



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

VINÍCIUS ESCÓRSIO SILVA

**ANÁLISE DA SECREÇÃO DE INTERLEUCINA-6 EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS E SUBMETIDAS À REPOSIÇÃO HORMONAL
APÓS REIMPLANTE DENTÁRIO IMEDIATO.**

Araçatuba - SP

2016



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

VINÍCIUS ESCÓRSIO SILVA

**ANÁLISE DA SECREÇÃO DE INTERLEUCINA-6 EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS E SUBMETIDAS À REPOSIÇÃO HORMONAL
APÓS REIMPLANTE DENTÁRIO IMEDIATO.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof.^a. Dr.^a Sônia Regina Panzarini.

Coorientador: Prof. Dr. Claudio Aparecido Casatti.

Araçatuba - SP

2016

A Valdiléia Cristina Marim, minha mãe, que apesar da distância durante esses anos, sempre esteve presente em todos os momentos, me apoiando, me orientando, sendo a força que me motivava a continuar e não desistir dos meus objetivos, e que acima de tudo nunca deixou de acreditar que um dia eu chegaria até aqui.

AGRADECIMENTOS

Aos meus avós pela ajuda que sempre me deram, ao apoio desde o começo e por acreditarem na minha capacidade.

Às minhas tias, que cuidaram de mim como filho desde criança, e ajudaram da forma mais carinhosa durante todos esses 6 anos.

À minha orientadora, Sônia Regina Panzarini, que me deu a oportunidade de conhecer a pesquisa científica da melhor forma possível. Aos ensinamentos adquiridos, à paciência em transmitir os seus conhecimentos, mas acima de tudo ao respeito durante todos esses anos de trabalho.

À minha companheira de pesquisa, Vanessa Ferreira da Silva, com quem tive contato basicamente todos os dias durante o desenvolvimento desse trabalho, que me orientou e me ajudou muito em todos os sentidos.

A todos os professores que de alguma forma estiveram envolvidos no decorrer da execução desse trabalho e que me ajudaram a desenvolvê-lo.

Aos meus amigos, que viveram junto comigo toda essa experiência e acompanharam de perto meu amadurecimento, como acadêmico e pessoa, e me deram grande suporte.

“Precisamos dar um sentido humano às nossas construções. E, quando o amor ao dinheiro, ao sucesso nos estiver deixando cegos, saibamos fazer pausas para olhar os lírios do campo e as aves do céu.”

Érico Veríssimo

SILVA, VE. **Análise da secreção de interleucina-6 em ratas ovariectomizadas e submetidas à reposição hormonal após reimplante dentário imediato.** Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

RESUMO

A deficiência de estrógeno é uma condição sistêmica com a qual o cirurgião dentista pode se deparar na clínica e aparece durante a menopausa e após ovariectomia. Essa condição pode levar ao desenvolvimento da osteopenia e da osteoporose que acometem os ossos maxilares promovendo perda óssea do processo alveolar. O objetivo do trabalho foi analisar a secreção da IL-6 e dos níveis de 17β - estradiol pelo método ELISA em ratas ovariectomizadas e submetidas à terapia de reposição hormonal (TRH) após reimplante dentário imediato. Foram selecionadas 60 ratas com ciclo estral regular. Os animais foram divididos em três grupos: Sham, OVX e OVX/E2. No 8º dia após ovariectomia foi implantado pellets subcutâneo com óleo de milho (OVX) e com 17β - estradiol (OVX/E2) e realizado exodontia e reimplante imediato em 30 animais. No 53º dia os outros 30 animais foram submetidos à exodontia e reimplante imediato. ATRH foi mantida por 60 dias quando foi realizada a coleta do sangue para as dosagens de IL-6 e 17β -estradiol. Concentrações plasmáticas de 17β -estradiol estavam $14,58 \text{ pg/mL} \pm 2,73$; $6,42 \text{ pg/mL} \pm 1,45$; $40,39 \text{ pg/mL} \pm 1,60$ para grupos Sham, OVX e OVX/E2 respectivamente. Os níveis de IL-6 apresentaram-se mais elevados no grupo OVX/E2 nos dois períodos estudados ($4,04 \text{ pg/mL} \pm 0,61$ e $3,29 \text{ pg/mL} \pm 0,19$) em relação aos demais grupos. Foi possível observar que houve aumento da secreção de IL-6 no grupo com maior nível plasmático de 17β - estradiol.

Palavras-chave: Reimplante Dentário. Ovariectomia. Estradiol. IL-6. Elisa.

SILVA, VE. **Interleukin-6 secretion analysis in ovariectomized rats and submitted to hormonal replacement therapy after tooth immediately replantation.** Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

ABSTRACT

Estrogen deficiency is a systemic condition that a dentist can encounter in clinical practice. It appears during menopause or after ovariectomy, and it can cause development of osteopenia and osteoporosis. These conditions affect the maxillary bone and cause bone loss, leading to an imbalance in the processes of bone formation and absorption. Considering the scarcity of literature on tooth replantation associated with this systemic condition and estrogen replacement therapy, the aim of this study was to assess the effect of estrogen deficiency after ovariectomy and hormone replacement therapy with 17β -estradiol following immediate tooth replantation, using the ELISA method for interleukin 6 (IL-6) secretion analyses and radioimmuno assay to test 17β levels. Female rats were submitted to estrous cycle study for a period of 10 days, after which 60 animals with a regular cycle were selected. The animals were divided into 3 groups: Group Sham – ovary exposition surgery; Group OVX - ovariectomy; Group OVX/E2 – ovariectomy and estrogen replacement therapy. On the 8th day post-surgery subcutaneous pellets with corn oil (OVX) or 17β -estradiol (OVX/E2) were implanted in the dorsal region of all animals, and 30 animals were submitted to extraction and immediate tooth replantation. On the 53rd day there remaining 30 animals underwent tooth same procedure. Estrogen replacement therapy was maintained for a period of 60 days, after which blood was collected and tested for IL-6 and estradiol. Plasma concentrations of 17β -estradiol were $14.58 \text{ pg/mL} \pm 2.73$; $6.42 \text{ pg/mL} \pm 1.45$; $40.39 \text{ pg/mL} \pm 1.60$ to Sham group, OVX and OVX/E2 respectively. IL-6 levels showed to be higher in OVX/E2 group in both periods studied ($4.04 \text{ pg/mL} \pm 0.61$ and $3.29 \text{ pg/mL} \pm 0.19$) compared to other groups. It was observed that there was an increase in IL-6 secretion in the group with higher plasma levels of estradiol 17β .

Keywords: Tooth replantation. Ovariectomy. Estradiol. IL-6. Elisa

LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1 (A e B)** - Porcentual de animais do grupo SHAM nas diferentes fases ciclo estral. (A) Sham período 15 dias e (B) 60 dias pós-reimplante.- *Págs. 18 e 19*
- **Figura 2** - Média e erro padrão da concentração plasmática de 17β - estradiol (pg/mL) para todos os grupos experimentais [SHAM, OVX, OVX/E2], ao final do experimento. -*Pág. 20*
- **Figura 3** - Média e erro padrão da concentração plasmática de 17β - estradiol (pg/mL) para todos os grupos experimentais [SHAM, OVX, OVX/E2], ao final do experimento.- *Pág. 21*
- **Figura 4** - Média e erro padrão da concentração plasmática de interleucina-6 (pg/mL) para todos os grupos experimentais [SHAM, OVX, OVX/E2] ao final do experimento, separados pelos períodos pós-reimplante dentário (15 e 60 dias).- *Pág. 22*
- **Figura 5** -Média e erro padrão da comparação entre os níveis de concentrações plasmáticas de IL-6 (pg/mL) e 17β - estradiol (pg/mL) para todos os grupos experimentais [SHAM, ovariectomia (OVX), TRH (OVX/E2)] no período de 15 dias pós-reimplante dentário.- *Pág. 23*
- **Figura 6** -Média e erro padrão da comparação entre os níveis de concentrações plasmáticas de IL-6 (pg/mL) e 17β - estradiol (pg/mL) para todos os grupos experimentais [SHAM, OVX, OVX/E2] no período de 60 dias pós-reimplante dentário.- *Pág.24*

