

IGOR DE OLIVEIRA PUTTINI

**ANÁLISE HISTOLÓGICA,
IMUNOISTOQUÍMICA E POR MICRO-CT
DO PROCESSO DE REPARO
ALVEOLAR DE RATOS
ORQUIECTOMIZADOS SUBMETIDOS À
TERAPIA COM TERIPARATIDA**

Araçatuba – São Paulo

2017

IGOR DE OLIVEIRA PUTTINI

**ANÁLISE HISTOLÓGICA,
IMUNOISTOQUÍMICA E POR MICRO-CT
DO PROCESSO DE REPARO
ALVEOLAR DE RATOS
ORQUIECTOMIZADOS SUBMETIDOS À
TERAPIA COM TERIPARATIDA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial).

Orientador: Prof^a. Adj. Roberta Okamoto

Coorientadora: Prof^a. Adj. Mariza Akemi Matsumoto

Araçatuba – São Paulo

2017

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Puttini, Igor de Oliveira.

P993a Análise histológica, imunoistoquímica e por micro-ct do processo de reparo alveolar de ratos orquiectomizados submetidos à terapia com teriparatida / Igor de Oliveira Puttini. - Araçatuba, 2017

71 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Roberta Okamoto

Coorientadora: Profa. Mariza Akemi Matsumoto

1. Osso e ossos 2. Teriparatida 3. Homens 4. Osteoporose
I. T.

Black D7
CDD 617.6

DEDICATÓRIA

Dedicatória

Aos meus Pais Geraldo Gilson Puttini e Lucy Imaculada de

Oliveira Puttini

Pelo suporte, doação e sacrifícios.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

Meu sincero agradecimento a todos que foram responsáveis por fazer deste trabalho hoje uma realidade.

À minha Orientadora **Professora Roberta Okamoto** pela dedicação, humanidade e profundo conhecimento compartilhado,

A minha Co-orientadora Professora **Marisa Akemi Matsumoto** pela oportunidade e dedicação,

Ao Professor **Leonardo Perez Faverani** que além da ciência ensina como ser humano,

A **todos os funcionários** que permitiram, através de seus esforços diários, que hoje este trabalho e toda a minha graduação tenham sido concluídos com êxito e sucesso,

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Odontologia de Araçatuba** por ter me recebido e oferecido todos os recursos e estrutura para a minha pós-graduação,

A **CAPES** pelo auxílio durante todo o período,

Meus sinceros agradecimentos aos amigos da pós-graduação **Valthierre Nunes, João Paulo Bonardi, Pedro Henrique, Leonardo Freitas, Erick Neiva, Fábio Batista, Gabriel Mulinari, André Oliva, Ciro Duailibe, Rodrigo Pereira e William Ricardo**, pelos momentos compartilhados, ajudas e conselhos, sem vocês o difícil talvez se tornasse impossível,

Aos meus amigos **Tarik Polo, Juliana Zorzi, André Fabris, Sabrina Ferreira, Gustavo Momesso, Gestter Willian Lattari Tessarin, Paulo Roberto**

Pompeu Gallo, Cesar Diogo, Vitor Scalet, João Vitor e Éverton Ribeiro Lelis
por terem compartilhado grande parte de minha vida e oferecido uma amizade real,

Às Minhas avós **Sebastiana Ferreira de Oliveira e Hilda Alsleben Puttini**
e ao meu finado avô **Elias da Silva de Oliveira** por todo o amor que sempre
recebi,

Ao meu irmão **Enzo de Oliveira Puttini** por ser essa pessoa pura que
serve de inspiração,

Aos meus Pais **Geraldo Gilson Puttini e Lucy Imaculada de Oliveira**
Puttini que com palavras não poderia agradecer o que fizeram por mim

E por fim a **Deus**, por ter sido sempre bom e fiel.

Obrigado!

Epígrafe

“Uma pessoa que nunca cometeu um erro nunca tentou nada de novo.”

Albert Einstein

LISTAS E SUMÁRIO

Lista de Figuras

- Figura 1** – Linha do tempo experimental 45
- Figura 2** – **A:** Antissepsia com PVPI em ambos os sacos escrotais; **B:** Incisão; **C e D:** Exposição de ambos escrotos; **E:** Laqueamento do ducto deferente e do pedículo vascular; **F:** Remoção de ambos escrotos com auxílio de uma tesoura; **G:** Sutura; **H:** Ambos escrotos removidos (Orquiectomia). 45
- Figura 3** – **1:** Antissepsia com PVPI na área cirúrgica; **2:** Luxação do dente com alavanca **3:** Luxação do elemento dental com fórceps adaptado; **4:** exodontia. 46
- Figura 4** – Imagem em 3 dimensões obtida através do software DataViewer da micro-ct. 46
- Figura 5** – Seleção da área de interesse da análise de micro-ct através do software CT Analyzer. 47
- Figura 6** – Utilização da ferramenta threshold para mensurações da micro-ct através de escalas de cinza feita pelo software CT Analyzer. 47
- Figura 7** – Quantificação do volume ósseo. Volume equiparados. Teste de Shapiro-Wilk e pós-teste de Tukey. 48
- Figura 8** – Quantificação do percentual de volume ósseo. Percentuais aproximados Teste de Shapiro-Wilk e pós-teste de Tukey. 48
- Figura 9** – Quantificação da espessura trabecular. Valores similares do SHAM e ORQTRAT Teste de Shapiro-Wilk e pós-teste de Tukey. ($p>0,05$). 49

Figura 10 – Quantificação da separação entre as trabéculas. Valores maiores para SHAM e ORQTRAT e menor para o grupo ORQ. Teste de Shapiro-Wilk e pós-teste de Tukey. 49

Figura 11 – Quantificação do número de trabéculas. Valor maior para ORQ e menor para SHAM e ORQTRAT. Teste de Shapiro-Wilk e pós-teste de Tukey. ($p>0,05$). 50

Figura 12 – Quantificação do percentual de porosidade total. Valor compatível com osso mais poroso para o grupo ORQ e menos poroso para SHAM e ORQTRAT ($p>0,05$). 50

Figura 13 – Prancha com as imagens histológicas e imunohistoquímicas dos alvéolos em reparação no período de 42 dias após a exodontia em aumento de 40x. 52

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Grupos experimentais de acordo com o tratamento com Teripatida 44

Lista de Abreviaturas

PTH - Paratormônio

Micro CT - Microtomografia Computadorizada

HE – Hematoxilina e Eosina

BMD – Densidade mineral óssea

BV - Volume ósseo

BV/TV - Percentual de volume ósseo

Tb.Th - Espessura trabecular

Tb.N - Número de trabéculas

Tb.Th – Espessura das trabéculas

Tb.Sp - Separação entre as trabéculas

Po-tot - Percentual de porosidade total

n° - Número

g - Grama

mm - Milímetro

µg/kg/dia - Micrograma por quilograma por dia

ml - Mililitro

Kv - Quilovolt

µm - Micrometro

mm³ - Milímetros cúbicos

Sumário

1. Análise histológica, imunoistoquímica e por micro-ct do processo de reparo alveolar de ratos orquiectomizados submetidos à terapia com teriparatida	16
1.1 Resumo	17
1.2 Abstract	19
1.3 Introdução	21
1.4 Materiais e métodos	24
1.5 Resultados	30
1.6 Discussão	33
1.7 Referências	37
1.8 Lista de tabelas	44
1.9 Lista de figuras	45
2.0 Anexo A - Comitê de ética	54
2.1 Anexo B - Normas para publicação (COIR)	55

**ANÁLISE HISTOLÓGICA, IMUNOISTOQUÍMICA E
POR MICRO-CT DO PROCESSO DE REPARO
ALVEOLAR DE RATOS ORQUIECTOMIZADOS
SUBMETIDOS À TERAPIA COM TERIPARATIDA**

**Este trabalho foi formatado de acordo com as normas do periódico Clinical Oral
Implants Research*

Puttini, I.O. **ANÁLISE HISTOLÓGICA, IMUNOISTOQUÍMICA E POR MICRO-CT DO PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR DE RATOS ORQUIECTOMIZADOS SUBMETIDOS À TERAPIA COM TERIPARATIDA.** 2014. Trabalho de Conclusão de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

Resumo

Objetivos: Avaliar a influência da teriparatida, administrada sistemicamente, nas características morfológicas e estruturais do osso reparacional formado durante o processo de reparo alveolar em ratos com osteoporose induzida (orquitectomizados).

Materiais e Métodos: Foram utilizados 48 ratos divididos 3 em grupos discriminados a seguir: 16 ratos orquitectomizados tratados com teriparatida, 16 ratos orquitectomizados sem tratamento e 16 ratos sham. Deste modo, dividindo-se 8 ratos para análise histológica e para a análise imuno-histoquímica que foi feita através da expressão das proteínas TRAP, osteocalcina, e WNT, com período de eutanásia em 42 dias (tecidos descalcificados), e 8 ratos para análise microtomográfica (tecidos calcificados), nesta análise o período de eutanásia foi de 60 dias pós exodôntico. Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade e este indicou um teste estatístico mais adequado (paramétrico VS não paramétrico). Foi adotado para todos os testes nível de significância de 5%.

Resultados: A análise histológica mostrou melhores padrões de neoformação óssea para o grupo ORQTRAT com maior quantidade de tecido mineralizado e pouco tecido conjuntivo. Os resultados imunohistoquímicos novamente mostraram um padrão de reparo melhor no grupo ORQTRAT com marcações mais intensas de wnt e osteocalcína e marcações mais fracas de trap. Aos resultados da microtomografia novamente o grupo ORQTRAT se demonstrou melhor que os demais, com maior volume ósseo (BV), porcentagem de trabeculado ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th) e separação entre as trabéculas (Tb.Sp). E, menor número (Tb.N) e menor porosidade total óssea (Po.Tot) quando comparado ao grupo sem tratamento.

