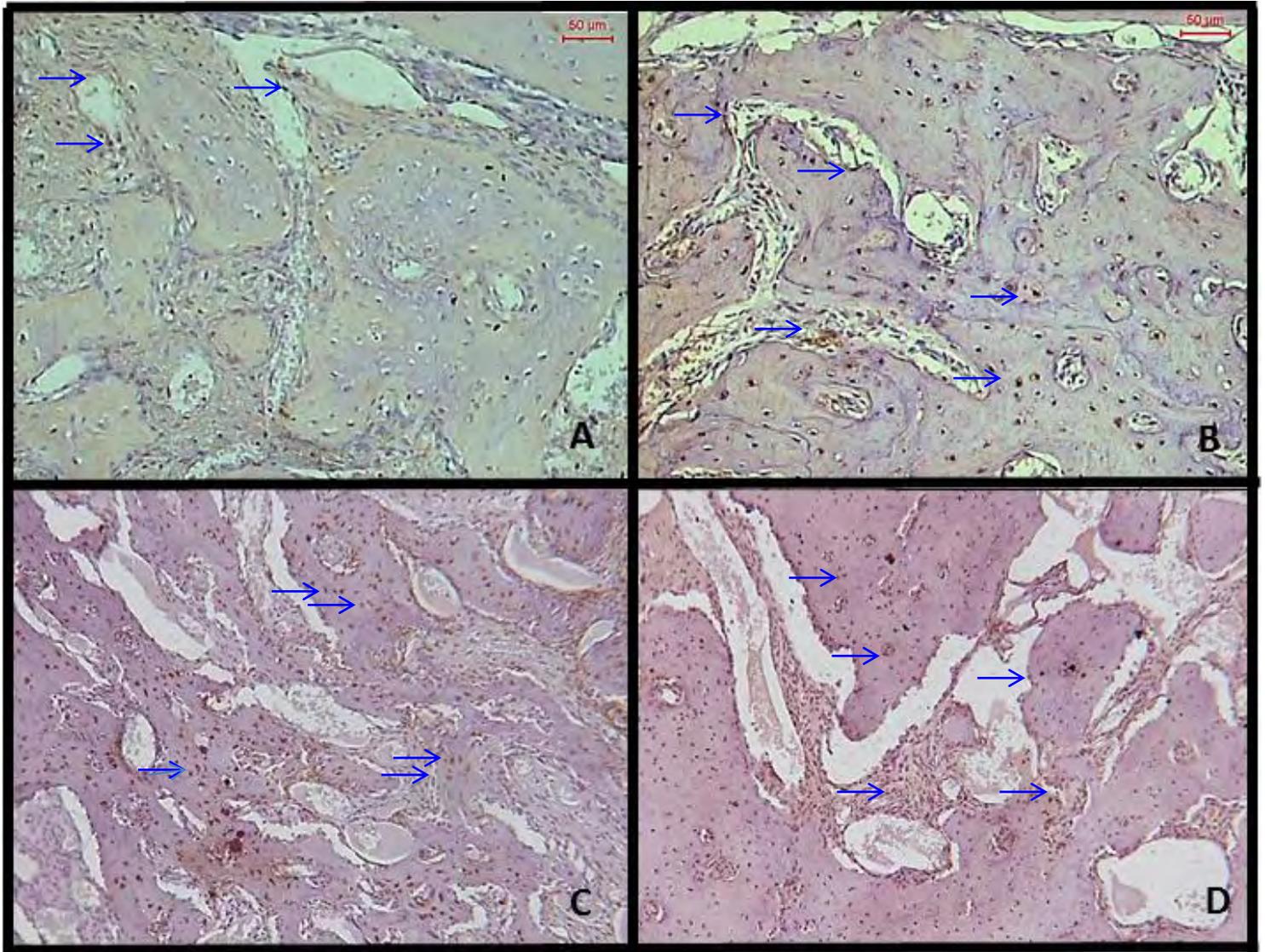


Figura 17. RANKL correspondente a 14 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). Imunomarcações nas setas azuis. (Objetiva 16x).

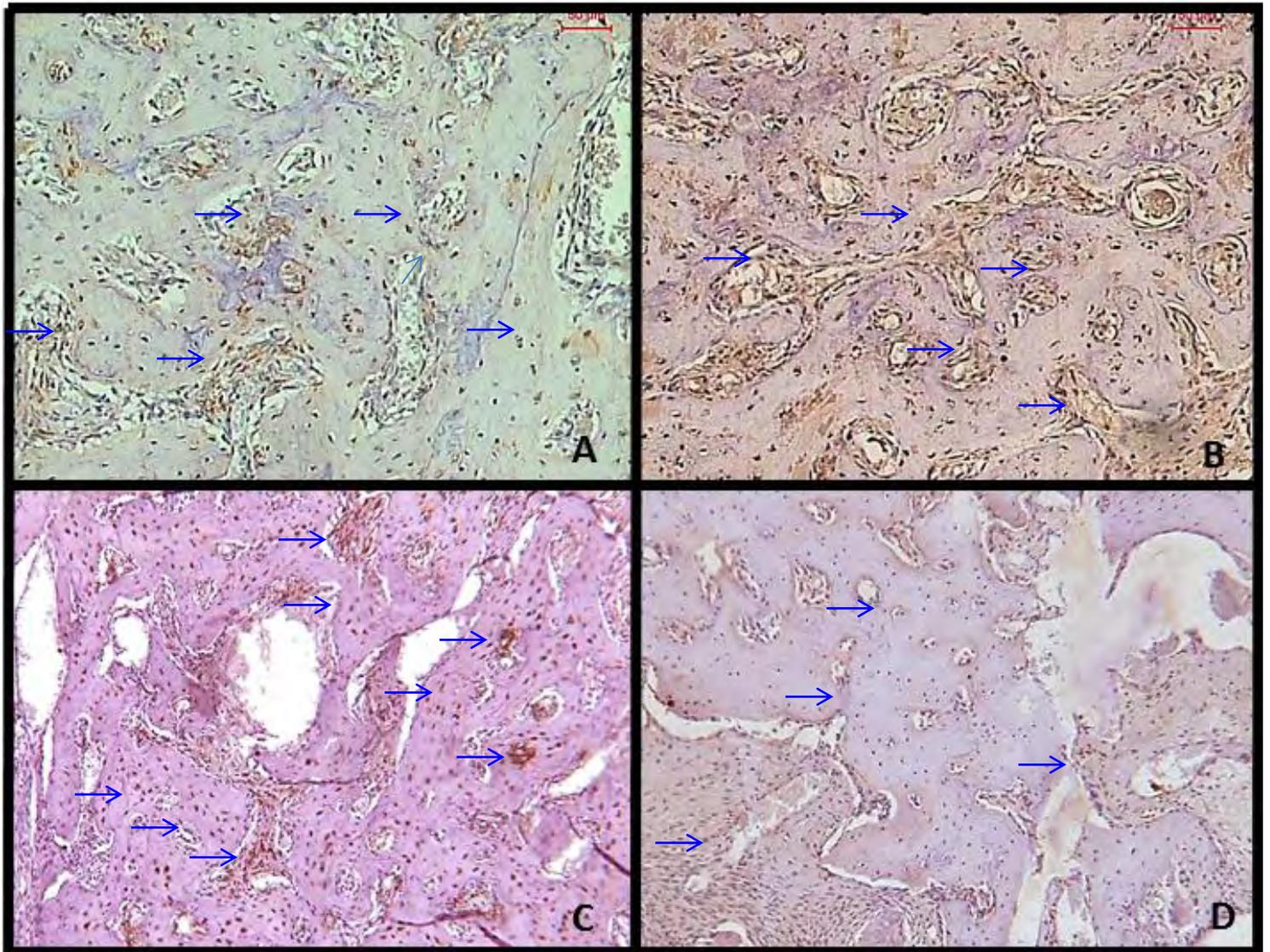


Figura 18. Imunomarcção de RANKL correspondente a 28 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). Imunomarcações nas setas azuis. (Objetiva 16x).

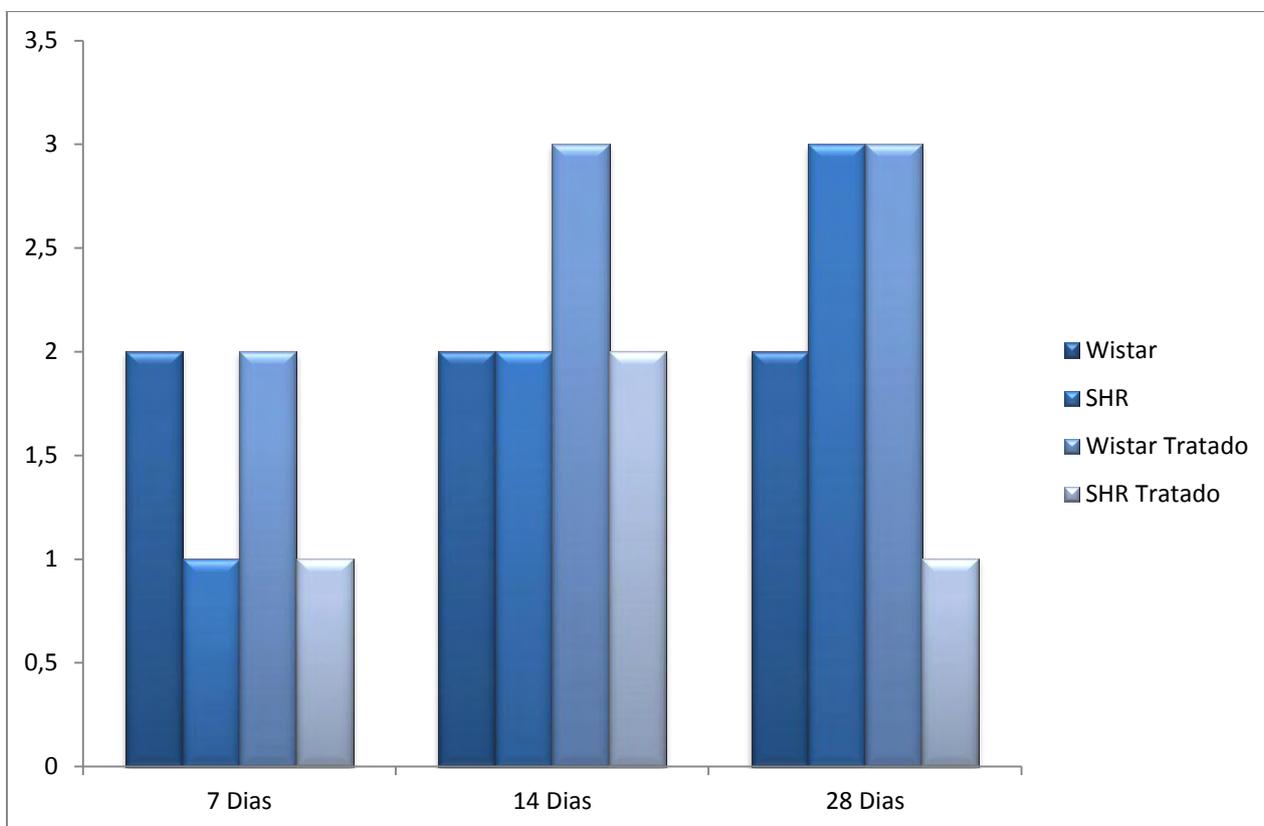


Figura 19. Imunomarcações de RANKL. Escore 0 (fraco/ausente), escore 1 (leve), escore 2 (moderado), escore 3 (intenso) em todos os grupos e períodos avaliados. (N=5).