LISTA DE ABREVIATURAS

DHEA= dehidroepiandrosterona

E₂=estradiol

ELISA=ensaio imunoenzimático

ERs=receptores de estrogênio

IL-1=interleucina-1

IL-6 = inteleucina-6

OPG= osteoprotegerina

OVX=grupo ovariectomizado

OVX/E2= grupo ovariectomizado com reposição hormonal

PTHa= paratormônio

RPM=erro padrão da média

TNF- α =fator de necrose tumoral α

TRH=terapia de reposição hormonal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVO	12
3. MATERIAL E MÉTODO	13
4. RESULTADOS	18
5. DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30
ANEXO	38

INTRODUÇÃO

Avulsão dentária é uma lesão grave cuja incidência é de aproximadamente 1-16% de todas as lesões traumáticas na dentição permanente e o tratamento ideal é o reimplante imediato do dente em seu alvéolo, garantindo a viabilidade das células do ligamento periodontal cementário promovendo assim o reparo por meio da reinserção de suas fibras (1-3).

Além de fatores locais (4) algumas condições sistêmicas como a deficiência de estrógeno também podem interferir nesse processo de reparo e na manutenção do dente reimplantado.

O ligamento periodontal, desempenha um papel vital na manutenção da homeostase dos tecidos periodontais, mantendo o equilíbrio entre às atividades de formação e reabsorção óssea (5,6) e na proteção da superfície radicular (7).

O tecido ósseo, também fundamental no processo de reparo do dente reimplantado, é um tecido complexo composto de células, matriz colagenosa e elementos inorgânicos. Seu crescimento, desenvolvimento e manutenção são processos altamente regulados (8). Proteínas, hormônios, fatores de crescimento e citocinas, estão ativamente envolvidos nestes processos e exerce ação direta sobre células com atividade osteoblástica e osteoclástica, atuando em sua diferenciação e ativação metabólica (9).

O estrógeno é um hormônio que tem um importante papel no controle do metabolismo ósseo regulando a expressão de proteínas como a Osteoprotegerina (OPG) (10, 11) e RANKL (11) e citocinas pró-inflamatórias (12,13). A sua deficiência causa a liberação de citocinas, como a IL-6 e TNF- α , que desempenham um papel destrutivo ao tecido ósseo (13).

As citocinas pro-inflamatórias assim como as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) estimulam a proliferação e diferenciação dos osteoclastos aumentando a reabsorção óssea e a subsequente perda de osso (14, 15). Essas citocinas são

produzidas principalmente por células mononucleadas e um caminho pela qual o estrógeno pode prevenir a reabsorção óssea é através da modulação da secreção das citocinas produzidas por monócitos da medula óssea (16).

A deficiência de estrógeno na pós-menopausa é devido à baixa função folicular ovariana ou ainda pode acontecer frente à remoção cirúrgica dos ovários (17).

A ovariectomia profilática pode ser em decorrência da prevenção ou tratamento contra o câncer ou durante uma histerectomia por agravo uterino benigno (18).

Também existem outras situações em que a deficiência de estrógeno ocorre em pacientes jovens como: a falência ovariana prematura, tratamentos de quimioterapia e radioterapia, uso de medicações que podem gerar a chamada menopausa química, doenças auto-imunes como lúpus e inflamações na tireóide (Tireoidite de Hashimoto), ou de problemas metabólicos como o diabetes, ou ainda infecções virais adquiridas, podem necessitar de medicações que acabam por acelerar o processo da menopausa precoce (19, 20).

Há relatos de aumento da circulação de IL-6 e TNF- α após a menopausa natural ou cirúrgica (12,13).

Baseado no efeito de proteção do estrógeno no tecido ósseo, a terapia de reposição hormonal atualmente permanece entre os tratamentos mais utilizados para os sintomas da menopausa e prevenção da osteoporose (20-23).

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

Pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na regulação da proliferação celular e atividade osteoclástica no periodonto após o reimplante dentário (24) e quando se associa este reparo com a deficiência de estrógeno e a reposição hormonal é ainda mais escasso. Portanto, a análise dos níveis de estradiol (17 β - estradiol) e da interleucina-6 (IL-6) por meio do ensaio

imunoenzimático (ELISA) possibilitará a correlação do estudo da dinâmica dos tecidos periodontais com os níveis plasmáticos de E_2 e IL-6 em diferentes períodos do processo de reparo do reimplante dentário.

OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi analisar a secreção da IL-6 e dos níveis de 17β - estradiol pelo método ELISA em ratas ovariectomizadas e submetidas à terapia de reposição hormonal (TRH) após reimplante dentário imediato.

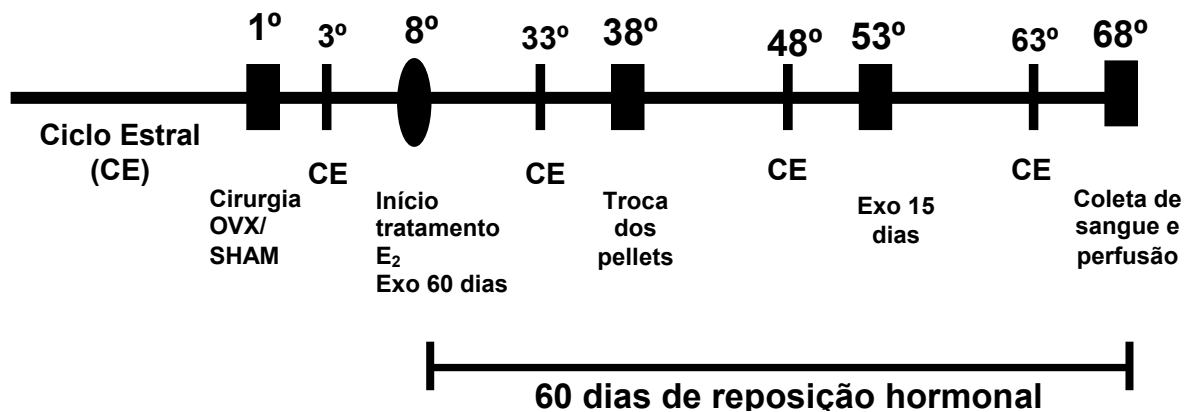
MATERIAL E MÉTODO

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP e foi aprovado (processo FOA – 00583-2013 –Anexo).

Foram selecionadas ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com idade de 4 meses, que já tenham tido uma cria antes do início do experimento. Os animais foram mantidos em gaiolas no biotério do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, com luz e temperatura controladas e alimentadas com ração balanceada (Ração ativada Produtor, Moinho Primor S/A), exceto 24 horas antes da intervenção cirúrgica e água *ad libitum*.

Ciclo estral

Foi realizado estudo diário do ciclo estral pela técnica descrita por Long e Evans (25), que consiste na introdução, dentro da vagina, de 1-2 gotas de soro fisiológico que, em seguida, é aspirado e colocado em lâmina histológica para leitura microscópica imediata. Após a obtenção de 2 a 3 ciclos regulares foram selecionadas 60 ratas para o experimento. O ciclo estral foi repetido nas seguintes etapas para controle do experimento:



Procedimentos Cirúrgicos

Ovariectomia

Após sedação dos animais com a associação de Cloridrato de Xilazina (Dopaser, Laboratório Calier do Brasil Ltda, Osasco, SP, Brasil) na dosagem de 10mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Ketamina (Dopalen AgriBands Ltda, Paulínea, SP, Brasil) na dosagem de 75mg/Kg de peso corporal as ratas do grupo Sham (n=20) foram submetidas à cirurgia para exposição bilateral dos ovários e as dos grupos OVX (n=20) e OVX/E₂ (n=20) foram submetidas à ovariectomia bilateral.