Conclusões: Foi possível concluir que o tratamento com Teriparatida melhorou parâmetros importantes que determinam a qualidade do tecido ósseo reparacional mesmo na presença da condição sistêmica estabelecida nos animais.

Palavras-chave: Osso e ossos, Teriparatida, Homens, Osteoporose.

Putini, I.O. **Orchiectomized rats submitted to teriparatide therapy. Histological, Immunohistochemical and micro-ct analysis of the alveolar repair process.** 2014. Trabalho de Conclusão de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

Abstract

Objectives: To evaluate the influence of teriparatide, systemically administered, on the morphological and structural characteristics of the reparative bone formed during the alveolar repair process in rats with induced osteoporosis (orchiectomized).

Materials and Methods: Forty-eight rats were divided into three groups: 16 orchiectomized rats treated with teriparatide, 16 unqualified orchiectomized rats and 16 sham rats. Thus, 8 rats were divided for histological analysis and for Immunohistochemical analysis, which was done by the expression of TRAP proteins, osteocalcin, and WNT, with euthanasia at 42 days (decalcified tissues), and 8 rats for analysis for microtomographic analysis (calcified tissues). In this analysis, the euthanasia period was at 60 days after the extraction surgery. The quantitative data were submitted to the normality test and this indicated the most adequate statistical test (parametric vs non-parametric). The significance level of 5% was adopted for all tests.

Results: Histological analysis showed better patterns of bone neoformation for the ORQTRAT group with greater amount of mineralized tissue and little connective tissue. The immunohistochemical results again showed a better

repair pattern in the ORQTRAT group with more intense markings of wnt and osteocalcin and weaker trap markings. To the results of the microtomography again the ORQTRAT group showed better than the others, with higher bone volume (BV), percentage of trabecular bone (BV / TV), thickness of trabecular bone (Tb.Th) and separation between trabeculae (Tb.Sp). And, lower number (Tb.N) and lower total bone porosity (Po.Tot) when compared to the non-treated group.

Conclusions: It was possible to conclude that the treatment with Teriparatide improved important parameters that determine the quality of reparative bone tissue even in the presence of the established systemic condition in the animals.

Key-words: Bone and Bone, Teriparatide, Men, Osteoporosis.

1.3 Introdução

Ainda que a maioria das pesquisas de osteoporose no passado tenha seu foco em mulheres, a osteoporose está se tornando um problema relevante nos homens. Um em cada oito homens acima dos 50 anos terão uma fratura relacionada à osteoporose (Cooper; Melton III, 1992). E este quadro tem perspectiva de aumentar com o envelhecimento da população masculina (Burge; Dawson-Hughes; Solomon; et al, 2007). A osteoporose no gênero masculino pode ser classificada como primária ou secundária, na primária ela ainda pode ser dividida em idiopática e relacionada à idade baseado na idade do diagnóstico.

A osteoporose primária compromete aproximadamente cinquenta por cento dos casos em homens e é uma condição heterogênea multifatorial em relação ao desenvolvimento da osteoporose quando nenhuma causa secundária é identificada (Khosla; Amin; Orwoll, 2008). Perda óssea relacionada à idade acontece em homens acima dos 70 anos, combinado a dieta e níveis hormonais deficientes (Khosla; Amin; Orwoll, 2008). Ao contrário do que acontece com as mulheres pós-menopausa, a redução da neoformação óssea é o mecanismo predominante da perda óssea relacionada à idade nos homens, tornando os agentes anabólicos uma opção de tratamento lógica para homens com osteoporose (Gagnon; Li; Ebeling, 2008). Ambos a queda de absorção de cálcio no intestino e alta prevalência de insuficiência de vitamina D em homens idosos contribuem para o elevado nível sérico de hormônio da paratireoide (PTH) e perda óssea (Lips, 2001) Outros mecanismos potenciais pelos quais os suficientes níveis de vitamina D podem preservar a saúde dos

ossos é a indução de osteoblastogênese e atividade osteoblástica, a ativação de genes osteogênicos, prevenção da apoptose de osteoblastos e de inibição de adipogênese (Duque; Abadaimi; Henderson; et al, 2004; Duque; Macoritto; Dion; et al, 2005).

Muitos outros fatores hormonais também foram incriminados na fisiopatologia da perda óssea relacionada com a idade nos homens. Ambos os níveis livre ou biodisponível de testosterona e estradiol diminuem com a idade, devido ao aumento do nível sérico da globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) e falha de compensação do eixo hipotálamo/hipófise/testículo (Orwoll; Lambert; Marshall; et al, 2006). Embora várias evidências suportem um papel dominante de estrogênio na manutenção da massa óssea em homens, a testosterona também contribui (Falahati-Nini; Riggs; Atkinson; et al, 2000; Leder; LeBlanc; Schoenfeld; et al, 2003; Amin; Zang; Felson; et al, 2006). Os fármacos ainda não foram estudados em homens com osteoporose da mesma forma que foram em mulheres, e apenas alguns tratamentos foram aprovados para o uso em homens. Destes se incluem os bisfosfonatos e teriparatida (Gagnon; Li; Ebeling, 2008).

A terapia com bisfosfonatos tem se mostrado efetiva em aumentar a densidade mineral óssea (BMD) em homens com osteoporose primária, assim como em homens com osteoporose secundária, incluindo por hipogonadismo (Orwoll; Ettinger; Weiss; et al, 2000; Ringe; Faber; Farahmand; et al, 2006). Embora a maioria dos ensaios de bisfosfonatos orais nos homens tenham sido de fraca potência ou não principalmente destinado a avaliar o seu efeito sobre a incidência de fraturas, alguns estudos mostraram uma redução significativa

na ocorrência de novas fraturas vertebrais (Orwoll; Ettinger; Weiss; et al, 2000; Ringe; Faber; Farahmand; et al, 2006). Mesmo que o aumento da densidade mineral óssea com a terapia com bisfosfonatos seja semelhante em homens e mulheres (Ho; Frauman; Thomson; et al, 2000) e poderia, portanto, teoricamente, se traduzir em uma redução do risco de fratura semelhante ao observado em mulheres, mais dados são necessários para determinar os benefícios de bisfosfonatos orais em homens. Os bisfosfonatos são geralmente bem tolerados. No entanto, tanto bisfosfonatos intravenosos e orais têm sido associados em casos de osteonecrose da mandíbula, embora uma quantidade limitada de dados sugira que não há um claro aumento do risco desta complicação em pacientes com osteoporose (Bilezikian, 2006).

Em diversos casos de osteoporose, colocar um fim na perda óssea pode não ser suficiente. Nestes casos, tratamentos que estimulam a neoformação óssea e reverta a deterioração óssea podem se tornar uma opção de tratamento viável (National Cancer Institute - EUA - 2001). Em homens, em que a deficiente formação óssea se dá como importante fator etiológico, um tratamento anabólico se dá como uma abordagem lógica. A teriparatida é o único agente anabólico atualmente aprovado para o tratamento da osteoporose em homens (Cheng; Gupta, 2012).

O processo de reparo alveolar é um interessante modelo para estudar a dinâmica do tecido ósseo, pois representa uma situação na qual o organismo cria condições para produção de tecido ósseo com o objetivo de preenchimento total do alvéolo previamente ocupado pelo dente (Okamoto; Russo, 1973; Carvalho; Okamoto, 1987). Uma questão importante consiste em

obter mais respostas sobre como produzir um tecido mineralizado de boa qualidade (Von Wowern; Kollerup, 1992; Elsubeihi; Heersch, 2002).

Considerando o aumento da expectativa de vida, o aumento do número de idosos com osteoporose a procura de tratamento odontológico para reposição de dentes perdidos, as peculiaridades do processo de reparo alveolar e a necessidade de obter melhores entendimentos da formação do tecido ósseo no processo de reparo alveolar para que possamos obter um tecido ósseo de melhor qualidade, o presente estudo teve o objetivo de estudar através de uma análise histométrica o metabolismo ósseo no processo de reparo alveolar em ratos machos orquiectomizados sem tratamento farmacológico, ratos orquiectomizados tratados com teriparatida e ratos Sham sem tratamento farmacológico para o grupo controle.

1.4 Materiais e métodos

Após a aprovação do Comitê de ética em pesquisa no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Processo FOA nº 00706-2015) (**Anexo A**).

Para este estudo foi utilizado um total de 48 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, adultos, com peso de aproximadamente 300g, os quais foram divididos em três grupos (n=16 por grupo) descritos a seguir: Sham, representando os animais que passaram pela cirurgia fícticia apenas para simular o *stress* cirúrgico. Orq, grupo dos animais orquiectomizados para induzir à osteoporose, e, sem tratamento. E o último grupo, o Orqtrat, dos animais também orquiectomizados, mas, tratados com teriparatida. Estes 16

animais por grupo experimental foram divididos em dois subgrupos de análises, 8 para o subgrupo dos tecidos descalcificados que analisou por via de histologia em H&E e imunohistoquímica, com período de eutanásia dos 8 animais em 42 dias. E ainda 8 ratos para o subgrupo dos tecidos calcificados, onde foi realizado análise pela micro-ct, com período de eutanásia de 60 dias **(Figura 1)**. Estes animais foram mantidos em gaiolas, e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brasil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água ad libitum.

ORQUIECTOMIA

Os ratos dos grupos orquiectomizados e orquiectomizados tratados com teriparatida foram anestesiados com cloridrato de xilazina (Xilazina - Coopers, Brasil, Ltda.) e Cloridrato de Cetamina (Cloridrato de quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda.) e, a seguir, foram imobilizados sobre prancha cirúrgica em posição de decúbito dorsal, foi realizada uma incisão mediana anterior no escroto, abertura da túnica vaginal e exteriorização dos testículos. Em seguida, os funículos espermáticos foram ligados com fio de Nylon 5.0 (Ethicon – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos) e seccionados. Os testículos e os epidídimos foram removidos e o escroto foi suturado com fio de Poliglactina 910 4.0 (Vicryl™ – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). Os ratos do grupo sham passaram pelo mesmo procedimento, porém apenas foi realizada a exposição cirúrgica dos

testículos e dos epidídimos sem suas respectivas remoções (Petroianu; Veloso; Alberti; et al, 2010). **(Figura 2)**

TRATAMENTO COM TERIPARATIDA

Logo após o procedimento cirúrgico os ratos foram submetidos a injeções subcutânea diárias de teriparatida numa concentração de 0,5 µg/kg/dia diluídos numa solução salina estéril a 0,1mg/ml até o fim dos períodos experimentais de 42 e 60 dias (Ersan; Ruijven; Bronckers, 2014).