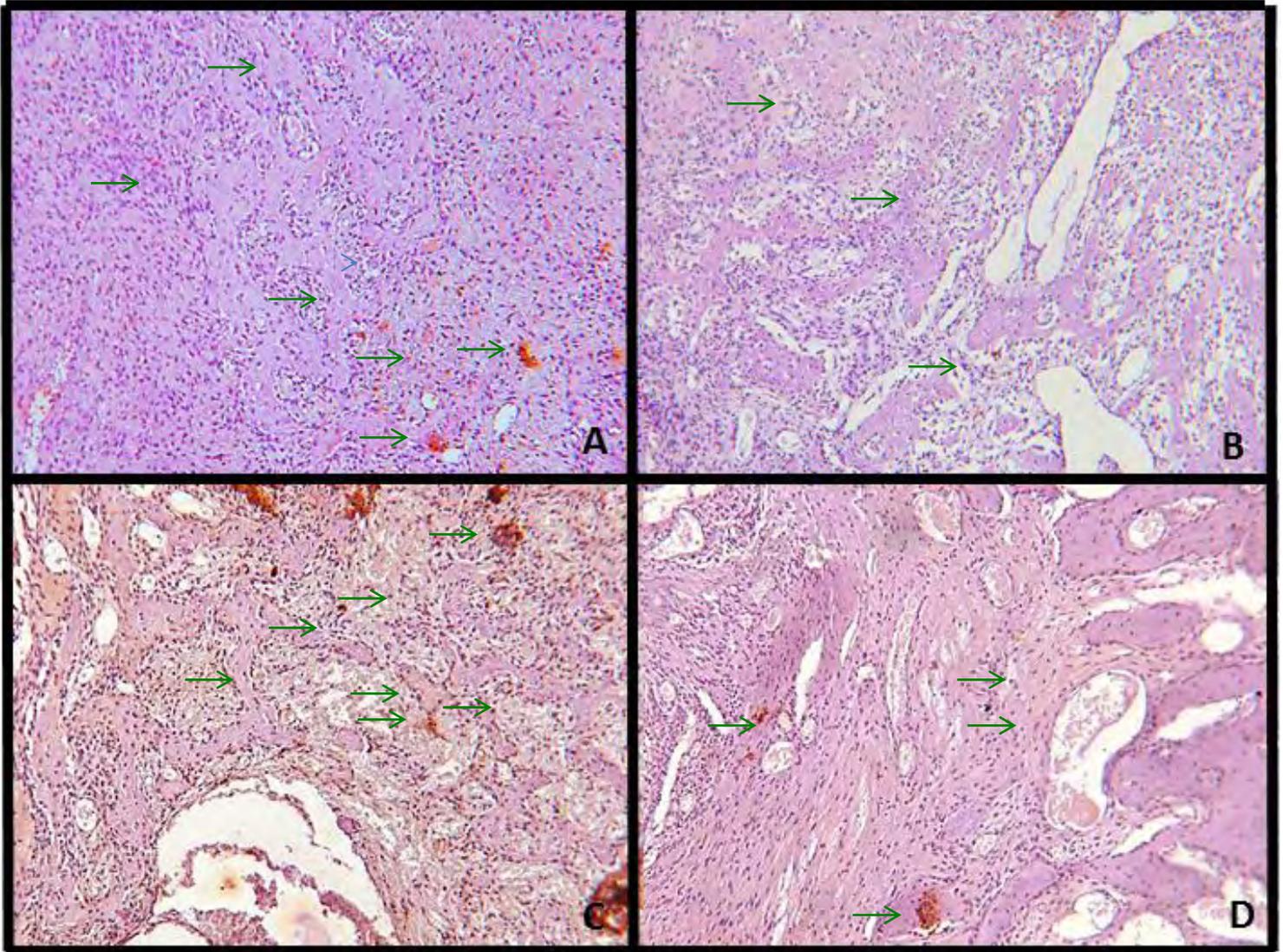


Figura 20. PECAM correspondente a 7 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). Imunomarcações nas setas verdes. (Objetiva 16x).

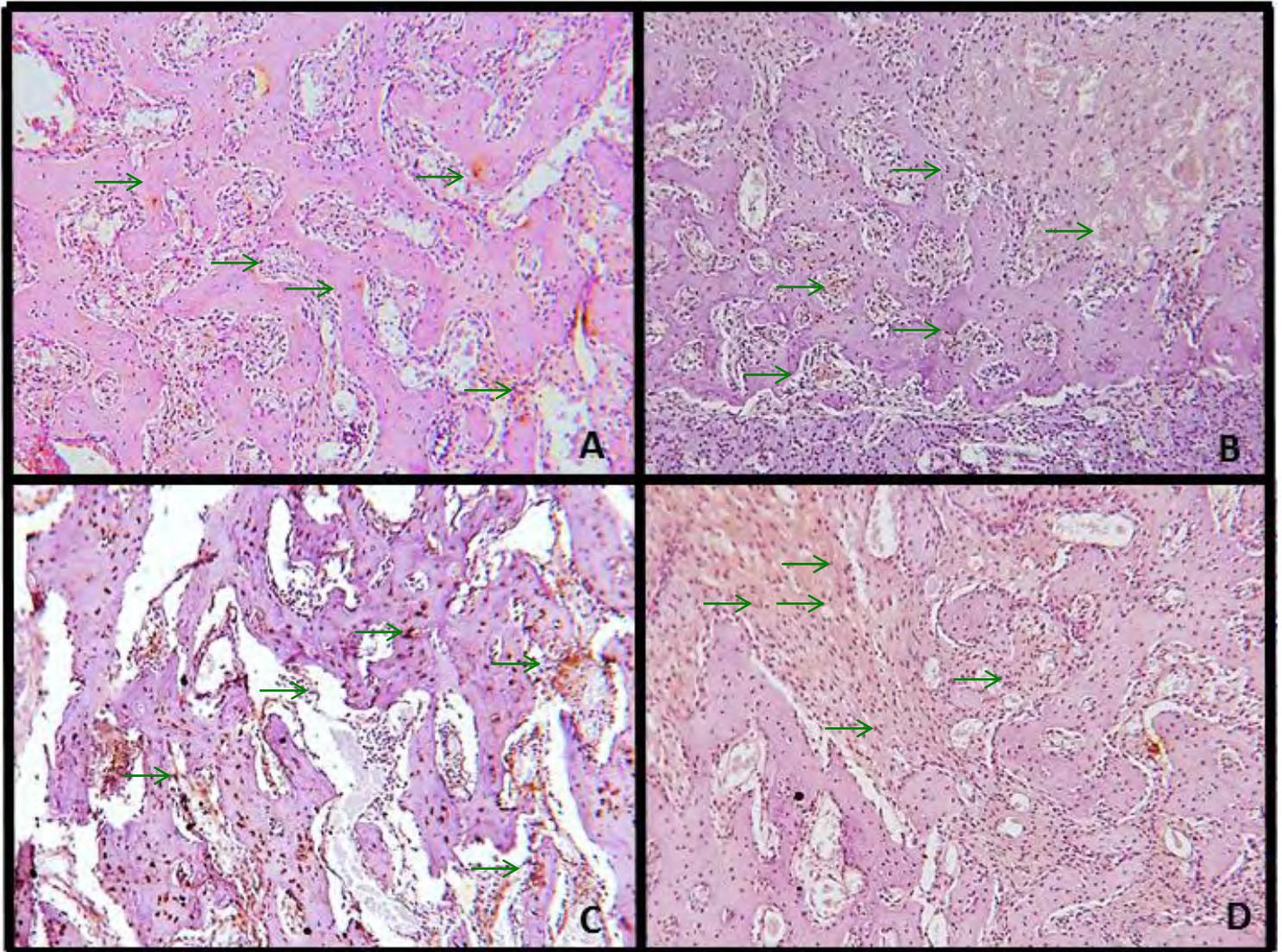


Figura 21. PECAM correspondente a 14 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). Imunomarcações nas setas verdes. (Objetiva 16x).

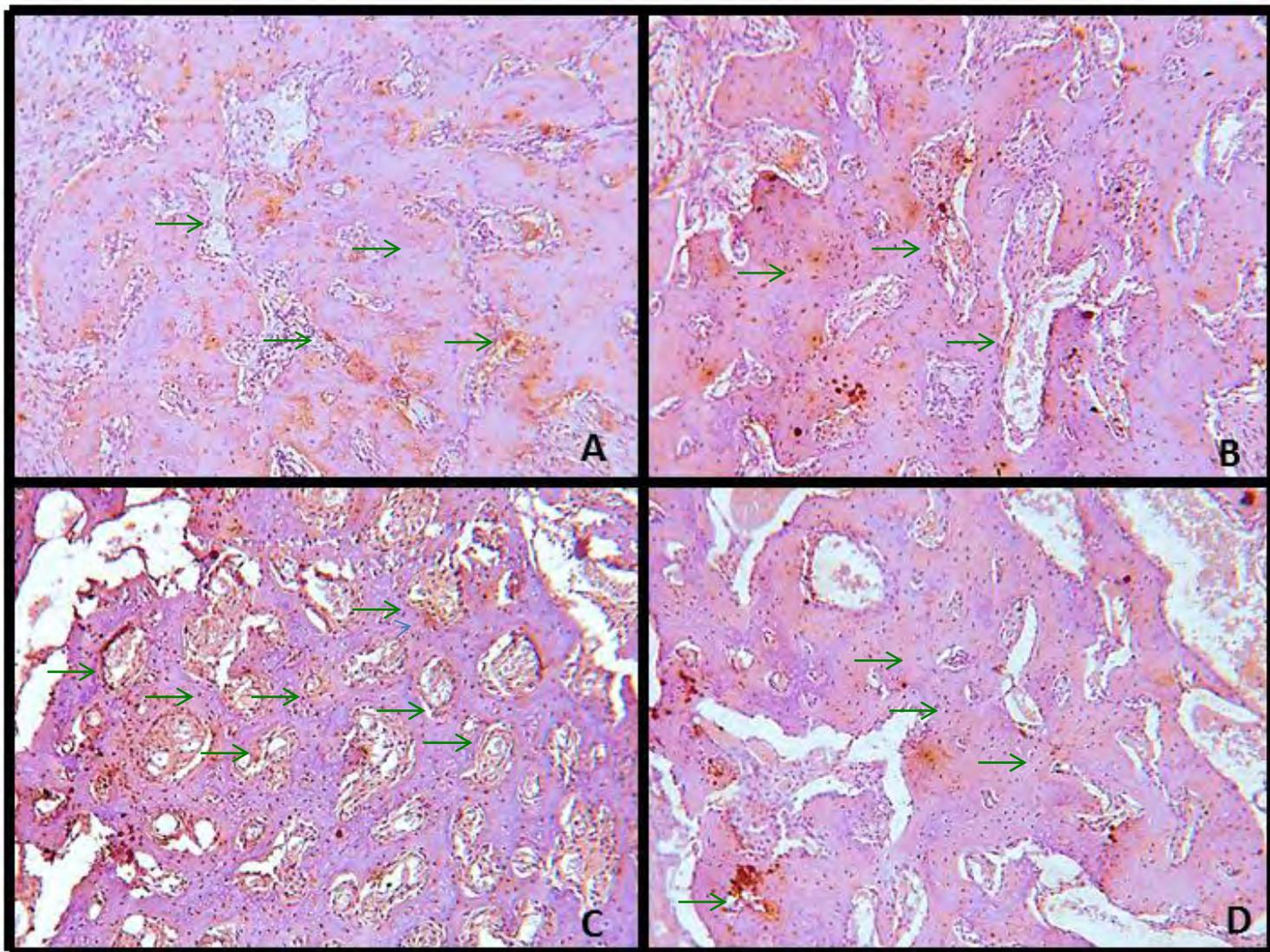


Figura 22. PECAM correspondente a 28 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). Imunomarcações nas setas verdes. (Objetiva 16x).