Para a exposição ou retirada dos ovários foi realizada a tricotomia bilateral do ventre do animal e a assepsia vigorosa da área com solução de digluconato de clorexidina a 0,12%. Após o isolamento da área cirúrgica, com o auxílio de uma lâmina de bisturi n° 15, incisões bilaterais de aproximadamente 1cm foram realizadas, obtendo-se acesso aos ovários. Logo após a sua exposição e/ou remoção foi realizada suturas internas com fio absorvível Vicryl 4-0 (Johnson & Johnson / Ethicon) e externas com fio de Seda 4-0 (Johnson & Johnson / Ethicon).

Cada animal recebeu, no pós-operatório imediato, dose única de antibiótico penicilina G benzatina por via intramuscular de 20000UI/animal.

Terapia de reposição hormonal (TRH)

Foi realizado o acompanhamento do ciclo estral para a confirmação da aciclicidade nos animais ovariectomizados. No 8° dia após a realização da cirurgia de remoção dos ovários todos os animais ovariectomizados receberam pellets (1,5 cm) confeccionados com Silastic (Dow Corning Cat n°508-006; Diâmetros: 0.058in ID (1,47mm); 0.077 in OD (1,96mm). Para a confecção de cada pellet, uma das extremidades foi colada com silicone e em seguida foi adicionado volume de preenchimento aproximado de 8,4 mm³ de óleo de milho (grupo OVX)

e o mesmo volume de E₂ (17β-estradiol/Sigma-Aldrich) na concentração de 300μg/mm³ (grupo OVX/E₂).

Após o preenchimento, a outra extremidade foi colada com silicone. Os pellets permaneceram em secagem por 24 horas, e após esse período, foram implantados no dorso dos animais. A TRH durou sessenta dias e os pellets foram trocados no trigésimo terceiro dia após a cirurgia de remoção do ovário.

Exodontia e reimplante dentário

Em 30 animais a exodontia e o reimplante foram realizados no primeiro dia do tratamento de reposição hormonal. Nos 30 animais restantes esses procedimentos foram realizados no 45º dia após o início do tratamento de reposição hormonal.

Após sedação em todos os animais (Sham, OVX e OVX/E₂) foi realizada a sindesmotomia, luxação e extração do incisivo superior direito que permaneceu por 5 minutos em meio ambiente sobre gaze estéril. A seguir, foi realizado a antissepsia da porção anterior da maxila com polivinilpirrolidona iodo (Riodeine – Ind. Farmac. Rioquímica Ltda, São José do Rio Preto- SP, Brasil) e o reimplante do dente.

Coleta do material

Após 60 dias do início do tratamento de reposição hormonal, os animais foram sedados para coleta de sangue.

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

GMBH, Hamurg, Germany) e da IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) através do ELISA.

Dosagem de 17 β - estradiol por ELISA

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

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

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

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

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

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

Dosagem de interleucina-6 por ELISA

A interleucina-6 (IL-6) foi quantificada de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota). Resumidamente, placas de 96 poços foram recobertas e incubadas durante 16-18 horas a 4°C, com anticorpo anti-IL-6 (R&D Systems) diluídos em tampão de fosfato de cálcio. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,5% de Tween 20 e incubadas durante 2 horas, em temperatura ambiente, com PBS contendo albumina bovina a 1% (BSA). As placas, então, foram lavadas e incubadas com 50 µl de plasma (amostra) e com IL-6 recombinante (para a curva padrão), durante 2 horas, à temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas e incubadas com anticorpo biotilado anti-IL-6 (R&D Systems), por 1 hora, à temperatura ambiente. As placas foram lavadas e incubadas com solução de estreptoavidina (Sigma) com PBS + BSA 1%, por aproximadamente 30 minutos, à temperatura ambiente. Após nova lavagem, o substrato tetrametilbenzidina (TMB-Invitrogen[®]) foi adicionado conforme instruções do fabricante. Após 30 minutos, solução de paralisação da reação (H₂SO₄) foi adicionada, e a leitura realizada em espectrofotômetro ajustado para o comprimento de onda de 450nm.

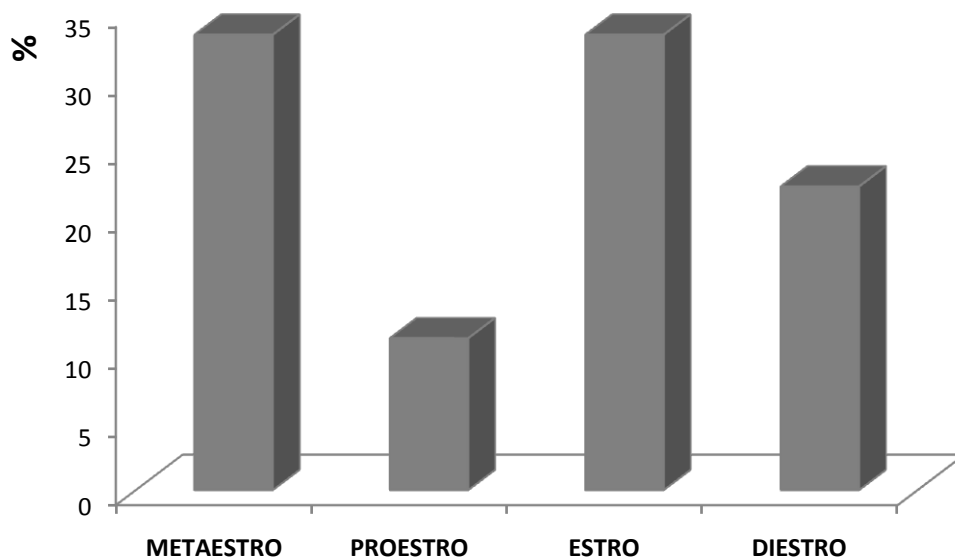
ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste t de Student com correção de Tukey foi usado para determinar a significância da diferença entre os grupos de animais normais e tratados dentro do mesmo ensaio. Os resultados das dosagens plasmáticas de IL-6 e 17β-estradiol são apresentados em média ± erro padrão da média (EPM) sempre em triplicata. O nível crítico foi fixado em 5% (p<0,05) para se admitir diferença de valores como estatisticamente significantes.

RESULTADOS

A aparência clínica dos cornos uterinos e avaliação do ciclo estral confirmaram o sucesso da OVX e reposição de estrogênio. Os animais do grupo OVX apresentaram no esfregaço a fase *diestro*, que se caracteriza por um predomínio de leucócitos e seus órgãos reprodutivos atrofiados, confirmando a redução dos níveis de estrógeno sérico neste grupo. Em contraste, os animais submetidos à cirurgia Sham apresentaram os quatro estágios regulares do ciclo estral (*estro*, *diestro*, *proestro* e *metaestro*). Observou-se que no momento da coleta de sangue os animais desse grupo apresentavam em fases diversas do ciclo estral (fig.1). Finalmente, as ratas que foram ovariectomizadas e medicadas com estradiol (OVX/E2) mantiveram-se na fase do *estro* (enucleados células cornificadas).

