

GABRIEL RAMALHO FERREIRA

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E
IMUNOISTOQUÍMICA DO PROCESSO DE
REPARO ALVEOLAR DE RATAS
OVARIETOMIZADAS COM DIETA POBRE EM
CÁLCIO E SUBMETIDAS À TERAPIA COM
RALOXIFENO OU COM ALENDRONATO**

Araçatuba – São Paulo

2012

GABRIEL RAMALHO FERREIRA

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E
IMUNOISTOQUÍMICA DO PROCESSO DE REPARO
ALVEOLAR DE RATAS OVARIETOMIZADAS COM
DIETA POBRE EM CÁLCIO E SUBMETIDAS À TERAPIA
COM RALOXIFENO OU COM ALENDRONATO**

Tese 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: Profa. Dra Roberta Okamoto

Co-Orientador: Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior

Araçatuba – São Paulo

2012

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F273e Ramalho-Ferreira, Gabriel.
Análise histomorfométrica e imunoistoquímica do processo de reparo alveolar de ratas ovariectomizadas com dieta pobre em cálcio e submetidas à terapia com raloxifeno ou com alendronato / Gabriel Ramalho Ferreira. - Araçatuba : [s.n.], 2011
83 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Roberta Okamoto
Coorientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior

1. Alendronato 2. Raloxifeno 3. Osteocalcina 4. Osteoprotegerina 5. Ligante RANK

Black D7
CDD 617.64

Dados Curriculares

GABRIEL RAMALHO FERREIRA

NASCIMENTO	24/10/1980, BAURU – SP
FILIAÇÃO	Marianne de Azevedo Ramalho Ferreira Paulo Martins Ferreira
2000/2003	Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade De São Paulo, Bauru, São Paulo, Brasil
2004/2005	Prática profissionalizante em cirurgia bucal Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade De São Paulo, Bauru, São Paulo, Brasil
2006	Aperfeiçoamento em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo
2007/2009	Curso de Residência em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial Associação Hospitalar de Bauru – Hospital de Base da 7ª Regional e Colégio Brasileiro de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial – Bauru, São Paulo, Brasil

2010/2012

Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de
concentração em Cirurgia e Traumatologia
Bucocomaxilofacial, nível Mestrado

Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Araçatuba, São Paulo, Brasil



DEDICATÓRIA

Dedicatória

Ao meu grande **Pai Celestial e seu Filho (Jesus Cristo)**. Cada dia que passa vejo como vocês mudam minha vida, Suas palavras realmente são a fonte inesgotável de verdadeiro amor, alegria e esperança. Como um filho prudente, quero Lhes dar bons frutos e amar aqueles que me são apresentados.

A meu pai (Paulo Martins Ferreira), por ter me ensinado muitos valores que norteiam minha vida. Se tenho eu algum espírito de luta, de não desistir facilmente de sonhos, creio que devo a ti! Muito obrigado por sempre me apoiar e ser um porto seguro na minha vida. Desejo que Deus te dê muita saúde para desfrutar bons anos de vida conosco, e que possas ver seus filhos dando bons frutos. Saiba que amo você e me orgulho em ser teu filho.

À minha mãe (Marianne de Azevedo Ramalho Ferreira), por seu lindo coração e cuidado com todos de casa. Sem tua presença nosso lar não seria como é. Sei que passou por momentos muito difíceis nos últimos tempos. Mas que as obrigações do dia a dia, e as lutas da vida jamais lhe roubem a alegria. Seu filho te ama muito, e quer te dar alegrias! Beijo.

Ao meu irmão “Felipão” **(Felipe Ramalho Ferreira)**, por seu amor e cuidado com minha vida. Sei que se preocupa muito comigo, principalmente nos meus momentos de dificuldade. Saiba que te amo muito e desejo que Deus te faça sempre próspero, feliz e com muita saúde! Que possamos partilhar

momentos muito agradáveis sempre, e venhamos a construir lindas famílias mantendo sempre nossa comunhão como irmãos.

Dedico este trabalho, a esses que por me amarem de uma maneira especial tornam a caminhada mais fácil!



AGRADECIMENTOS

ESPECIAIS

Agradecimentos Especiais

A minha Orientadora Profa. Dra Roberta Okamoto, por sua disponibilidade e humildade. A distância não foi um empecilho para a realização deste trabalho devido a essas qualidades. É muito bom ser seu orientado. Saiba também que é uma honra ser conduzido por alguém que tem um pai tão importante dentro da cirurgia como o seu. E mais ainda porque a senhora tem brilho próprio, e dá continuidade ao belo trabalho por ele começado. Que continues assim, sem perder a alegria e a disposição mesmo diante das intempéries da vida. Deus com certeza preparou grandes coisas para você. Um abraço!

Ao meu Co-Orientador Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Júnior, por sua amizade e cuidado conosco. Agradeço pela oportunidade de estudar nesta casa que já recebeu muitos dos expoentes da cirurgia nacional, e por continuar aprendendo mais da cirurgia aqui. Que sua família seja abençoada pelos talentos que o senhor recebeu e que desfrute de muita paz para aproveitar a vida! Abraço.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo 2010/04366-1), indispensáveis para a realização desta pesquisa.



AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP** na pessoa da Diretora **Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhia** pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À **Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” **Profa. Adj. Maria José Hitomi Nagata**, pela diligência e competência nas diretrizes da pós-graduação.

Ao Professor Dr. Osvaldo Magro Filho, pela humildade e respeito com que nos trata, mesmo sendo uma grande figura dentro da cirurgia. Um abraço!

Aos Professores Dr. Michel Saad Neto, Alessandra Marcondes Aranega, Daniela Ponzoni, Ana Paula Farnezi Bassi, Francisley Àvila Campos e ao ilustríssimo Professor Tetuo Okamoto, por serem os grandes docentes que são, sempre dispostos a ensinar e ajudar, nos fazendo sentir em casa. Um grande abraço!

Aos Professores da Clínica Integrada Celso Koogi Sonoda, Sonia Regina Panzarini Barioni e Wilson Roberto Poi, pelos ensinamentos da vida, da ciência e convivência pacífica.

Ao professor Cláudio Maldonado Pastori, por ter sido um grande exemplo dentro do curso de residência. E pelas oportunidades que oferece. Deus abençoe você e família sempre!

Ao “Léo” (Leonardo Perez Faverani), porque nesses dois anos de curso foi a pessoa mais presente em minha vida. E sempre pude contar com sua amizade, seu companheirismo, sua compreensão, e incansável ajuda. Tens um grande coração e todos aqueles que cruzaram sua vida e precisaram de ti, com certeza sabem disso. Cada dia aprendo que nada fazemos sozinhos e não há nada mais nobre do que ajudar os outros, Deus o abençoe e te guarde sempre. Muito obrigado! Abraços!

À Ellen Cristina Gaetti Jardim, por ter me acolhido tão bem aqui em Araçatuba, que Deus abençoe você e sua família. Um beijo!

Ao Tarik Polo, pela inestimável ajuda no cuidado com os animais da pesquisa e competência em tudo que fez.

Aos colegas de curso da Pós-graduação em Cirurgia: Abraão, Rodolpho, Cassiano, Marcelo, Pedro, Fernando, Heloísa, Pamela, Igor e Lamis, pela oportunidade de aprendizado mútuo. Um abraço e felicidades a todos!

Aos funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP Cleide, Gilmar, Dirce e Dona Tina, *pela ajuda e carinho com que nos tratam. Abraços!*

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Aos pacientes, porque sem vocês o desafio de aprender mais e melhorar não existiria.

Epígrafe

Quando o cálice do sofrimento e da alegria é levado para que outros vejam e celebrem, torna-se o cálice da vida.

Na maioria das vezes estamos dispostos a olhar para nossa vida passada e dizer:

Sou grato pelas coisas boas que me trouxeram a este lugar. Quando, porém, erguemos nosso cálice para brindar à vida, devemos ter a coragem de dizer: Sou grato por tudo que me aconteceu e que me trouxe a este momento. A gratidão por todo o nosso passado apaga a amargura, o ressentimento, o remorso e a vingança, bem como todas as desconfianças e rivalidades. E isso faz com que nossa vida torne-se uma verdadeira dádiva para os outros. Ela transforma nosso passado em um presente cheio de frutos para o futuro; transforma a nossa vida em uma vida que dá vida.

O grande individualismo de nossa sociedade, em que tanto dá ênfase ao "faça você mesmo", impede-nos de disponibilizar nossa vida uns para os outros. Entretanto, todas as vezes que tivermos coragem de vencer o medo de nos tornar vulneráveis, a nossa vida, e vida de outras pessoas que dependem de nossa existência, florescerão de formas inesperadas. Beber o cálice da vida faz com que tudo o que estamos vivendo seja nosso. É dizer: "Esta é minha vida", mas também: "Quero que isto seja minha vida". Beber o cálice da vida é apropriar-se plenamente de nossa existência com as suas aflições e alegrias.

Henri Nouwen



LISTAS E SUMÁRIO

Lista de Figuras

- Figura 1 - Cronologia dos procedimentos experimentais 55
- Figura 2 - Cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina (HE) do terço cervical do alvéolo. Grupos SHAM (14 e 42 dias); OVX ST (14 e 42 dias); OVX ALE (14 e 42 dias) e OVX RAL (14 e 42 dias). Original x100 56
- Figura 3 - Gráfico mostrando a porcentagem média de coágulo nos grupos SHAM, OVX ST, OVX ALE e OVX RAL, nos períodos experimentais de 14 e 42 dias 57
- Figura 4 - Gráfico mostrando a porcentagem média de tecido conjuntivo nos grupos SHAM, OVX ST, OVX ALE e OVX RAL, nos períodos experimentais de 14 e 42 dias. 58
- Figura 5 - Gráfico mostrando a porcentagem média de tecido ósseo neoformado nos grupos SHAM, OVX ST, OVX ALE e OVX RAL, nos períodos experimentais de 14 e 42 dias. 59
- Figura 6 - Expressões das imunomarcações aos 14 dias pós-extração dos animais do grupo SHAM. A OPG foi expressa positivamente no tecido mineralizado (seta preta) e matriz extracelular – MEC (seta branca); Houve expressão da RANKL em osteócitos (Seta amarela) e MEC (seta branca). A osteocalcina foi intensamente expressa no tecido mineralizado (seta preta). E a TRAP foi exibida em alguns osteócitos (seta com OC).Original x200 60
-

Figura 7 - No grupo OVX ST a OPG foi expressa principalmente na MEC (seta branca). A RANKL foi exibida em osteoblastos (seta azul) e MEC (seta branca); A osteocalcina ficou restrita a MEC (seta branca) e osteoblastos (seta azul); e a TRAP foi intensamente expressada em osteoclastos (seta com OC). Original x200

61

Figura 8 – No grupo OVX ALE a OPG foi expressa na MEC (seta branca); Já RANKL corou positivamente osteócitos (setas amarelas), MEC (seta branca) e osteoblastos (setas azuis); a osteocalcina corou osteoblastos (seta azul) e osteócitos (setas amarelas); E TRAP marcou moderadamente osteoclastos (seta com OC). Original x200.

62

Figura 9 – No grupo OVX RAL a OPG foi expressa no tecido mineralizado (seta preta) e MEC (setas brancas); a RANKL foi expressa em osteoblastos (setas azuis) e osteócitos (setas amarelas); a OC corou a MEC (seta branca) e alguns osteócitos. (seta amarela); a TRAP evidenciou a presença de osteoclastos (setas com OC). Original x200.

63

Lista de Abreviaturas

HE – Hematoxilina e eosina

OPG – Osteoprotegerina

SHAM – Ratas submetidas à cirurgia fictícia.