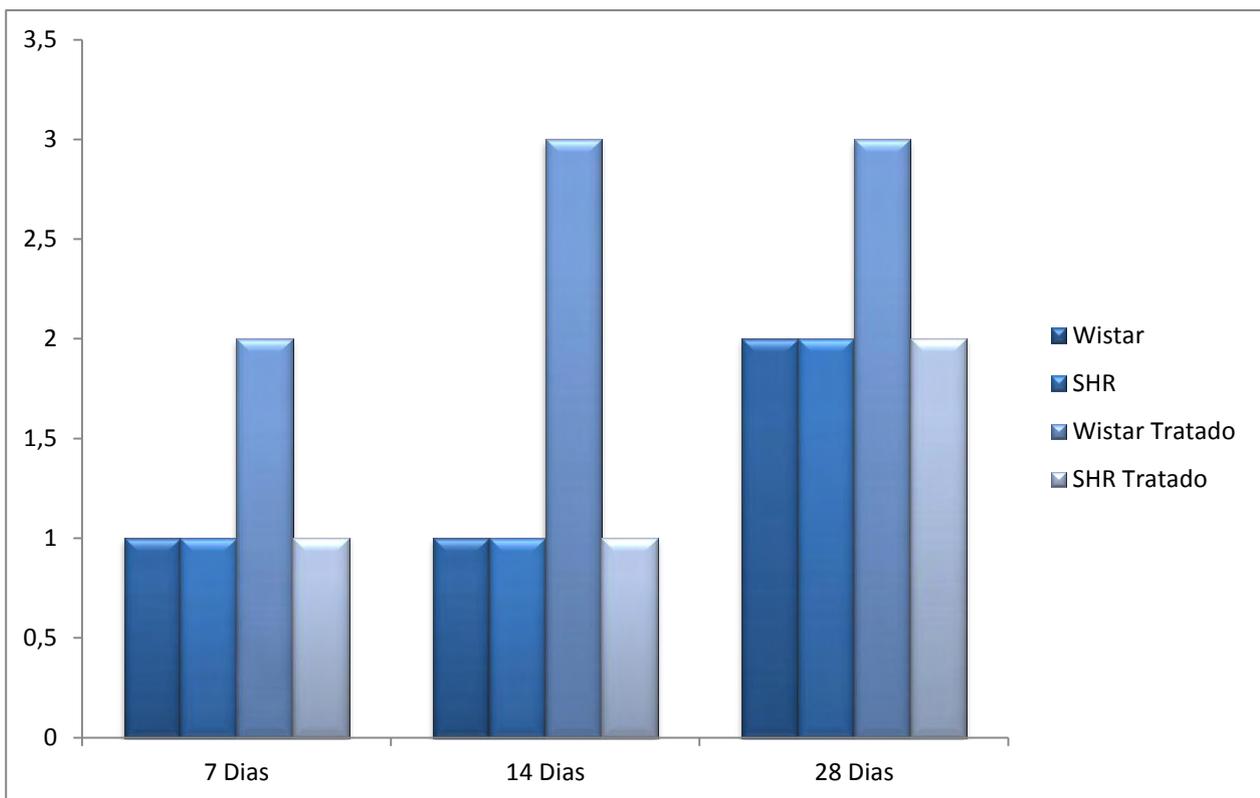


Figura 23. Imunomarcações de PECAM. Escore 0 (fraco/ausente), escore 1 (leve), escore 2 (moderado), escore 3 (intenso) em todos os grupos e períodos avaliados. (N=5).

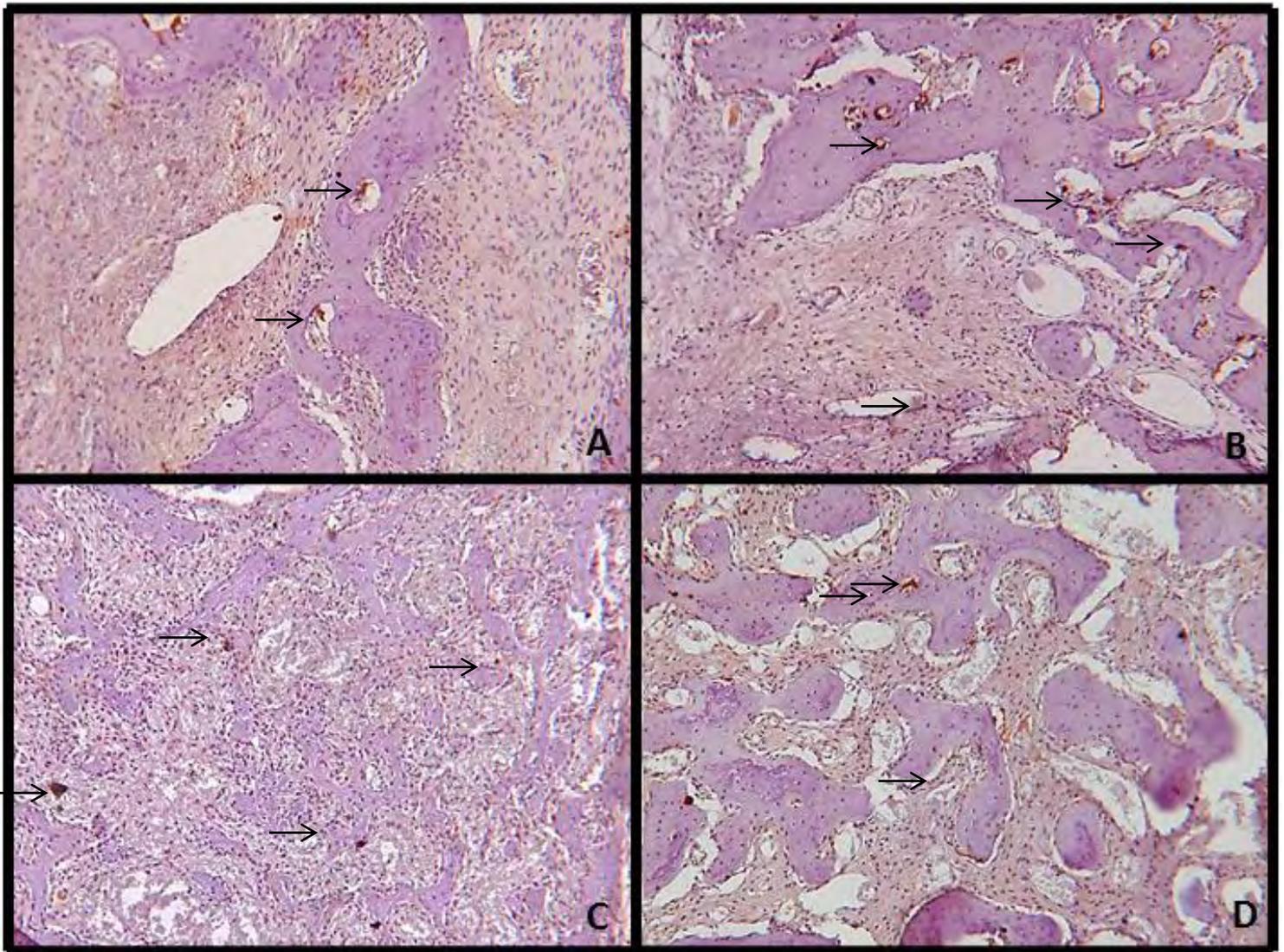


Figura 24. TRAP correspondente a 7 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). Imunomarcações nas setas pretas. (Objetiva 16x).