TÉCNICA PARA EXTRAÇÃO DENTAL

Um mês após o início da terapia medicamentosa com Teriparatida os ratos foram anestesiados por infiltração intramuscular de Cloridrato de Xilazina 0,03ml/100g de peso do animal e Cloridrato de Cetamina 0,07ml/100g de peso do animal, foi realizada a antissepsia do campo operatório com polivinilpirrolidona iodada (Riodeine Indústria Química e Farmacêutica Rio Química, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) e em seguida, foi realizada a exodontia do incisivo superior direito, utilizando instrumental especialmente adaptado para este fim (Okamoto; Russo, 1973). A mucosa gengival foi suturada com fio de nylon (Mononylon 4.0 – Jhonson & Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). **(Figura 3)**

AValiação Microtomográfica (Micro-CT)

Após a fixação em formol 10% tamponado por 24 horas, as maxilas foram lavadas por 48 horas em água corrente e armazenadas em álcool 70%, a fim de serem submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada (FOP/UNICAMP). As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 9 µm de espessura (50Kv e 500µ), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0). No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital) (**Figura 4**). Em seguida, utilizando o software CT Analyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0) foi definida a área de interesse para avaliação tridimensional (**Figura 5**). O software CTAnalyzer analisa e mede a imagem de acordo com as escalas de cinza (thershould) (**Figura 6**). O threshold utilizado na análise foi de 25-90 tons de cinza, que possibilitará obter o volume de osso formado nos alvéolos em reparação. (Ramalho-Ferreira et al., 2015)

ANÁLISE HISTOLÓGICA

Oito animais de cada grupo experimental foram sacrificados por sobredosagem anestésica aos 42 dias do período pós-exodôntico, foram retiradas as hemi-maxilas direitas para a realização da análise histológica dos cortes em parafina dos alvéolos.

As peças obtidas foram fixadas em formol e sofreram descalcificação em EDTA 18% e em seguida a desidratação utilizando uma sequência de álcoois. Após estas etapas, realizou-se a diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina para obtenção de corte sagitais com 5 µm de espessura e montados em lâminas. Algumas lâminas foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE) e outras para as reações de imuno-histoquímica.

Previamente a realização das análises histométricas e imuno-histoquímicas, as amostras foram codificadas de maneira que somente o orientador conheceria quais grupos pertencem. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconhecia o respectivo grupo da secção.

ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

O processamento imuno-histoquímico foi realizado no Laboratório para o Estudo de Tecidos Mineralizados (LSMT) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (FAPESP, 2012/159122-2; 2015/14688-0).

A atividade da peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio. A seguir, as lâminas passaram pela etapa de recuperação antigênica com tampão fosfato citrato (ph 6.0). Os anticorpos primários a serem utilizados foram contra WNT, TRAP, OSTEOCALCINA (Santa Cruz Biotechnology) e, com o objetivo de se analisar as respostas celulares quanto ao processo de reabsorção óssea (TRAP), regulação da taxa de renovação celular (turnover ósseo) (WNT/BETA CATEINA), e mineralização (osteocalcína).

Foram realizados experimentos de imuno-histoquímica utilizando como método de detecção a imunoperoxidase. Foi utilizado o anticorpo secundário biotilado anti-cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology), o amplificador foi a Streptavidina e Biotina (Dako) e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno. Para cada um dos anticorpos utilizados, foi avaliada a expressão destas proteínas semi-quantitativamente

Pela atribuição de diferentes “scores” de acordo com o número de células imunomarcadas no processo de reparo alveolar. A análise foi realizada em microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland), através da contagem manual das células marcadas em áreas previamente determinadas, que sabidamente estarão envolvidas na dinâmica do tecido ósseo, e foram consideradas positivas as marcações com diaminobenzidina, tomando-se o cuidado de se realizar controles negativos para avaliar a especificidade dos anticorpos (Manrique et al. 2015, Ramalho-Ferreira et al. 2016).

ANÁLISE ESTADÍSTICA

Para a análise estatística dos dados quantitativos foi utilizado o software Sigma Plot 12.3 (San Jose, CA, EUA). A análise da homocedasticidade foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk, para distinção dos dados paramétricos e não paramétricos. Para análise dos dados paramétricos do micro-CT de volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação e número de trabéculas (TB.Sp e Tb.N) e porosidade total (Po-tot), foi utilizado o teste Shapiro-Wilk e pós-teste Tukey. Adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$.

1.5 Resultados

ANÁLISE POR MICRO-CT

Quantitativamente, na avaliação microtomográfica referente a medida do volume ósseo (BV) no grupo SHAM obtida em média, foi de $124,120\text{mm}^3$, no grupo ORQ foi $65,006\text{mm}^3$ e ORQTRAT $157,915\text{mm}^3$, em que o volume se apresentou semelhante ao grupo SHAM, porém com diferença estatisticamente significativa entre em comparação ao ORQ ($p < 0,05$, Tukey test). **(Figura 7)**. Quando avaliado a porcentagem de volume ósseo (BV/TV) o grupo ORQ (59,69%) se mostrou inferior ao grupo SHAM (60,35%) e ORQTRAT (67,19%), ($p = 0,749$, Shapiro-Wilk) **(Figura 8)**.

Referente às trabéculas ósseas do osso alveolar em reparação, a espessura trabecular (Tb.Th) mostrou resultados aproximados entre os grupos

SHAM (1,454mm) e ORQTRAT (1,873mm), os quais apresentaram resultados melhores em comparação ao grupo ORQ (1,212mm) ($p=0,057$, Shapiro Wilk) **(Figura 9)**. Seguindo este mesmo padrão, a separação entre as trabéculas (Tb.Sp) apresentou-se aproximado os valores médios do grupo SHAM (1,103mm) e ORQTRAT (1,067mm), com diminuição para o grupo ORQ (0,764mm), ($p=0,073$, Shapiro-Wilk) **(Figura 10)**. Quanto ao número de trabéculas (Tb.N), foi obtido uma média de 0,417 para SHAM com valor próximo ao ORQ de 0,496, e diminuição no número para o grupo ORQTRAT, com 0,358. Apresentando diferença estatística entre os grupos ORQ e ORQTRAT ($p<0,05$, Tukey test) **(Figura 11)**.

Em relação à porosidade óssea do alvéolo em reparação avaliada através da porcentagem de porosidade total (Po-tot), os valores foram 46,292% (SHAM), 40,310% (ORQ) e 32,812% (ORQTRAT) mostrando então menor percentual de porosidade no grupo ORQTRAT ($p=0,496$, Shapiro-Wilk) **(Figura 12)**.

ANÁLISE HISTOLÓGICA

Foi obtida a fotomicrografia das lâminas histológicas do período de 42 dias de todos os grupos através da objetiva de 40x, que possibilitou analisar que o grupo SHAM teve uma boa neoformação óssea, apresentando pouco tecido conjuntivo o que representa pouco espaço trabecular **(Figura 13A)**. Já nas imagens obtidas do grupo ORQ, foi possível notar as imagens com os piores resultados, com pobre neoformação óssea e rica em tecido conjuntivo, caracterizando grandes espaços intertrabeculares **(Figura 13E)**. Analisando as

lâminas dos animais tratados com teriparatida (ORQTRAT), notou-se os melhores resultados histológicos por HE, onde foi possível notar uma grande neoformação óssea e pequenas áreas de tecido conjuntivo (**Figura 13I**).

ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada aos 42 dias em todos os grupos experimentais, a fim de avaliar o processo da remodelação óssea através da marcação das proteínas WNT/Beta-catenina, Osteocalcina e Trap.

GRUPO SHAM:

Marcação pela WNT: As fotomicrografias obtidas aos 42 dias após a extração mostraram forte marcação (3) (**Figura 13B**).

Marcação pela osteocalcina: as fotomicrografias obtidas aos 42 dias após a extração mostraram-se moderadamente marcadas (2) (**Figura 13C**).

Marcação pela TRAP: As fotomicrografias obtidas aos 42 dias após a exodontia mostraram marcação moderada (2) (**Figura 13D**).

GRUPO ORQ:

Marcação pela WNT: As fotomicrografias obtidas aos 42 dias após a extração mostraram moderada marcação (2) (**Figura 13F**).

Marcação pela osteocalcina: as fotomicrografias obtidas aos 42 dias após a extração mostraram-se moderadamente marcadas (2) (**Figura 13G**).

Marcação pela TRAP: As fotomicrografias obtidas aos 42 dias após a exodontia mostraram marcação moderada (2) (**Figura 13H**).

GRUPO ORQTRAT:

Marcação pela WNT: As fotomicrografias obtidas aos 42 dias após a extração mostraram forte marcação (3) **(Figura 13J)**.

Marcação pela osteocalcína: as fotomicrografias obtidas aos 42 dias após a extração mostraram-se fortemente marcadas (3) **(Figura 13K)**.

Marcação pela TRAP: As fotomicrografias obtidas aos 42 dias após a exodontia mostraram marcação fraca (1) **(Figura 13L)**.

1.6 Discussão

Este estudo indicou que o tratamento com teriparatida melhorou o reparo ósseo alveolar em 42 dias pós exodôntico nos animais com osteoporose induzida e tratados com teriparatida. Este tratamento se mostrou capaz de aumentar a atividade celular ligada ao reparo ósseo e de aumentar as características histológicas de neoformação óssea quando comparado aos ratos induzidos à osteoporose sem tratamento.