OVX – Ovariectomia, ratas ovariectomizadas

OVX ALE – Ratas ovariectomizadas tratadas com Alendronato de Sódio

OVX RAL – Ratas ovariectomizadas tratadas com raloxifeno

RANK – Receptor ativador de NF-Kappa B

RANKL – Ligante do receptor ativador de NF-Kappa B

TRAP - Fosfatase ácida resistente ao tartarato

RAL – Raloxifeno

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

Sumário

1. Artigo: Análise histomorfométrica e imunoistoquímica do processo de reparo alveolar de ratas ovariectomizadas com dieta pobre em cálcio e submetidas à terapia com raloxifeno ou com alendronato	20
Resumo	22
Abstract	24
1.1 Introdução	25
1.2 Materiais e métodos	30
1.3 Resultados	36
1.4 Discussão	42
1.5 Conclusões	47
1.6 Referências	48
1.7 Anexos	64



Artigo

Análise histomorfométrica e imunoistoquímica do processo de reparo alveolar de ratas ovariectomizadas com dieta pobre em cálcio e submetidas à terapia com raloxifeno ou com alendronato

**Este artigo será formatado de acordo com as normas do periódico Bone*

Gabriel Ramalho Ferreira DDS^a, Leonardo Perez FAVERANI DDS^a, Idelmo Rangel GARCIA-JÚNIOR, DDS, MSc, PhD^b, Tetuo OKAMOTO, DDS, MSc, PhD^c, Roberta Okamoto, DDS, MSc, PhD^d.

^a Mestrandos do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, Brasil.

^b Professor Adjunto do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e Implantodontia, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, Brasil.

^c Professor Titular do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e Implantodontia, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, Brasil.

^d Professora Doutora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e Implantodontia, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, Brasil e do Programa de Biologia Oral da Universidade Do Sagrado Coração de Jesus (USC), Bauru, Brasil.

Endereço dos Autores:

Rua José Bonifácio, 1193, Araçatuba, São Paulo, Brasil

Cep: 16015-050

Autor Responsável:

Roberta Okamoto

Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), São Paulo, Brasil.

Rua José Bonifácio, 1193, Araçatuba, São Paulo, Brasil, Cep: 16015-050

Fax: (55)-18-3636-3270

E-mail: beta.okamoto@gmail.com

Resumo

Objetivos: Avaliar a influência do alendronato e raloxifeno no processo de reparo alveolar em ratas com osteoporose induzida (ovariectomizadas e submetidas a uma dieta pobre em cálcio).

Materiais e Métodos: Sessenta e quatro ratas foram divididas em quatro grupos (n = 16) de acordo com o tratamento em ratas sham com dieta normal, ratas ovariectomizadas com uma dieta pobre em cálcio sem tratamento medicamentoso, ratas ovariectomizadas com uma dieta pobre em cálcio tratadas com alendronato e ratas ovariectomizadas com uma dieta pobre em cálcio tratadas com raloxifeno. Assim, a análise histomorfométrica foi realizada, bem como expressão da proteína TRAP, osteocalcina, osteoprotegerina (OPG) e RANKL, pela técnica de imunistoquímica. Para comparar os valores médios obtidos nos diferentes grupos e períodos experimentais, os dados foram analisados pelos testes de Kruskal-Wallis e Nemenyi-Damico-Wolfe-Dunn como post-hoc técnicas ($\alpha = .05$).

Resultados: No longo prazo, os grupos SHAM e raloxifeno mostraram a melhor taxa de formação óssea ($P < 0,05$). A pior taxa de formação óssea foi observado no grupo OVX ST. Os grupos raloxifeno e alendronato melhoraram a taxa de formação óssea, quando administrados em animais com osteoporose. O grupo raloxifeno apresentou uma melhor resposta no longo prazo. O grupo alendronato mostrou uma resposta favorável em 14 dias comparado ao grupo raloxifeno, mas uma resposta reduzida aos 42 dias pós-extração. A imunistoquímica revelou a expressão da proteína TRAP, osteocalcina,

osteoprotegerina (OPG) e fator de RANKL. Foi possível notar um osso maduro no grupo SHAM aos 14 dias, um osso imaturo no grupo OVX ST e uma qualidade óssea intermediária nos grupos OVX ALE e OVX RAL.

Conclusões: A ovariectomia associada a uma dieta pobre em cálcio atrasou o processo de reparo alveolar. O tratamento com alendronato e raloxifeno melhorou o reparo alveolar em ratas osteoporóticas, mas não o suficiente para atingir os valores histométricos e de expressão das proteínas do grupo sham.

Palavras-chave: alendronato, raloxifeno, osteocalcina, osteoprotegerina, RANKL.

Histomorphometric and immunohistochemistry analysis of the alveolar healing process of ovariectomized rats with a low calcium diet submitted to raloxifene or alendronate therapy

Abstract

Objectives: To evaluate the influence of alendronate and raloxifene in the alveolar healing process of rats with induced osteoporosis (ovariectomized and low calcium diet).

Materials and Methods: The sixty-four rats were divided into four groups (n = 16) according to the treatment in ovariectomized rats with a low calcium diet treated with alendronate, ovariectomized rats with a low calcium diet raloxifene-treated, ovariectomized rats with a low calcium diet without pharmacological treatment and sham rats with a balanced diet. Thus, histomorphometric analysis was performed, as well as expression of TRAP protein, osteocalcin, osteoprotegerin (OPG) and RANKL, by the immunohistochemistry technique. To compare the mean values obtained in different groups and experimental periods, the data were analyzed by Kruskal-Wallis, Nemenyi-Damico-Wolfe-Dunn tests were further used as post-hoc techniques ($\alpha=.05$).

Results: In the long term, the SHAM and raloxifene groups showed the best bone formation rate ($P <.05$). The worst bone formation rate was observed in the untreated OVX group. Raloxifene and Alendronate groups improved bone formation rate when administered in osteoporotic animals. Raloxifene group had a better response in the long term. Alendronate group showed a favorable

response at 14 days compared to Raloxifene group, but a reduced response at 42 days post-extraction. Immunohistochemistry revealed the expression of TRAP protein, osteocalcin, osteoprotegerin (OPG) and RANKL, it was possible to note a mature bone at 14 days in the SHAM group balanced diet, and an immature bone in OVX group low calcium diet and an intermediate quality in the Alendronate and Raloxifene groups.

Conclusion: Ovariectomy delays the alveolar wound healing process and interferes with the bone turnover. The ALE replacement and the RLX treatment improved the healing but not enough to reach histomorphometric and immunocolocalization values of the sham group.

Keywords: alendronate, raloxifene, osteocalcin, osteoprotegerin, RANK Ligand.

1.1 Introdução

A deficiência de estrógeno (E2) como consequência da menopausa causa osteopenia em aproximadamente dois terços das mulheres. Com a associação da deficiência estrogênica ao envelhecimento um quadro osteoporótico é observado (Kribbs, 1990). A perda óssea decorrente do envelhecimento difere da perda óssea provocada pela diminuição da função gonadal, já que a redução dos hormônios sexuais femininos provoca aumento do número e da atividade de osteoblastos e osteoclastos, ocorrendo uma perda do equilíbrio entre formação (osteogênese inadequada) e absorção óssea (osteoclastogênese excessiva), resultando na perda óssea, principalmente trabecular (Manolagas e Jilka, 1995).

Os autores sugerem que ocorre aumento do número de precursores de osteoclastos em decorrência do aumento da produção de IL-6 pelos pré-osteoblastos. Enquanto a perda óssea decorrente do envelhecimento é devido à diminuição da absorção intestinal do cálcio da dieta resultando na perda óssea principalmente cortical (Teófilo et al 2003, 2004).

O tratamento com reposição hormonal é utilizado com frequência para tratar sintomas da menopausa e prevenir a osteoporose (Burg et al 2006). Entretanto, as possíveis contra-indicações clínicas e o risco dos efeitos colaterais aumentaram o número de pesquisas relacionadas a terapias alternativas (Regan et al 2001). Portanto outros fármacos como a calcitonina (Netelenbos 1998; Chen et al 2010), bifosfonatos (Netelenbos 1998; Russel e Rogers, 1999; Muñoz-Torres et al 2009) e os moduladores seletivos de receptores de estrógeno (SERMs) (Ettinger et al 1999; Cummings et al 1999; Barret-Connor et al 2002), foram propostos como terapias alternativas promissoras para o tratamento da osteoporose pós-menopausa.

Os bisfosfonatos são medicamentos novos e representam uma esperança no que se refere à prevenção e ao tratamento da osteoporose, em especial o alendronato (4-amino-1-hidroxybutyidene) que faz parte da segunda geração dos bifosfonatos, o qual possui menor efeito colateral relativo aos da primeira geração. A classe destes fármacos é análoga dos pirofosfatos e exerce sua ação anti-reabsortiva por meio da ligação à hidroxiapatita, inibindo o desenvolvimento de osteoclastos e sua atividade migratória e também promovendo a apoptose dos mesmos (Giro, 2006). Devido à grande afinidade

pela matriz óssea, aproximadamente 50% da dose absorvida permanece fixa no osso e o restante é eliminado lentamente, com meia vida de cerca de 10 anos, sem haver qualquer sinal de metabolização (Amler, 1969; Russel e Rogers 1999).

Os SERMs são uma classe de fármacos que atua como agonista de receptores de estrógeno em alguns tecidos e como antagonista em outros. São usados para tratar ou prevenir várias condições hormonais dependentes, como o câncer de mama, a osteoporose e as doenças cardiovasculares (Iwamoto et al 2005). O raloxifeno (RLX), um análogo do benzotiofeno, é o único SERM aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) para tratamento e prevenção da osteoporose nos Estados Unidos e em vários outros países devido seu efeito preventivo na incidência de fraturas vertebrais em mulheres com osteoporose pós-menopausa (Ettinger et al 1999). RLX também reduz a incidência de câncer de mama (Cummings et al 1999) e altera a concentração de lipídio na corrente sanguínea que talvez seja favorável para prevenção de doenças cardiovasculares em indivíduos de alto risco; possui pouquíssimo efeito no endométrio (Barret-Connor et al 2002).

Numa remodelação óssea normal, a formação óssea pelos osteoblastos segue a reabsorção osteoclástica e ocorre de maneira precisa e quantitativa. A molécula ativadora e receptora do fator kappa B da família do fator de necrose tumoral (RANKL: expressada pelos osteoblastos e seus precursores) (Lacey et al 1998) e seu receptor RANK (expressado em precursores de osteoclastos e osteoclastos maduros) (Hsu et al 1999) são reguladores chaves da remodelação óssea e essenciais para o desenvolvimento e ativação da reabsorção óssea (Theill

et al 2002). A homeostasia óssea é alcançada pelo balanço dos efeitos da reabsorção óssea de RANKL e seu receptor chamariz, a osteoprotegerina (OPG: expressada pelos osteoblastos e seus precursores) (Simonet et al 1997). OPG se liga à RANKL limitando a interação entre RANKL e RANK que inibe a sinalização dos eventos que modulam a diferenciação osteoclástica e o desenvolvimento de linfócitos. O balanço entre RANKL e OPG é regulado por citocinas e hormônios que determinam às funções osteoclásticas, a alteração desse balanço é crítica nas patologias ósseas resultando num aumento de reabsorção óssea.