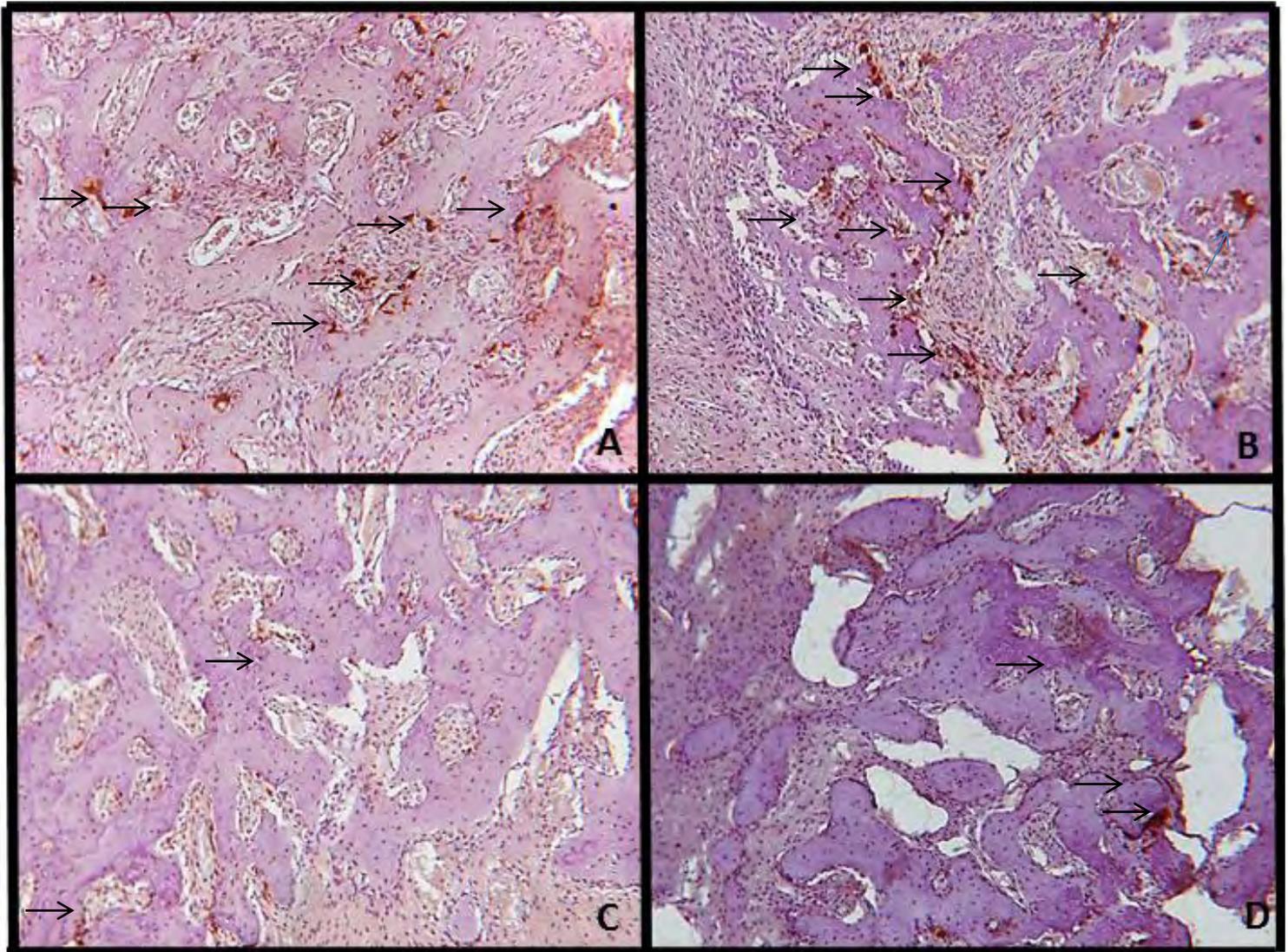


Figura 25. TRAP correspondente a 14 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). Imunomarcações nas setas pretas. (Objetiva 16x).

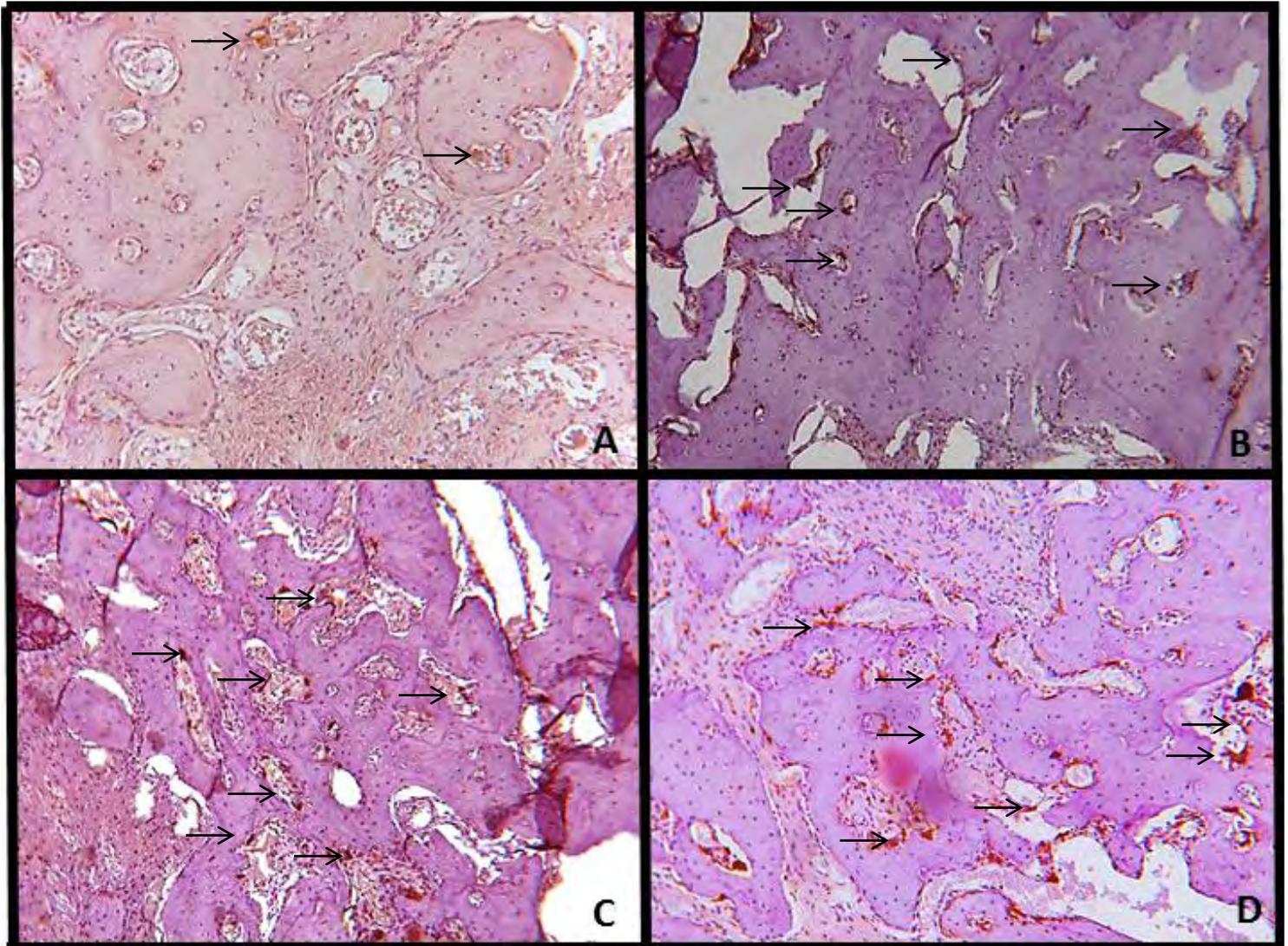


Figura 26. TRAP correspondente a 28 dias. A. Wistar; B. SHR; C. Wistar tratado (losartan); D. SHR tratado (losartan). Imunomarcações nas setas pretas. (Objetiva 16x).

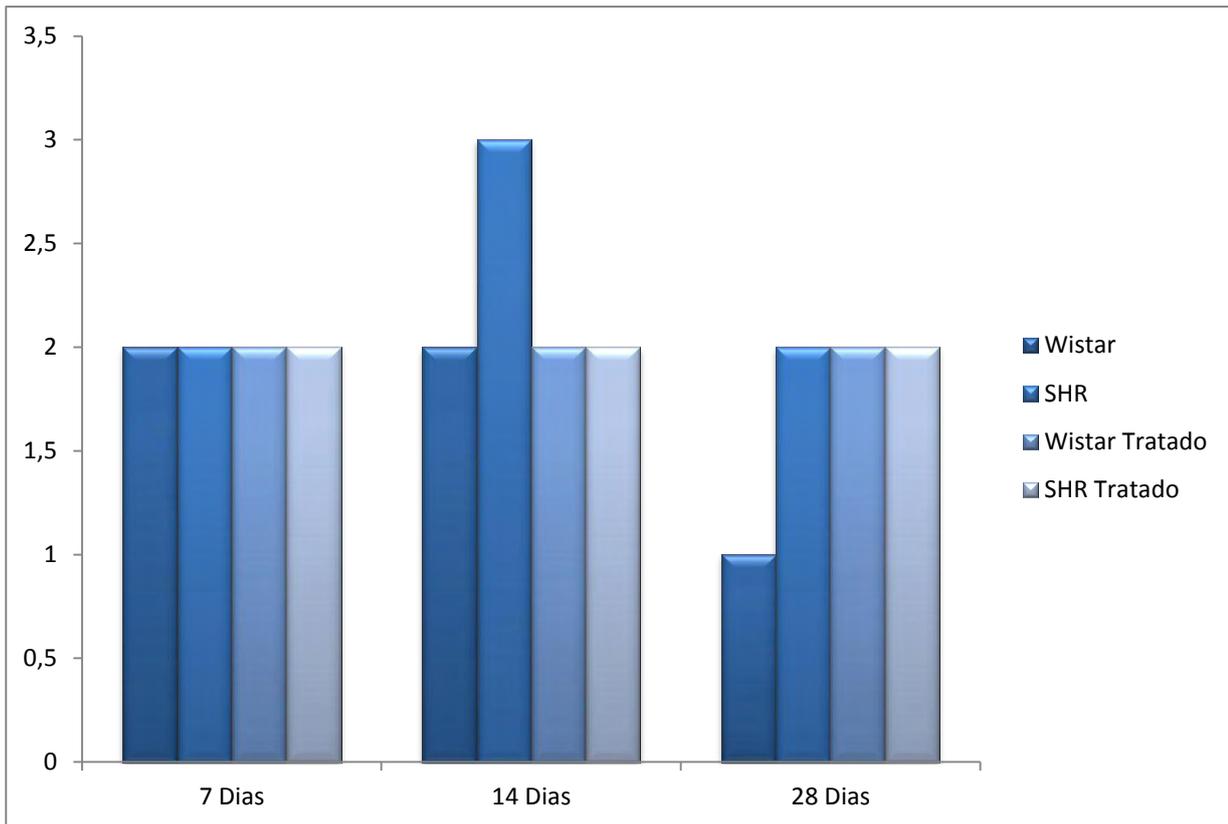


Figura 27. Imunomarcações de TRAP. Escore 0 (fraco/ausente), escore 1 (leve), escore 2 (moderado), escore 3 (intenso) em todos os grupos e períodos avaliados. (N=5).

Discussão

DISCUSSÃO

A hipertensão arterial essencial humana é uma condição clínica de etiologia multifatorial, com altos índices de complicações, como doenças cardiovasculares e renais, que tornam essa entidade um dos maiores problemas de saúde pública mundial (IZAWA et al. 1985; WRIGHT & DEMOSS, 2000; GOTOH et al. 2005; KEARNEY et al., 2005; VESTERGAARD et al. 2009). Estudos tem sugerido que o estado hipertensivo causa aumento da mobilização de cálcio do osso, aumentando a excreção de cálcio dos rins, ativando secundariamente o hormônio da paratireoide (PTH) e alterando a atividade e diferenciação de células ósseas mediadas por angiotensina II (NAKAGAMI & MORISHITA, 2009). Entretanto, os mecanismos fisiológico, celular e molecular envolvidos na hipertensão e que podem afetar o metabolismo ósseo não tem sido claramente elucidados (BASTOS et al., 2010)

O osso alveolar é essencial para o sucesso de reabilitações orais implantossuportadas em pacientes edêntulos. Assim, o reconhecimento de condições sistêmicas que possam afetar o osso alveolar é importante para identificar grupos com alto risco de pobre qualidade e quantidade óssea.