A



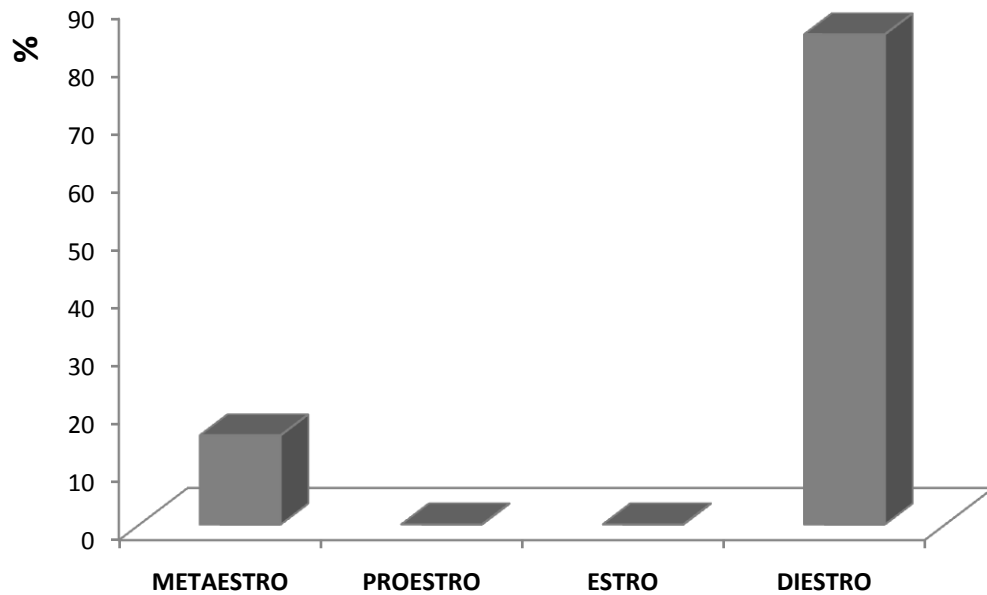
B

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

Concentrações séricas de 17β -estradiol (\pm erro padrão), determinado no momento da eutanásia, estavam $14,58\text{pg/mL} \pm 2,73$; $6,42\text{pg/mL} \pm 1,45$; $40,39\text{pg/mL} \pm 1,60$ para os grupos Sham, OVX e OVX/E2 respectivamente. O nível de 17β -estradiol no grupo Sham foi maior do que em OVX, porém menor do que no grupo OVXE2 (fig.2).

O nível de 17β -estradiol no plasma foi elevado no grupo OVX/E2, que havia recebido os pellets de liberação lenta em ambos os períodos de 15 e 60 dias após reimplante dentário. O nível de 17β -estradiol foi baixo em ratas OVX, com valores de $6,21\text{pg/mL} \pm 3,56$ e $5,65\text{pg/mL} \pm 0,92$, respectivamente para os períodos (15 e 60 dias).

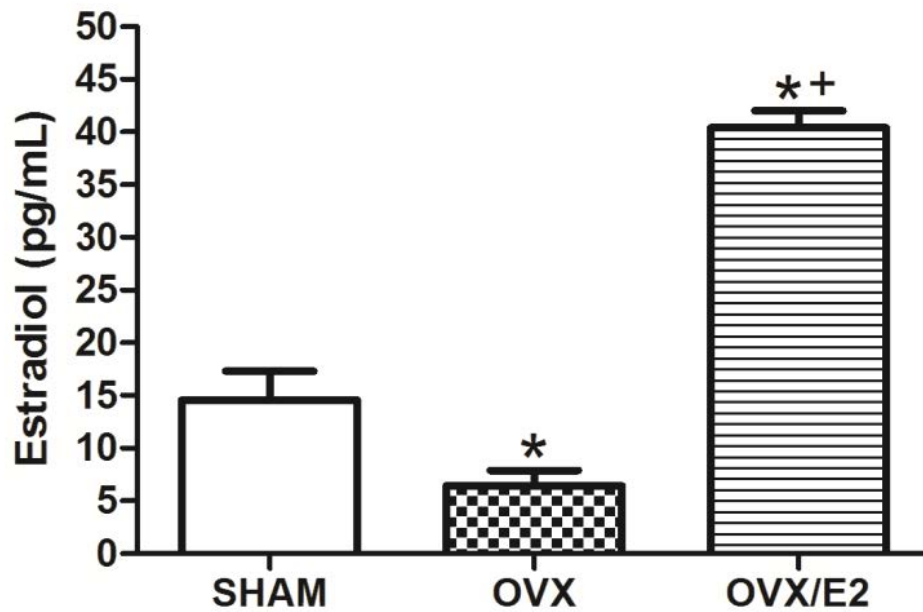


Fig. 2. Média e erro padrão da concentração plasmática de 17β - estradiol (pg/mL) para todos os grupos experimentais [SHAM, OVX, OVX/E2] ao final do experimento independente do período pós-reimplante dentário. *,⁺ Diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$) [análise de variância one-way (ANOVA)].

No grupo Sham, o nível de estradiol foi flutuante com aumentos e diminuições de acordo com o número de ratos em relação às fases distintas do ciclo estral, apresentando média de $26,33 \text{ pg/mL} \pm 5,34$ para o período de 15 dias e $9,89 \text{ pg/mL} \pm 2,64$ para o período de 60 dias (fig. 3).

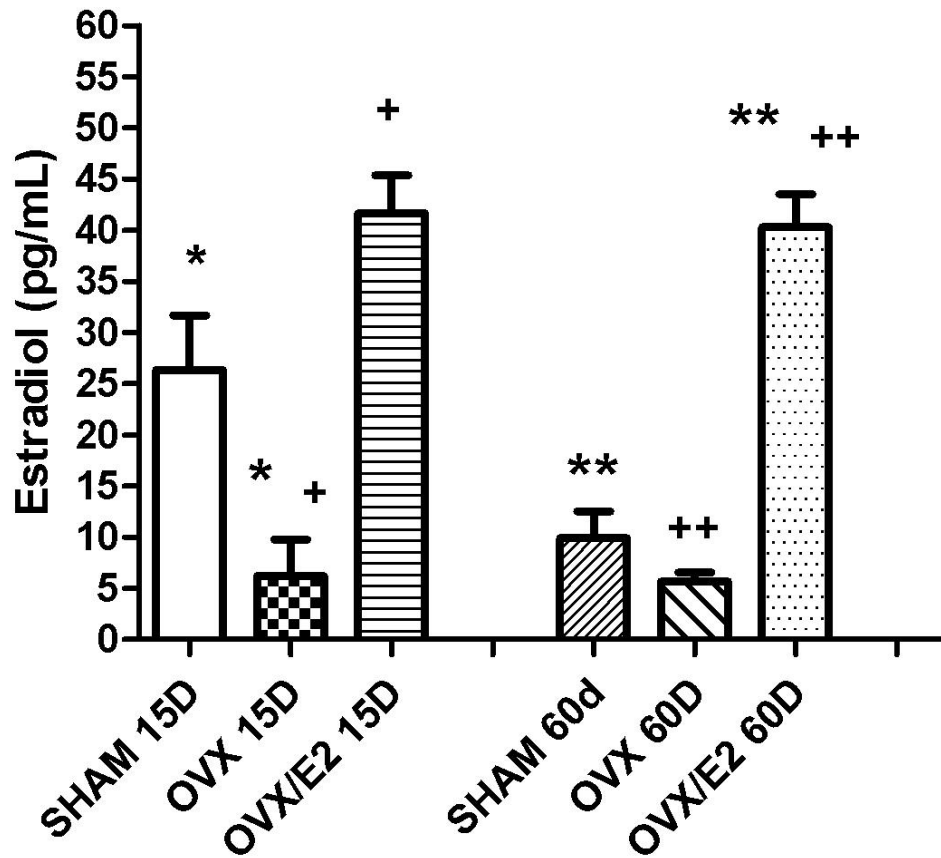


Fig. 3. Média e erro padrão da concentração plasmática de 17β - estradiol (pg/mL) para todos os grupos experimentais [SHAM, OVX, OVX/E2] ao final do experimento, separados pelos períodos pós-reimplante dentário (15 e 60 dias). *, +, **, ++ Diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$) [análise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

O nível de IL-6 no plasma no período de 15 dias pós-cirurgia de reimplante foi mais elevado no grupo OVX/E2 ($4,04 \text{ pg/mL} \pm 0,61$), seguido pelo grupo OVX ($2,76 \text{ pg/mL} \pm 0,04$) e Sham ($1,75 \text{ pg/mL} \pm 0,09$). Para o período de 60 dias o grupo OVX/E2 continuou mais elevado em relação aos demais ($3,29 \text{ pg/mL} \pm 0,19$). O Sham apresentou média de $2,98 \text{ pg/mL} \pm 0,0$ e o grupo OVX $2,38 \text{ pg/mL} \pm 0,30$ (fig. 4).