O processo de mineralização é o último passo do reparo alveolar, e resulta da deposição de cálcio na matriz orgânica óssea, composta por colágeno em sua maior parte. A participação de proteínas não colágenas, sintetizadas por osteoblastos durante a deposição de cálcio, tais como osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea, é importante durante a maturação e mineralização óssea, além de regular a atividade funcional das células ósseas (Amler, 1969; Shyng et al. 1999; De Oliveira et al. 2003; Kassem et al. 2008)

A ovariectomia tem se mostrado um modelo particularmente útil para investigar a interferência da deficiência de estrógeno no metabolismo ósseo, porém estudos na literatura mostram que apenas a deficiência de estrógeno decorrente da ovariectomia não é suficiente para provocar osteoporose maxilar em ratas, num período de até 11 semanas. Sendo assim, associação da dieta pobre em Ca^{++} à ovariectomia ocasionou uma diminuição da massa óssea 2 vezes maior na maxila do que na metáfise proximal da tíbia após 5 semanas (Teófilo et al. 2003 e 2004). 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 e Russo, 1973; Carvalho e Okamoto, 1987). Uma importante questão consiste em como produzir um tecido mineralizado de boa qualidade para suportar as forças mecânicas decorrentes de uma reabilitação com prótese sobre implante (Von Wowern e Kollerup 1992; Elsubeihi e Heersch, 2002).

Considerando o aumento da expectativa de vida, o número de idosos com osteoporose e a procura de tratamento odontológico para reposição de dentes perdidos, as peculiaridades do reparo alveolar e a necessidade de se obter melhor entendimento da formação do tecido ósseo no processo de reparo alveolar se fazem importantes, para se alcançar um tecido ósseo de maior qualidade. O presente projeto apresentou como proposta estudar a influência do alendronato e do raloxifeno no processo de reparo alveolar em ratas com osteoporose induzida por meio de análise histomorfométrica e imunohistoquímica.

Além disso, a hipótese apresentada pelos autores foi que o tratamento com Alendronato de sódio seria superior ao Raloxifeno, nas análises do processo alveolar.

1.2 Materiais e métodos

ANIMAIS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal sob o número 2010/003045. Para o desenvolvimento deste, foi utilizado um total de 64 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), fêmeas, adultas (50-60 dias), com peso de aproximadamente 200g, as quais foram divididas em quatro grupos (n=16 por grupo). Estes animais foram mantidos em gaiolas, e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água ad libitum.

Após a realização das cirurgias sham (cirurgia fictícia) e das cirurgias de ovariectomia, os animais do grupo sham com dieta balanceada continuarão sendo alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brazil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água ad libitum, enquanto os demais animais foram alimentados com ração contendo 0.1% Ca e 0.5%P (RHOSTER Ind. Com., Vargem Grande Paulista, SP, Brazil) e água ad libitum (Figura 1).

Os grupos experimentais foram: ratas sham dieta normal (SHAM); ratas ovariectomizadas submetidas à dieta pobre em cálcio sem tratamento medicamentoso (OVX ST), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta pobre em cálcio e tratadas com alendronato (OVX ALE), ratas ovariectomizadas submetidas à dieta pobre em cálcio e tratadas com raloxifeno (OVX RAL). A distribuição das ratas de acordo com os grupos e períodos experimentais foi realizada da seguinte forma:

SHAM (sub grupos 14 e 42) – n= 16 ratas

OVX ST (sub grupos 14 e 42) – n = 16 ratas

OVX ALE (sub grupos 14 e 42) – n = 16 ratas.

OVX RAL (sub grupos 14 e 42) – n= 16 ratas.

Os grupos foram divididos em subgrupos 14 e 42 dias, de acordo com o tipo de estudo a ser realizado:

Subgrupo 14 – ratas que sofreram exodontia e foi avaliado o processo de reparo alveolar aos 14 dias após exodontia.

Subgrupo 42 – ratas que sofreram exodontia e foi avaliado o processo de reparo alveolar aos 42 dias após exodontia.

ESTUDO DO CICLO ESTRAL

As ratas foram colocadas em gaiolas individuais para o estudo diário do ciclo estral. A técnica utilizada foi descrita por Long e Evans (1922), que consiste na introdução, intravaginal, de 1-2 gotas de soro fisiológico que, em seguida, é aspirado e colocado numa lâmina de histologia para leitura microscópica imediata. Após a obtenção de 2 a 3 ciclos regulares, os animais foram utilizados nos experimentos.

CASTRACÃO BILATERAL

As ratas dos grupos OVX ST, OVX ALE e as OVX RAL foram anestesiadas com Coopazine (Xilazina-Coopers, Brasil, Ltda) e Vetaset (Cloridrato de quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda) e, a seguir, foram realizadas incisões em ambos os flancos, com a exposição dos ovários e remoção cirúrgica

dos mesmos. As ratas do grupo sham passaram pelo mesmo procedimento, porém apenas foi realizada a exposição cirúrgica dos ovários sem sua remoção.

TRATAMENTOS:

Com Alendronato

Oito dias após a ovariectomia as ratas foram submetidas ao tratamento com Alendronato Sódico por 30 dias por meio da gavagem de 0,1mg/Kg/dia (Da Paz et al. 2001) dissolvido em solução aquosa. Esta medicação permaneceu até o término do experimento (eutanásia dos animais), totalizando 44 e 72 dias de administração, respectivamente.

Com Raloxifeno

Oito dias após a ovariectomia as ratas foram submetidas ao tratamento com Raloxifeno por 30 dias por meio da gavagem de 1mg/kg/dia (Luvizuto et al. 2010) dissolvido em solução aquosa. Esta medicação permaneceu sendo administrada até o término do experimento (eutanásia dos animais), totalizando 44 e 72 dias de administração, respectivamente.

TÉCNICA PARA EXTRAÇÃO DENTAL

Um mês após o início da terapia medicamentosa com Alendronato ou Raloxifeno as ratas foram anestesiadas por infiltração intramuscular de Coopazine (Xilazina-Coopers, Brasil, Ltda) e Vetaset (Cloridrato de quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda) na dosagem indicada pelo fabricante,

foi realizada a antissepsia do campo operatório com polivinilpirrolidona iodada (Riodeine Indústria Química e Farmacêutica Rio Química, Ltda) e em seguida, foi realizada a exodontia do incisivo superior direito, utilizando instrumental especialmente adaptado para este fim (Okamoto e Russo, 1973). A mucosa gengival foi suturada com fio de poliglactina 910 (Vicryl 4.0) (Johnson & Johnson, São José dos Campos, São Paulo, Brasil).

TÉCNICA HISTOLÓGICA EM PARAFINA

Os animais de todos os grupos experimentais foram eutanasiados por sobredosagem anestésica aos 14 e 42 dias após a exodontia e, foram retiradas as hemi-maxilas direitas para a realização da análise histológica dos cortes em parafina dos alvéolos.

As peças foram fixadas em formol e sofreram descalcificação em EDTA (18%) e em seguida a desidratação utilizando uma sequência de alcoóis. Após estas etapas, realizou-se a diafanização com xilol para posterior inclusão em parafina para obtenção de corte 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 imunistoquímica. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconhecia o respectivo grupo da secção.

ANÁLISE HISTOMÉTRICA

Dois cortes de cada animal foram corados em hematoxilina e eosina (HE) para análise histométrica. O alvéolo foi didaticamente dividido em terço cervical,

médio e apical para realizar a análise histológica. Os eventos foram observados no terço cervical.

A análise histométrica foi feita pelo método da planimetria de pontos. Para isto, os cortes dos alvéolos foram primeiramente fotografados com um sistema de câmera digital acoplada ao microscópio Nikon (Eclipse 80i, Shinagawa, Tokyo, Japão), com objetiva de 10x e processadas pelo software Image-Pro® (Plus 5.1, Bethesda, Maryland, EUA). Utilizando o programa gráfico Software Adobe Photoshop versão 6.0, foram sobrepostas 2 grades de Merz em cada terço cervical do alvéolo para estimar o volume de tecido ósseo formado. Cada grade contém 100 pontos equidistantes, portanto foram um total de 200 pontos. Esta análise foi realizada sem o conhecimento do examinador e realizada em dois cortes histológicos de cada animal.

Os dados relativos à avaliação histométrica dos resultados da área do coágulo, tecido conjuntivo e tecido ósseo (% da área total) foram estatisticamente analisados utilizando teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste (post-hoc) de Nemenyi-Damico-Wolfe-Dunn. Diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

O processamento imunoistoquímico foi realizado no Laboratório de Histologia da Universidade Sagrado Coração /USC, Bauru.

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 utilizados foram contra TRAP (SC30832), OPG (SC210832), RANKL (SC7627), e osteocalcina (SC18319), todos os anticorpos primários foram policlonais, produzidos em cabras (Santa Cruz Biotechnology). A escolha destes anticorpos foi realizada baseada na necessidade em se avaliar as respostas celulares quanto ao processo de reabsorção óssea (TRAP), remodelação (OPG e RANKL) e mineralização (osteocalcina).

Foram realizados experimentos de imunoistoquímica utilizando como método de detecção a imunoperoxidase. Foi utilizado o anticorpo secundário biotilado anti-cabra produzido em coelho (Pierce Biotechnology), o amplificador foi a Avidina e Biotina (Vector Laboratories) e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno. Ao término da revelação com a diaminobenzidina, foi realizada a contra-coloração pela Hematoxilina de Harris. 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 um microscópio Nikon (Eclipse 80i, Shinagawa, Tokyo, Japão), objetiva de 20x, através da contagem manual das células marcadas em áreas previamente determinadas, que sabidamente estavam 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.

As avaliações foram realizadas por meio de escores que representam: marcação leve (++) , marcação moderada (+++) e marcação intensa (++++). A avaliação foi realizada em toda a extensão do alvéolo no período de 14 dias após a exodontia.

1.3 Resultados

Avaliação clínica e microscópica

O ciclo estral mostrou a eficácia da ovariectomia como proposto pelo estudo. Os grupos OVX ST, OVX ALE e OVX RAL estavam na fase de diestro, caracterizado pela predominância de leucócitos. Em contrapartida, os animais submetidos à cirurgia sham apresentaram as 4 fases do ciclo estral (diestro, proestro, estro, metaestro).

Levando em consideração a dinâmica do processo alveolar, foram realizadas as análises quantitativas da formação de coágulo, tecido conjuntivo e tecido ósseo em todos os grupos (Figura 2). Ao longo do processo, o coágulo foi diminuindo assim como o tecido conjuntivo, já em relação ao tecido ósseo foi observado um aumento no interior do alvéolo em reparação. Esta observação foi comum aos quatro grupos experimentais (SHAM, OVX ST, OVX ALE e OVX RAL). Aos 14 dias pós-operatórios as melhores respostas biológicas foram observadas no grupo SHAM, que apresentou juntamente com o grupo OVX ALE as melhores respostas de taxa de formação óssea. O maior atraso no processo de reparo foi observado no grupo OVX ST. Os grupos OVX ALE e OVX RAL melhoraram a taxa

de formação óssea quando foram administrados nos animais com osteoporose induzida.

Aos 42 dias, o grupo OVX RAL teve uma resposta ligeiramente superior ao grupo SHAM. Já o grupo OVX ALE teve uma resposta mais favorável que o OVX RAL aos 14 dias, mas ainda inferior ao grupo SHAM. (Figura 2).

Análise histométrica

Para o coágulo aos 14 dias, o menor valor médio observado foi para o grupo OVX RAL e o maior valor médio para o grupo OVX ST. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo OVX RAL e OVX ST ($p < 0,05$) (Figura 3 e Tabela 1).

Para o tecido conjuntivo aos 14 dias, o menor valor médio observado foi para o grupo OVX ALE e o maior valor médio para o grupo OVX RAL. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos OVX RAL e OVX ALE e, entre os grupos SHAM e OVX ALE ($p < 0,05$) (Figura 4 e Tabela 2).

Para o tecido ósseo aos 14 dias, o menor valor médio observado foi para o grupo OVX ST e o maior valor médio para o grupo OVX ALE. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados.