Assim, o presente estudo objetivou avaliar o impacto da HAS sobre o processo de reparo alveolar pós-extração dental em animais SHR. É o modelo experimental que mais se aproxima geneticamente da HAS essencial em humanos no que diz respeito às manifestações hemodinâmicas (TRIPPODO & FROHLICH, 1981). É importante enfatizar que os dados referentes aos valores da PAS dos ratos SHR (igual ou superior a 150 mmHg) foram tomados e

tabulados a fim de confirmar o quadro clínico hipertensivo, confirmando o resultado de estudos prévios (HATTON et al. 1997) (Fig. 4).

Alguns autores (HATTON et al. 1997) identificaram a Ang I e II como potentes estimuladores da atividade osteoclástica, concluindo que o sistema renina-angiotensina desempenha importante papel na reabsorção óssea. Nesse contexto, sabe-se que a angiotensina II (Ang II), peptídeo ativo na regulação da hipertensão, pode controlar o crescimento de células ósseas isoladamente ou em combinação com outros fatores de regulação, através do estímulo dos receptores AT1, aumentando a síntese de DNA nas culturas de osteoblastos (HIRUMA et al. 1997). Segundo Lamparter et al. (1998) a Ang II estimula a síntese de DNA, proliferação celular e síntese de colágeno nas células precursoras de osteoblastos.

As drogas inibidoras dos receptores AT1 da angiotensina II (losartan) ocupam lugar de destaque pela capacidade de proteção dos órgãos-alvo e baixa incidência de eventos adversos (SEE, 2001). Assim, também foi proposto como objetivo desse trabalho avaliar o efeito do losartan sobre o reparo alveolar em SHR. A dosagem de 30 mg/kg/dia de losartan adotada nesse estudo corrobora com Kaneko et al. (1996), que observaram repercussões positivas no sistema cardiovascular como a diminuição da pressão sanguínea e regressão da hipertrofia cardíaca e vascular. Doses menores de até 10 mg/kg/dia podem ser empregadas desde que por tempo prolongado ou outras vias de administração, como a subcutânea (SOLTIS, 1993; SOLTIS et al. 1993), a fim de propiciar benefícios semelhantes.

Na análise do processo de reparo alveolar (terço médio) os resultados demonstraram que há uma importante diferença na formação óssea observada ao final do processo de reparo alveolar em SHR, quando comparado aos ratos Wistar, em especial quando do uso de terapêutica com droga anti-hipertensiva.

Sabe-se que a Ang II é um potente supressor da diferenciação de células osteoblásticas (HAGIWARA et al. 1998). Tal afirmação corrobora com o presente estudo onde se pôde observar maior formação óssea nos animais normotensos (Wistar), quando comparados às amostras SHR (Tab.1 Fig.6). Pode ser sugerido ainda, atraso no processo de reparo em SHR nos períodos iniciais (7 e 14 dias), o que corrobora com estudos prévios (CARVALHO et al., 1983), onde foi detectado tecido ósseo imaturo formado entre 9 e 21 dias pós-operatório e alvéolos de ratos hipertensos renais (1 rim-1clip).

Nos grupos Wistar e SHR tratados com losartan foram observados maior percentual de neoformação óssea quando comparados aos grupos não tratados, sendo que SHR tratado apresentou tendência de aumento em relação a Wistar tratado, porém se significância estatística. Tais resultados sugerem que o losartan, inibidor da AT1 de Ang II interfere no metabolismo ósseo, o que contraria estudos prévios (NISHIYA & SUGIMOTO, 2001; BROULIK, 2001). Entretanto, L MA et al. (2010) relata que a perda óssea induzida em SHR ovariectomizadas foi claramente diminuída com o uso de telmisartan, um medicamento BRA II.

Na análise histométrica do trabeculado ósseo, constatou-se maior espessura das trabéculas em Wistar comparado a SHR nos períodos de 7 (estatisticamente significante, onde $p < 0,05$) e 14 dias. Aos 28 dias as

espessuras se equivaleram, com ligeira tendência a maiores valores nos animais SHR ($P > 0,05$). Nos grupos tratados com losartan (Wistar e SHR), observou-se aumento da espessura do trabeculado, principalmente no 28º dia ($p > 0,05$). Tais resultados reafirmam os de Gealh (2010), que observou em modelo experimental com SHR, maior formação óssea em enxertos nos grupos tratados com losartan. Como advogado por alguns autores (HATTON et al. 1997; SHIMIZU et al. 2008), acredita-se que houve uma diminuição da diferenciação osteoclástica mediada pela ação do losartan nos receptores AT1 inibindo a Ang II. Entretanto não se pode descartar estudos prévios (HIRUMA et al. 1997; LAMPARTER et al. 1998) que afirmam que a angiotensina II (Ang II) estimula a proliferação de células osteoprogenitoras, a atividade osteoblástica e formação óssea e, ainda, outros autores (NISHIYA & SUGIMOTO 2001; BROULIK et al. 2001; LI et al. 2009) que advogam que o losartan não interfere no metabolismo ósseo. Tais controvérsias reafirmam a complexidade do tema e suscitam futuros estudos.

A avaliação comparativa do metabolismo ósseo no processo de reparo alveolar de ratos Wistar *versus* SHR foi realizado por meio da expressão de proteínas OPG e RANKL. Os animais espontaneamente hipertensos apresentam maior concentração de Ang II com conseqüente aumento da osteoclasia. Os dados do presente estudo permitem afirmar que o grupo SHR apresentou relevante expressão de RANKL o que vem a confirmar tal hipótese. Contudo, no grupo Wistar tratado (losartan) também foi evidenciado imunomarcção intensa de RANKL nos períodos de 14 e 28 dias (Figs. 16-19). Entretanto, esse apresentou expressão intensa de OPG nos três períodos, o que denota o *turn over* ósseo mais acelerado nos grupos estudados. O grupo

SHR losartan, em contrapartida, apresentou o turn over mais lento com marcações leves de OPG e RANKL com ligeira tendência para atividade osteoclástica (RANKL). (Figs. 12-15 e Figs. 16-19).

A partir de tais resultados pode-se sugerir que as drogas inibidoras de AT1 de Ang II interferem de algum modo no metabolismo ósseo. Conforme estudos prévios de Shimizu et al. (2008), foi observado que a Ang II induz a expressão de RANKL em osteoblastos e aumenta o número de células TRAP+ levando a ativação de osteoclastos. Corroborando com tal estudo, observou-se marcação intensa de TRAP para o grupo de turn over ósseo intenso, o SHR, seguido dos grupos Wistar e SHR tratados com losartan (Figs. 24-27).

A hipertensão, maior fator de risco para doenças cardiovasculares, é caracterizada por uma disfunção endotelial e alterado controle do crescimento de células vasculares (TEA et al., 1999). Estudos têm demonstrado que a HAS prejudica a neovascularização pós-isquêmica em cardiopatas, em parte devido à diminuição de células progenitoras com potencial próangiogênico (YOU et al. 2008), como a VEGF (EMANUELI et al. 2001). No presente trabalho observou-se semelhança na imunomarcagem de PECAM nos grupos não tratados. Entretanto os grupos Wistar losartan e SHR losartan apresentaram escores moderados a intensos (Figs. 20-23), principalmente o grupo Wistar tratado.

O restabelecimento da densidade capilar nos músculos esqueléticos de animais SHR pode ser obtido com o tratamento antihipertensivo, especificamente com losartan e enalapril (RIZZONI et al. 2008). O losartan, bloqueador do sistema renina-angiotensina, parecem ser capazes em prevenir ou regredir a rarefação microvascular no coração e cérebro de ratos

(MUNZENMAIER & GREENE 2006). Pode ser sugerido neste estudo que a vasodilatação propiciada pelo agente anti-hipertensivo nos grupos tratados acarretou escores mais intensos do marcador vascular. You et al. (2008), demonstraram que o uso de agentes anti-hipertensivos combinados (IECA e diuréticos) proporcionaram aumento do número de células progenitoras circulantes, restabelecendo o potencial angiogênico diminuído em animais SHR.

De acordo com estudos de Riveiro et al. 2002; Niida et al. 2005; Potenza et al. 2006; Munzenmaier & Greene 2006; Rizzoni et al. 2008; You et al. 2008, o emprego de medicamentos anti-hipertensivos em modelos de HAS acarretou restabelecimento nos padrões de angiogênese. Adicionalmente, foi possível observar nesse estudo que nos animais normotensos o uso do losartan aumentou as imunomarcações de PECAM, provavelmente relacionada a vasodilatação periférica propiciada pela droga (Figs. 20-22).

Devido à complexidade do metabolismo ósseo e a gama de mediadores envolvidos a fim de manter a homeostase mineral, muitas pesquisas serão necessárias para a compreensão dos fenômenos envolvidos na dinâmica óssea. Em especial quando alterações sistêmicas estiverem associadas.

Conclusão

CONCLUSÃO

O referido estudo permite concluir que:

(1) Ocorreu atraso na cronologia do processo de reparo alveolar em SHR quando comparado a Wistar.

(2) O losartan influenciou o processo de reparo em animais SHR e Wistar acarretando maior neoformação óssea nos grupos tratados, assim como maior espessura do trabeculado.

(3) As proteínas OPG, RANKL, TRAP e PECAM relacionam-se com as alterações encontradas na dinâmica óssea reparacional, tendo suas expressões alteradas pelo fármaco losartan.

(4) O sistema renina-angiotensina-aldosterona interfere no metabolismo ósseo

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afghani A, Goran MI. Lower bone mineral content in hypertensive compared with normotensive overweight latino children and adolescents. *Am J Hypertens* 2007;20(2):190-6.

Aicher, A., Rentsch, M., Sasaki, K., Ellwart, J.W., Fändrich, F., Siebert, R., Cooke, J.P., Dimmeler, S. & Heeschen, C. Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia. *Circulation Research*. 2007; 100:581-589.

Amler MH. The age factor in human extraction wound healing. *J Oral Surg*. 1977;35(3):193-7.

Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc*. 1960;61(7):32-44.

Asaba, Y., Ito, M., Fumoto, T., Watanabe, K., Fukuhara, R., Takeshita, S., et al. Activation of renin-angiotensin system induces osteoporosis independently of hypertension. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2009; 24: 241-250.

Astrand P, Carlsson GE. Changes in the alveolar process after extractions in the white rat: a histologic and fluorescence microscopic study. *Acta Odontol Scand*. 1969;27(1):113-27.

Aubin, J.E. & Bonny, E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporosis International*. 2000; 11: 905-913.

Barbagallo M, Quaini F, Baroni MC, Barbagallo CM, Boiardi L, Passeri G, et al. Histological evidence of increased turnover in bone from spontaneously hypertensive rats. *Cardioscience*. 1991;2(1):15-17.

Bastos MF, Brilhante FV, Gonçalves TED, Pires AG, Napimoga MH, Marques MR, et al. Hypertension may affect tooth-supporting alveolar bone quality: a study in rats. *J Periodontol*. 2010; 81(7): 1075-83.

Becit, N., Ceviz, M., Koçak, H., Yekeler I, Unlü Y, Celenk, C. & Akin, Y. (2001) The effect of vascular endothelial growth factor on angiogenesis. An experimental study. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 22: 310-316.