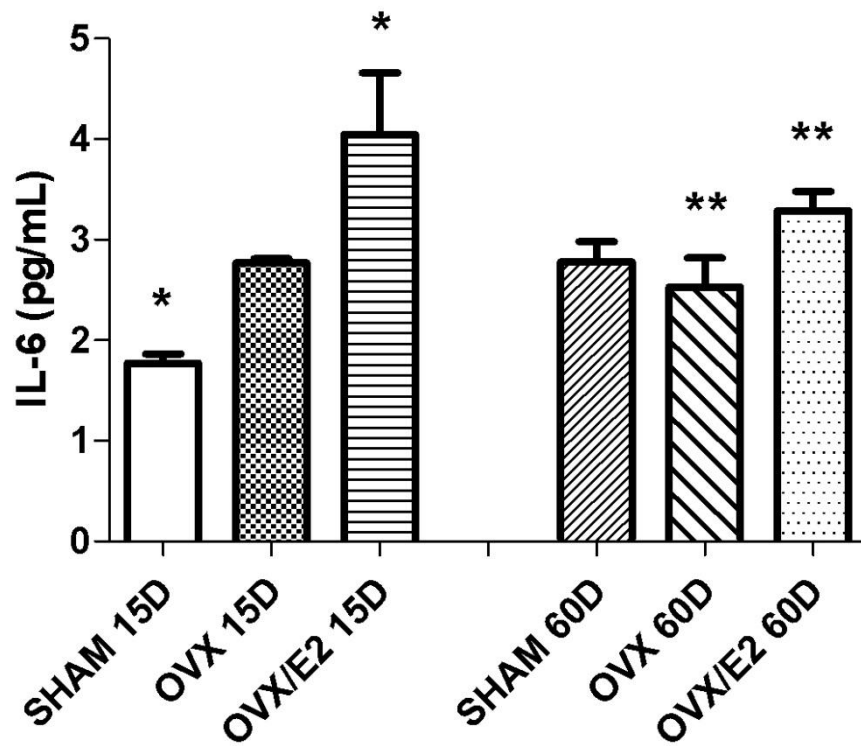


Fig. 4. Média e erro padrão da concentração plasmática de interleucina-6 (pg/mL) para todos os grupos experimentais [SHAM, OVX, OVX/E2] ao final do experimento, separados pelos períodos pós-reimplante dentário (15 e 60 dias). *, ** Diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$) [análise de variância one-way (ANOVA)].

A comparação entre os níveis de concentração plasmática da IL-6 e 17β -estradiol estão representados nas figuras 5 e 6 por período de tempo pós-reimplante 15 e 60 dias respectivamente.

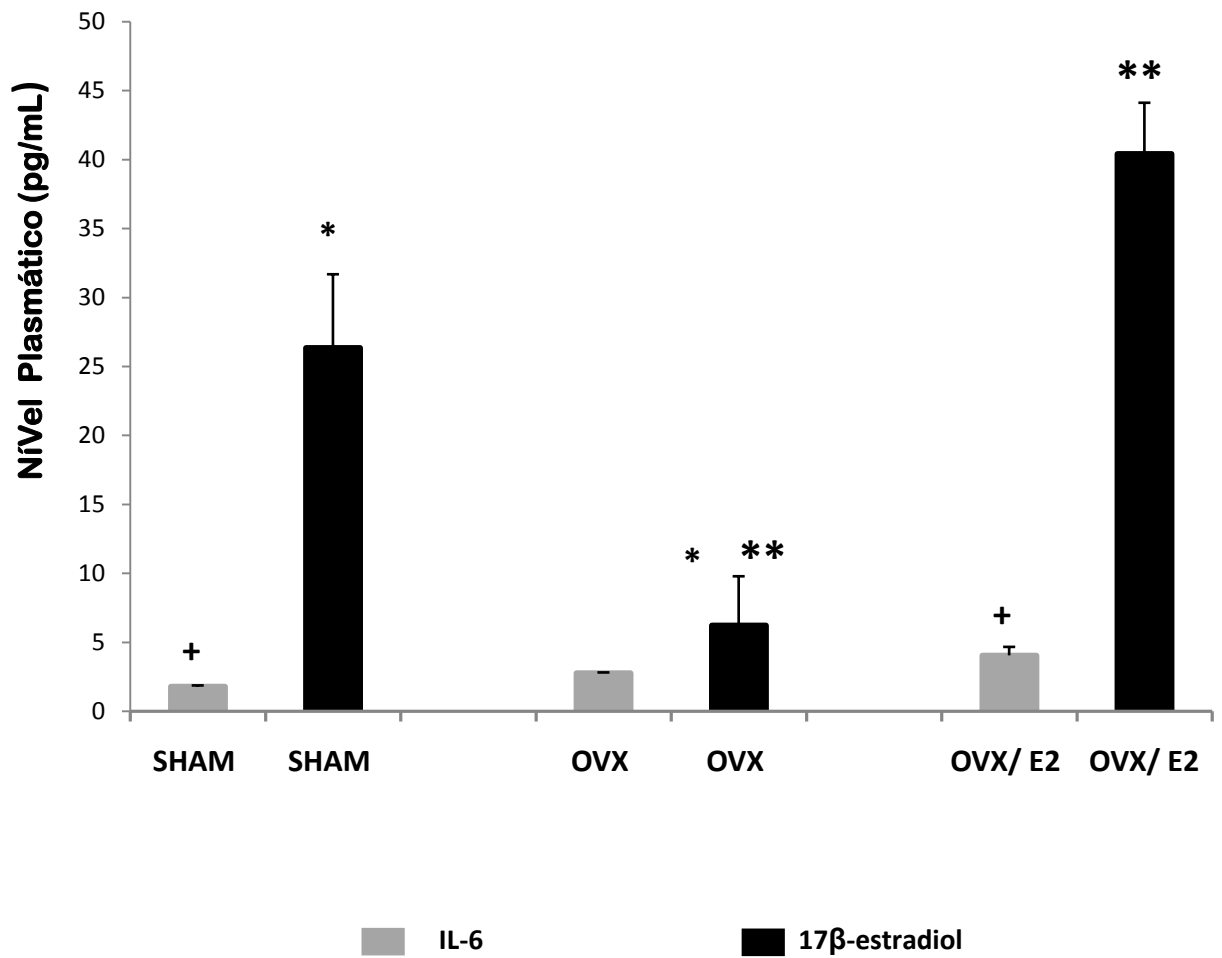


Fig. 5. Média e erro padrão da comparação entre os níveis de concentrações plasmáticas de IL-6 (pg/mL) e 17β- estradiol (pg/mL) para todos os grupos experimentais [SHAM, ovariectomia (OVX), TRH (OVX/E2)] no período de 15 dias pós-reimplante dentário. *, **, + Diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$) [análise de variância one-way (ANOVA)].