Aos 42 dias, no coágulo notou-se o menor valor médio para o grupo SHAM e o maior valor médio para o grupo OVX ALE. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos OVX RAL e SHAM ($p < 0,05$) (Figura 5 e Tabela 3).

No mesmo período, o tecido conjuntivo apresentou o menor valor médio para o grupo OVX RAL e o maior valor médio para o grupo OVX ST. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados.

Já o tecido ósseo apresentou o menor valor médio para o grupo OVX ST e o maior valor médio para o grupo OVX RAL. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados.

Análise Imunoistoquímica

Foram realizadas reações imunoistoquímicas com o objetivo de avaliar as respostas celulares através de diferentes proteínas sintetizadas durante o processo de reparo alveolar aos 14 dias após a exodontia, que é o período de expressão máxima destas proteínas.

A imunomarcagem para OPG é observada em células da linhagem osteoblástica, bem como na matriz extracelular, no tecido conjuntivo e mesmo junto ao trabeculado ósseo em formação. É uma proteína solúvel e por esse motivo caracteriza-se por se apresentar de maneira difusa no tecido ósseo e matriz extracelular.

No grupo SHAM foi observada a presença desta proteína nas células da linhagem osteoblástica, especificamente nos osteócitos, também foram observadas marcações na matriz extracelular, tecido conjuntivo precursor do tecido ósseo e também junto ao trabeculado ósseo em formação. O conjunto de lâminas avaliadas mostrou um escore moderado para esta proteína (Figura 6 e Tabela 4).

No grupo OVX ST foi observada a presença desta proteína na matriz extracelular e no tecido conjuntivo. Não foram observadas marcações junto ao trabeculado ósseo. O conjunto de espécimes avaliados mostrou um escore leve para esta proteína (Figura 7 e Tabela 4).

No grupo de ratas OVX ALE foi observada a marcação da OPG na matriz extracelular, tecido conjuntivo e uma marcação discreta no trabeculado ósseo em formação. O escore atribuído para as imunomarcações avaliadas foi o moderado (Figura 8 e Tabela 4).

Nas ratas OVX RAL foi observada a imunomarcação da OPG na matriz extracelular, no tecido conjuntivo e já foi possível observar uma marcação discreta no trabeculado ósseo em formação. O escore atribuído para os espécimes avaliados representa a marcação moderada para OPG (Figura 9 e Tabela 4).

A proteína RANKL apresenta-se expressa em células da linhagem osteoblástica, bem como na matriz extracelular e no tecido conjuntivo.

Para o grupo SHAM, foi observada imunomarcação positiva para osteócitos, bem como na matriz extracelular e no tecido conjuntivo. Algumas áreas de tecido ósseo em formação também foram observadas neste período além de áreas do trabeculado ósseo com imunomarcação discreta para esta proteína. O escore atribuído para esta proteína foi o de marcação moderada (Figura 6).

No grupo de ratas OVX ST, foi observada uma marcação bastante intensa de RANKL em osteoblastos. Também foi possível observar a matriz extracelular

marcada e o trabeculado ósseo mostrou-se em organização, porém com ausência de marcação para esta proteína. O escore atribuído para o conjunto de espécimes avaliados foi o de marcação intensa (Figura 7).

Nas ratas OVX ALE, foram observados osteoblastos marcados intensamente e alguns osteócitos também marcados positivamente para a RANKL. A matriz extracelular também apresentou marcação positiva para a RANKL e o trabeculado ósseo apresentou-se bem organizado. O escore atribuído para os espécimes deste grupo foi intenso (Figura 8).

Nas ratas OVX RAL, foram observados osteoblastos e principalmente osteócitos marcados positivamente para o RANKL. As trabéculas ósseas mostraram-se organizadas e com marcação positiva para a RANKL. O escore atribuído para os espécimes deste grupo foi o intenso (Figura 9).

A osteocalcina é a proteína não colágena mais abundante da matriz óssea. Marca a mineralização do tecido ósseo e um marcador de células da linhagem osteoblástica.

No grupo SHAM, foi observada a presença de poucos osteócitos marcados positivamente para a osteocalcina. A matriz extracelular e o trabeculado ósseo em formação também apresentaram marcação positiva para a osteocalcina. As observações neste grupo sinalizam um grau de maturidade do tecido ósseo, principalmente em função da marcação positiva para osteócitos, bem como a precipitação da osteocalcina sobre o trabeculado ósseo em formação. O escore atribuído para o grupo foi intenso (Figura 6).

No grupo de OVX ST, foram observados osteoblastos intensamente marcados. A matriz extracelular também se apresentou bastante marcada. Alguns osteócitos apresentaram discreta marcação. Neste grupo foi possível observar que a partir da atividade de sinalização protéica, o tecido ósseo encontrava-se mais imaturo quando comparado ao grupo anterior. O escore atribuído para os espécimes deste grupo foi intenso (Figura 7).

No grupo de ratas OVX ALE, foram observados osteócitos e osteoblastos com marcação positiva. Pouca matriz extracelular apresentou-se marcada positivamente para esta proteína. Ao conjunto dos espécimes avaliados foi atribuído o escore intenso (Figura 8). Vale destacar que neste grupo, pela presença de marcações positivas tanto para osteoblastos como para osteócitos, o estágio de maturação do tecido ósseo encontra-se num grau superior ao do grupo de ratas osteoporóticas, porém inferior ao grupo SHAM.

No grupo de ratas OVX RAL, foram observadas marcações moderadas para osteoblastos e osteócitos. Também foi observada marcação na matriz extracelular. O escore atribuído ao conjunto dos espécimes neste grupo foi moderado (Figura 9). Neste grupo, assim como no grupo OVX ALE, foi possível observar respostas celulares que indicam um menor grau de maturidade neste grupo, quando comparado ao grupo SHAM. Porém, vale destacar que o grau de maturidade foi superior ao do grupo de ratas OVX ST.

A enzima TRAP mostra a atividade osteoclástica em andamento no tecido ósseo em formação. No grupo SHAM o escore atribuído foi moderado para a presença de osteoclastos TRAP positivos. No grupo OVX ST, o escore atribuído foi

o intenso para os osteoclastos TRAP positivos. Nos grupos de ratas tratadas com alendronato ou com raloxifeno, o escore atribuído foi moderado para os osteoclastos TRAP positivos (Tabela 4).

1.4 Discussão

A hipótese apresentada pelos autores deste trabalho foi parcialmente aceita, tendo em vista que a avaliação da porcentagem da neofomação óssea no período de 14 dias foi maior no grupo tratado com alendronato em relação ao raloxifeno. Entretanto, no segundo período avaliado, houve uma inversão, com o raloxifeno superando os valores de porcentagem de neofomação óssea até do grupo SHAM, porém sem significância estatística.

A análise dos eventos histológicos mostrou que em todos os grupos experimentais os passos do processo de reparo alveolar ocorreram conforme descrito na literatura (Shyng, 1999; De Oliveira, 2003). O modelo experimental seguido no presente trabalho foi eficiente para a indução da osteoporose, já que mesmo nos grupos tratados (OVX ALE e OVX RAL) houve uma melhora apenas parcial no reparo alveolar em relação às ratas OVX ST. Estando de acordo com o método seguido por Teófilo et al. (2003) em que foi realizada a ovariectomia associada a uma dieta pobre em cálcio, e a osteoporose resultante foi mais acentuada que somente a ovariectomia. Porém uma das dificuldades encontradas para a realização deste trabalho foi o alto custo da ração pobre em cálcio.

O processo de reparo alveolar envolve respostas biológicas que mostram a dinâmica do tecido ósseo, podendo ser dividida didaticamente em três etapas: fase exsudativa, que representa a formação da fibrina, fase proliferativa, representando a proliferação de células que formarão o tecido de granulação e por último, a fase reparadora, representando a síntese de colágeno e ossificação (Amler, 1969). Neste estudo, avaliamos os três eventos através da quantificação do coágulo sanguíneo, tecido conjuntivo e tecido ósseo, com o intuito de avaliar a dinâmica do processo de reparo alveolar no quadro de osteoporose e posteriormente, em presença de medicamentos como o raloxifeno ou o alendronato, que têm sido utilizados pela população.

O grupo SHAM, considerado o grupo controle, mostrou as melhores respostas quanto à taxa de formação óssea, bem como uma diminuição na presença do coágulo sanguíneo e do tecido conjuntivo, mostrando que o processo de reparo alveolar ocorreu da maneira esperada (Okamoto e Russo, 1973). O quadro instalado de osteoporose mostrou que houve uma grande diminuição na taxa de formação óssea, representada pela menor porcentagem de osso formado aos 14 e aos 42 dias no grupo OVX ST. O grupo OVX ST também apresentou a maior quantidade de coágulo remanescente e tecido conjuntivo no alvéolo aos 42 dias. A utilização de alendronato ou raloxifeno nos animais com a osteoporose instalada promoveu uma melhora na taxa de formação óssea, conforme o esperado. Inicialmente, o alendronato promoveu respostas melhores do que o raloxifeno, como observado aos 14 dias pós exodontia. No entanto, aos 42 dias, pôde-se constatar que houve uma tendência do grupo OVX RAL e do

grupo SHAM a apresentarem uma taxa de formação óssea maior que do grupo OVX ALE. Portanto, o raloxifeno parece promover respostas do tecido ósseo que resultam numa melhor dinâmica. Este achado vem ao encontro dos resultados observados por Luvizuto et al. (2010), quando foi possível observar que o raloxifeno inicialmente promoveu uma baixa taxa de formação óssea. No entanto, aos 42 dias foram notadas respostas bastante favoráveis com a utilização deste fármaco, que promoveu respostas constantes quanto à porcentagem de osso formado.

Considerando as respostas biológicas e das sinalizações celulares aos 14 dias pós exodontia, período de maior atividade metabólica durante o processo de reparo alveolar (Okamoto e Russo, 1973), é possível observar que as células osteoblásticas produzem proteínas que buscam o equilíbrio do tecido ósseo. A osteoprotegerina e RANKL foram produzidas de maneira equilibrada para todos os grupos experimentais. No entanto, é importante destacar que no grupo OVX ST há uma grande expressão de RANKL, proteína que ativa pré osteoclastos presente nos osteoblastos mostrando a intensa ativação da osteoclasia. Este achado é confirmado por artigos na literatura que mostram que a maior expressão de RANKL resulta numa maior ativação osteoclástica (Giner et al. 2011; Luvizuto et al. 2010; Ostrowska et al. 2012). Osteoprotegerina e RANKL encontram-se equilibrados porém com ligeira redução na expressão de RANKL no grupo OVX RAL. Este achado também foi observado no trabalho de Luvizuto et al. 2010, onde a administração de raloxifeno levou a uma menor expressão de RANKL e conseqüentemente de TRAP, marcador da atividade osteoclástica.

A presença de osteocalcina no tecido ósseo também foi um fator que mostrou as diferenças na qualidade do tecido ósseo a ser formado durante o processo de reparação. O grupo SHAM mostrou as maiores expressões de osteocalcina e o grupo osteoporose apresentou a menor presença desta proteína, considerada o marcador da mineralização óssea. Aos 14 dias foi possível observar uma presença de osteocalcina ligeiramente maior no grupo OVX ALE quando comparado ao grupo OVX RAL. Estes resultados justificam o achado de que aos 14 dias pós exodontia, há uma menor taxa de formação óssea do grupo OVX RAL quando comparado ao grupo OVX ALE. Vale destacar que estes resultados também confirmam os achados de Luvizuto et al. (2010), em que a expressão de osteocalcina aos 14 dias pós exodontia foi maior no grupo SHAM e menor no grupo OVX ST bem como no grupo OVX RAL. Conforme discutido anteriormente, o raloxifeno parece não promover respostas evidentes nos períodos iniciais da sua administração.

Os bisfosfonatos (BFs) contendo nitrogênio como alendronato, risedronato e ibandronato, são agentes inibidores da reabsorção óssea (Epstein, 2006; Pazianas et al. 2010). Impedem a perda de massa óssea através da inibição do receptor RANKL bloqueando a diferenciação e ativação osteoclástica reduzindo a dor e o risco de fraturas patológicas (Naidu et al. 2008; Kavanagh et al. 2006; Reszka e Rodan, 2003). Portanto são medicações que previnem a perda de massa óssea por inibir a reabsorção, sendo deficientes em relação a estimular a diferenciação e a ativação de osteoblastos, buscando um equilíbrio entre OPG e RANKL. Uma das vantagens do alendronato percebidas neste estudo é que

além de melhorar a qualidade óssea em relação ao grupo OVX ST, teve um menor custo comparado ao raloxifeno. Também deve ser destacado que a osteonecrose induzida por bisfosfonatos orais é uma possível complicação da terapia com bisfosfonatos. Embora seja rara, de menor severidade, e de maior previsibilidade quando comparada a osteonecrose causada pelos bisfosfonatos endovenosos (Marx et al. 2007).

O tecido ósseo necessita de um equilíbrio entre as suas atividades celulares, traduzido no equilíbrio do metabolismo ósseo onde a taxa de formação é equivalente à taxa de absorção óssea. O predomínio de uma destas respostas pode acarretar respostas prejudiciais à dinâmica do tecido ósseo (Bucay et al. 1998; Simonet et al. 1997).

O osteoblasto, célula chave no comando das respostas do tecido ósseo libera fatores que interferem diretamente na resposta dos osteoclastos, através da sinalização parácrina. Por outro lado, osteoclastos, através de respostas de feedback negativo interferem nas atividades dos osteoblastos. Uma célula atua em função da presença da outra. Hormônios, como fatores sistêmicos e fatores locais podem interferir diretamente neste equilíbrio das células ósseas (Giner et al. 2011).

Uma tentativa de se obter alternativas farmacológicas que poderiam ser utilizadas no tratamento da osteoporose levou a elaboração dos moduladores de receptores de estrógeno. O raloxifeno, fármaco desta classe, é o único aprovado pela FDA para utilização na clínica (Ettinger et al. 1999). O tratamento com raloxifeno e a reposição hormonal ajustam a produção local de citocinas e

fatores de crescimento, diminuem a formação de osteoclastos e aumentam a vida de osteoblastos e osteócitos, além de ter um efeito anti-oxidante ao inibir a apoptose de osteócitos ocasionadas pela ovariectomia (Cao et al. 2002; Stepan et al. 2003). Ou seja, o raloxifeno atua tanto inibindo a reabsorção óssea, como estimulando células que produzem matriz óssea e, talvez por esse motivo, teve um melhor desempenho no longo prazo do que o alendronato neste trabalho.

As medicações usadas no presente trabalho melhoraram a qualidade óssea nos períodos estudados, em relação ao OVX ST, porém numa qualidade inferior ao grupo SHAM. Fica ainda a dúvida quanto qual a qualidade da osseointegração em ossos com as características observadas, com trabéculas mais delgadas, expressão diminuída das proteínas estudadas. Portanto novos estudos avaliando também a osseointegração serão necessários.

1.5 Conclusões

Portanto, baseado nos resultados e dentro dos limites experimentais do presente estudo, podemos observar que:

1. A ovariectomia associada à administração da dieta pobre em cálcio e fosfato é um modelo experimental que representa a perda óssea que caracteriza a osteoporose.
2. Há um prejuízo na dinâmica da resposta do processo de reparo alveolar frente á osteoporose.
3. A administração do alendronato e do raloxifeno consegue melhorar as respostas dinâmicas durante o processo de reparo alveolar.

Agradecimentos

Os autores gostariam de expressar seus protestos de estima e consideração à FAPESP (2010/13971-6), pela concessão de bolsa Mestrado ao primeiro autor (Ramalho-Ferreira G).

1.6 Referências

Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1969; 27:309-318.

Barrett-Connor E, Grady D, Sashegyi A, Anderson PW, Cox DA, Hozowski K, et al. Raloxifene and cardiovascular events in osteoporotic postmenopausal women: Four-year results from the MORE (Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation) randomized trial. *JAMA* 2002; 287:847-857.

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;19:122-131.

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

Chen BL, Xie DH, Zheng ZM, Lu W, Ning CY, Ling YQ et al. Comparison of the effects of alendronate sodium and calcitonin on bone-prosthesis osseointegration in osteoporotic rats. *Osteoporos Int*. 2010; 2: 350-359.

Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley JÁ, et al. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: Results

from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. JAMA 1999; 281: 2189-2197.

Da Paz LH, de Falco V, Teng NC, Dos Reis LM, Pereira RM, Jorgett V. Effect of 17 beta-estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. Braz J Med Res. 2001; 34(8): 1015-1022

Elsubeihi ES, Heersch JMN. Effects of postmenopausal osteoporosis in the mandible. In: Zarb G, Lekholm U, Albrektsson T, Tenenbaum H. *Aging, osteoporosis and dental implants*. London: Quintessence Books, 2002: 207–215.

Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, et al. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: Results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. JAMA 1999;282:637-645.

Giro G. Avaliação radiográfica e biomecânica da influência da osteoporose induzida em ratas e seu tratamento com alendronato e estrógeno, sobre tecido ósseo ao redor de implantes com osseointegração estabelecida. Tese de Mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em Periodontia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP, 2006.

Graziani F, Rosini S, Cei S, La Ferla F, Gabriele M. The effects of systemic alendronate with or without intraalveolar collagen sponges on postextractive bone resorption: a single masked randomized clinical trial. J Craniofac Surg. 2008 Jul;19(4):1061-6.

Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:3540-3545.

Iwamoto J, Yeh JK, Schmidt A, Rowley E, Stanfield L, Takeda T, Sato M. Raloxifene and vitamin K2 combine to improve the femoral neck strength of ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 2005 Aug; 77(2):119-26. Epub 2005 Jul 28.

Kribbs PJ. Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. *J. Prosthet. Dent*. 1990; 63: 218–222.

Lacey DL, Timms E, Tan H-L, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-176.

Long JA, Evans HM. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem. Univ. Calif*. 1922; 6: 1-148.

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(4): 1021-1029.

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

Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med*. 1995 Feb 2;332(5):305-11.

Muñoz-Torres M, Reyes-García R, Mezquita-Raya P, Fernández-García D, Alonso G, Luna Jde D, Ruiz-Requena ME, Escobar-Jiménez F. Serum cathepsin K as a marker of bone metabolism in postmenopausal women treated with alendronate. *Maturitas*. 2009 Nov 20;64(3):188-92.

Netelenbos C. Osteoporosis: intervention options *Maturitas*. 1998; Nov 16;30(3):235-9

Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Araçatuba* 1973; 2:153-169.

Regan MM, Emond SK, Attardo MJ, Parker RA, Greenspan SL. Why do older women discontinue hormone replacement therapy? *J Womens Health Gend Based Med* 2001; 10:343-350.

Russel RG, Rogers MJ. Biphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone*. 1999; 25: 97-106.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89:309-319.

Teófilo JM, Azevedo AC, Petenusci SO, Mazaro R, Lamano-Carvalho TL. Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxilla and proximal tibia of female rats. *Pesq Odontol Bras*. 2003 Oct-Dec;17(4):302-6.

Teófilo JM, Brentegani LG, Lamano-Carvalho TL. Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. *Arch Oral Biol.* 2004 Sep;49(9):755-62.

Theill LE, Boyle Wj, Penninger JM. RANK-Land RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:795-823.

Von Wowern N, Kollerup G. Symptomatic osteoporosis: a risk factor for residual ridge reduction of the jaws. *J. Prosthet. Dent.* 1992; 67: 656–660.

Tabelas

Tabela 1. Valores médios e Desvio padrão (DP) dos resultados da área do coágulo de ratos (% da área total) para todos os grupos após 14 e 42 dias.

Média de PORCENTAGEM	TEMPO	
	14 dias	42 dias
GRUPO		
SHAMDN	13,64 (9,75) ABa	4,71 (3,16) Ab
ALE	19,50 (16,71) ABa	6,67 (3,42) ABb
OVXST	30,33 (15,31) Ba	12,30 (15,99) ABb
RAL	10,50 (10,05) Aa	12,60 (4,79) Ba

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna e letras minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de significância ($P < 0,05$), pelo teste de Nemenyi-Damico-Wolfe-Dunn.

Tabela 2. Valores médios e Desvio padrão (DP) dos resultados da área do tecido conjuntivo de ratos (% da área total) para todos os grupos após 14 e 42 dias.

Média de PORCENTAGEM	TEMPO	
	14 dias	42 dias
GRUPO		
SHAMDN	37,79 (8,65) Aa	17,86 (6,50) Ab
ALE	23,29 (7,13) Ba	20,42 (4,39) Aa
OVXST	34,50 (0,50) ABa	23,90 (18,24) Aa
RAL	41,33 (14,50) Aa	15,10 (4,56) Ab

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna e letras minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de significância ($P < 0,05$), pelo teste de Nemenyi-Damico-Wolfe-Dunn.

Tabela 3. Valores médios e Desvio padrão (DP) dos resultados da área do tecido ósseo de ratos (% da área total) para todos os grupos após 14 e 42 dias.

GRUPO	Média de PORCENTAGEM	TEMPO
		14 dias 42 dias
SHAMDN	40,29 (6,97) Aa	62,57 (8,42) Ab
ALE	44,71 (16,28) Aa	52,33 (8,04) Aa
OVXST	34,33 (12,10) Aa	49,80 (18,32) Aa
RAL	35,67 (10,33) Aa	66,00 (4,95) Ab

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas na coluna e letras minúsculas distintas na linha diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de significância ($P < 0,05$), pelo teste de Nemenyi-Damico-Wolfe-Dunn.

Tabela 4 – Escores obtidos com a análise imunoistoquímica nos grupos avaliados.

GRUPOS	OPG	RANKL	Osteocalcina	TRAP
SHAM	++	+++	++++	++
OVX ST	+++	++++	++++	++++
OVX ALE	+++	++++	++++	++
OVX RAL	+++	++++	+++	++

Figuras

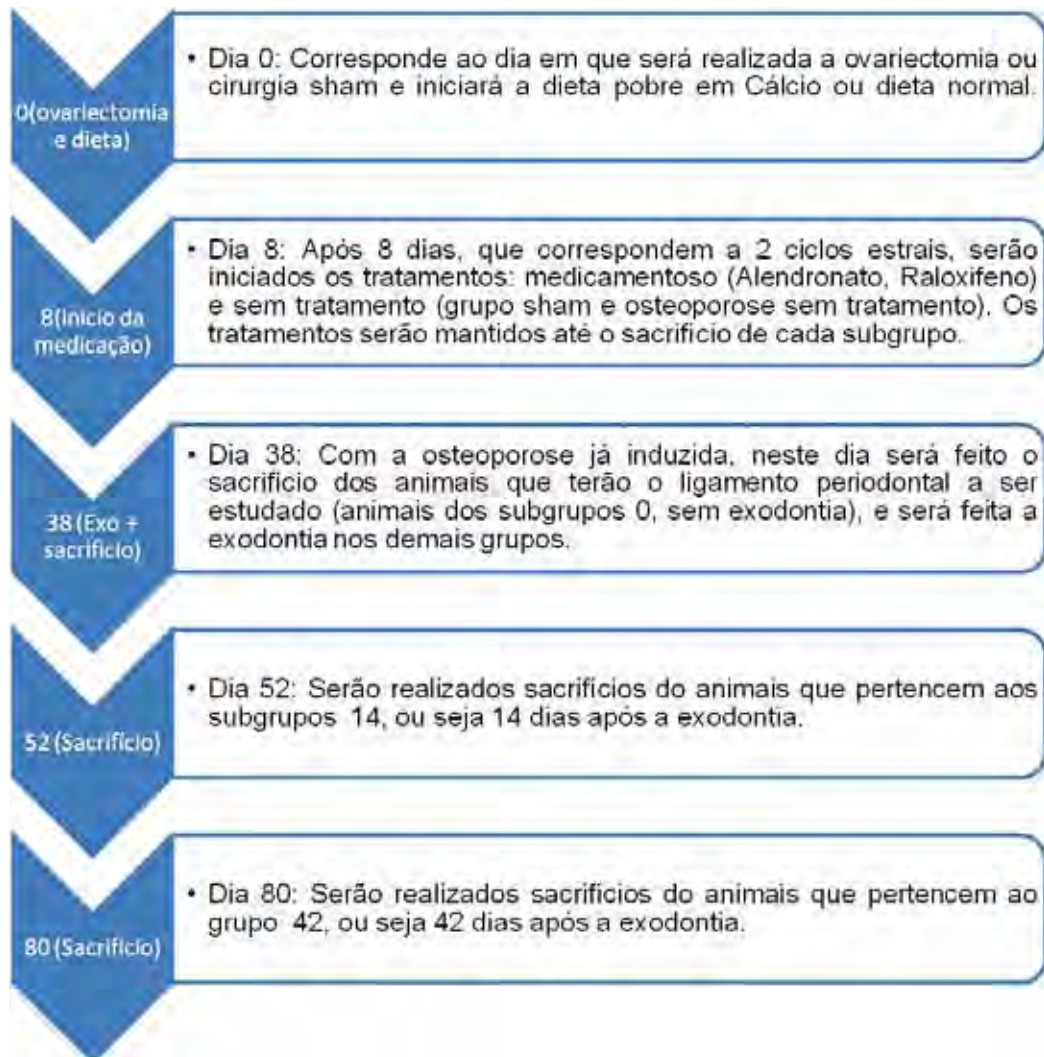


Figura 1 – Cronologia dos eventos experimentais.

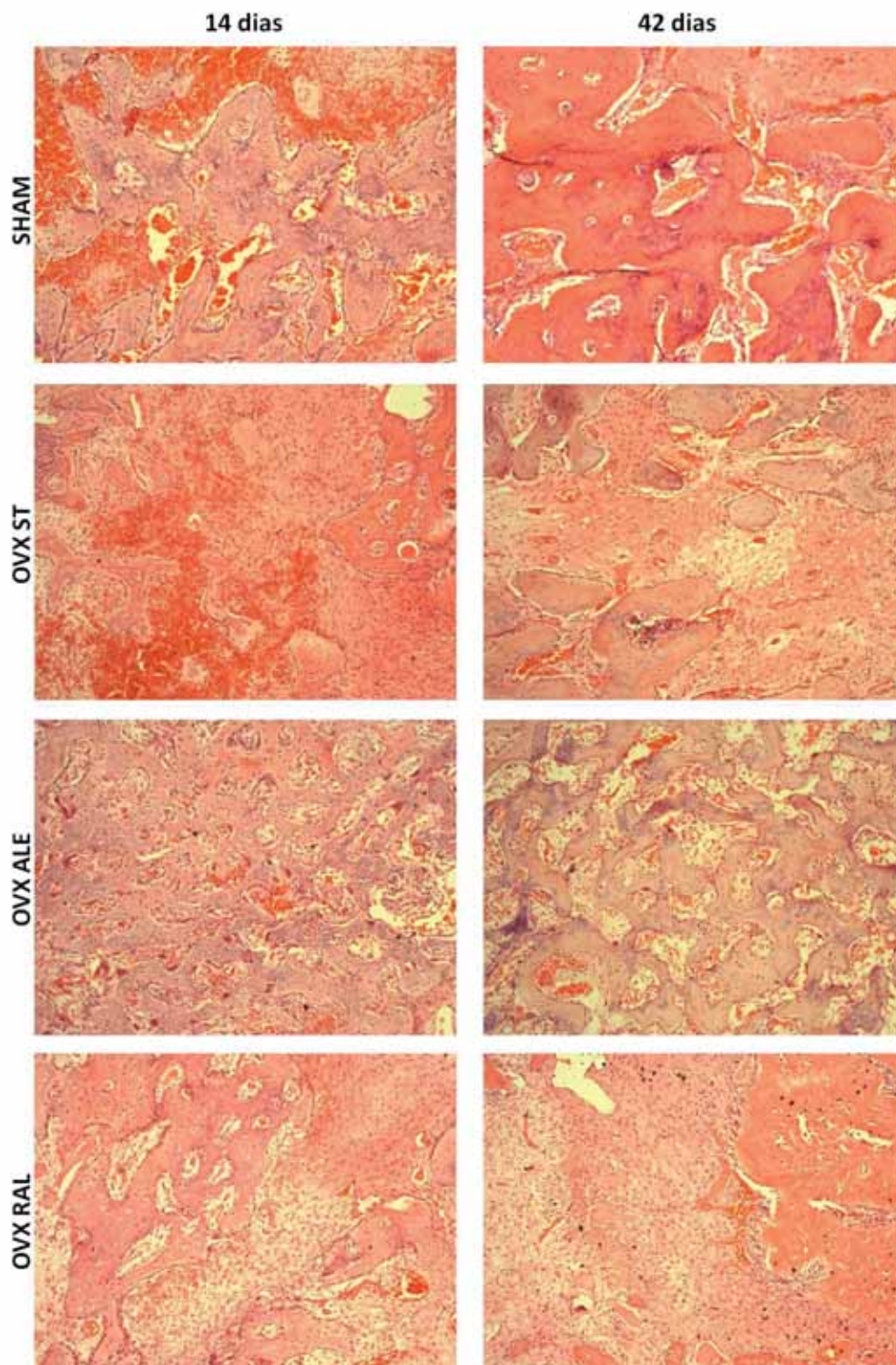
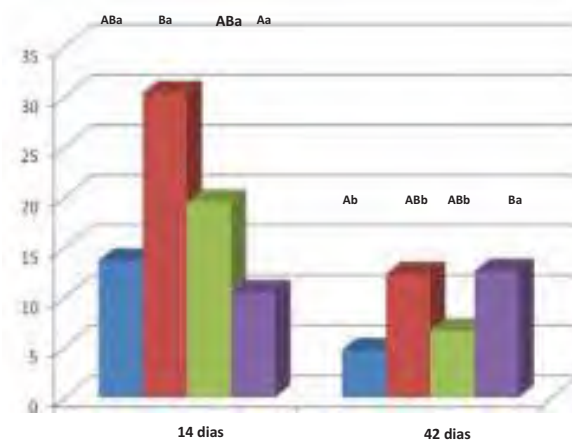


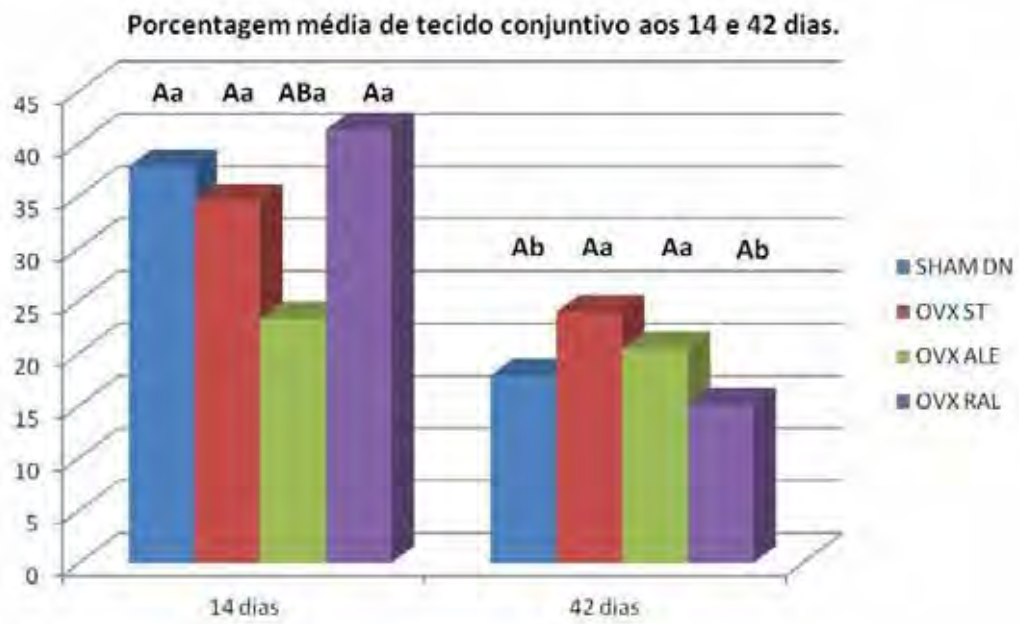
Figura 2 – Cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina (HE) do terço cervical do alvéolo. Grupos SHAM (14 e 42 dias); OVX ST (14 e 42 dias); OVX ALE (14 e 42 dias) e OVX RAL (14 e 42 dias). Original x100.

Porcentagem média de coágulo aos 14 e 42 dias.



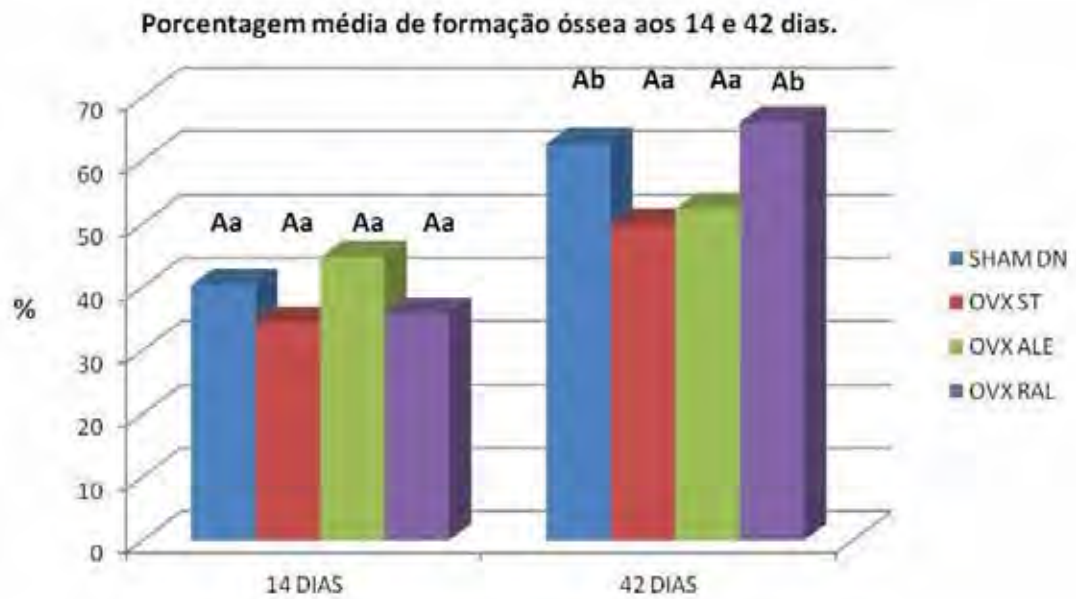
Médias seguidas de letras maiúsculas distintas entre as colunas do mesmo período e letras minúsculas distintas entre os diferentes períodos diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de significância ($P < 0,05$), pelo teste de Nemenyi-Damico-Wolfe-Dunn.

Figura 3 – Gráfico mostrando a porcentagem média de coágulo nos grupos SHAM, OVX ST, OVX ALE e OVX RAL, nos períodos experimentais de 14 e 42 dias.



Médias seguidas de letras maiúsculas distintas entre as colunas do mesmo período letras minúsculas distintas entre os diferentes períodos diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de significância ($P < 0,05$), pelo teste de Nemenyi-Damico-Wolfe-Dunn.

Figura 4 – Gráfico mostrando a porcentagem média de tecido conjuntivo nos grupos SHAM, OVX ST, OVX ALE e OVX RAL, nos períodos experimentais de 14 e 42 dias.



Médias seguidas de letras maiúsculas distintas entre as colunas do mesmo período letras minúsculas distintas entre os diferentes períodos diferem estatisticamente entre si em nível de 5% de significância ($P < 0,05$), pelo teste de Nemenyi-Damico-Wolfe-Dunn.

Figura 5 – Gráfico mostrando a porcentagem média de tecido ósseo neoformado nos grupos SHAM, OVX ST, OVX ALE e OVX RAL, nos períodos experimentais de 14 e 42 dias.

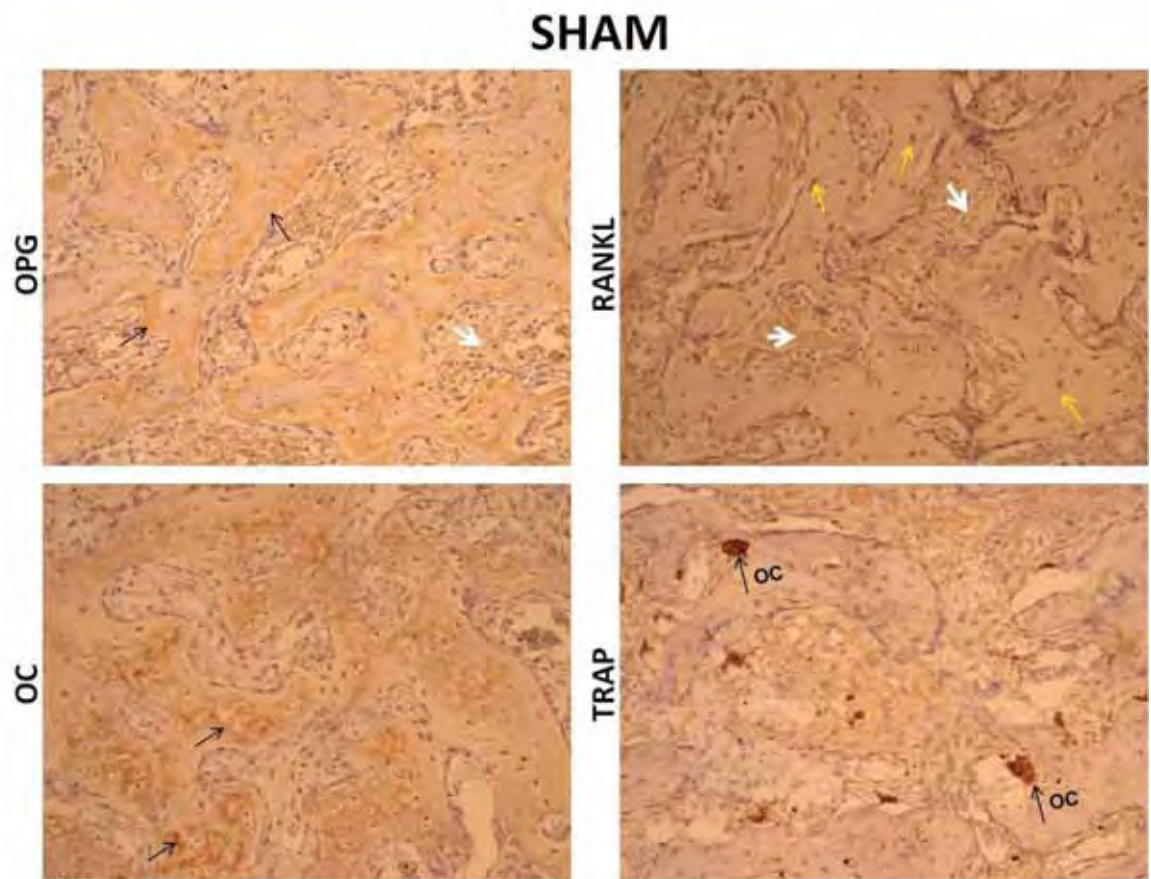


Figura 6 – Expressões das imunomarcações aos 14 dias pós-extração dos animais do grupo SHAM. A OPG foi expressa positivamente no tecido mineralizado (seta preta) e matriz extracelular – MEC (seta branca); Houve expressão da RANKL em osteócitos (Seta amarela) e MEC (seta branca). A osteocalcina foi intensamente expressa no tecido mineralizado (seta preta). E a TRAP foi exibida em alguns osteócitos (seta com OC).Original x200.

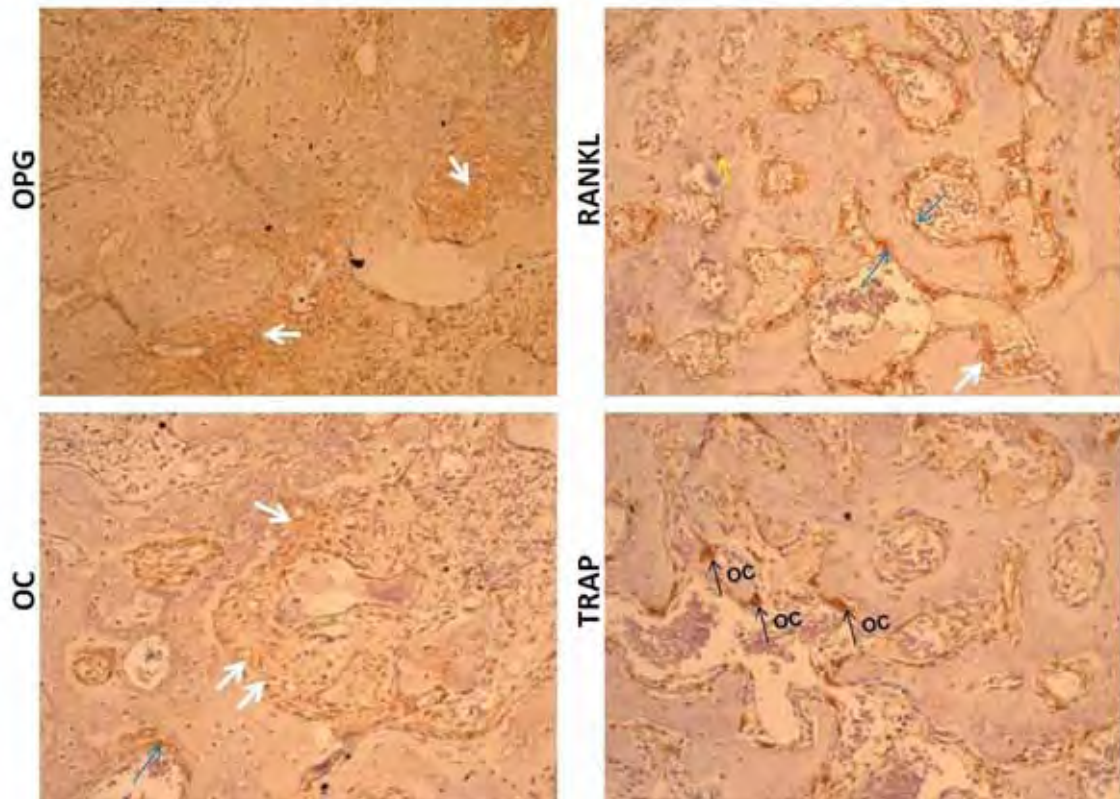
OVX ST

Figura 7 – No grupo OVX ST a OPG foi expressa principalmente na MEC (seta branca). A RANKL foi exibida em osteoblastos (seta azul) e MEC (seta branca); A osteocalcina ficou restrita a MEC (seta branca) e osteoblastos (seta azul); e a TRAP foi intensamente expressada em osteoclastos (seta com OC). Original x200.

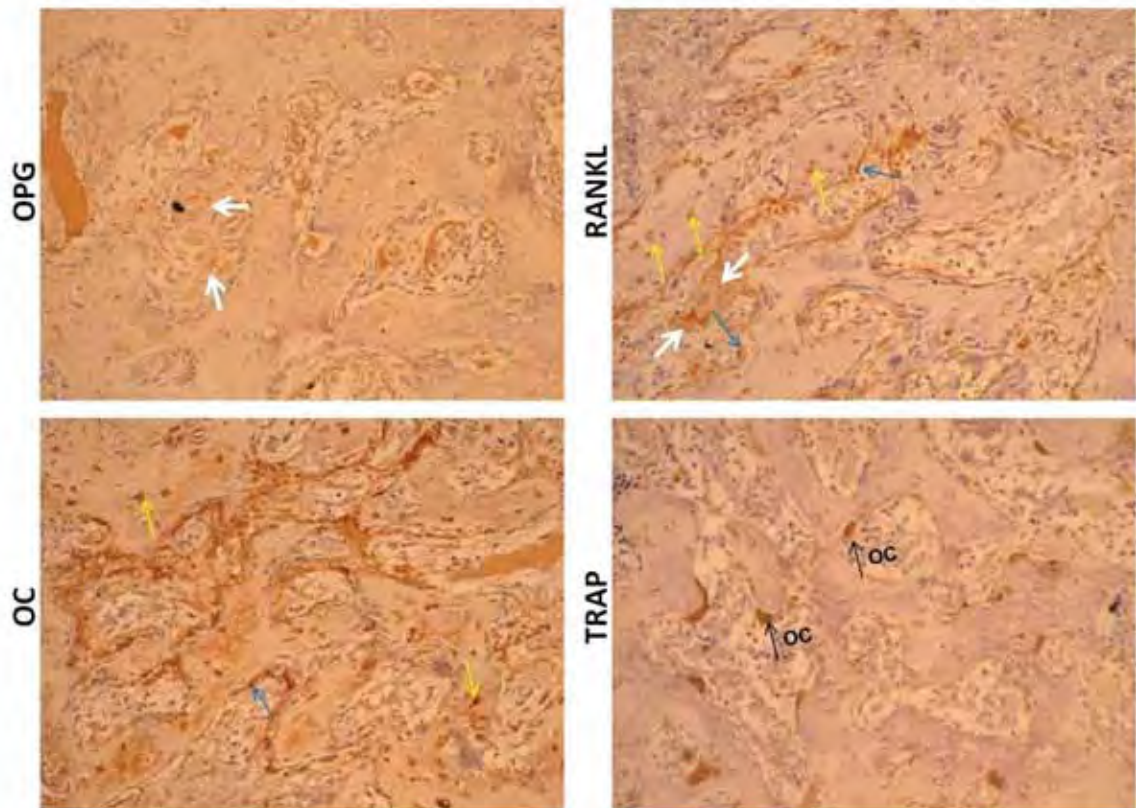
OVX ALE

Figura 8 – No grupo OVX ALE a OPG foi expressa na MEC (seta branca); Já a RANKL corou positivamente osteócitos (setas amarelas), MEC (seta branca) e osteoblastos (setas azuis); a osteocalcina corou osteoblastos (seta azul) e osteócitos (setas amarelas); E TRAP marcou moderadamente osteoclastos (seta com OC). Original x200.

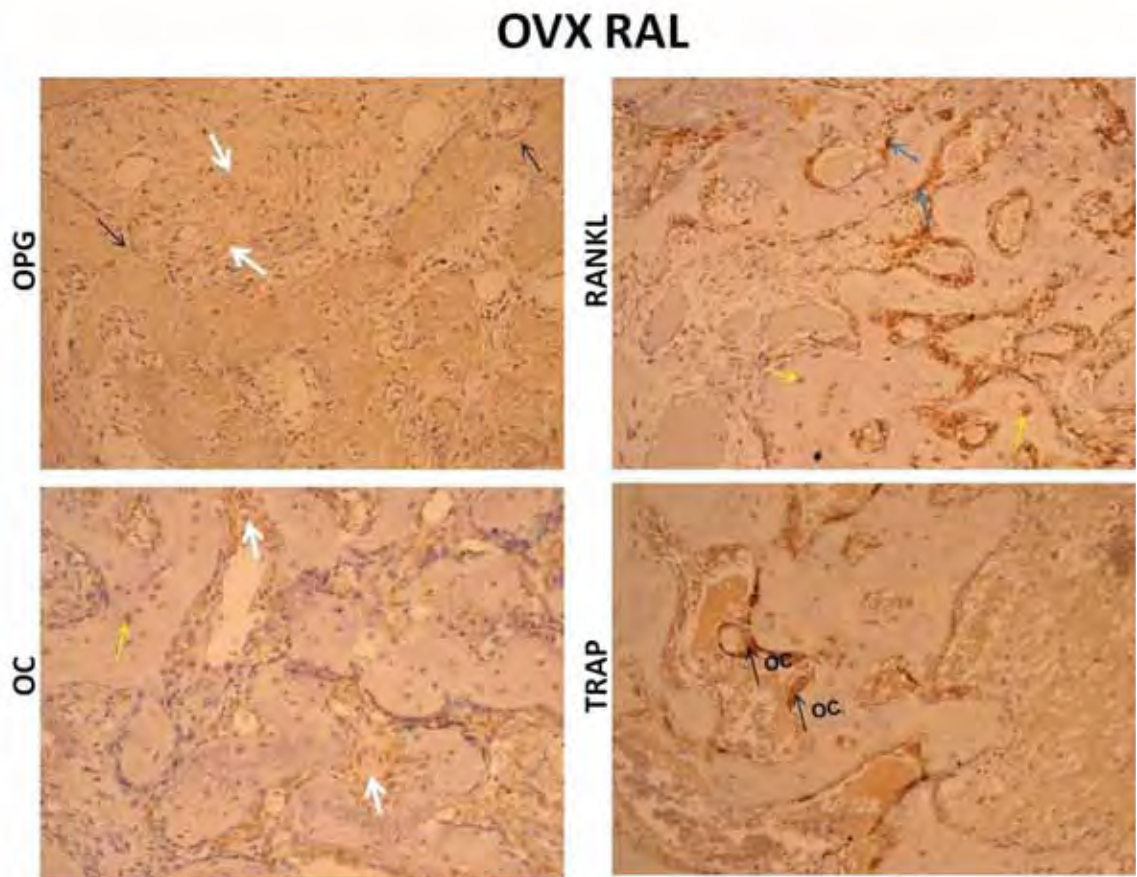
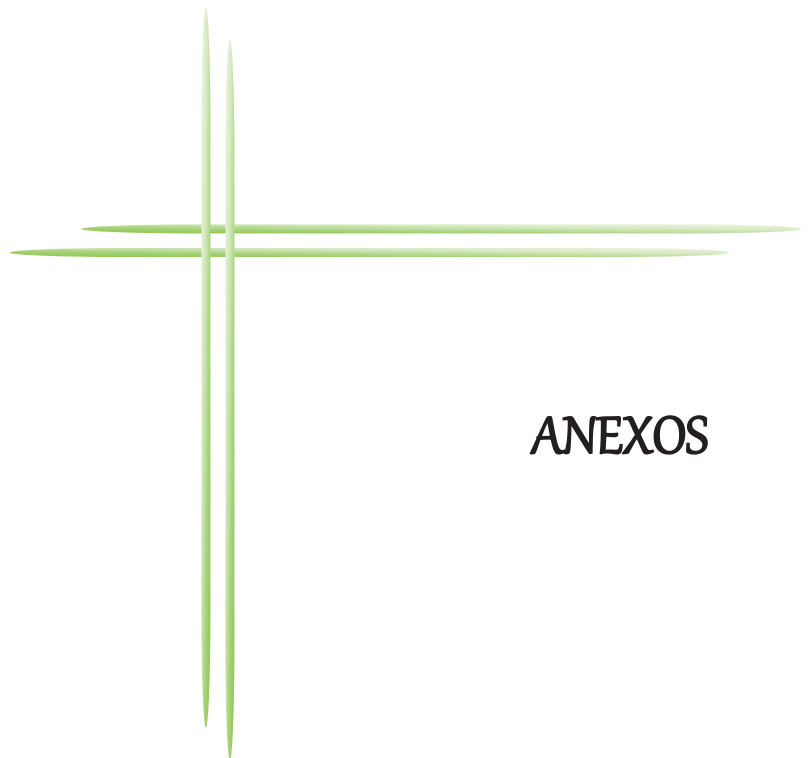


Figura 9 – No grupo OVX RAL a OPG foi expressa no tecido mineralizado (seta preta) e MEC (setas brancas); a RANKL foi expressa em osteoblastos (setas azuis) e osteócitos (setas amarelas); a OC corou a MEC (seta branca) e alguns osteócitos. (seta amarela); a TRAP evidenciou a presença de osteoclastos (setas com OC). Original x200.



ANEXOS

1.7 Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba



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



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR DE RATAS OVARIECTOMIZADAS COM DIETA POBRE EM CÁLCIO E SUBMETIDAS À TERAPIA COM RALOXIFENO OU ALENFRONATO" sob responsabilidade da **Profa. Dra. Roberta Okamoto** e colaboração de **Idelmo Rangel Garcia Junior, Leonardo Perez Faverani, Eloá Rodrigues Lavizuto, Tetuo Okamoto** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) foi aprovado pela CEEA em 21/06/2010 de acordo com os protocolos 2010-003045.

Araçatuba, 21 de Junho de 2010

Prof.ª Adj Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP

1.7 Anexo B- Normas para publicação do periódico Bone

BONE

Cell Molecular Biology; Pathophysiology; Treatment

Guide for Authors

AUTHOR INQUIRIES

Types of article

Types of articles Bone accepts include:

- 1) Memoriam
- 2) Editorial or Commentary
- 3) Review
- 4) Original Articles
- 5) Rapid Communication
- 6) Case Report
- 7) Technical Note
- 8) Letters and Response to Letter to the Editor
- 9) Erratum/Corrigendum
- 10) Announcements

There are no length or format requirements other than those already shown on the GFA under Article Structure.

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the

corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant

awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

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

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files

are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not

included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the

author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use Highlights in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 20 words per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations

firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking and Accession numbers

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: Database ID: xxxx

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

-
- GenBank: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
 - PDB: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
 - CCDC: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
 - TAIR: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
 - NCT: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
 - OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
 - MINT: Molecular INTERactions database (MINT ID: 6166710)
 - MI: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
 - UniProt: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are

included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations:

<http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our

recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

1.7 Anexo C- Tabelas dos valores de P e significância estatística

Tabela 1 – Valores de p para coágulo.

P-valores:

	ALE-14 d	OVXST-14 d	RAL-14 d	SHAMDN-14 d	ALE-42 d	OVXST-42 d	RAL-42 d	SHAMDN-42 d
ALE-14 d	1	0,344	0,170	0,511	0,039	0,104	0,871	0,005
OVXST-14 d	0,344	1	0,045	0,145	0,011	0,028	0,306	0,002
RAL-14 d	0,170	0,045	1	0,459	0,504	0,755	0,269	0,187
SHAMDN-14d	0,511	0,145	0,459	1	0,152	0,305	0,661	0,032
ALE-42 d	0,039	0,011	0,504	0,152	1	0,746	0,082	0,532
OVXST-42 d	0,104	0,028	0,755	0,305	0,746	1	0,175	0,352
RAL-42 d	0,871	0,306	0,269	0,661	0,082	0,175	1	0,017
SHAMDN-42d	0,005	0,002	0,187	0,032	0,532	0,352	0,017	1

Tabela 2 – Diferenças estatísticas para valores de p para coágulo.

Diferenças Significativas:

	ALE-14 d	OVXST-14 d	RAL-14 d	SHAMDN-14 d	ALE-42 d	OVXST-42 d	RAL-42 d	SHAMDN-42 d
ALE-14 d	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim
OVXST-14 d	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Sim
RAL-14 d	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
SHAMDN-14 d	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
ALE-42 d	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
OVXST-42 d	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não
RAL-42 d	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim
SHAMDN-42 d	Sim	Sim	Não	Sim	Não	Não	Sim	Não

Tabela 3 – Valores de p para o tecido conjuntivo.

P-valores:

	ALE-14 d	OVXST-14 d	RAL-14 d	SHAMDN-14 d	ALE-42 d	OVXST-42 d	RAL-42 d	SHAMDN-42 d
ALE-14 d	1	0,158	0,046	0,046	0,622	0,617	0,123	0,282
OVXST-14 d	0,158	1	0,847	0,896	0,077	0,083	0,010	0,025
RAL-14 d	0,046	0,847	1	0,934	0,016	0,020	0,001	0,002
SHAMDN-14d	0,046	0,896	0,934	1	0,016	0,020	0,001	0,002
ALE-42 d	0,622	0,077	0,016	0,016	1	0,975	0,298	0,589
OVXST-42 d	0,617	0,083	0,020	0,020	0,975	1	0,334	0,630
RAL-42 d	0,123	0,010	0,001	0,001	0,298	0,334	1	0,574
SHAMDN-42d	0,282	0,025	0,002	0,002	0,589	0,630	0,574	1

Tabela 4 – Diferenças estatísticas para valores de p para o tecido conjuntivo.

Diferenças Significativas:

	ALE-14 d	OVXST-14 d	RAL-14 d	SHAMDN-14 d	ALE-42 d	OVXST-42 d	RAL-42 d	SHAMDN-42 d
ALE-14 d	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
OVXST-14 d	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim
RAL-14 d	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
SHAMDN-14 d	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
ALE-42 d	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
OVXST-42 d	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
RAL-42 d	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
SHAMDN-42 d	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não

Tabela 5 – Valores de p para o tecido ósseo.

P-valores:

	ALE-14 d	OVXST-14 d	RAL-14 d	SHAMDN-14 d	ALE-42 d	OVXST-42 d	RAL-42 d	SHAMDN-42 d
ALE-14 d	1	0,274	0,244	0,598	0,323	0,507	0,012	0,028
OVXST-14 d	0,274	1	0,881	0,494	0,065	0,118	0,002	0,005
RAL-14 d	0,244	0,881	1	0,510	0,038	0,087	0,000	0,001
SHAMDN-14d	0,598	0,494	0,510	1	0,135	0,252	0,003	0,006
ALE-42 d	0,323	0,065	0,038	0,135	1	0,790	0,126	0,260
OVXST-42 d	0,507	0,118	0,087	0,252	0,790	1	0,085	0,178
RAL-42 d	0,012	0,002	0,000	0,003	0,126	0,085	1	0,608
SHAMDN-42d	0,028	0,005	0,001	0,006	0,260	0,178	0,608	1

Tabela 6 – Diferenças estatísticas para valores de p para o tecido ósseo.

Diferenças Significativas:

	ALE-14 d	OVXST-14 d	RAL-14 d	SHAMDN-14 d	ALE-42 d	OVXST-42 d	RAL-42 d	SHAMDN-42 d
ALE-14 d	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim
OVXST-14 d	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim
RAL-14 d	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Sim	Sim
SHAMDN-14 d	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim
ALE-42 d	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
OVXST-42 d	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
RAL-42 d	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não
SHAMDN-42 d	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não	Não