Bekker, P.J., Holloway, D., Nakanishi, A., Arrighi, M., Leese, P.T. & Dunstan, C.R. The effect of a single dose of osteoprotegerin in post-menopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2001; 16: 348-60.

Brenner BM, Cooper ME, Zeeuw D, et al. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med*. 2001; 345:861-9.

Broulik, P.D., Tesar, V., Zima, T., Jirsa, M. (2001) Impact of antihypertensive therapy on the skeleton: effects of enalapril and AT1 receptor antagonist losartan in female rats. *Physiology Research*. 2001; 50: 353-358.

Buckley, K.A. & Fraser, W.D. Receptor activator for nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin: regulators of bone physiology and immune responses/potential therapeutic agents and biochemical markers. *Annals of Clinical Biochemistry*. 2002; 39: 551-556.

Carvalho AA, de Castro AL, Melhado RM, Bedran de Castro JC. Healing of tooth extraction wounds in rats with renal hypertension: a histological study. *J Nihon Univ Sch Dent*. 1983; 25(3):214-20.

Carvalho ACP, Okamoto T. *Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados a clínica*. São Paulo: Panamericana; 1987.

Carvalho ACP, Okamoto, T. Cuidados pós-exodônticos: considerações clínicas e experimentais. *Ars Cvrandi Odontol*. 1978; 5(1):19-27.

Carvalho ACP, Okamoto T. Estudo preliminar sobre os efeitos de anticonceptivo no processo de reparo em feridas de extração dental em ratas. *Ars Cvrandi Odontol*. 1981;8(2):60-8.

Carvalho TL, Bombonato KF, Brentegani LG. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. *Braz Dent J*. 1997; 8(1):9-12.

Chiu, A.T., Herblin, W.F., McCall, D.E., Ardecky, R.J., Carini, D.J., Duncia, J.V., Pease, L.J., Wong, P.C., Wexler, R.R., Johnson, A.L. et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 1989; 165: 196-203.

Christenson, R.H. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clinical Biochemistry*. 1997; 30(8): 573-593.

Clafin RS. Healing of disturbed and undisturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc*. 1936; 23(6):945-959.

Cohn JN, Tognoni G on behalf of Valsartan Heart Failure Trial Investigators. A randomized trial of the angiotensin receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med*. 2001; 345:167-75.

Dahlof B, Devereux R, Kjeldsen S, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in the losartan intervention or endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomized trial against atenolol. *Lancet*. 2002; 359:995-1003.

Elefteriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, et al. Leptin regulation of bone resorption by sympathetic nervous system and CART. *Nature* 2005; 434(7032):514-20.

Emanuelli, C., Salis, M.B., Stacca, T., Gaspa, L., Chao, J., Chao, L., Piana, A. & Madeddu, P. Rescue of impaired angiogenesis in spontaneously hypertensive rats by intramuscular human tissue kallikrein gene transfer. *Hypertension*. 2001; 38: 136-141.

Gotoh M, Mizuno K, Ono Y, Takahashi M. High blood pressure, bone-mineral loss and insulin resistance in women. *Hypertens Res*. 2005 Jul;28(7):565-70.

Gealh WC. Análise do processo de reparo de enxerto ósseo autógeno em mandíbula de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) não tratados e tratados com losartan. Estudo imunoistoquímico e histomorfométrico [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba; 2010.

Haddad A, Hetem S, Brandão HJJ, Pinto RS. A tetraciclina no processo de reparo em feridas de extração dental em ratos. *Rev. FOA*. 1965; 1(2):33-42.

Hagiwara, H., Hiruma, Y., Inoue, A., Yamaguchi, A. & Hirose, S. Deceleration by angiotensin II of the differentiation and bone formation of rat calvarial osteoblastic cells. *The Journal of Endocrinology*. 1998; 156: 143-150.

Hatton, R., Stimpel, M. & Chambers, T.J. (1997) Angiotensin II is generated from angiotensin I by bone cells and stimulates osteoclastic bone resorption in vitro. *The Journal of Endocrinology*. 1997; 152: 5-10.

Hiruma, Y., Inoue, A., Hirose, S. & Hagiwara, H. (1997) Angiotensin II stimulates the proliferation of osteoblast-rich populations of cells from rat calvariae. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 1997; 230:176-178.

Hofbauer, L.C., Khosla, S., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Boyle, W.J. & Riggs, L. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2000; 15(1): 2-12.

Huebsch RF, Hansen LS. A histopathologic study of extraction wounds in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1969;28(2):187-96.

Izawa Y, Sagara K, Kadota T, Makita T. Bone disorders in spontaneously hypertensive rat. *Calcif Tissue Int*. 1985;37(6):605-7.

Johansen JR. Repair of the post-extraction alveolus in the Wistar rat: a histologic and autoradiographic study. *Acta Odontol Scand.* 1970;28(4):441-61.

Julius S, Kejdelsen SE, Weber M, et al. Outcomes in hypertensive patients in high cardiovascular risk treated with regimens based on valsartan and amlodipine: the VALUE randomised trial. *Lancet.* 2004; 363:2022-31.

Julius S, Weber MA, Kjeldsen SE, McInnes GT, Zanchetti A, Brunner HR, et al. The Valsartan Antihypertensive Long-Term Use Evaluation (VALUE) trial: outcomes in patients receiving monotherapy. *Hypertension.* 2006; 48(3):385-91.

Kaneko K, Susic D, Nunez E, Frohlich ED: Losartan reduces cardiac mass and improves coronary flow reserve in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertension.* 1996; 14: 645-653.

Kearney, P.M., Whelton, M., Reynolds, K., Muntner, P., Whelton, P.K. & He, J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet.* 2005; 365(9455): 217-223.

Khosla, S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology.* 2001; 142: 5050-5055.

Kong, Y.Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H.L., Timms, E., Capparelli, C., Morony, S., Oliveira-dos-Santos, A.J., Van, G., Itie, A., Khoo, W., Wakeham, A., Dunstan, C.R., Lacey, D.L., Mak, T.W., Boyle, W.J. & Penninger, J.M. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* 1999; 397: 315-323.

Konishi, M. & Su, C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension.* 1983; 5: 881-886.

Konstam MA, Neaton JD, Dickstein K, Drexler H, Komajda M, Martinez FA, et al.; HEAAL Investigators Effects of high-dose versus low-dose losartan on clinical outcomes in patients with heart failure (HEAAL study): a randomised, double-blind trial. *Lancet.* 2009; 374(9704):1840-8.

L. Ma, J.L. Ji, H. Ji, X. Yu, L.J. Ding, K. Liu & Y.Q.L. Telmisartan alleviates rosiglitazone-induced bone loss in ovariectomized spontaneous hypertensive rats. *Bone.* 2010; 47: 5-11.

Lamparter, S., Kling, L., Schradler, M., Ziegler, R. & Pfeilschifter, J. Effects of angiotensin II on bone cells in vitro. *Journal of Cellular Physiology* 1998; 175: 89-98.

Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR. Renoprotective effect of the angiotensin receptor antagonist irbersartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Eng J Med.* 2001; 345:851-60.

Li, Y.Q., Ji, H., Shen, Y., Ding, L.J., Zhuang, P., Yang, Y.L. & Huang, Q.J. Chronic treatment with angiotensin AT1 receptor antagonists reduced serum but not bone TGF- β 1 levels in ovariectomized rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2009; 87: 51-55.

Lindholm LH, Ibsen H, Dahlöf B, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomized trial against atenolol. *Lancet*. 2002; 359:1004-10.

Luvizuto ER, Queiroz TP, Dias SMD, Okamoto T, Dornelles RCM, Garcia JR IR, et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol*. 2010; 55(1):52-9.

Mann JF, Schmieder RE, McQueen M, Dyal L, Schumacher H, Pogue J, et al.; ONTARGET investigators Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet*. 2008; 372(9638):547-53.

Manrique N. Avaliação do Efeito do Atenolol no Processo de Reparo Alveolar Em Ratos Espontaneamente Hipertensos (SHR) [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba; 2010.

McCarron, DA; Yung, NN; Ugorets, BA; Krutzik, S. Disturbances of calcium metabolism in the spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 3. 1981; (Suppl 1). 1981:1162-1167.

Munzenmaier, D.H., Greene, A.S. Chronic angiotensin II AT1 receptor blockade increases cerebral cortical microvessel density. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. 2006; 290: H512–H516.

Nakagami H, Morishita R. Hormones and osteoporosis update. Effect of angiotensin II on bone metabolism. *Clin Calcium*. 2009 Jul;19(7):997-1002.

Newmann, P. J. The biology of PECAM-1. *Journal of Clinical Investigation*. 1997; 99:3-8.

Niida, S., Kondo, T., Hiratsuka, S., Hayashi, S., Amizuka, N., Noda, T, Ikeda, K. & Shibuya, M. VEGF receptor 1 signaling is essential for osteoclast development and bone marrow formation in colony-stimulating factor 1 – deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102: 14016-14021.

Nishiya, Y., Sugimoto, S. Effects of various antihypertensive drugs on the function of osteoblast. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2001; 24(6): 628-633.

Ogihara T, Nakao K, Fukui T, et al. Effects of candesartan compared with amlodipine in hypertensive patients with high cardiovascular risks. Candesartan Antihypertensive Survival Evaluation in Japan trial (CASE-J). *Hypertension*. 2008;51:1-6.

Ohazama A, Courtney JM, Sharpe PT. Opg, Rank, RankL in tooth development: co-ordination of odontogenesis and osteogenesis. *J Dent Res*. 2004; 83(3): 241-4.

Okamoto K, Aoki K. Development of strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*. 1963; 27:282-93.

Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Araçatuba*. 1973; 2(2):153-69.

Otomo-Corgel, J. Periodontal treatment of medically compromised patients. In: Carranza JR, FA; Newmann, MG. *Clinical periodontology*. 8^a ed. Philadelphia: Saunders, 1996. p. 406-423.

Panza, J.A., Quyyumi, A.A., Brush, J.E. Jr. & Epstein, S.E. Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *New England Journal of Medicine*. 1990; 323: 22-27.

Papademetriou V, Farsang C, Elmfeldt D, Hofman A, Lithell H, Olofsson B, et al.; for the SCOPE study group. Stroke prevention with the angiotensin II type-1 receptor blocker candesartan in elderly patients with isolated systolic hypertension. The Study on Cognition and Prognosis in Elderly (SCOPE). *J Am Coll Cardiol*. 2004; 44:1175-80.

Parving H-H, Lehnert H, Brochner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P. The effect of irbersartan on the development of diabetic nephropathy in patients with Type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2001; 345:870-8.

Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, et al.; CHARM Investigators and Committees. Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: The CHARM-Overall Program. *Lancet*. 2003; 362(9386):759-66.

Piedboeuf, B., Gamache, M., Frenette, J., Horowitz, S. & Baldwin, H. Increased endothelial cell expression of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 during hyperoxic lung injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 1998; 19: 543-553.