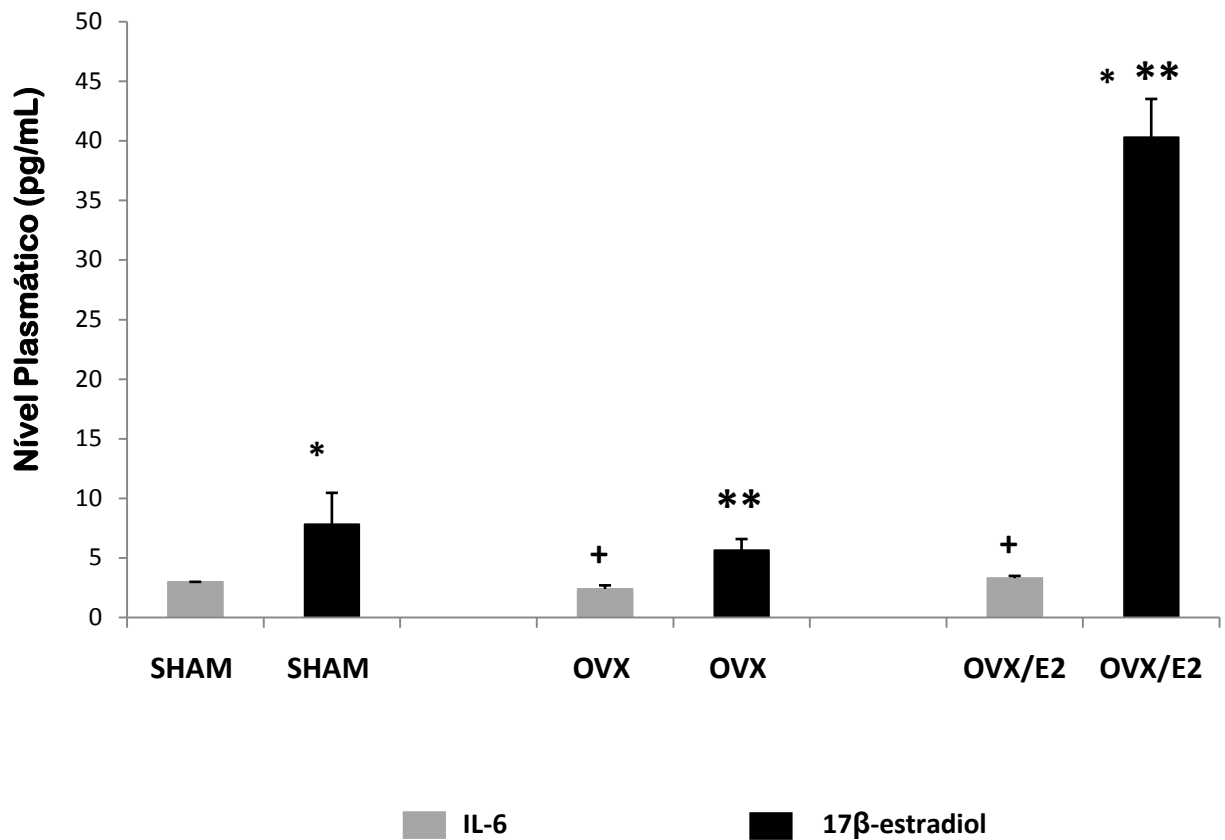


Fig.6. Média e erro padrão da comparação entre os níveis de concentrações plasmáticas de IL-6 (pg/mL) e 17β- estradiol (pg/mL) para todos os grupos experimentais [SHAM, OVX, OVX/E2] no período de 60 dias pós-reimplante dentário. *, **, + Diferenças significativas entre os grupos ($p < 0.05$) [análise de variância one-way (ANOVA)].

DISCUSSÃO

O estrogênio pode atuar por diversas vias e estudos têm sido realizados com o intuito de entender esses mecanismos de ação em distintos tecidos não podendo atribuir apenas a um único fator (26-29).

As mudanças desencadeadas pela falta do estrogênio podem ter um impacto significativo sobre a função de muitos tecidos interferindo inclusive na atividade de citocinas pró-inflamatórias (29). A deficiência de estrógeno na pós-menopausa pode ser devido à baixa função folicular ovariana ou pela remoção cirúrgica dos ovários (17).

Nas ratas ovariectomizadas, observou-se que o nível de estradiol foi estatisticamente menor em comparação com o grupo Sham e OVX/E2 justamente pela remoção dos ovários que são os órgãos com maior participação na produção dos estrogênios, dentre eles o 17 β -estradiol (30-33).

No grupo Sham o nível de estradiol, quando comparado ao grupo OVX/E2, foi menor com diferença estatisticamente significante, provavelmente pela interferência da ciclicidade hormonal natural decorrente das várias fases do ciclo estral (31,34). No momento da coleta de sangue as ratas apresentavam-se em diferentes fases do ciclo estral interferindo na quantidade de hormônio liberada.

O grupo OVX/E2 foi o que apresentou maior expressividade no nível de estradiol plasmático devido à liberação osmótica constate promovida pelos pellets implantados, eliminando as flutuações hormonais naturais uma vez que a via foi exógena e contínua (32-36).

A literatura relata que os hormônios influenciam a função do sistema imune de muitas maneiras diferentes e didaticamente podem ser divididos em 3 grupos de acordo com suas características predominantes: 1- hormônios estimuladores como a tiroxina, prolactina e

vitamina D; 2- hormônios inibitórios como o cortisol e os DHEA (dehidroepiandrosterona); 3 –hormônios com efeitos ambíguos, dentre eles o estradiol, testosterona, progesterona, calcitonina e paratormônio (PTHa) (37).

A atividade estrogênica é mediada pela interação entre os receptores de estrogênio (ERs) e o hormônio, com subsequente ativação dos receptores (38) que acontece por duas vias principais: genômica, que ocorre em algumas horas, e não genômica que ocorre dentro de alguns segundos ou minutos (39). A característica comum entre elas é que funcionam como fatores de transcrição nuclear modulados por ligante. O complexo estrógeno-receptor se liga a elementos de resposta nos genes alvo, o que facilita a transcrição genética. (40).

Do mesmo modo que ocorre com a compreensão das vias de atuação do estrogênio, apesar de estudos mostrarem aumentos espontâneos na expressão e secreção das citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, e TNF α com deficiência de estrogênio (41- 46), esforços para demonstrar diretamente esse aumento em amostras de tecido *in vivo* ou em circulação não tem sido bem sucedidos (47,48).

Vargas e colaboradores (47) investigaram em modelo *in vivo*, o efeito da ovariectomia ou da terapia de reposição de estrogênios na produção de IL-6 mRNA e expressão de proteína no osso de rato adulto e na medula óssea *in vivo* e em culturas de células do estroma de medula. Nesse modelo, foi concluído que não houve aumento na produção de IL-6 *in vivo* na ausência do estrogênio quando se avaliou a cálcia, medula óssea ou células estromais da medula óssea (47).

Nesse estudo observou-se que a produção sistêmica de IL-6 aumentou no grupo onde ocorreu a reposição hormonal, portanto quando o estradiol se encontrava em níveis mais elevados e constantes.

Dados conflitantes foram relatados para os efeitos do estrogênio sobre a concentração de TNF- α (49), IL-1, IL-6 (50) e trabalhos relatam que a falta de ação do estrogênio pode

interferir nos níveis circulantes dessas citocinas (51-54) com efeito fraco (51,55-59) ou até mesmo ambíguo (49) sobre a liberação de IL-1, TNF α , ou IL-6 de monócitos / macrófagos.

Chao et al. (49) utilizou macrófagos peritoneal de ratos para estudar os efeitos dos hormônios femininos estradiol e progesterona na liberação de TNF. A quantidade de TNF liberado por macrófagos expostos a 10^{-2} e 10^{-3} ng/ml de 17β -estradiol (35,1 e 23,2 units/ml) foi significativamente maior do que o liberado pelos não tratados. Por outro lado a quantidade de TNF liberado pelos macrófagos expostos a concentrações superiores a 10^{-1} ou menores que 10^{-4} ng/ml foi significativamente reduzida comparada com os controles não tratados. Com isso, Chao et al. (49) concluíram que dentro da faixa fisiológica de concentrações do estradiol e progesterona, a liberação de TNF por macrófagos é finamente regulado e dramaticamente afetado por mudanças relativamente pequenas nas concentrações hormonais. Dependendo de suas concentrações, estradiol e progesterona, podem estimular ou inibir a produção de IL-1 pelos monócitos humanos e macrófagos peritoniais de ratos. Concluíram assim que o efeito do 17β -estradiol na liberação de TNF é dose-dependente (49).