A teriparatida tem se mostrado eficiente no tratamento da osteoporose, reduzindo o risco de fraturas e aumentando a densidade óssea mineral dos ossos longos (Kim et al. 2017). Embora, pouco se saiba dos efeitos nos ossos maxilares.

O presente estudo apresentou melhora dos padrões histológicos do osso alveolar em reparação dos animais tratados com teriparatida. Foi possível notar

através dos cortes histológicos um melhor padrão trabecular com pouca presença de tecido conjuntivo.

Quando analisado o reparo ósseo alveolar dos ratos induzidos à osteoporose neste estudo, foi possível observar que os 42 dias do tratamento com teriparatida levou a uma intensa (3) marcação de WNT assim como no grupo SHAM indicando um padrão normal e mais alto quando comparado ao grupo ORQ (2) de proliferação e migração das células osteogênicas. Quando analisado a marcação da osteocalcina os resultados também foram favoráveis, onde foi possível notar uma forte marcação (3) no grupo ORQTRAT, sendo esta superior à encontrada nos grupos ORQ e SHAM (2), indicando que o tratamento foi capaz de aumentar a secreção dessa proteína pelos osteoblastos melhorando a atividade osteogênica. Ainda, foi observada uma maior atividade de TRAP (2) nos grupos ORQ e SHAM quando comparado ao grupo ORQTRAT (3), mostrando também que o tratamento foi capaz de regular a atividade osteoclástica, auxiliando na manutenção da massa óssea. Esses dados são consistentes com os da literatura previamente estudada que relata uma melhora do anabolismo ósseo e diminuição da reabsorção óssea proporcionada pelo tratamento com a teriparatida (Murray et al. 2005).

Ainda, é sabido que a qualidade do tecido ósseo é fundamental para o sucesso da reabilitação (Jaffin and Berman 1991, Jemt et al. 1992). Tem sido sugerido que a densidade óssea, volume ósseo e volume do osso trabecular são fundamentais parâmetros na taxa de sucesso dos implantes osseointegráveis (Shapurian et al. 2006, Parfitt et al. 1987). A microtomografia

se apresenta como padrão ouro de avaliação desses parâmetros ósseos, ainda que esta não seja usada clinicamente (Burghardt, Link, and Majumdar 2011).

De fato, a micro-ct aos 60 dias do reparo alveolar mostrou que o tratamento proposto foi capaz de melhorar a porcentagem de volume ósseo (BV/TV), a espessura das trabéculas (Tb.Th), a separação das trabéculas (Tb.Sp) e, com diferença estatística, o volume ósseo (BV) ($p > 0,05$, Tukey test). Além de diminuir a quantidade de trabéculas (Tb.N) e a porosidade óssea (Po.Tot). Estes dados sugerem que o tratamento com a teriparatida pode melhorar as características microestruturais do osso alveolar em reparação, caracterizando uma melhor qualidade do osso alveolar.

O maior volume ósseo neoformado encontrado para o grupo ORQTRAT, compactua com os valores de percentual de volume ósseo, tendo assim, resultados que mostram maior neoformação óssea neste grupo. Os parâmetros de espessura do trabeculado, número e espaçamento das trabéculas e a porosidade total também foram avaliados. Um maior volume do osso trabecular, menor número e espaço entre as trabéculas, assim como menor porcentagem de porosidade total, é considerado um osso de melhor qualidade (Bouxsein et al., 2010).

Devido à alta incidência de osteoporose no homem, uma quantidade alta de tratamentos tem sido propostos (Riggs, Khosla, and Melton 1998). Entretanto, pouco é discutido sobre o efeito dessas drogas no turnover do osso alveolar. É sabido que os bisfosfonatos, principalmente o alendronato, são as drogas mais usadas no tratamento das osteoporoses, tendo bons resultados na prevenção de fraturas vertebrais (Wells et al. 2008). Embora seu uso a longo

termo promova osteonecrose dos maxilares (Ruggiero and Drew 2007), e de não ser a via de tratamento ideal na osteoporose em homens, uma vez que esta droga diminui a reabsorção óssea e no homem a deficiente neoformação óssea que se da como etiologia desta patologia (Gagnon; Li; Ebeling, 2008).

Assim, tratamentos que estimulem a neoformação óssea necessitam de mais estudos, os tratamentos para osteoporose ainda não foram estudados em homens como em mulheres, e somente algumas terapias foram aprovadas para a aplicação em homens. Destes se incluem os bisfosfonatos e teriparatida (Gagnon; Li; Ebeling, 2008). Sendo a teriparatida então o único tratamento anabólico aprovado para o uso em homens com osteoporose (Cheng; Gupta, 2012).

Assim, diante do exposto e dos limites deste estudo *in vivo*, foi possível concluir que o tratamento com teriparatida em ratos orquiectomizados aumenta o volume e melhora a qualidade óssea no reparo alveolar.

1.7 Referências

Amin, S.; Zhang, Y.; Felson, D.T.; Sawin, C.T.; Hannan, M.T.; Wilson, P.W.; Kiel, D.P. (2006). Estradiol, testosterone, and the risk for hip fractures in elderly men from the Framingham Study. *Am J Med*, v119, n5, p.426-433.

Bilezikian, J.P. (2006). Osteonecrosis of the jaw - do bisphosphonates pose a risk? *N Engl J Med*, v355, n22, p2278-2281.

Bouxsein, M. L., S. K. Boyd, B. A. Christiansen, R. E. Guldberg, K. J. Jepsen, and R. Müller. (2010). "Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography." *J Bone Miner Res* 25 (7):1468-86.

Burge, R.; Dawson-Hughes, B.; Solomon, D.H.; Wong, J.B.; King, A.; Tosteson, A. (2007). Incidence and Economic Burden of Osteoporosis-Related Fractures in the United States, 2005-2025. *Journal of bone and mineral research*, v2, n3, p.465-475.

Burghardt, A. J., T. M. Link, and S. Majumdar. (2011). "High-resolution computed tomography for clinical imaging of bone microarchitecture." *Clin Orthop Relat Res* 469 (8):2179-93.

Carvalho, A.C.P.; Okamoto, T. (1987). *Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados a clínica*. São Paulo: Panamericana.

Cheng, M.L.; Gupta, V. (2012). Teriparatide – Indications beyond osteoporosis. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, v16, n3, p343-348.

Cooper, C.; Melton III, L.J. (1992). Epidemiology of osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab*, v3, p.224-229.

Duque, G.; El Abdaimi, K.; Henderson, J.E.; Lomri, A.; Kremer, R. (2004). Vitamin D inhibits Fas ligand-induced apoptosis in human osteoblasts by regulating components of both the mitochondrial and Fas-related pathways. *Bone*, v35, n1, p.57-64.

Duque, G.; Macoritto, M.; Dion, N.; Ste-Marie, L.G.; Kremer, R. (2005). 1,25(OH)₂D₃ acts as a bone-forming agent in the hormone-independent senescence-accelerated mouse(SAM-P/6). *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v288, n4, p.E723-E730.

Elsubeihi, E.S.; Heersch, J.M.N.; (2002). Effects of postmenopausal osteoporosis in the mandible. In: Zarb, G.; Lekholm, U.; Albrektsson, T.; Tenenbaum, H. *Aging, osteoporosis and dental implants*. London: Quintessence Books, p.207–215.

Ersan, N.; van Ruijven, L.J.; Bronckers, A.L.; Olgaç, V.; Ilgüy, D.; Everts, V. (2014). Teriparatide and the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a rat model. *Dentomaxillofac Radiol*, v43, n1, 20130144.

Falahati-Nini, A.; Riggs, B.L.; Atkinson, E.J.; O'Fallon, W.M.; Eastell, R.; Khosla, S.(2000). Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *Journal of Clinical Investigation*, v106, n12, p.1553-1560.

Gagnon, C.; Li, V.; Ebeling, P.R. (2008). Osteoporosis in men: its pathophysiology and the role of teriparatide in its treatment. *Clinical interventions in aging*, v3, n4, p.635-645.

Ho, Y.V.; Frauman, A.G.; Thomson, W.; Seeman, E. (2000). Effects of alendronate on bone density in men with primary and secondary osteoporosis. *Osteoporos Int*, v11, n2, p.98-10.

Jaffin, R. A., and C. L. Berman. (1991). "The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis." *J Periodontol* 62 (1):2-4.

Jemt, T., K. Book, B. Lindén, and G. Urde. (1992). "Failures and complications in 92 consecutively inserted overdentures supported by Brånemark implants in severely resorbed edentulous maxillae: a study from prosthetic treatment to first annual check-up." *Int J Oral Maxillofac Implants* 7 (2):162-7.

Khosla, S.; Amin, S.; Orwoll, E. (2008). Osteoporosis in Men. *Endocrine Reviews*, v29, n4, p.441–464.

Kim SM, Kang KC, Kim JW, Lim SJ, Hahn MH. (2017). Current Role and Application of Teriparatide in Fracture Healing of Osteoporotic Patients: A systematic Review. *J Bone Metab*. Feb;24(1):65-73.

Leder, B.Z.; LeBlanc, K.M.; Schoenfeld, D.A.; Eastell, R.; Finkelstein, J.S. (2010). Differential effects of androgens and estrogens on bone turnover in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*, v88, n1, p.204-210.

Lips, P. (2001). Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev*, v22, n4, p.477-501.

Manrique, N., C. C. Pereira, E. R. Luvizuto, M. el P Sánchez, T. Okamoto, R. Okamoto, D. H. Sumida, and C. Antoniali. (2015). "Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneous Ramalho-Ferreira, G., L. P. Faverani, G. A. Momesso, E.

Murray TM, Rao LG, Divieti P, et al. (2005). Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl-terminal ligands. *Endocr Rev*;26:78–113.

Okamoto T, Russo MC. (1973) Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Araçatuba*; v2, p.153-169.