Pietrokovski J, Massler M. Residual ridge remodeling after tooth extraction in monkeys. *J Prosthet Dent*. 1971;26(2):119-29.

Pietrokovski J, Massler M. Ridge remodeling after tooth extraction in rats. *J Dent Res*. 1967;46(1):222-31.

Potenza, M.A., Marasciulo, F.L., Tarquínio, M., Quon, M.J. & Montagnani, M. Treatment of spontaneously hypertensive rats with rosiglitazone and/or enalapril restores balance between vasodilator and vasoconstrictor actions of insulin with simultaneous improvement in hypertension and insulin resistance. *Diabetes*. 2006; 55: 3594-3603.

Reboldi G, Angeli F, Cavallini C, Gentile G, Mancia G, Verdecchia P. Comparison between angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers on the risk of myocardial infarction, stroke and death: a meta-analysis. *J Hypertens*. 2008; 26(7):1282-9.

Riveiro, A., Mosquera, A., Alonso, M. & Calvo, C. Angiotensin II type 1 receptor blocker irbesartan ameliorates vascular function in spontaneously hypertensive rats regardless of oestrogen status. *Journal of Hypertension*. 2002; 20: 1365-1372.

Rizzoni, D., Pasini, E., Flati, V., Rodella, L.F., Paiardi, S., Assanelli, D., De Ciuceis, C., Porteri, E., Boari, G.E., Rezzani, R., Specca, S., Fávero, G., Martinotti, S., Toniato, E., Platto, C. & Agabiti-Rosei, E. Angiotensin receptor blockers improve insulin signaling and prevent microvascular rarefaction in the skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*. 2008; 26: 1595-1601.

Sakuta, T., Matsushita, K., Yamaguchi, N., Oyama, T., Motani, R., Koga, T., Nagaoka, S., Abeyama, K., Maruyama, I., Takada, H. & Torii, M. Enhanced production of vascular endothelial growth factor by human monocytic cells stimulated with endotoxin through transcription factor SP-1. *Journal of Medical Microbiology*. 2001; 50: 233-237.

Sato T, Arai M, Goto S, Togari A. Effects of propranolol on bone metabolism in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010; 334(1):99-105.

Schrader J, Luders S, Kulschewsky A, et al. The ACCESS Study, evaluation of acute candesartan cilexetil therapy in stroke survivors. *Stroke*. 2003; 34:1699-703.

Schwarz, E.M. & O'Keefe, R.J. Breakthrough in bone: the molecule mechanism of osteoclast/osteoblast coupling revealed. *Current Opinion in Orthopaedics*. 2000; 11(5): 329-335.

See, S. Angiotensin II receptor blockers for the treatment of hypertension. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2001; 2(11): 1795-804.

Shimizu, H., Nakagami, H., Osako, M.K., Hanayama, R., Kunugiza, Y., Kizawa, T., Tomita, T., Yoshikawa H, Ogihara T, Morishita R. et al. Angiotensin II accelerates osteoporosis by activating osteoclasts. *FASEB Journal*. 2008; 22: 2465- 2475.

Simonet, W.S., Lacey, D.L., Dunstan, C.R., Kelley, M., Chang, M.S., Luthy, R., et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997; 89: 309-319.

Simpson HE. Experimental investigation into the healing of extraction wounds in *Macacus rhesus* monkeys. *J Oral Surg Anesth Hosp Dent Serv*. 1960; 18:391-9.

Simpson HE. The healing of extraction wounds. *Br Dent J*. 1969; 126(12):550-7.

Soltis EE: Alterations in vascular structure and function after short-term losartan treatment in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993; 266: 642-646.

Soltis EE, Jewell AL, Dwoskin LP, Cassis LA: Acute and chronic effects of losartan (DUP-753) on blood-pressure and vascular reactivity in normotensive rats. *Clin Exp Hypertens*. 1993; 15: 171-184.

Sonis ST, Fazio RC, Fang L. Hypertension. In: Sonis ST, Fazio RC, Fang L. *Principles and Practice of Oral Medicine*. W.B. Saunders Company. 2nd Ed. Philadelphia, PA. 1995. 37-44.

Springer, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994; 76: 301-314.

Stejskal, D., Bartek, J., Pastorkova, R., Ruzicka, V. & Horalik, D. Osteoprotegerin, RANK, RANKL. *Biomedical Papers of the Faculty of the University Palacky, Olomuc, Czechoslovakia*. 2001 (a); 145(2): 61-64.

Stejskal, D., Zurek, M.L., Bartek, J., Jedelsky, L. & Ruzicka, V. Osteoprotegerin and bone density. *Biomedical Papers of the Faculty of the University Palacky, Olomuc, Czechoslovakia*. 2001 (b); 145(2): 75-76.

Suzuki H, Kanno Y. Effects of candesartan on cardiovascular outcomes in Japanese hypertensive patients (E-COST). *Hypertens Res*. 2005;28(4):307-14.

Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, et al. Leptin regulates bone formation via sympathetic nervous system. *Cell*. 2002; 111(3): 305-17.

Tea, B.S., Dam, T.V., Moreau, P., Hamet, P. & deBlois, D. Apoptosis during regression of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: temporal regulation and spatial heterogeneity. *Hypertension*. 1999; 34: 229–235.

Teitelbaum, S.T. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000; 289: 1504-1508.

The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The JNC 7 Report. *JAMA*. 2003; 289(19): 2560-72.

Todo H. Healing mechanism of tooth extraction wounds in rats I: initial cellular response to tooth extraction in rats studied with 3H thymidine. *Arch Oral Biol*. 1968;13(12):1421-7.

Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circ Res*. 1981 Mar;48(3):309-19.

Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, Mizuno A, Itoh K, Ueno Y, et al. Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology* 2000; 141(9):3478-84.

Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L. Hypertension is a risk factor for fractures. *Calcif Tissue Int*. 2009;84(2):103-11.

Wang TM, Hsu JF, Jee WS, Matthews JL. Evidence for reduced cancellous bone mass in the spontaneously hypertensive rat. *Bone Miner*. 1993;20(3):251-64.

Whitworth JA. World Health Organization, International Society of Hypertension Writing Group. 2003 World Health Organization (WHO)/ International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens*. 2003;21(11):1983-92.

Whitebread, S., Male, M., Kamber, B., De Gasparo M. Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 1989; 163: 284-291.

Willians B. The year in hypertension. *JACC*. 2010; 55(1): 66-73.

Wright GL, DeMoss D. Evidence for dramatically increased bone turnover in spontaneously hypertensive rats. *Metabolism*. 2000; 49(9):1130-3.

Wright, GL; Rankin, GD. Concentrations of ionic and total calcium in plasma of four models of hypertension. *Am J Physiol*. 1982: 243:H365-H370.

Ye S, Mozayani P, Gamburd M, Zhong H, Campese VM. Interleukin-1 β and neurogenic control of blood pressure in normal rats and rats with chronic renal failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 279(6):H2786-96.

You, D., Cochain, C., Loinard, C., Vilar, J., Mees, B., Duriez, M., Lévy, B.I. & Silvestre, J.S. (2008) Combination of the angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril and the diuretic indapamide activate postnatal vasculogenesis in spontaneous hypertensive rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008 [a]; 323(3): 766-773.

You, D., Cochain, C., Loinard, C., Vilar, J., Mees, B., Duriez, M., Lévy, B.I. & Silvestre, J.S. (2008) Hypertension impairs postnatal vasculogenesis. Role of antihypertensive agents. *Hypertension*. 2008 [b]; 51: 1537-1544.

VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão – DBH VI. Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Brazilian Journal of Hypertension*. Jan/Mar 2010; 17(1): 7-60.

Anexos

Anexo A – Certificado CEEA

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

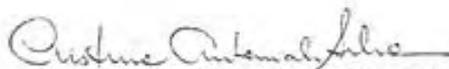


COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "ANÁLISE DO PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR) NÃO TRATADOS E TRATADOS COM LOSARTAN. ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO E HISTOMORFOMÉTRICO" sob responsabilidade de Profa Dra ROBERTA OKAMOTO e colaboração de CASSIANO COSTA SILVA PEREIRA, Profa Dra CRISTINA ANTONIALI SILVA, WALTER CRISTIANO GEALH e Prof Emérito TETUO OKAMOTO está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 25 de agosto de 2008 de acordo com o protocolo no. 2008-005158.

Araçatuba, 05 de agosto de 2008


Profª Drª CRISTINA ANTONIALI SILVA
Presidente da CEEA - FOA/UNESP

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba - SP
Tel (13) 3636.3100

Anexo B – Normas para publicação



International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery

Guide for Authors

Would authors please note that the reference style for the journal has now changed. Please pay special attention to the guidelines under the heading "References" below

Authors wishing to submit their work to the journal are urged to read this detailed guide for authors and comply with all the requirements, particularly those relating to manuscript length and format. This will speed up the reviewing process and reduce the time taken to publish a paper following acceptance.

Online Submission

Submission and peer-review of all papers is now conducted entirely online, increasing efficiency for editors, authors, and reviewers, and enhancing publication speed. Authors requiring further information on online submission are strongly encouraged to view the system, including a tutorial, at <http://ees.elsevier.com/ijoms> A comprehensive Author Support service is available to answer additional enquiries at authorsupport@elsevier.com. Once a paper has been submitted, all subsequent correspondence between the Editorial Office (ijoms@elsevier.com) and the corresponding author will be by e-mail.

Editorial Policy

A paper is accepted for publication on the understanding that it has not been submitted simultaneously to another journal, has been read and approved by all authors, and that the work has not been published before. The Editors reserve the right to make editorial and literary corrections. Any opinions expressed or policies advocated do not necessarily reflect the opinions and policies of the Editors.

Declarations

Upon submission you will be required to complete and upload this form (pdf version or word version) to declare funding, conflict of interest and to indicate whether ethical approval was sought. This information must also be inserted

into your manuscript under the acknowledgements section with the headings below. If you have no declaration to make please insert the following statements into your manuscript:

Funding: None

Competing interests: None declared

Ethical approval: Not required

Patient permission: Not required

PLEASE NOTE that all funding must be declared at first submission, as the addition of funding at acceptance stage may invalidate the acceptance of your manuscript.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data

(2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content

(3) final approval of the version to be submitted.

Normally one or two, and no more than three, authors should appear on a short communication, technical note or interesting case/lesson learnt. Full length articles may contain as many authors as appropriate. Minor contributors and non-contributory clinicians who have allowed their patients to be used in the paper should be acknowledged at the end of the text and before the references.

The corresponding author is responsible for ensuring that all authors are aware of their obligations.

Before a paper is accepted all the authors of the paper must sign the Confirmation of Authorship form. This form confirms that all the named authors agree to publication if the paper is accepted and that each has had significant input into the paper. Please download the form and send it to the Editorial Office. (pdf version or word version) It is advisable that to prevent delay this form is submitted early in the editorial process.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors

should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the main text, all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If an author has no conflict of interest to declare, this should be stated.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Ethics

Work on human beings that is submitted to the International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery should comply with the principles laid down in the Declaration of Helsinki (Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964, amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975, the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983, and the 41st World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989). The manuscript should contain a statement that the work has been approved by the appropriate ethical committees related to the institution(s)

in which it was performed and that subjects gave informed consent to the work. Studies involving experiments with animals must state that their care was in accordance with institution guidelines. Patients' and volunteers' names, initials, and hospital numbers should not be used.

Patient confidentiality

Patients have a right to privacy. Therefore identifying information, including patients' images, names, initials, or hospital numbers, should not be included in videos, recordings, written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and you have obtained written informed consent for publication in print and electronic form from the patient (or parent, guardian or next of kin where applicable). If such consent is made subject to any conditions, The Editor and Publisher must be made aware of all such conditions. Written consents must be provided to the Editorial Office on request. Even where consent has been given, identifying details should be omitted if they are not essential. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note. If consent for publication has not been obtained, personal details of patients included in any part of the paper and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Language Editing Services

Papers will only be accepted when they are written in an acceptable standard of English. Authors, particularly those whose first language is not English, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission should visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note, Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions.

Article Types

The following contributions will be accepted for publication. Please take careful note of the maximum length where applicable. Overlength articles will be returned to the authors without peer review:

- editorials (commissioned by the editor)
- clinical papers: no more than 5000 words and 30 references
- research papers: no more than 6000 words and 40 references

- review papers - no limit on length or number of references
- technical notes (surgical techniques, new instruments, technical innovations) - no more than 2000 words, 10 references and 4 figures
- case reports - no more than 2000 words, 10 references and 2 figures
- book reviews
- letters to the editor - please see detailed guidelines provided at the end of the main guide for authors
- IAOMS announcements
- general announcements.

Please note: Case reports will be considered for publication only if they add new information to the existing body of knowledge or present new points of view on known diseases.

All authors must have contributed to the paper, not necessarily the patient treatment. Technical notes and case reports are limited to a maximum of 4 authors, in exceptional circumstances, 5.

Criteria for Publication

Papers that will be considered for publication should be: • focused

- based on a sound hypothesis and an adequate investigation method analysing a statistically relevant series, leading to relevant results that back the conclusion
- well written in simple, scientific English grammar and style
- presented with a clear message and containing new information that is relevant for the readership of the journal
- Note the comment above relating to case reports.

Following peer-review, authors are required to resubmit their revised paper within 3 months; in exceptional circumstances, this timeline may be extended at the editor's discretion.

Presentation of Manuscripts

General points

Papers should be submitted in journal style. Failure to do so will result in the paper being immediately returned to the author and may lead to significant delays in publication. Spelling may follow British or American usage, but not a

mixture of the two. Papers should be double-spaced with a margin of at least 3 cm all round.

Format

Papers should be set out as follows, with each section beginning on a separate page:

- title page

- abstract
- text
- acknowledgements
- references
- tables
- captions to illustrations.

Please note that the qualifications of the authors will not be included in the published paper and should not be listed anywhere on the manuscript.

Title page

The title page should give the following information:

- title of the article

- full name of each author
- name and address of the department or institution to which the work should be attributed
- name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author

responsible for correspondence and to whom requests for offprints should be sent

- sources of support in the form of grants
- key words.

If the title is longer than 40 characters (including spaces), a short title should be supplied for use in the running heads.

Abstract

200 words maximum. Do not use subheadings or abbreviations; write as a continuous paragraph. Must contain all relevant information, including results and conclusion.

Text

Please ensure that the text of your paper conforms to the following structure: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion. There is no separate Conclusion section. There should be no mention of the institution where the work was carried out, especially in the Materials and Methods section.

Introduction

- Present first the nature and scope of the problem investigated
- Review briefly the pertinent literature
- State the rationale for the study
- Explain the purpose in writing the paper
- State the method of investigation and the reasons for the choice of a particular method
- ; Should be written in the present tense

Materials and Methods

- Give the full details, limit references
- Should be written in the past tense
- Include exact technical specifications, quantities and generic names
- Limit the number of subheadings, and use the same in the results section
- Mention statistical method
- Do not include results in this section

Results

- Do not describe methods
- Present results in the past tense
- Present representations rather than endlessly repetitive data
- Use tables where appropriate, and do not repeat information in the text

Discussion

- Discuss - do not recapitulate results
- Point out exceptions and lack of correlations. Do not try to cover up or 'fudge' data
- Show how results agree/contrast with previous work
- Discuss the implications of your findings
- State your conclusions very clearly

Headings: Headings enhance readability but should be appropriate to the nature of the paper. They should be kept to a minimum and may be removed by the Editors. Normally only two categories of headings should be used: major

ones should be typed in capital letters; minor ones should be typed in lower case (with an initial capital letter) at the left hand margin.

Quantitative analysis: If any statistical methods are used, the text should state the test or other analytical method applied, basic descriptive statistics, critical value obtained, degrees of freedom, and significance level, e.g. (ANOVA, $F=2.34$; $df=3,46$; $P<0.001$). If a computer data analysis was involved, the software package should be mentioned. Descriptive statistics may be presented in the form of a table, or included in the text.

Abbreviations, symbols, and nomenclature: Only standardized terms, which have been generally accepted, should be used. Unfamiliar abbreviations must be defined when first used. For further details concerning abbreviations, see Baron DN, ed. Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors, London, Royal Society of Medicine, 1988 (available from The Royal Society of Medicine Services, 1 Wimpole Street, London W1M 8AE, UK).

The minus sign should be -.

If a special designation for teeth is used, a note should explain the symbols. Scientific names of organisms should be binomials, the generic name only with a capital, and should be italicised in the typescript. Microorganisms should be named according to the latest edition of the Manual of Clinical Microbiology, American Society of Microbiology.

Drugs: use only generic (non-proprietary) names in the text. Suppliers of drugs used may be named in the Acknowledgments section. Do not use 'he', 'his' etc where the sex of the person is unknown; say 'the patient' etc. Avoid inelegant alternatives such as 'he/she'. Patients should not be automatically designated as 'she', and doctors as 'he'.

References

The journal's reference style has changed. References should be numbered consecutively throughout the article, beginning with 1 for the first-cited reference. References should be listed at the end of the paper in the order in which they appear in the text (not listed alphabetically by author and numbered as previously).

The accuracy of references is the responsibility of the author. References in the text should be numbered with superscript numerals inside punctuation: for example "Kenneth and Cohen¹⁴ showed..."; "each technique has advantages and disadvantages⁵⁻¹³." Citations in the text to papers with more than two authors should give the name of the first author followed by "et al."; for example: "Wang et al³⁷ identified..."

All references cited in the text must be included in the list of references at the end of the paper. Each reference listed must include the names of all authors. Please see section "Article Types" for guidance on the maximum number of reference for each type of article.

Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus (see www.nlm.nih.gov.uk) . When citing papers from monographs and books, give the author, title of chapter, editor of book, title of book, publisher, place and year of publication, first and last page numbers. Internet pages and online resources may be included within the text and should state as a minimum the author(s), title and full URL. The date of access should be supplied and all URLs should be checked again at proof stage.

Examples:

Journal article: Halsband ER, Hirshberg YA, Berg LI. Ketamine hydrochloride in outpatient oral surgery. *J Oral Surg* 1971; 29: 472-476.

When citing a paper which has a Digital Object Identifier (DOI), use the following style: Toschka H, Feifel H. Aesthetic and functional results of harvesting radial forearm flap. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001; 30: 45-51. doi: 10.1054/ijom.2000.0005

Book/monograph: Costich ER, White RP. Fundamentals of oral surgery. Philadelphia: WB Saunders, 1971: 201-220.

Book chapter: Hodge HC, Smith FA. Biological properties of inorganic fluorides. In: Simons JH, ed.: Fluorine chemistry. New York: Academic Press, 1965: 135.

Internet resource: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. <http://www.icmje.org> [Accessibility verified March 21, 2008]

Tables

Tables should be used only to clarify important points. Double documentation in the form of tables and figures is not acceptable. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. They should be double spaced on separate pages and contain only horizontal rules. Do not submit tables as photographs. A short descriptive title should appear above each table, with any footnotes suitably identified below. Care must be taken to ensure that all units are included. Ensure that each table is cited in the text.

Figures

All illustrations (e.g. graphs, drawings or photographs) are considered to be figures, and should be numbered in sequence with Arabic numerals. Each figure should have a caption, typed double-spaced on a separate page and

numbered correspondingly. The minimum resolution for electronically generated figures is 300 dpi.

Line illustrations: All line illustrations should present a crisp black image on an even white background (127 x 178 mm (5 x 7 in), or no larger than 203 x 254 mm (8 x 10 in). The size of the lettering should be appropriate, taking into account the necessary size reduction.

Photographs and radiographs: Photomicrographs should show magnification and details of any staining techniques used. The area(s) of interest must be clearly indicated with arrows or other symbols.

Colour images are encouraged, but the decision whether an illustration is accepted for reproduction in colour in the printed journal lies with the editor-in-chief. Figures supplied in colour will appear in colour in the online version of the journal.

Size of photographs: The final size of photographs will be: (a) single column width (53 mm), (b) double column width (110 mm), (c) full page width (170 mm). Photographs should ideally be submitted at the final reproduction size based on the above figures.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author, which they are requested to correct and return within 48 hours. Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author will be provided, at no cost, with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use. Additional paper offprints can be ordered by the authors. An order form with prices will be sent to the corresponding author.

Accepted Articles

For the facility to track accepted articles and set email alerts to inform you of when an article's status has changed, visit: <http://authors.elsevier.com/TrackPaper.html> There are also detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those related to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Instructions for Letters to the Editor

The IJOMS welcomes Letters to the Editor. To facilitate submission of the highest quality of Letters to the Editor, the following guidelines should be followed:

1. Letters are meant to be focus pieces and, therefore, are limited to no more than 600 words, 6 references and a maximum of 2 figures. One reference should include a reference to the IJOMS article being addressed.
2. It is recommended that you limit your letter to one or two important and critical points to which you wish to provide a clear and precise discussion regarding the previously published article.
3. One should support all assertion by peer review literature which should be a primary research or large clinical studies rather than a case report.
4. Please include any financial disclosures at the end of the letter. This would include the potential conflicts of interest not just related to the specific

content of your letter but also the content of the IJOMS article and other related areas.

5. Please recognize that letters that are essentially in agreement with the author's findings and offer no additional insights provide little new information for publication. Likewise, letters that highlight the writer's own research or are otherwise self promotional will receive a low publication priority.

6. There may be a need for additional editing. Should editing be required the letter will be sent back to the author for final approval of the edited version.

7. It is important to use civil and professional discourse. It is not advisable that one adopt a tone that may be misconstrued to be in anyway insulting.

8. Finally, it is not advisable to provide a letter that is anecdotal. While personal experiences can have great value in patient care, it is generally not strong evidence to be placed in a letter to the editor.