As discrepâncias encontradas não são facilmente explicadas por diferenças na espécie, tipo de célula, o tempo após a menopausa, nas concentrações de estrogênio, ou condições de cultura. Levanta-se a hipótese de que pode haver várias vias distintas, pelo qual o estrogênio pode afetar a expressão do gene de citocina, quer provocando aumentos ou diminuição na produção de citocinas, dependendo da ativação destas vias no contexto celular individual (29).

A relação entre o estrogênio e IL-6 está longe de ser simples (29) assim como a ativação da via de IL-6 que é uma interação complexa entre a IL-6 e os seus dois receptores solúveis e ligados à membrana (60) e não foi totalmente esclarecida em diferentes tecidos e tipos de células (61).

Isso levou à hipótese de que os efeitos de estrogênio sobre a expressão de genes das citocinas pode ser dependente do tecido alvo ou do contexto celular, bem como das diferenças farmacológicas entre os hormônios administrados (61).

A terapia com pellets de 17β -estradiol promove uma liberação constante e gradual do hormônio (62, 63) que no caso desse estudo permaneceu por 60 dias consecutivos. As taxas de E_2 durante todo esse período equivalem à concentração de estrógeno dos níveis encontrados durante a fase *proestro* na concentração fisiológica (64-67). Isso poderia sugerir que a manutenção de um nível plasmático alto e constante do estradiol poderia influenciar na produção de IL-6 como relatado na literatura (68, 69).

Parte das discrepâncias, particularmente aqueles que envolvem os estudos *in vivo*, também pode ser devido às diferenças farmacológicas entre substituição hormonal e secreção de estrogênio endógeno (29).

A melhor compreensão da influência do 17β - estradiol sobre a produção de citocinas como a IL-6 após a menopausa e na terapia de reposição hormonal, devido sua complexidade, dependerá do entendimento dos mecanismos subjacentes a esses efeitos ao nível molecular. Grande parte das evidências disponíveis até o momento é sugestiva e não definitiva.

Nesse estudo não foi possível correlacionar diretamente o efeito do trauma com a expressão da IL-6 uma vez que foram mensurados níveis plasmáticos e não local da citocina. Os resultados sugerem que a resposta foi mais em função dos níveis de estradiol do que propriamente do trauma.

CONCLUSÃO

Foi possível observar um aumento da secreção de IL-6 no grupo com maior nível plasmático de 17β - estradiol, porém não houve alteração significativa no processo de reparo do reimplante dentário imediato.

REFERÊNCIAS

1. Andreasen JO. A time-related study of periodontal healing and root resorption activity after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Swed Dent J* 1980;4:101-10.
2. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors 1. Diagnosis of healing complications. *Endod Dent Traumat* 1995; 11:51-8.
3. Trope M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. *Dent Traumatol* 2011; 27: 281-94.
4. Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth, 4th edn. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2007.
5. Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec* 1996;245:327-341.
6. Shimizu Y, Inomata Y, Tagami A. Suppression of osteoclast-like cell formation by periodontal ligament cells. *J Bone Miner Metab* 1996;14:65-72.
7. Consolaro A. The four mechanisms of dental resorption initiation. *Dental Press J Orthod.* 2013; 18(3):7-9.
8. Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JH. Cells of the bone: proliferation, differentiation and hormonal regulation. *Physiol Rev* 1986; 66:855-886.
9. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000; 289: 1501-1504.
10. Wang YL, Fei LS, Jin CX, Liu SY. Effect of estrogen-deficiency on expression of osteoprotegerin in alveolar bone: experiment with rats with periodontitis. *Zhonghua Yi XueZaZhi* 2008; 88(24):1715-8.
11. Jabbar S, Drury J, Fordham J, Datta H, Francis R, Tuck S. Osteoprotegerin, RANKL and bone turnover in postmenopausal. *Osteoporos Int* 2009; 20:S271.

12. Shu L, Guan SM, Fu SM, Guo T, Cao M, and Ding Y. Estrogen Modulates Cytokine Expression in Human Periodontal Ligament Cells. *J Dent Res* 2008; 87(2):142-147.
13. Zhou Y, Fu Y, Li JP, Qi LY. The role of estrogen in osteogenetic cytokine expression in human periodontal ligament cells. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2009; 29:507-513.
14. Scheidt-Nave CE, Bismar H, Leidig-Bruckner G, Seibel MJ, Ziegler R, Pfeilschifter J. Serum interleukin-6 is a major predictor of bone loss in women specific to the first decade past menopause. *J Bone Miner Res* 1999;1:S147.
15. Girasole G, Giuliani N, Modena AB, Passeri G, Pedrazzoni M. Oestrogens prevent the increase of human serum soluble interleukin-6 receptor induced by ovariectomy in vivo and decrease its release in human osteoblastic cells in vitro. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999;51:801–807.
16. Cohen-Solal, M. E., Graulef, A. M., Denne, M. A., Gueris, J., Baylink, D., and Devernejoul, M. C. Peripheral monocyte culture supernatants of menopausal women can induce bone resorption: Involvement of cytokines. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1648 –1653.
17. Teixeira KS. Efeitos da ooforectomia e do Deidroepiandrosterona (DHEA) sobre a massa cardíaca de ratas. 2011. 18 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
18. Aldrighi JM, Wolff LP, Oliveira ASVM, Aoki T. Ooforectomia profilática na histerectomia por agravo uterino benigno: evidências atuais *Rev Assoc Med Bras* 2009; 55(3): 229-50.
19. Vico L, Prallet B, Chappard D, Pallot-Prades B, Pupier R, Alexandre C. Contributions of chronological age, age at menarche and menopause and of anthropometric parameters to axial and peripheral bone densities. *Osteoporos Int* 1992; 2(3):153-158.

20. Kayath MJ. Raloxifeno e Osteoporose: Revisão de Um Novo Modulador Seletivo do Receptor de Estrógeno. *Arq Bras Endocrinol Metab* 1999; 43:433-41.
21. Cantatore FP, Loverro G, Ingrosso AM, Lacanna R, Sassanelli E, Selvaggi L, Carrozzo M. Effect of oestrogen replacement on bone metabolism and cytokines in surgical menopause. *Clin Rheumatol* 1995;14:157–160.
22. Burg MA, Fraser K, Gui S, Grant K, Kosch SG, Nierenberg B, et al. Treatment of menopausal symptoms in family medicine settings following the Women's Health Initiative Findings. *J Am Board Fam Med* 2006; 19:122–31.
23. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000; 289: 1508–14.
24. Sato K, Muramatsu T, Tsuchiya Y, Masaoka T, Enokiya Y, Hashimoto S, Shimono M. Proliferation, migration and apoptosis of periodontal ligament cells after tooth replantation. *Oral Dis* 2010; 16:263-8.
25. Long JA, Evans HM. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem Univ Calif* 1922; 6: 1-148.
26. Cooper C. The crippling consequences of fractures and their impact on quality of life. *Am J Med* 1997;103:12S–19S.
27. Maxwell SRJ. Women and heart disease. *Basic Res Cardiol* 1998; 93:79 – 84.
28. Chung HY, Cesari M, Anton S, Marzetti E, Giovannini S, Seo AY, Carter C, Yu BP, Leeuwenburgh C. Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev* 2009; 8:18–30.
29. Pfeilschifter J, Kü Ditz R, Pfohl, Schatz H. Changes in Proinflammatory Cytokine Activity after Menopause. *Endocrine Reviews* 2002; 23:90–119.