Orwoll, E.; Ettinger, M.; Weiss, S.; Miller, P.; Kendler, D.; Graham, J.; Adami, S.; Weber, K.; Lorenc, R.; Pietschmann, P.; Vandormael, K.; Lombardi, A. (2000). Alendronate for the treatment of osteoporosis in men. *N Engl J Med*, v343, n9, p.604-610.

Orwoll, E.; Lambert, L.C.; Marshall, L.M.; Phipps, K.; Blank, J.; Barrett-Connor, E.; Cauley, J.; Esnrud, K.; Cummings, S. (2006). Testosterone and Estradiol among Older Men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v91, n4, p.1336-1344.

Parfitt, A. M., M. K. Drezner, F. H. Glorieux, J. A. Kanis, H. Malluche, P. J. Meunier, S. M. Ott, and R. R. Recker. (1987). "Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee." *J Bone Miner Res* 2 (6):595-610.

Petroianu, A.; Veloso, D.F.; Alberti, L.R.; Figueiredo, J.A.; Rodrigues, F.H. (2010). Is there a relationship between physical performance and orchiectomy? *Andrologia*, v42, n5 p.302-304.

R. Luvizuto, I. de Oliveira Puttini, and R. Okamoto. (2016). "Effect of antiresorptive drugs in the alveolar bone healing. A histometric and immunohistochemical study in ovariectomized rats." *Clin Oral Investig*. doi: 10.1007/s00784-016-1909-x.usly hypertensive rats." *Clin Oral Investig* 19 (6):1319-27.

Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Prado FB, Garcia IR Jr & Okamoto R: (2015). Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 44(6):798-805.

Ramalho-Ferreira, G.; Faverani, L.P.; Grossi-Oliveira, G.A.; Okamoto,T.; Okamoto, R. (2015). Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. *Journal of Biomedical Optics*, v20, n3, p.038003-1 – 038003-7.

Riggs, B. L., S. Khosla, and L. J. Melton. (1998). "A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men." *J Bone Miner Res* 13 (5):763-73.

Ringe, J.D.; Faber, H.; Farahmand, P.; Dorst, A. (2006). Efficacy of risedronate in men with primary and secondary osteoporosis: results of a 1-year study. *Rheumatol Int*, v26, n5, p.427-431.

Ruggiero, S. L., and S. J. Drew. (2007). "Osteonecrosis of the jaws and bisphosphonate therapy." *Journal of dental research* 86 (11):1013-1021.

Von Wower N & Kollerup G (1992). Symptomatic osteoporosis: a risk factor for residual ridge reduction of the jaws. *J Prosthet Dent.* 67(5):656-60.

Wells, G. A., A. Cranney, J. Peterson, M. Boucher, B. Shea, V. Robinson, D. Coyle, and P. Tugwell. (2008). "Alendronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women." *Cochrane Database Syst Rev* (1):CD001155.

Wells, G. A., A. Cranney, J. Peterson, M. Boucher, B. Shea, V. Robinson, D. Coyle, and P. Tugwell. (2008). "Alendronate for the primary and secondary prevention of osteoporotic fractures in postmenopausal women." *Cochrane Database Syst Rev* (1):CD001155.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP pelo auxílio pesquisa regular concedido (# 2015/14688-0).

1.8 Lista de Tabelas

Tabela 1 – Grupos experimentais de acordo com o tratamento com Teripatida.

SHAM (n= 16), ratos submetidos à cirurgia fictícia e não receberam tratamento medicamentoso.

ORQ (n=16), ratos submetidos à orquiectomia que não receberam tratamento medicamentoso.

ORQTRAT (n=16), ratos submetidos à orquiectomia que receberam teriparatida (dose 0,5 mcg/kg/dia).

1.9 Lista de Figuras



Figura 1 – Linha do tempo experimental

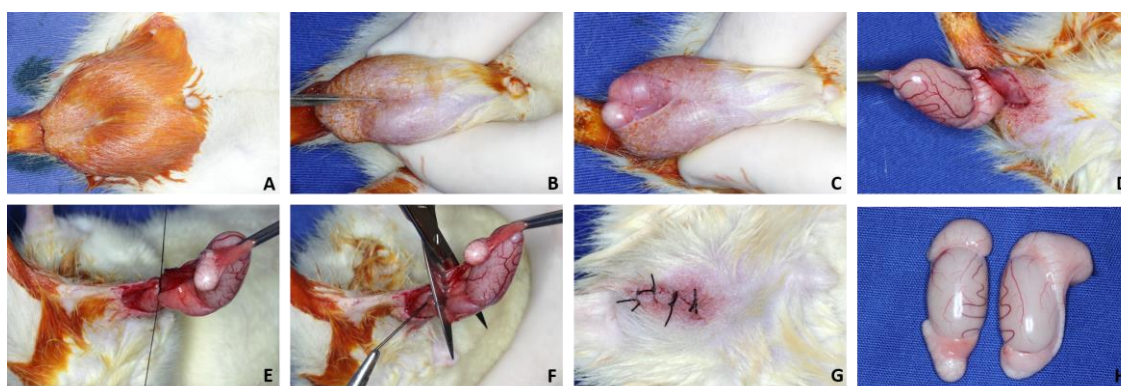


Figura 2 – **A:** Antissepsia com PVPI em ambos os sacos escrotais; **B:** Incisão; **C e D:** Exposição de ambos escrotos; **E:** Laqueamento do ducto deferente e do pedículo vascular; **F:** Remoção de ambos escrotos com auxílio de uma tesoura; **G:** Sutura; **H:** Ambos escrotos removidos (Orquiectomia).

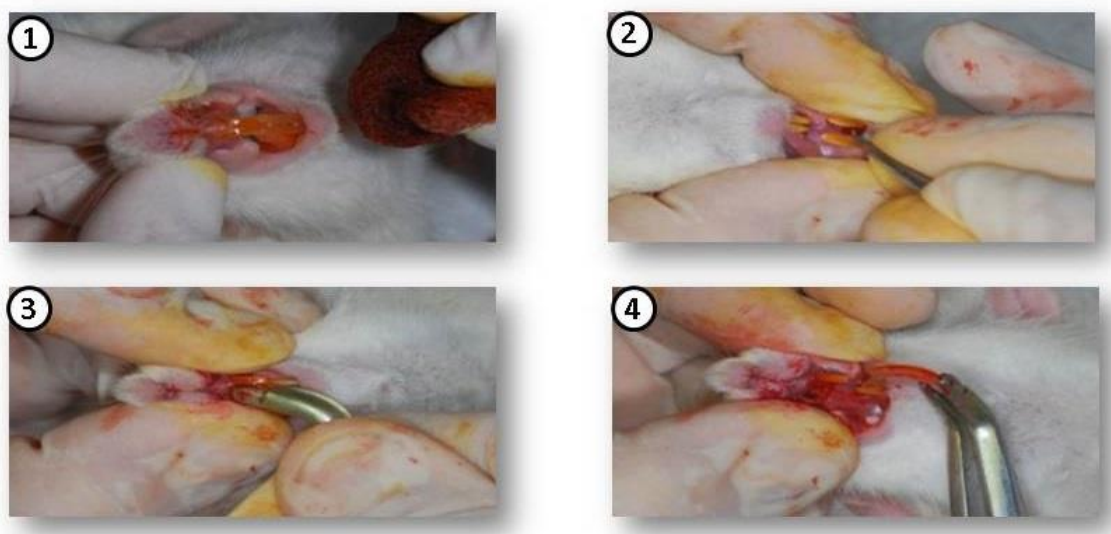


Figura 3 – 1: Antissepsia com PVPI na área cirúrgica; 2: Luxação do dente com alavanca 3: Luxação do elemento dental com fórceps adaptado; 4: exodontia.

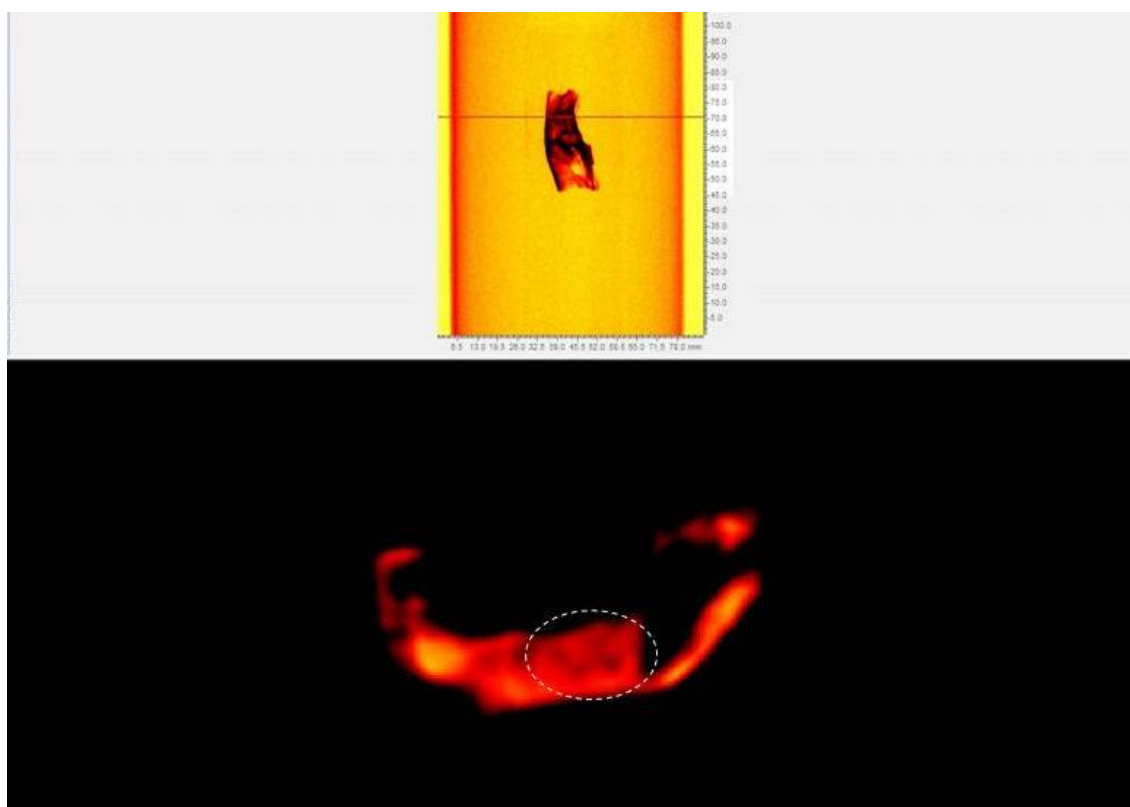


Figura 4 – Imagem em 3 dimensões obtida através do software DataViewer da micro-ct.

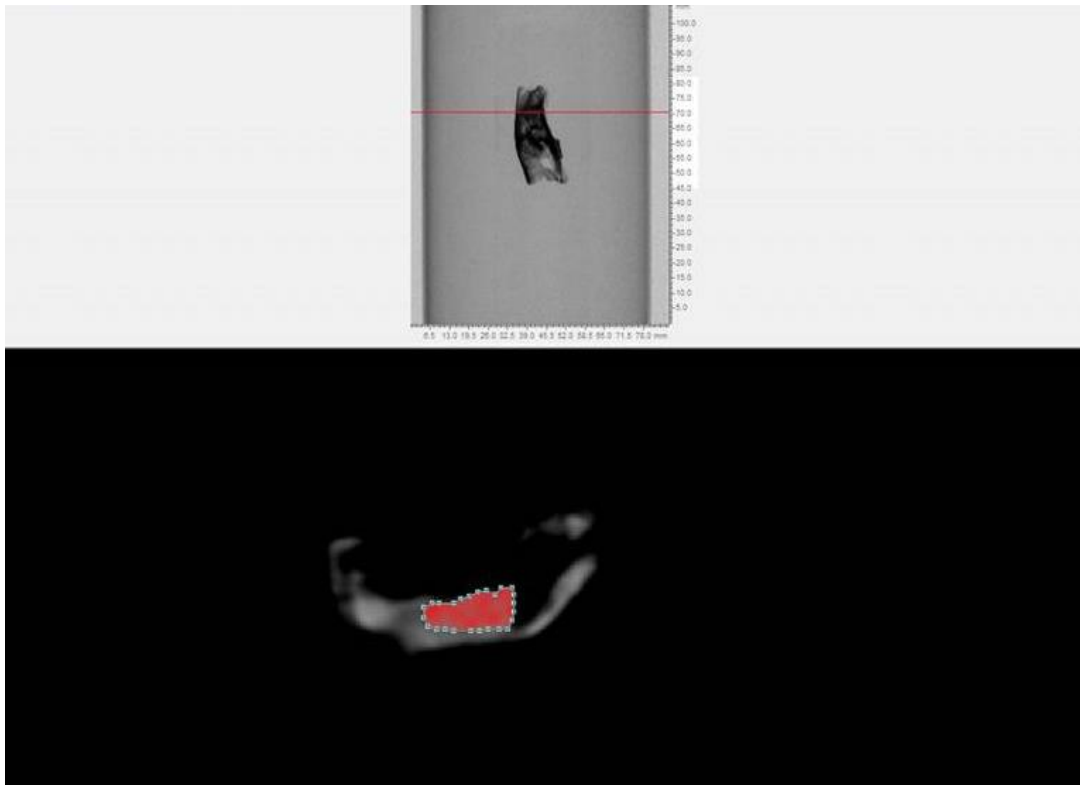


Figura 5 – Seleção da área de interesse da análise de micro-ct através do software CT Analyzer.

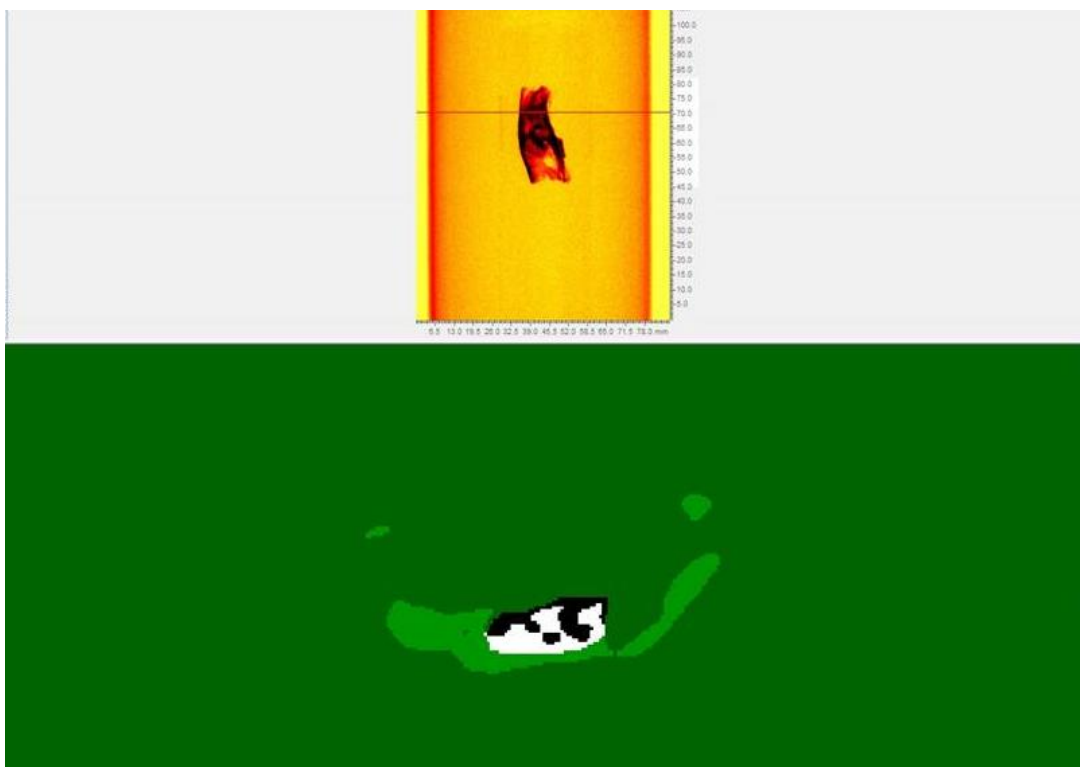


Figura 6 – Utilização da ferramenta threshold para mensurações da micro-ct através de escalas de cinza feita pelo software CT Analyzer.

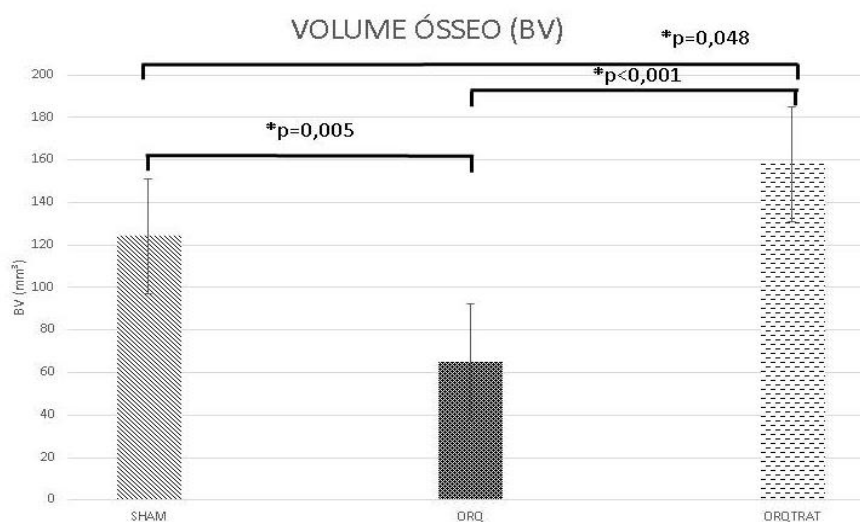


Figura 7 – Quantificação do volume ósseo. Volume equiparados do SHAM e ORQ. Teste de Shapiro-Wilk e pós-teste de Tukey.

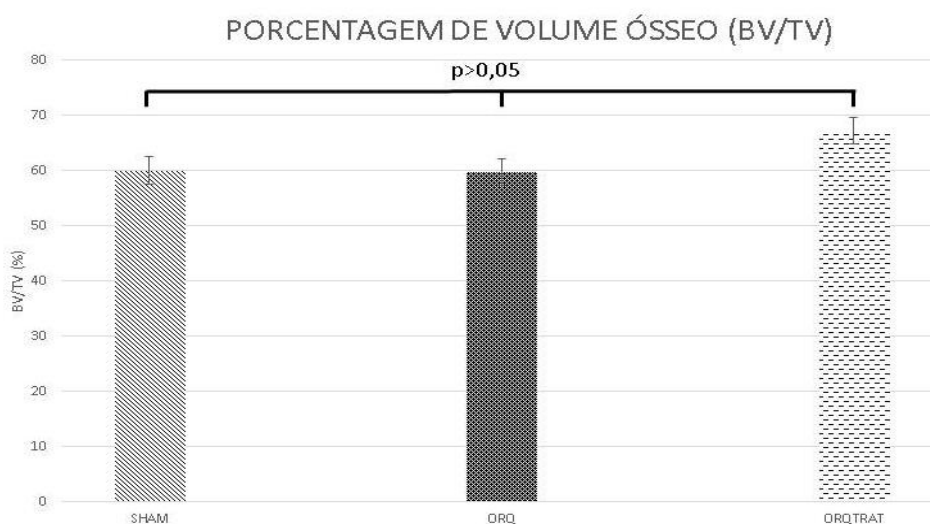


Figura 8 – Quantificação do percentual de volume ósseo. Percentuais aproximados. Teste de Shapiro-Wilk e pós-teste de Tukey.

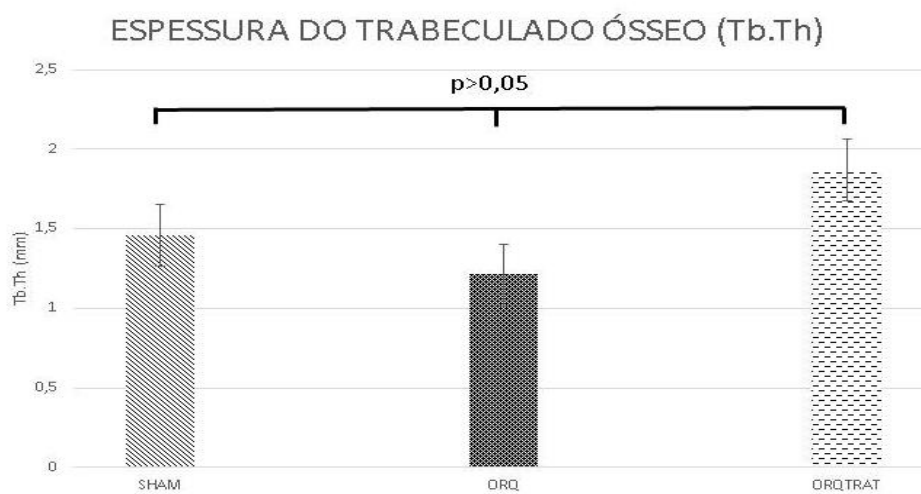


Figura 9 – Quantificação da espessura trabecular. Valores similares do SHAM e ORQTRAT Teste de Shapiro-Wilk e pós-teste de Tukey. ($p > 0,05$).

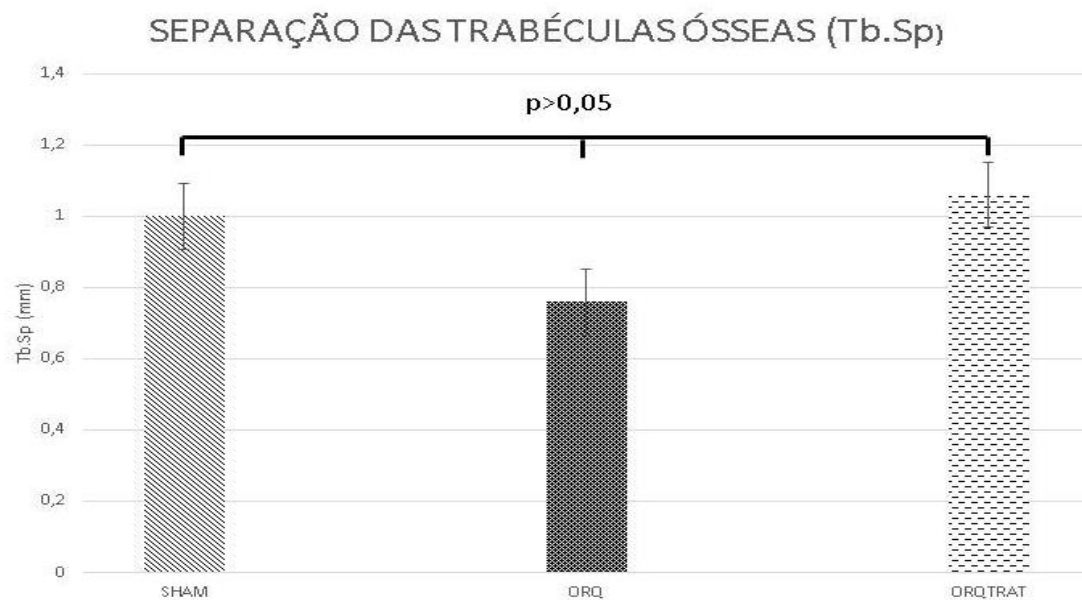


Figura 10 – Quantificação da separação entre as trabéculas. Valores maiores para SHAM e ORQTRAT e menor para o grupo ORQ. Teste de Shapiro-Wilk e pós-teste de Tukey.

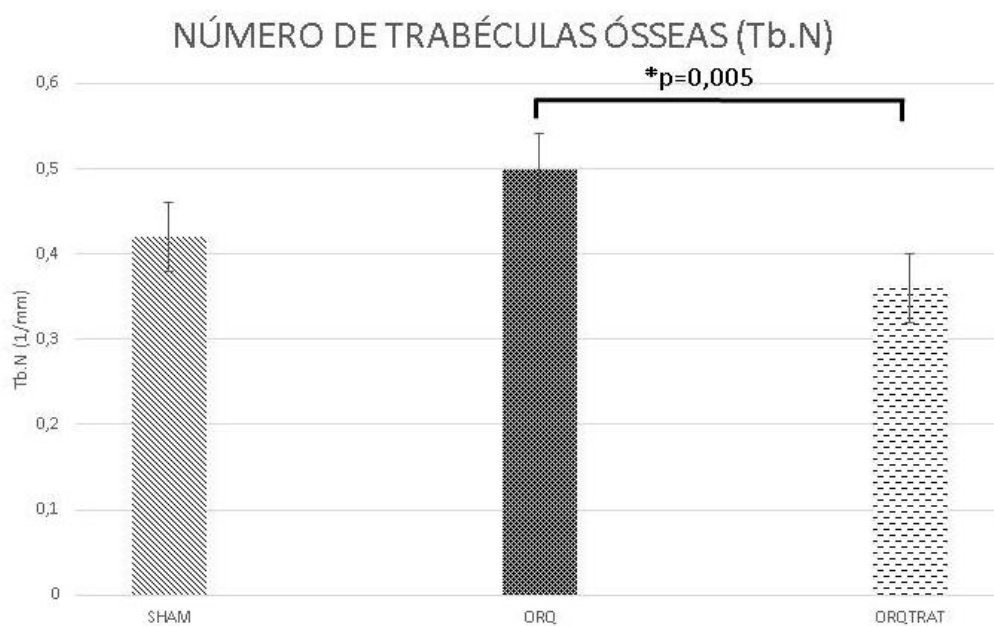


Figura 11 – Quantificação do número de trabéculas. Valor maior para ORQ e menor para SHAM e ORQTRAT. Teste de Shapiro-Wilk e pós-teste de Tukey. ($p > 0,05$).

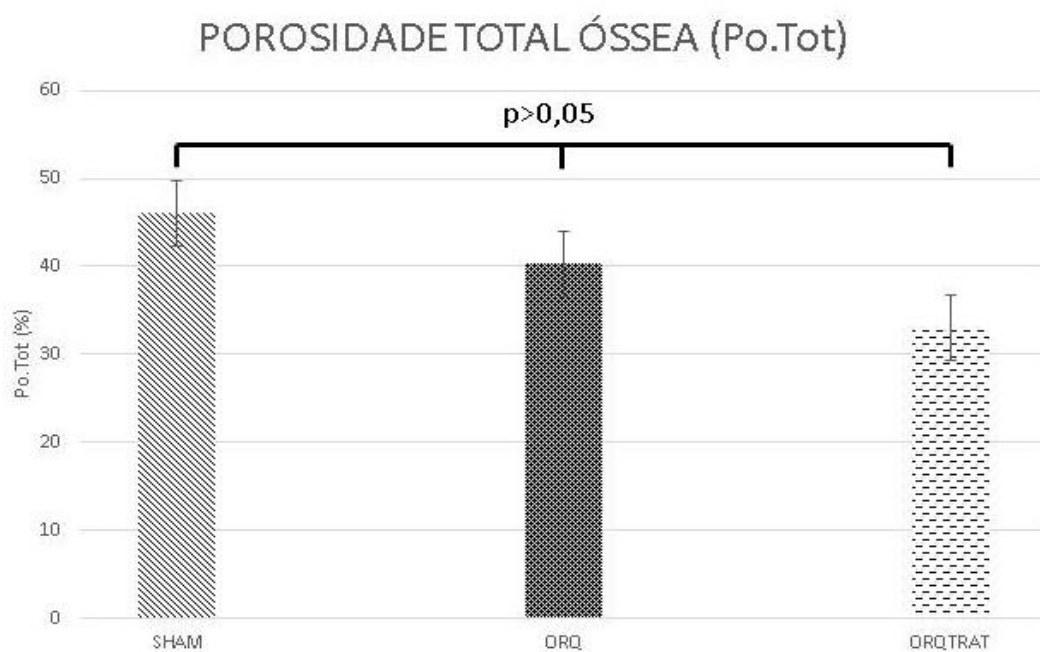


Figura 12 – Quantificação do percentual de porosidade total. Valor compatível com osso mais poroso para o grupo ORQ e menos poroso para SHAM e ORQTRAT ($p > 0,05$).

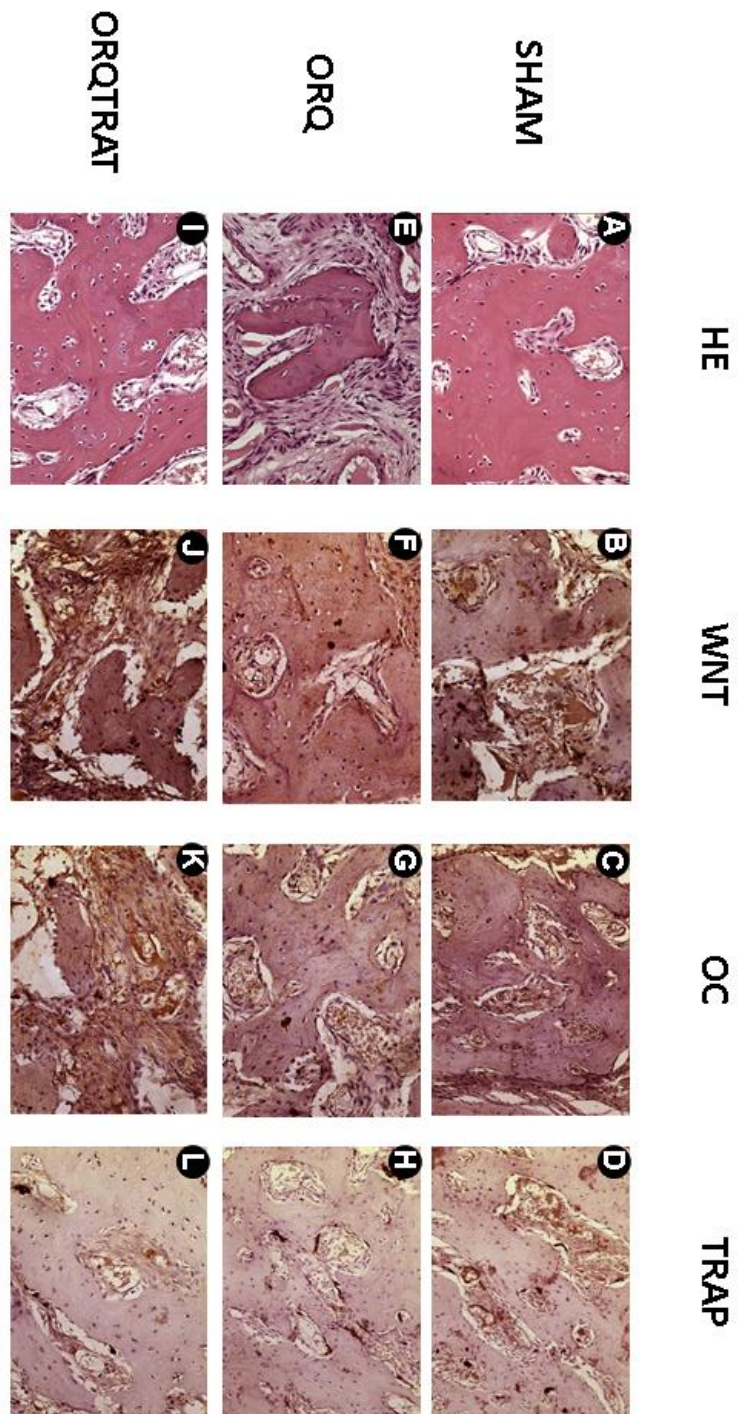


Figura 13 – Prancha com as imagens histológicas e imunohistoquímicas dos alvéolos em reparação no período de 42 dias após a exodontia em aumento de 40x.

ANEXO

2.0 Anexo A - Comitê de ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Análise histométrica e imunoistoquímica do processo de reparo alveolar de ratos orquiectomizados submetidos à terapia com teriparatida**", Processo FOA nº 00706-2015, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 03 de Agosto de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 15 de Junho de 2017.

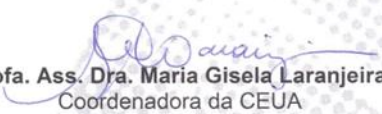
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 15 de Julho de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Alveolar repair process. Histometric and immunohistochemical analysis in orchidectomized rats treated with teriparatide**", Protocol FOA nº 00706-2015, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on August 03, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: June 15, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: July 15, 2017.


Prof. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

2.1 Anexo B - Normas para publicação do periódico Clinical Oral Implants Research

Author Guidelines

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

Useful Websites: Submission Site, Articles published in Clinical Oral Implants Research, Author Services, Wiley-Blackwell's Ethical Guidelines, Guidelines for Figures

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

1. GENERAL

Clinical Oral Implants Research conveys scientific progress in the field of implant dentistry and its related areas to clinicians, teachers and researchers concerned with the application of this information for the benefit of patients in need of oral implants. The journal addresses itself to clinicians, general practitioners, periodontists, oral and maxillofacial surgeons and prosthodontists, as well as to teachers, academicians and scholars involved in the education of professionals and in the scientific promotion of the field of implant dentistry.

Clinical Oral Implants Research publishes:

Original research articles of high scientific merit in the field of material sciences, physiology of wound healing, biology of tissue integration of implants, diagnosis and treatment planning, prevention of pathologic processes jeopardizing the

Anexo

longevity of implants, clinical trials on implant systems, stoma-tognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation.

Review articles by experts on new developments in basic sciences related to implant dentistry and clinically applied concepts.

Case reports and case series only if they provide or document new fundamental knowledge.

Novel developments if they provide a technical novelty for any implant system.

Short communications of important research findings in a concise format and for rapid publication.

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

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

2. ETHICAL GUIDELINES

Clinical Oral Implants Research adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

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

Anexo

interpretation of the data and/or the drafting of the paper and ALL must have critically reviewed its content and have approved the final version submitted for publication. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship.

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

Up to 6 authors are accepted without need for justification. In the case of a specific and detailed justification of the role of every author, up to 8 authors may be mentioned. It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editor reserve the right

Anexo

to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

2.3 Clinical Trials

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

Clinical Oral Implants Research encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.4 Conflict of Interest and Source of Funding

Clinical Oral Implants Research requires that sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest noted. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included. Information concerning conflict of interest and sources of funding should be included under Acknowledgements.

2.5 Appeal of Decision

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

2.6 Permissions

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

2.7 Copyright Assignment

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere.

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

For authors signing the copyright transfer agreement

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

CTA Terms and Conditions
http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

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

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit

<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

2.8 OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

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

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

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

3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from the Editorial Assistant Ms. Brigitte Baur. E-mail: coir@zmk.unibe.ch

3.1. Getting Started

Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>

- Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user.
- If you are creating a new account.
 - After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.
- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/coir> and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.

- Log-in and select Corresponding Author Center.

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged in, click the 'Submit a Manuscript' link in the menu bar.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop-down menu next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before sending to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

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

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to Clinical Oral Implants Research will be reviewed by two experts in the field. Clinical Oral Implants Research uses single blinded

review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.5. Suggest a Reviewer

Clinical Oral Implants Research attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of one potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the journal editor will choose one or two reviewers as well.

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

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

3.7. E-mail Confirmation of Submission

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

3.8. Manuscript Status

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

3.9. Submission of Revised Manuscripts

Anexo

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

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original research articles of high scientific merit in the field of material sciences, physiology of wound healing, biology of tissue integration of implants, diagnosis and treatment planning, prevention of pathologic processes jeopardizing the longevity of implants, clinical trials on implant systems, stomatognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation.

Review articles by experts on new developments in basic sciences related to implant dentistry and clinically applied concepts. Reviews are generally by invitation only and have to be approved by the Editor-in-Chief before submission.

Case reports and case series, but only if they provide or document new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician.

Novel developments if they provide a technical novelty for any implant system.

Short communications of important research findings in a concise format and for rapid publication.

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

Proceedings of international meetings may also be considered for publication at the discretion of the Editor.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 10 published pages are subject to a charge of USD 160 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters (excluding figures and tables).

5.2. Format

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

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro*, *in vivo*, *in situ* and other Latin expressions are to be italicised. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point and not a comma will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of Webster's third new international dictionary will be adhered to.

Scientific Names: Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined on the typescript. The full proper name (e.g., *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e.g., *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e.g., streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalised and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e.g., Ps. for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names. If a proprietary name is used, it must be attached when the term is first used.

5.2. Structure

All manuscripts submitted to Clinical Oral Implants Research should include Title Page, Abstract, Main Text and Acknowledgements, Tables, Figures and Figure Legends as appropriate.

Title Page: should contain the title of the article, full name(s) of the authors (no more than 6) and institutional affiliation(s), a running title not exceeding 60 letters and spaces, and the name, telephone and fax numbers, email and complete mailing address of the author responsible for correspondence. The author must list appropriate key words for indexing purposes.

Abstract: should not to exceed 250 words. This should be structured into: objectives, material and methods, results, conclusions, and no other information.

Main Text of Original Research Article should include Introduction, Material and Methods, Results and Discussion.

Introduction: Summarise the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively. State clearly the working hypothesis.

Material and Methods: Material and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.

Results: Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all data in the tables and illustrations. The important observations should be emphasised.

Discussion: Summarise the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and

point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

Main Text of Short Communications: Short communications are limited to two printed pages including illustrations and references and need not follow the usual division into material and methods, etc., but should have an abstract.

Acknowledgements: Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support should be acknowledged.

5.3. References

References should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Black & Miller 1988). Three or more authors should always be referred to as, for example, (Fox et al. 1977).

A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in Units, symbols and abbreviations: a guide for biological and medical editors and authors (1988), p. 52, London: The Royal Society of Medicine.

a) The arrangement of the references should be alphabetical by author's surname.

b) The order of the items in each reference should be:

(i) for journal references:

name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.

(ii) for book references:

name(s) of author(s), year, title of book, edition, volume, chapter and/ or page number, town of publication, publisher.

Anexo

c) Author's names should be arranged thus: Daniels, J.A., Kelly, R.A. & Til, T.C. Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Author's names when repeated in the next reference are always spelled out in full.

d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1966).

c) The title of the paper should be included, without quotation marks.

f) The journal title should be written in full, italicised, and followed by volume number in bold type, and page numbers.

Examples:

Tonetti, M. S., Schmid, J., Hämmerle, C. H. & Lang, N. P. (1993) Intraepithelial antigen-presenting cells in the keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. *Clinical Oral Implants Research* 4: 177-186.

Poole, B., Ohkuma, S. & Warburton, M. (1978) Some aspects of the intracellular breakdown of erogenous and endogenous proteins. In: Segal, H.S. & Doyle, D.J., eds. *Protein turnover and lysosome function*, 1st edition, p. 43. New York: Academic Press.

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

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Figures: All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single-column width (81 mm) after reduction, although in exceptional cases 120mm (double-column) and 168 mm

Anexo

(full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed. Each figure should have a legend

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley-Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

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

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1 Proof Corrections

Anexo

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

Articles should not normally exceed 10 printed pages, including illustrations and references. Additional pages will be charged to the author(s) at the rate of USD 160 per page.

6.2 Early View (Publication Prior to Print)

Clinical Oral Implants Research is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3 Author Services

Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including.