30. Cardoso CC., Pereira, RT, Koyama, CA, Port CS, Abdalla FMF. Effects of estrogen on muscarinic acetylcholine receptors in the rat hippocampus. *Neuroendocrinology* 2004; 80: 379–386.
31. Duarte PM, Gonçalves PF, Casati MZ, de Toledo S, Sallum EA, Nociti Jr FH. Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodont Res* 2006; 41: 541–546.
32. Zychl M, Folwarczna J., Trzeciak IH. Natural phenolic acids may increase serum estradiol level in ovariectomized rats. *Regular paper* 2009; 56:503–507.
33. Luvizuto ER, Dias SM, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia IR, Jr, Okamoto R, Dornelles RC. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone*. 2010;46:1021.
34. Viau, V., Meaney, M.J. Variations in the hypothalamic–pituitary–adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology*. 1991; 129, 2503– 2511.
35. Mukai, H., Kimoto, T., Hojo, Y., Kawato, S., Murakami, G., Higo, S., Hatanaka, Y., Ogiue-Ikeda, M. Modulation of synaptic plasticity by brain estrogen in the hippocampus. *Biochim. Biophys* 2010;1800:1030–1044.
36. Kiss A, Delattre AM, Pereira SIR, Carolino RG, Szawka RE, Anselmo-Franci JA, Zanata SM, Ferraz AC. 17 β -Estradiol replacement in young, adult and middle-aged female ovariectomized rats promotes improvement of spatial reference memory and an antidepressant effect and alters monoamines and BDNF levels in memory- and depression-related brain areas. *Behavioural Brain Research* 2012; 227:100– 108.
37. Straub RH, Miller LE, Schölmerich J, Zietz B. Cytokines and hormones as possible links between endocrinosenescence and immunosenescence. *Journal of Neuroimmunology* 2000; 109:10–15.

38. Takahashi Y, Perkins SN, Hursting SD, Wang TT. 17Beta-estradiol differentially regulates androgen-responsive genes through estrogen receptor-beta-and extracellular-signal regulated kinase-dependent pathways in LNCaP human prostate cancer cells. *Mol Carcinog* 2007; 46:117-129.
39. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*, 2006; 116:561-570.
40. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biochem*. 2001;276:36869–36872.
41. Pacifici R, Rifas L, McCracken R, Vered I, McMurtry C, Avioli LV, Peck WA. Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:2398–2402.
42. Pacifici R, Brown C, Puscheck E, Friedrich E, Slatopolsky E, Maggio D, McCracken R, Avioli LV. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88:5134–5138.
43. Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passert G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 1992 ;257:88–91.
44. Kimble RB, Vannice JL, Bloedow DC, Thompson RC, Hopfer W, Kung VT, Brownfield C, Pacifici R. Interleukin-1 receptor antagonist decreases bone loss and bone resorption in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 1994; 93:1959–1967.
45. Kitazawa R, Kimble RB, Vannice JL, Kung VT, Pacifici R. Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice. *J Clin Invest* 1994; 94:2397–2406.

46. Bismar H, Diel I, Ziegler R, Pfeilschifter J. Increased cytokine secretion by human bone marrow cells after menopause or discontinuation of estrogen replacement. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:3351–3355.
47. Vargas SJ, Naprta A, Lee SK, Kalinowski J, Kawaguchi H, Pilbeam CC, Raisz LG, Lorenzo JA. Lack of evidence for an increase in interleukin-6 expression in adult murine bone, bone marrow, and marrow stromal cell cultures after ovariectomy. *J Bone Miner Res* 1996; 11:1926–1934.
48. Van Bezooijen RL, Farih-Sips HC, Papapoulos SE, Lowik CW. IL-1 α , IL-1 β , IL-6, and TNF- α steady state mRNA levels analyzed by reverse transcription-competitive PCR in bone marrow of gonadectomized mice. *J Bone Miner Res* 1998;13:185–194.
49. Chao TC, Van Alten PJ, Greager JA, Walter RJ. Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages. *Cell Immunol* 1995; 160:43–49.
50. Zuckerman SH, Bryan-Poole N, Evans GF, Short L, Glasebrook AL. In vivo modulation of murine serum tumour necrosis factor and interleukin-6 levels during endotoxemia by oestrogen agonists and antagonists. *Immunology* 1995; 86:18–24.
51. Keller ET, Binkley NC, Stebler BA, Hall DM, Johnston GM, Zhang J, Ershler WB. Ovariectomy does not induce osteopenia through inteleukin-6 in rhesus monkeys (*Macacamulatta*). *Bone* 2000; 26:55–62.
52. Keller ET, Zhang J, Yao Z, Qi Y. The impact of chronic estrogen deprivation on immunologic parameters in the ovariectomized rhesus monkey (*Macacamulatta*) model of menopause. *J Reprod Immunol* 2001; 50:41–55.
53. Rogers A, Eastell R. Effects of estrogen therapy of postmenopausal women on cytokines measured in peripheral blood. *J Bone Miner Res* 1998; 13:1577–1586.
54. Zanger D, Yang BK, Ardans J, Waclawiw MA, Csako G, Wahl LM, Cannon III RO. Divergent effects of hormone therapy on serum markers of inflammation in

- postmenopausal women with coronary artery disease on appropriate medical management. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:1797–1802.
55. HuSK, Mitcho YL, RathNC. Effect of oestradiol on interleukin 1 synthesis by macrophages. *Int J Immunopharmacol* 1998; 10:247–252.
56. Stock JL, Coderre JA, McDonald B, Rosenwasser LJ. Effects of estrogen in vivo and in vitro on spontaneous interleukin-1 release by monocytes from postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68:364–368.
57. Hogasen AK, Nordsletten L, Aasen AO, Falch JA. There is no difference in spontaneous and 17 β -estradiol-induced interleukin-1 β release by peripheral blood mononuclear cells from nonosteoporotic women with different rates of early postmenopausal bone loss. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:2480–2484.
58. Ruh MF, Bi Y, D'Alonzo R, Bellone CJ. Effect of estrogens on IL-1- promoter activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 66:203–210 75.
59. Li ZG, Danis VA, Brooks PM. Effect of gonadal steroids on the production of IL-1 and IL-6 by blood mononuclear cells in vitro. *Clin Exp Rheumatol* 1993;11:157–162.
60. Maggio M, Guralnik JM, Longo DL, Ferrucci L. Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2006; 61:575–584.
61. Ahtiainen M, Pöllänen E, Ronkainen PHA, Alen M, Puolakka J, Kaprio J, Sipilä S, Kovanen V. Age and estrogen-based hormone therapy affect systemic and local IL-6 and IGF-1 pathways in women. *AGE* 2012 34:1249–1260.
62. Cordellini MF, Piazzetta G, Pinto KC, Delattre AM, Matheussi F, Carolino RO, et al. Effect of different doses of estrogen on the nigrostriatal dopaminergic system in two 6-hydroxydopamine-induced lesion models of Parkinson's disease. *Neurochem Res* 2011;36:955–61.

63. Freeman ME. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: Neill JD, editor. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Philadelphia: Elsevier; 2006.
64. Smith MS, Freeman ME, Neil JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 1975;96:219–26.
65. Bohacek J, Daniel JM. The beneficial effects of estradiol on attentional processes are dependent on timing of treatment initiation following ovariectomy in middle-aged rats. *Psychoneuroendocrinology* 2010;35:694–705.
66. Walf AA, Paris JJ, Frye CA. Chronic estradiol replacement to aged female rats reduces anxiety-like and depression-like behavior and enhances cognitive performance. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34:909–16.
67. Li J, McMurray RW. Effects of cyclic versus sustained estrogen administration on peripheral immune functions in ovariectomized mice. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63: 274–281.
68. Strom JO, Ingberg E, Theodorsson E, Theodorsson A. Effects of high and low 17 β -estradiol doses on focal cerebral ischemia: negative results. *Sci Rep* 2013; doi:10.1038/srep03111
69. Che Q, Liu BY, Wanga FY, He YY, Lu W, Liao Y, Gu, Wanc XP. Interleukin 6 promotes endometrial cancer growth through an autocrine feedback loop involving ERK–NF- κ B signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2014; 446:167–172.

ANEXO



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

CERTIFICADO

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

CERTIFICATE

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



Prof. Dr. EDILSON ERVOLINO
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator