

Willian Morais de Melo

**Efeito do tratamento com Raloxifeno sobre o processo de
reparo de reimplante dentário tardio. Estudo histológico
em ratas**

2015

Willian Morais de Melo

**Efeito do tratamento com Raloxifeno sobre o processo de
reparo de reimplante dentário tardio. Estudo histológico
em ratas**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba da Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de doutor em Odontologia – ÁREA de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Prof. Adj. Dr. Celso Koogi Sonoda

Araçatuba – SP

2015

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M528e Melo, Willian Morais de.
Efeito do tratamento com raloxifeno sobre o processo de reparo de reimplante dentário tardio : estudo histológico em ratas / Willian Morais de Melo. - Araçatuba, 2015
85 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Celso Koogi Sonoda

1. Reimplante dentário 2. Ovariectomia 3. Raloxifeno
4. Ligamento periodontal I. T.

Black D7
CDD 617.64

Dados Curriculares

Willian Morais de Melo

Nascimento : 08.01.1982

Filiação : Sérgio Luiz de Melo
Clélia Helena de Morais Melo

- 2012 - 2015** **Doutorado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.**
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil. Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- 2010 - 2012** **Mestrado em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.**
Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- 2007 - 2010** **Residência em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.**
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil.
- 2001 - 2005** **Graduação em Odontologia.**
Universidade Federal de Alfenas, Unifal, Alfenas, Minas Gerais, Brasil.

Dedicatória

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia e socorro presente na hora da angústia.

Aos meus pais Clélia e Sérgio pela educação valiosa, apoio constante, amor e compreensão que sempre me concederam.

A minha irmã Ingrid pelo apoio e incentivo, mesmo a distância.

A minha esposa, amiga e companheira Rangelly que nos anos de minha formação esteve sempre ao meu lado dividindo sonhos, apoiando, torcendo e me amparando nos momentos difíceis. Você é a razão da minha eterna busca por me tornar um ser humano melhor.

À vocês, meu eterno obrigado.

Agradecimentos Especiais

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador Prof. Adj. Dr. Celso Koogi Sonoda, meu muito obrigado pela orientação, dedicação, paciência e, principalmente, pela amizade. Por acreditar em mim e partilhar comigo seus conhecimentos durante todo o desenvolvimento do trabalho, somando a minha formação valores inestimáveis.

A Profa. Ass. Dra. Roberta Okamoto muito obrigado pelos ensinamentos a mim dedicados, por sua simpatia, disponibilidade e pela inestimável colaboração frente à execução desse projeto.

Ao Prof. Ass. Dr. Francisley Ávila Souza pelos momentos de bate papo e troca de conhecimentos, pelo incentivo e apoio, meu imenso agradecimento.

Aos professores do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada agradeço pelo convívio enriquecedor e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

A funcionária aposentada Dirce pelo auxílio e prestatividade durante a realização desse projeto, meu muito obrigado.

Aos amigos Willian Caetano Rodrigues e Rafael Santiago, obrigado pela colaboração na realização desse projeto e sobretudo pela grande amizade, apoio e compreensão. O acolhimento e as experiências divididas durante esses anos em Araçatuba serão sempre lembrados.

Aos amigos André Fabrís, Júlio Cesar e Lamís Meorin Nogueira obrigado pela valiosa ajuda e colaboração na realização desse projeto.

Aos meus amigos do Curso de Mestrado da FORP-USP, Antônio Azoubel, Darklilson Santos, Marcos Brêda, Gustavo Grossi, André Pepato, Fernando Pando e Emanuela Ferraz. Turma realmente humana e de bom coração, galera de "Peso"... Sinto saudades dos cafezinhos e dos rodíziozinhos. Sempre estarei torcendo por vocês, vocês sempre serão lembrados...

Resumo

Resumo*

de Melo WM. Efeito do tratamento com Raloxifeno sobre o processo de reparo de reimplante dentário tardio. Estudo histológico em ratas. (Tese). Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2015.

Objetivos: O objetivo do trabalho foi analisar o efeito da ovariectomia e a terapia de reposição hormonal com 17β -estradiol e raloxifeno no processo de reparo do reimplante dentário tardio por meio da análise histomorfométrica em ratas. **Materiais e métodos:** Quarenta ratas Wistar (*Rattus norvegicus, albinus*) com ciclos estrais normais foram divididas aleatoriamente em 04 grupos: grupo Sham (grupo controle), grupo OVX/O (ratas ovariectomizadas e instalação de pellet com óleo de milho), grupo OVX/E (ratas ovariectomizadas e instalação de pellet com 17β -estradiol), e grupo OVX/R (ratas ovariectomizadas e tratadas com raloxifeno). Após 08 dias da ovariectomia, foi realizado extração dos incisivos superiores direito seguido de reimplante dentário tardio. Os animais sofreram eutanásia aos 60 dias após o reimplante para realização da análise histomorfométrica. **Resultados:** Existiram diferenças estatísticas ($P < 0,05$) favoráveis para os grupos OVX/E e OVX/R comparados aos demais grupos, com relação as variáveis reabsorção inflamatória, e reabsorção total; não existiram diferenças estatísticas com relação a reabsorção por substituição ($P \geq 0,05$). Em relação ao perímetro de anquilose, constatou-se diferenças estatísticas favoráveis nos grupos OVX/E e OVX/R, comparados aos grupos Sham e OVX/O ($P < 0,05$). Em relação ao perímetro de ligamento periodontal,

observou-se que os grupos OVX/E e OVX/R apresentaram resultados estatisticamente favoráveis sobre os demais grupos, sendo que o grupo OVX/R apresentou também diferenças estatísticas favoráveis comparado ao grupo OVX/E ($P < 0,05$). **Conclusão:** Esses dados permitem concluir que a ovariectomia influenciou de forma significativa no processo de reparo do reimplante tardio. A terapia com raloxifeno favoreceu a permanência de tecido fibroso/ligamento periodontal, e diminuição do índice de reabsorção inflamatória e reabsorção total.

Palavras-chave: reimplante dentário; ovariectomia; raloxifeno; ligamento periodontal.

* Normalização segundo a revista *Dental Traumatology* (Anexo A).

Abstract

Abstract

de Melo WM. Effects of raloxifene treatment on wound healing following delayed tooth replantation: histomorphometric analysis in rats. (Thesis) Araçatuba: Dentistry School of Estadual Paulista University; 2015.

Objectives: The objective of this study was to analyze the effect of ovariectomy and estrogen replacement therapy with 17β -estradiol or raloxifene treatment on periodontal tissues after delayed tooth replantation using histomorphometric analysis in rats. **Materials and methods:** Forty Wistar rats (*Rattus norvegicus*, Albinus) with normal estrous cycles were divided into 04 groups: Sham group (control group), OVX/O group (ovariectomized rats with corn oil pellet), OVX/E group (ovariectomized rats with 17β -estradiol pellet), and OVX/R group (ovariectomized rats treated with raloxifene). After 08 days of ovariectomy, it was performed extraction of upper incisors followed by delayed tooth replantation. The animals were euthanized 60 days after reimplantation to perform the histomorphometric analysis. **Results:** There were statistically significant differences ($P < 0.05$) favorable to the OVX/E and OVX/R groups compared to the other groups regarding the variables inflammatory resorption, and total resorption; there were no statistical differences with respect to replacement resorption ($P \geq 0.05$). In relation to the perimeter of ankylosis, it has been found favorable statistical differences in the OVX/E and OVX/R groups, compared with OVX/O and Sham groups ($P < 0.05$). Regarding the perimeter of periodontal ligament, it was found that OVX/E and OVX/R groups had statistically favorable results of the other groups, and the OVX/R group also showed favorable statistical

differences compared to the OVX/E group ($P < 0.05$). **Conclusion:** These data support the conclusion that ovariectomy had a significant influence in the healing process of delayed tooth replantation. Raloxifene therapy favored the permanence of fibrous tissue/periodontal ligament, and decreased inflammatory resorption and total resorption rate.

Key words: tooth replantation; ovariectomy; raloxifene; periodontal ligament.

Lista de Figuras

Figura 1	Superfície radicular com integridade da camada de cimento (C). Ligamento periodontal (LP) com fibras colágenas dispostas paralelamente a superfície radicular. H.E. 100X.....	28
Figura 2	Área de anquilose e reabsorção radicular por substituição (setas) comprometendo a camada superficial da raiz. H.E. 100X.....	28
Figura 3	Área extensa da superfície cementária (C) recoberta por tecido ósseo (TO) caracterizando a anquilose alveolodentária. H.E. 100X.....	29
Figura 4	Área de tecido conjuntivo fibroso (TCF) com fibras colágenas sem organização definida em contato com a superfície de cimento (C). H.E. 100X.....	31
Figura 5	Reabsorção inflamatória comprometendo maior profundidade da dentina (D). Tecido conjuntivo fibroso (TCF) com infiltrado inflamatório preenchendo a área de dentina reabsorvida. H.E. 100X.....	31
Figura 6	Área de reabsorção radicular inflamatória. Presença de clastos na parede dentinária reabsorvida (seta) H.E. 200X.....	32
Figura 7	Área extensa de cimento (C) íntegro recoberto por tecido ósseo TO). H.E. 100X.....	34

Figura 8	Reabsorção por substituição (RS) comprometendo a camada mais superficial da dentina (D). H.E. 100X.....	34
Figura 9	Área de reabsorção por substituição (seta 1) ao lado de reabsorção inflamatória (seta 2) localizada mais superficialmente à camada de dentina. H.E.100X.....	35
Figura 10	Presença de tecido ósseo neoformado (asterisco) formando área de anquilose e tecido conjuntivo fibroso (seta), com manutenção da integridade da camada de cimento (C). H.E. 100X	37
Figura 11	Reabsorção por substituição (seta 1) e pequeno ponto de reabsorção inflamatória (seta 2) comprometendo a camada superficial da dentina. H.E. 100X.....	37
Figura 12	Área de anquilose (A) e pontos de reabsorção por substituição (RS) na camada mais superficial da dentina (D). H.E. 100X.....	38
Figura 13	Tricotomia.....	74
Figura 14	Exposição do ovário.....	74
Figura 15	Remoção do ovário.....	74
Figura 16	Sutura, após a ovariectomia.....	74
Figura 17	Sindesmotomia.....	74
Figura 18	Luxação do incisivo superior direito.....	75
Figura 19	Extração dentária.....	75
Figura 20	Aspecto clínico do incisivo extraído.....	75
Figura 21	Dentes mantidos em bancada em meio seco por 60”	75
Figura 22	Remoção da papila dentária e órgão do esmalte.....	75

Figura 23	Remoção do ligamento periodontal por fricção com gaze.....	75
Figura 24	Remoção da polpa radicular por via retrógrada.....	75
Figura 25	Irrigação com soro fisiológico.....	75
Figura 26	Secagem do canal com cone de papel absorvente.....	76
Figura 27	Pó de cimento de hidróxido de cálcio PA para obtenção do cimento obturador.....	76
Figura 28	Preenchimento do conduto radicular com pasta de hidróxido de cálcio.....	76
Figura 29	Reimplante dentário.....	76
Figura 30	Dente reimplantado.....	76
Figura 31	Fotomicrografia digitalizada é exibida na área de trabalho do software Image J.....	77
Figura 32	Início da delimitação da área de reabsorção inflamatória da raiz, utilizando a ferramenta “Selecionar regiões”.....	78
Figura 33	Demarcação da área delimitada por meio da ferramenta “Cálculo de regiões”.....	79
Figura 34	Obtenção da “Planilha de cálculos” exibindo o valor, em pixels, da área de reabsorção inflamatória	80
Figura 35	Delimitação do perímetro de remanescentes do ligamento periodontal.....	81
Figura 36	“Planilha de cálculos” exibindo o perímetro de remanescentes de ligamento periodontal.....	82

Lista de Tabelas

Tabela 1	Distribuição das médias e desvio padrão (DP) expresso em porcentagem de cada grupo, em relação às reabsorções radiculares avaliadas.....	39
Tabela 2	Distribuição das médias e desvio padrão (DP) expresso em porcentagem de cada grupo, em relação aos perímetros de anquilose e remanescentes do ligamento periodontal.....	41
Tabela 3	Porcentagem das médias e desvio padrão (DP) da reabsorção inflamatória (RI), reabsorção por substituição (RS), reabsorção total (RT), perímetro de anquilose (PA) e perímetro de ligamento periodontal (PLP) obtida em cada espécime.....	83

Lista de Gráficos

Gráfico 1	Porcentagem das médias e desvio padrão dos valores de reabsorção inflamatória, reabsorção por substituição e reabsorção total de cada grupo experimental apresentados na Tabela 1.....	40
Gráfico 2	Porcentagem das médias e desvio padrão dos valores do perímetro de anquilose e perímetro dos remanescentes do ligamento periodontal de cada grupo experimental apresentados na Tabela 2.....	42

Lista de Abreviaturas

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

g - Grama.

H.E. – Expressa a técnica de coloração das lâminas - Hematoxilina e Eosina.

Kg - Unidade fundamental de medida de massa.

mg – Miligramas, equivalente à milésima parte do grama.

mg/Kg – Miligramas por quilo.

mL – Mililitros, equivalente à milésima parte do litro.

mm - Milímetro, equivalente a milésima parte do metro.

Sham – Ratas controle; submetidas à ovariectomia fictícia.

OVX/O – Grupo de ratas ovariectomizadas que receberam pellet de óleo de milho.

OVX/E – Grupo de ratas ovariectomizadas que receberam pellet de 17 β -estradiol.

OVX/R – Grupo de ratas ovariectomizadas que receberam raloxifeno.

μ g/ml – Microgramas por mililitros.

TO – Tecido ósseo.

RI – Reabsorção inflamatória.

RS – Reabsorção por substituição.

RT – Reabsorção total; somatório da RI e RS.

PA – Perímetro de anquilose.

PLP – Perímetro de remanescentes do ligamento periodontal.

D – Camada de dentina.

C – Camada de cimento.

TCF – Tecido conjuntivo fibroso.

Sumário

1. Introdução	18
2. Proposição	20
3. Material e Método	21
4. Resultado	27
5. Discussão	43
6. Conclusão	47
7. Referências	48
Anexo A – Normas do periódico “Dental Traumatology”	54
Anexo B - Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)	73
Anexo C – Ilustração dos Procedimentos Cirúrgicos	74
Anexo D – Ilustração da Análise Histomorfométrica	77
Anexo E – Tabela de Valores da Histomorfometria	83

Introdução

1. Introdução

Na Literatura, existem relatos epidemiológicos que sugerem que o traumatismo dentário deva ser considerado um problema de Saúde Pública, devido ao aumento da sua incidência, podendo gerar efeitos negativos consideráveis sobre os aspectos funcional, estético, psicológico, social e terapêutico (1-3). Embora, o traumatismo dentário seja mais comumente observado em crianças e adolescentes, esse trauma pode afetar indivíduos de qualquer idade (4,5).

Nesse contexto, a avulsão dentária é considerada um dos mais severos tipos de traumatismo dentário por expor a raiz ao meio externo, comprometendo de forma significativa a integridade do ligamento periodontal (6). O tratamento de escolha nesses casos é o reposicionamento do dente avulsionado no alvéolo, ou seja, o reimplante dentário (6). Após o reimplante, pode haver reabsorção radicular inflamatória, de superfície, por substituição, e anquilose, consequências indesejáveis que levam frequentemente à perda dentária (5).

Observa-se que o sucesso da manutenção do dente reimplantado está diretamente relacionado com a presença, tipo e velocidade do processo de reabsorção radicular (5,7-9) bem como a fatores locais e sistêmicos (5,7,10-13). Dentre os fatores sistêmicos, destaca-se a deficiência de estrógeno na circulação sanguínea e a osteoporose provocadas fisiologicamente ou cirurgicamente pela ovariectomia (14,15); assunto pouco estudado na Literatura frente à terapia de reposição hormonal com 17β -estradiol ou raloxifeno associado à metodologia experimental de reimplante dentário.

O estrógeno é um hormônio que tem um importante papel no controle do metabolismo ósseo regulando a expressão de proteínas como a osteoprotegerina (OPG) (16,17) e RANKL (17) e citocinas pró-inflamatórias (18,19). A sua deficiência

causa a liberação de citocinas, como a IL-6 e TNF- α , que desempenham um papel destrutivo ao tecido ósseo, e têm sido relacionadas à patogênese da osteoporose (19). Mulheres que possuem deficiência de estrógeno ou risco de desenvolver a osteoporose são tratadas geralmente com terapia de reposição hormonal com 17- β estradiol, ou com moduladores seletivos do receptor de estrógeno (SERMs), representado pelo raloxifeno, ou bisfosfonatos (20,21).

O raloxifeno (análogo do benzotiofeno) é um modulador seletivo dos receptores de estrógeno que previne a perda óssea. Esse medicamento é usado no tratamento e prevenção da osteoporose em muitos países, devido a sua atividade seletiva nos receptores de estrógeno no tecido ósseo. De acordo com a Literatura, o raloxifeno reduz a expressão dos marcadores do turnover ósseo, aumenta a densidade do tecido ósseo, reduz em 50 a 30% dos riscos de fraturas de vertebrae nas mulheres com menopausa precoce, diminui a incidência de câncer de mama e altera as concentrações de lipídeos na corrente sanguínea (17,18,20,21).

Uma série de condições locais e sistêmicas interage e determina o resultado final do processo de reparo do reimplante dentário. A perda dentária é uma das principais sequelas do traumatismo dentário e identificar os mecanismos envolvidos neste processo continua a ser um desafio (22). Compreender os fenômenos biológicos que norteiam a reparação do reimplante dentário relacionados com a deficiência de estrógeno continua a ser um campo de interesse para a pesquisa de traumatologia dentária.

Portanto, foi objetivo do presente estudo *in vivo* investigar o efeito da deficiência de estrógeno após a ovariectomia e tratamento de reposição hormonal com 17- β estradiol ou raloxifeno após o reimplante dentário tardio por meio da análise histomorfométrica.

Proposição

2. Proposição

O objetivo do trabalho foi investigar *in vivo* o efeito da deficiência de estrógeno após a ovariectomia e tratamento de reposição hormonal com 17 β -estradiol ou raloxifeno após o reimplante dentário tardio por meio da análise histomorfométrica.

Material e Métodos

3. *Material e Métodos*

Comitê de Ética e Cuidados com os Animais

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP e aprovado (processo - 00517-2013, Anexo B). Todos os cuidados com os animais foram rigorosamente seguidos.

Foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com peso de 200 a 220 g, mantidas em gaiolas no biotério do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, com luz e temperatura controladas (12 h luz/12 escuro) e alimentadas com ração balanceada (Ração ativada Produtor, Moinho Primor S/A), exceto 24 horas antes da intervenção cirúrgica e água *ad libitum*.

Foi realizado estudo diário do ciclo estral pela técnica descrita por Long & Evans (23) e após a obtenção de 03 ciclos regulares, foram selecionadas 40 ratas para o experimento, distribuídas aleatoriamente em 10 animais para cada grupo experimental.

Delineamento do Estudo e Procedimento Cirúrgico

Os animais foram divididos aleatoriamente em 04 grupos, sendo, grupo Sham (ovariectomia fictícia); grupo OVX/O (ovariectomia bilateral e pellet contendo óleo de milho); grupo OVX/E (ovariectomia bilateral e pellet contendo 17 β -estradiol); grupo OVX/R (ovariectomia bilateral e terapia com raloxifeno).

Esses animais foram anestesiados por via intramuscular com a associação de Cloridrato de Xilazina (Dopaser, Laboratório Calier do Brasil Ltda®, Osasco, SP, Brasil) na dosagem de 10 mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Ketamina (Doálen AgriBands Ltda®, Paulínea, SP, Brasil) na dosagem de 80 mg/Kg de peso corporal para serem submetidos bilateralmente a exposição cirúrgica dos ovários (grupo Sham) ou a remoção dos mesmos (grupos OVX/O, OVX/E e OVX/R). As tubas uterinas foram ligadas com sutura (4,0 Catgut; Ethicon®, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil) anteriormente a remoção dos ovários (Anexo C). As incisões foram feitas com sutura interna (3,0 Catgut; Ethicon®, São Paulo, Brasil) e sutura externa (4,0 Silk, Ethicon®, Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil).

Nos animais do grupo OVX/O, imediatamente após a ovariectomia, foi introduzido no subcutâneo da região dorsal um pellet de 1,2 cm (Silastic Tubing; Dow Corning, Grand Rapids, MI, USA) contendo óleo de milho. Nos animais do grupo OVX/E, imediatamente após a ovariectomia, foi introduzido no subcutâneo da região dorsal um pellet de 1,2 cm (Silastic Tubing; Dow Corning, Grand Rapids, MI, USA) contendo óleo de milho e 17β -estradiol (400 μ g; Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, USA) que foi trocado após 30 dias. Nos animais do grupo OVX/R foi realizado gavagem para liberação diretamente no estômago do animal o raloxifeno (Evista; Lilly®, São Paulo, SP, Brasil) na dosagem de 1 mg/Kg por peso corporal ao dia, iniciado no primeiro dia após à ovariectomia. Cada animal recebeu, no pós-operatório imediato, dose única de antibiótico penicilina G benzatina (administração intramuscular de 0,2 mL/animal).

Extração e Reimplante Dentário

Oito dias após o procedimento cirúrgico de ovariectomia, quarenta animais foram submetidos à cirurgia de extração do incisivo superior direito. Para isso, esses animais foram anestesiados com a associação de Cloridrato de Xilazina (Dopaser, Laboratório Calier do Brasil Ltda®, Osasco, SP, Brasil) na dosagem de 10 mg/Kg de peso corporal e Cloridrato de Ketamina (Doálen AgriBands Ltda®, Paulínea, SP, Brasil) na dosagem de 80 mg/Kg de peso corporal para a obtenção do efeito anestésico. Uma vez imobilizado o animal, foi realizada a antisepsia da porção anterior da maxila com polivinilpirrolidona-iodo (Riodeine-Ind. Farmac Rioquímica Ltda®, São José do Rio Preto, SP, Brasil), sindesmotomia, luxação e extração do incisivo superior direito com auxílio de instrumental especialmente adaptado.

Em todos os grupos, os dentes extraídos foram mantidos presos pela coroa em lâminas de cera e em meio seco sobre bancada por um período de 60 minutos. Após esse período, os dentes tiveram a superfície radicular friccionada com gaze embebida em soro fisiológico para remoção do ligamento periodontal desvitalizado, e tiveram a papila dentária e o órgão do esmalte seccionados com lâmina de bisturi nº 15 (Embramac Esp. e Insp., São Paulo, Brasil). A polpa foi removida então, por via retrógrada e o canal instrumentado, empregando-se lima tipo Kerr nº 25 (Kerr 25 mm – Sybron Kerr™) ligeiramente curvada. Os canais foram irrigados com soro fisiológico em seringa Luer descartável acoplada em agulha 25 x 6 mm, e na sequência, foram secos com cones de papel absorvente (Dentisplay®, Rio de Janeiro, Brasil). A seguir, os canais radiculares foram preenchidos por via retrógrada com pasta de hidróxido de cálcio (5 mL de propilenoglicol, 5g de Ca(OH)₂, 2g de óxido de zinco e 0,015g de colofônia - Ariston Ind. Quím. e Farm. Ltda® - São Paulo, Brasil). A pasta foi aplicada no interior do canal radicular com auxílio de uma seringa

de 1 mL acoplada numa agulha de 13 x 3 mm (BD Precision Guide™ – São Paulo, Brasil), respeitando-se o limite de 2 mm aquém do ápice radicular. Na sequência, os dentes foram reimplantados em seus alvéolos de origem, realizando-se previamente a irrigação do alvéolo com soro fisiológico (Ariston Ind. Quím. e Farm. Ltda® - São Paulo, Brasil).

Cada animal recebeu, no pós-operatório imediato, dose única de antibiótico penicilina G benzatina (administração por via intramuscular de 0,2 mL/animal), e foram mantidas em gaiolas separas e repetido semanalmente a análise do ciclo estral, comprovando a manutenção da depleção do estrógeno.

Eutanásia e Processamento das Peças Histológicas

Decorridos 60 dias do ato operatório de reimplante dentário tardio, os animais sofreram eutanásia por meio de overdose de anestésico (Ketamina e Xilazina). A maxila direita foi separada da esquerda na linha mediana com emprego de lâmina de bisturi nº 15 (Embramac Esp. e Insp., São Paulo, Brasil). Um corte com tesoura reta na porção distal do terceiro molar possibilitou a obtenção da maxila direita contendo o dente reimplantado.

Assim, os espécimes obtidos foram fixados em solução de formaldeído a 4% por 24 horas e descalcificados em solução de EDTA a 4,13%, em pH de 7,0 (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, USA).

Após a descalcificação, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Nos blocos foram realizados cortes semi-seriados de 05 µm de espessura, no sentido transversal da raiz, as quais foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) para a análise histológica qualitativa. Em seguida, foram selecionados 06 cortes de cada animal para análise histomorfométrica.

Análise Histológica

Esta análise foi realizada com auxílio de microscópio óptico (Axiolab – Zeiss©, Alemanha), e em função da anatomia, somente a face vestibular da raiz foi descartada da análise. Foram analisadas as características do ligamento periodontal, cemento e dentina, além da ocorrência de reabsorção inflamatória, anquilose e reabsorção por substituição ao longo do perímetro da secção transversal da superfície radicular.

Análise Histomorfométrica

As imagens dos cortes transversais das raízes foram capturados por meio de uma câmera Axio Cam MRc5 (Carl Zeiss do Brasil Ltda©, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) acoplada a um Estereomicroscópio Stemi 2000 C (Carl Zeiss do Brasil Ltda©, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) com um aumento de 1:25 que permitiu uma visão panorâmica do dente. Essa imagem foi salva como figura no programa Axio Vision 4.5 (Carl Zeiss do Brasil Ltda©, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e utilizada para a quantificação no programa Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, EUA).

Para análise histomorfométrica foram consideradas a face lingual, mesial e distal da raiz, sendo quantificados seis cortes histológicos de cada animal. Para quantificação da reabsorção inflamatória, reabsorção por substituição e reabsorção total (corresponde à soma da reabsorção inflamatória e por substituição), que se deu a partir da mensuração da área total de dentina radicular e em seguida, a mensuração da área de dentina radicular reabsorvida. O valor da área de dentina total e da área de dentina reabsorvida foi submetido a uma regra de três para quantificar a porcentagem de raiz comprometida pela reabsorção. A partir destes

valores, foram obtidos duas médias para cada animal, e obteve-se a média de cada grupo experimental. Aplicou-se o teste estatístico de acordo com o teste de aderência à curva de normalidade.

A anquilose e a permanência do ligamento periodontal foram mensurados por meio da medida do perímetro da secção transversal da lâmina histológica, sendo inicialmente mensurado o perímetro total da secção radicular e depois o perímetro no qual o tecido ósseo apresentava-se justaposto ao cimento, correspondendo à anquilose, e da mesma forma foi mensurado o perímetro do remanescente de ligamento periodontal. Assim, o valor do perímetro radicular total, e do perímetro de anquilose e ligamento periodontal, foram submetidos a uma regra de três para quantificar a porcentagem de perímetro radicular acometido pela anquilose e pela manutenção do ligamento periodontal (Anexo D).

Para a identificação e seleção das áreas de reabsorção, perímetro de anquilose e do ligamento periodontal, as imagens digitais foram comparadas com os cortes histológicos no microscópio óptico.

Análise Estatística

Os valores de reabsorção inflamatória, reabsorção por substituição e reabsorção total, perímetro de anquilose e perímetro de ligamento periodontal foram submetidos à análise estatística, utilizando o software GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software®, San Diego, USA). Foi considerado o nível de 5% significância para obtenção da diferença estatística.

Resultado

4. Resultado

4.1 Resultado Histológico

Grupo Sham

Pequenas áreas de tecido conjuntivo fibroso foram encontradas em todos os espécimes desse grupo. Apresentava-se rico em fibroblastos, fibras colágenas e vasos sanguíneos. As fibras colágenas desse tecido, geralmente se apresentavam dispostas paralelamente à superfície radicular ou sem uma organização definida (Figura 1). Em vários pontos um infiltrado inflamatório de intensidade de leve a moderado era encontrado nesse tecido. Áreas de cimento íntegro puderam ser encontradas em pequenos segmentos da superfície radicular. Parte delas apresentava-se recoberta por tecido ósseo alveolar formando a anquilose (Figura 2). Todos os espécimes foram comprometidos pela reabsorção radicular. Dessas áreas a reabsorção inflamatória também foi encontrada em todos os espécimes. Em dois espécimes, as áreas reabsorvidas eram mais extensas e profundas. Nas áreas reabsorvidas, o tecido conjuntivo fibroso apresenta um infiltrado inflamatório de linfócitos, histiócitos e em alguns casos polimorfonucleares neutrófilos. Em vários pontos foram observados clastos junto à parede dentinária (Figura 3). Com exceção de um espécime a reabsorção por substituição foi encontrada em pequenas áreas da raiz. Nesses locais, o tecido ósseo preenchia as áreas de dentina previamente reabsorvidas. A parede óssea alveolar era formada por tecido ósseo maduro, com osteoblastos em sua periferia. Eventuais pontos de reabsorção foram observados.

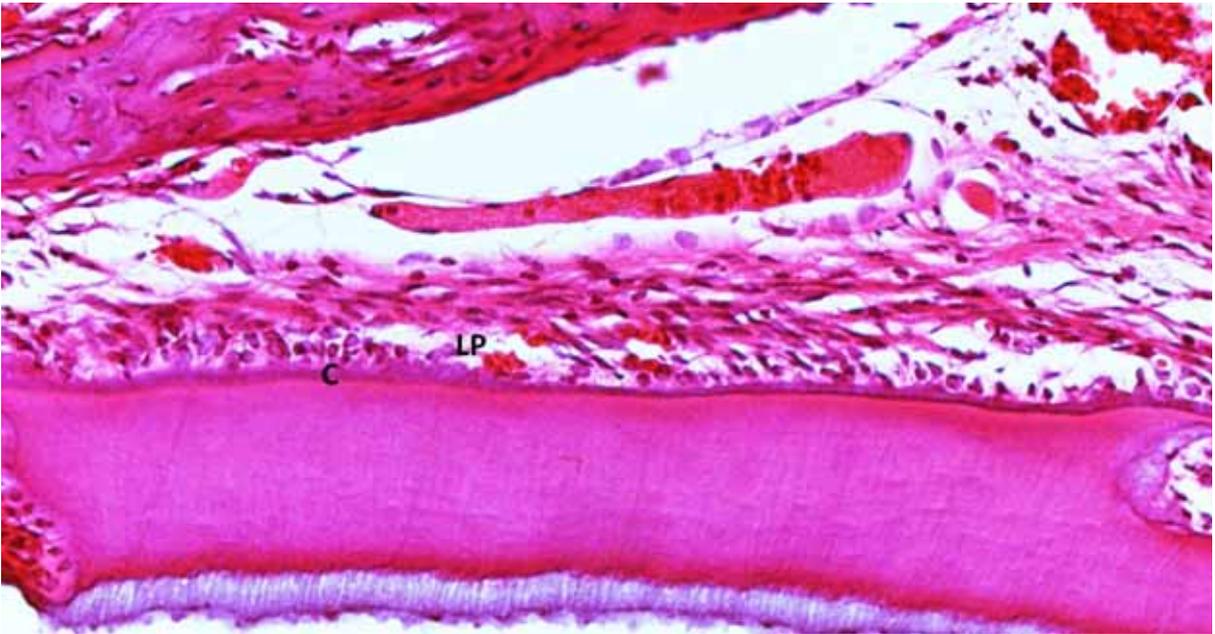


Figura 1 – Superfície radicular com integridade da camada de cimento (C). Ligamento periodontal (LP) com fibras colágenas dispostas paralelamente a superfície radicular. H.E. 100X

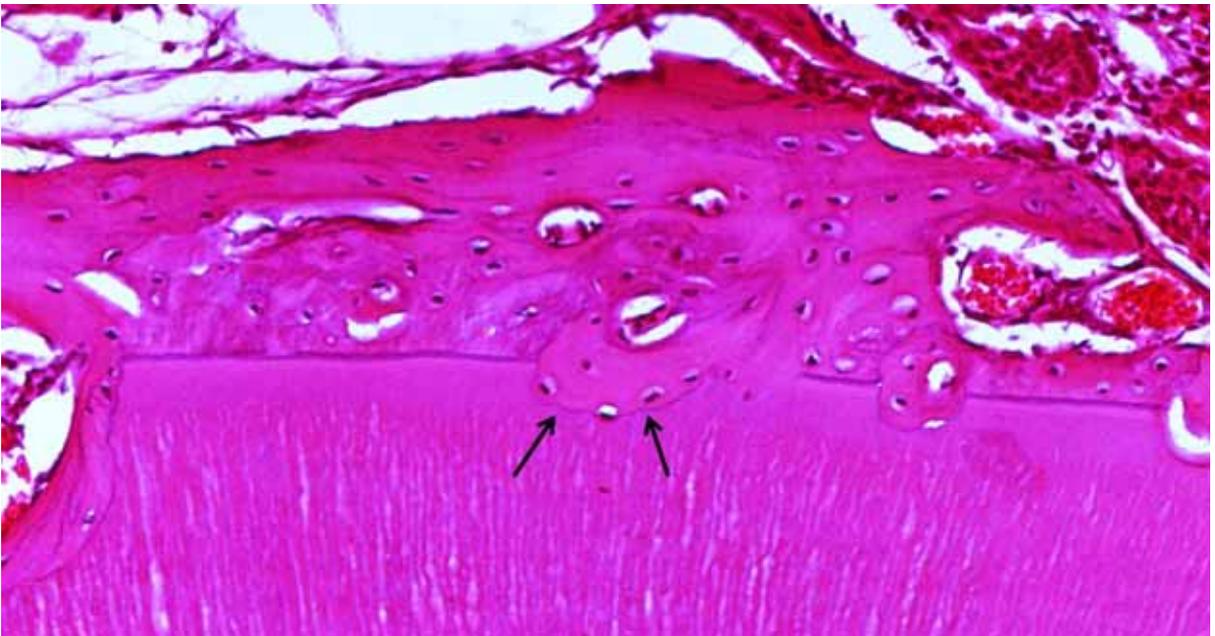


Figura 2 – Área de anquilose e reabsorção radicular por substituição (setas) comprometendo a camada superficial da raiz. H.E. 100X.

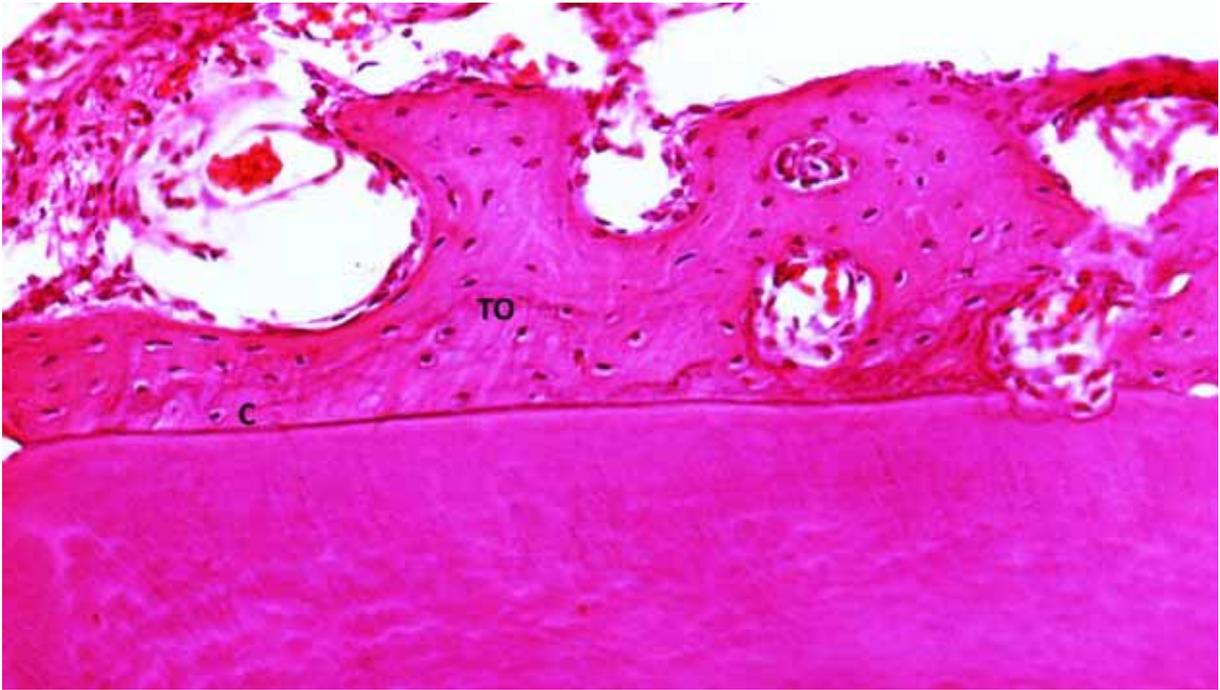


Figura 3 – Área extensa da superfície cementária (C) recoberta por tecido ósseo (TO) caracterizando a anquilose alveolodentária. H.E. 100X.

Grupo OVX/O

Em proporção semelhante ao grupo Sham, as áreas de tecido conjuntivo fibroso foram encontradas em todos os espécimes, mas em pequenos pontos da superfície radicular (Figura 4). Apresentava características histológicas semelhantes ao do grupo Sham. Áreas de anquilose também foram encontradas, mas em menor proporção do que nos demais grupos. Foi o grupo mais comprometido pela reabsorção radicular, estando presente em todos os espécimes. Houve predominância pela reabsorção inflamatória, estando presente em todos os espécimes (Figura 5). Em dois deles, essas áreas comprometiam o tecido dentinário em grande extensão e profundidade. Áreas de reabsorção por substituição também foram encontradas, envolvendo menor extensão da dentina. Tecido ósseo alveolar maduro formava a parede alveolar. Em alguns pontos, clastos foram encontrados junto a pontos de reabsorção (Figura 6).

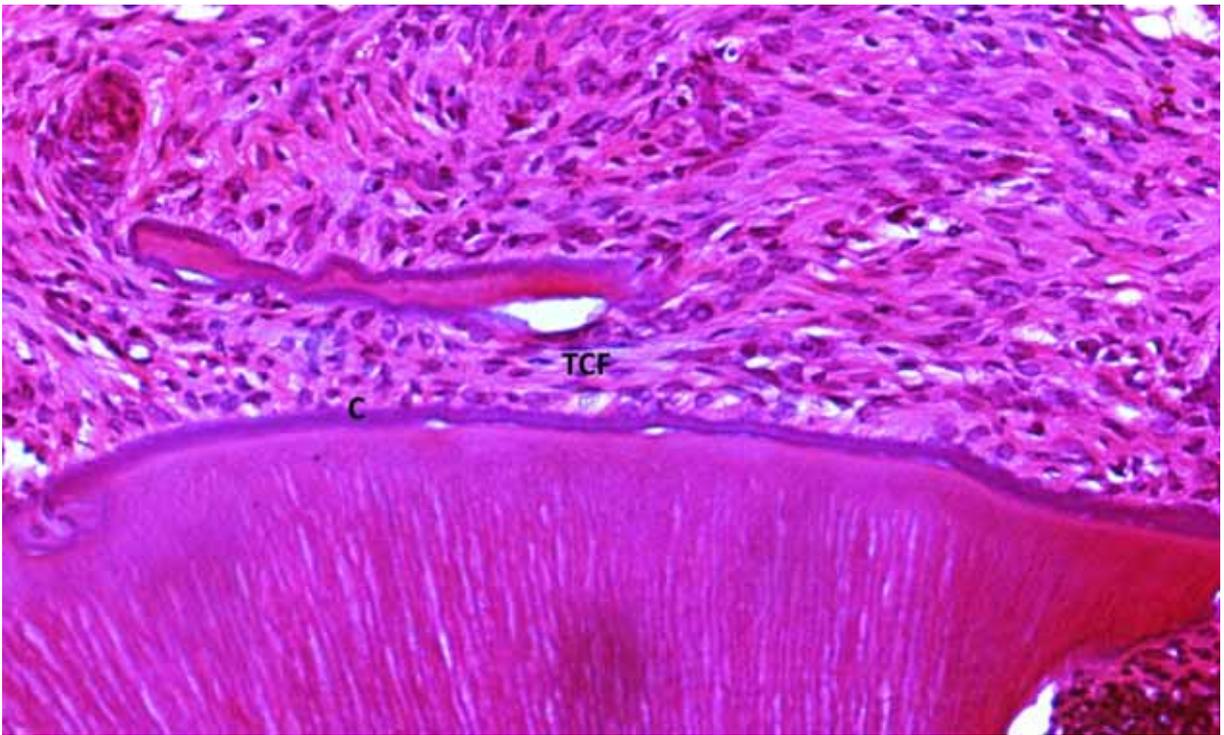


Figura 4 - Área de tecido conjuntivo fibroso (TCF) com fibras colágenas sem organização definida em contato com a superfície de cimento (C). H.E. 100X.

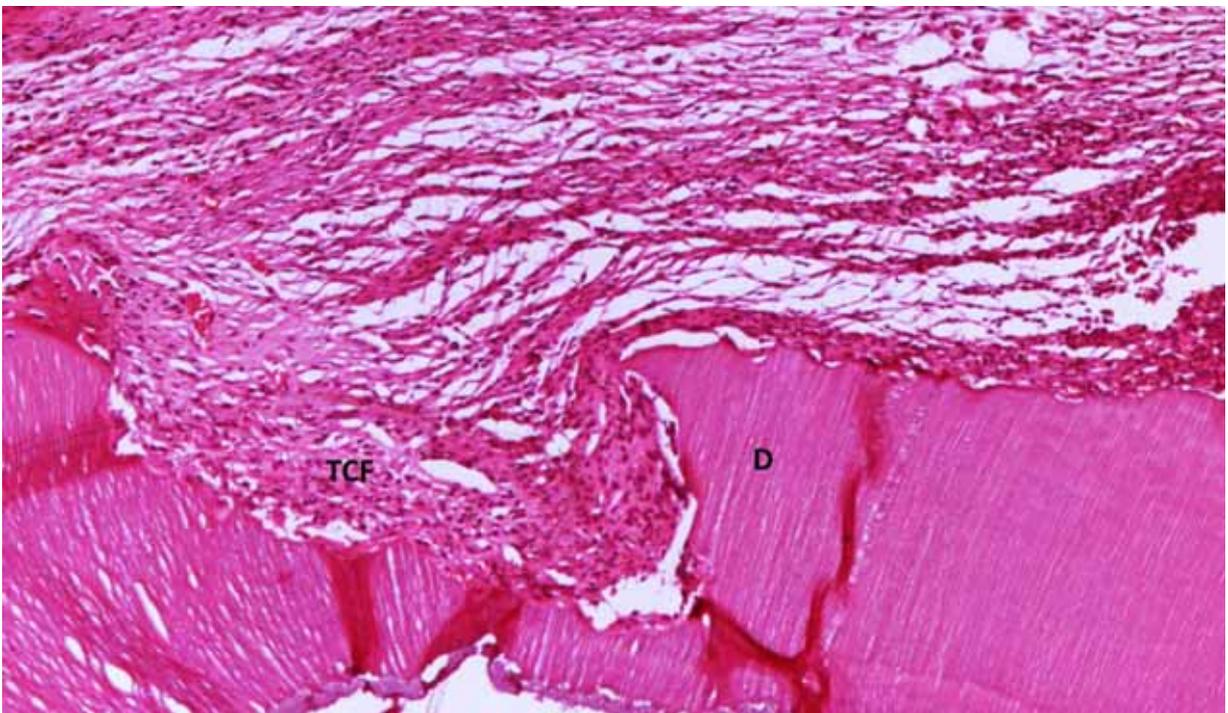


Figura 5 - Reabsorção inflamatória comprometendo maior profundidade da dentina (D). Tecido conjuntivo fibroso (TCF) com infiltrado inflamatório preenchendo a área de dentina reabsorvida. H.E. 100X

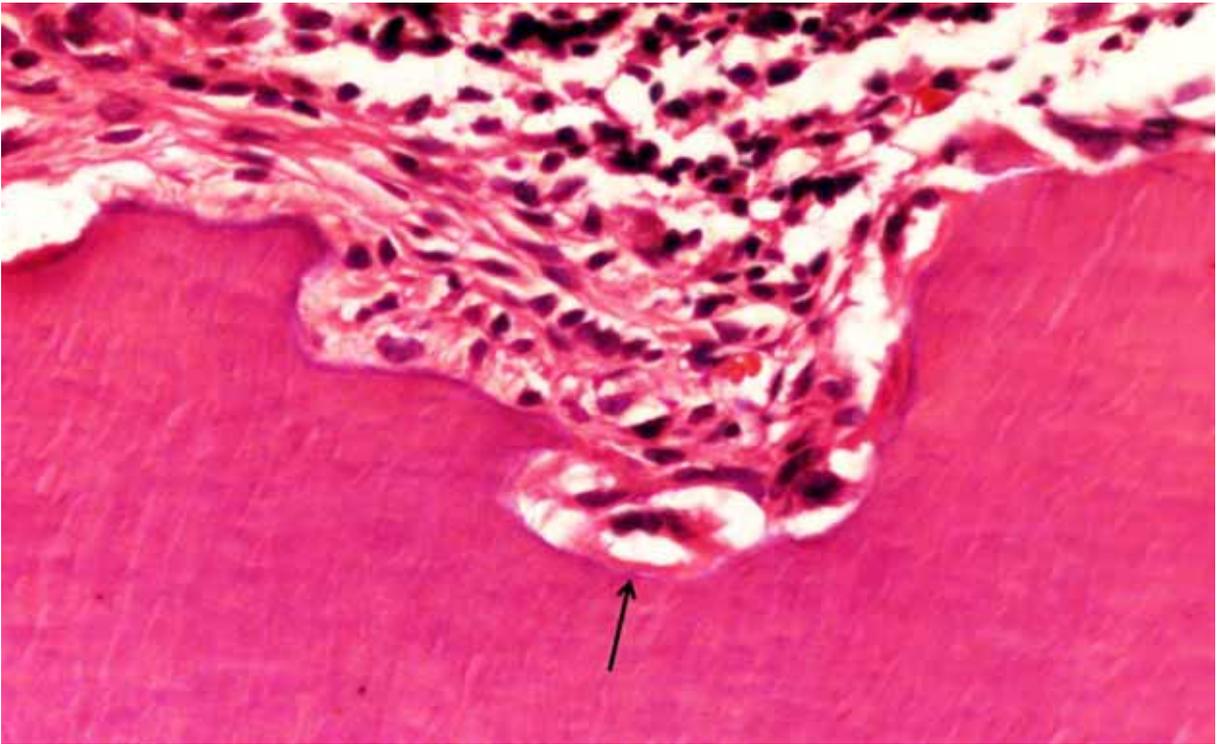


Figura 6 – Área de reabsorção radicular inflamatória. Presença de clastos na parede dentinária reabsorvida (seta) H.E. 200X.

Grupo OVX/E

A extensão de tecido conjuntivo fibroso neste grupo foi semelhante aos grupos Sham e OVX/O. Apresentava características histológicas também com grande quantidade de fibras colágenas e fibroblastos, e se apresentava bem vascularizado. As fibras colágenas geralmente apresentavam dispostas paralelamente à superfície radicular. Um infiltrado inflamatório de linfócitos e histiócitos podiam ser encontrados em vários pontos desse tecido. Adjacente a esse tecido conjuntivo fibroso era comum à presença de tecido ósseo justaposto ao cimento íntegro (Figura 7). À semelhança do grupo raloxifeno, as áreas reabsorvidas eram formadas principalmente pela reabsorção por substituição que comprometiam a camada mais superficial da raiz (Figura 8). A reabsorção inflamatória foi encontrada em 04 espécimes envolvendo áreas de pequena profundidade e extensão (Figura 9). O tecido ósseo alveolar apresentava espaços medulares mais amplos quando comparado ao grupo raloxifeno. Vários pontos de reabsorção podiam ser observados junto à parede óssea desses espaços.

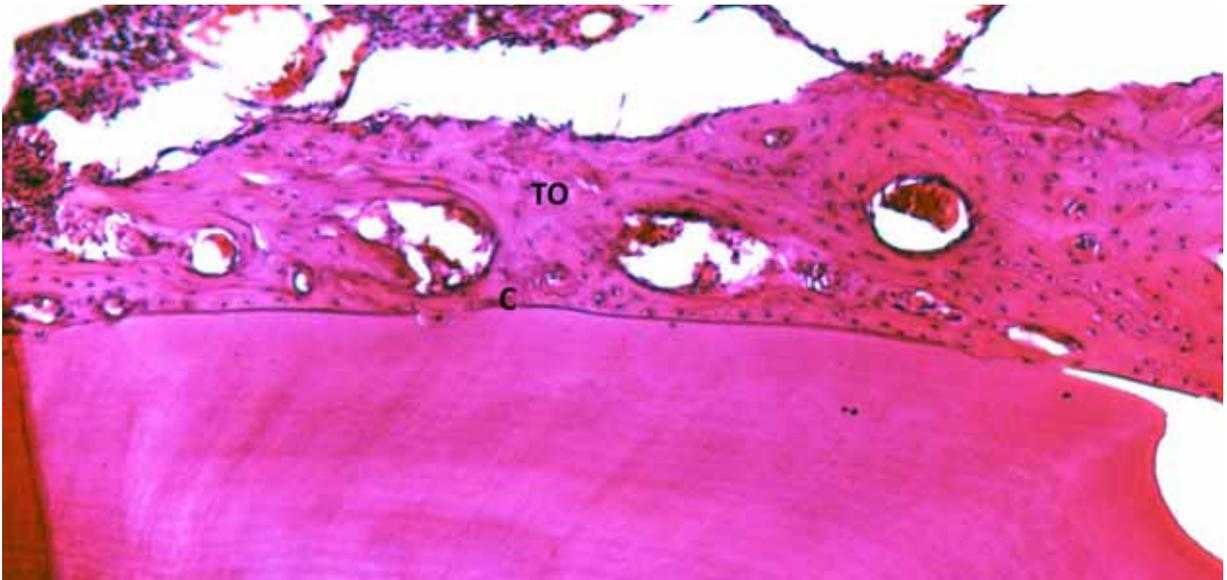


Figura 7 – Área extensa de cimento (C) íntegro recoberto por tecido ósseo (TO).
H.E. 100X

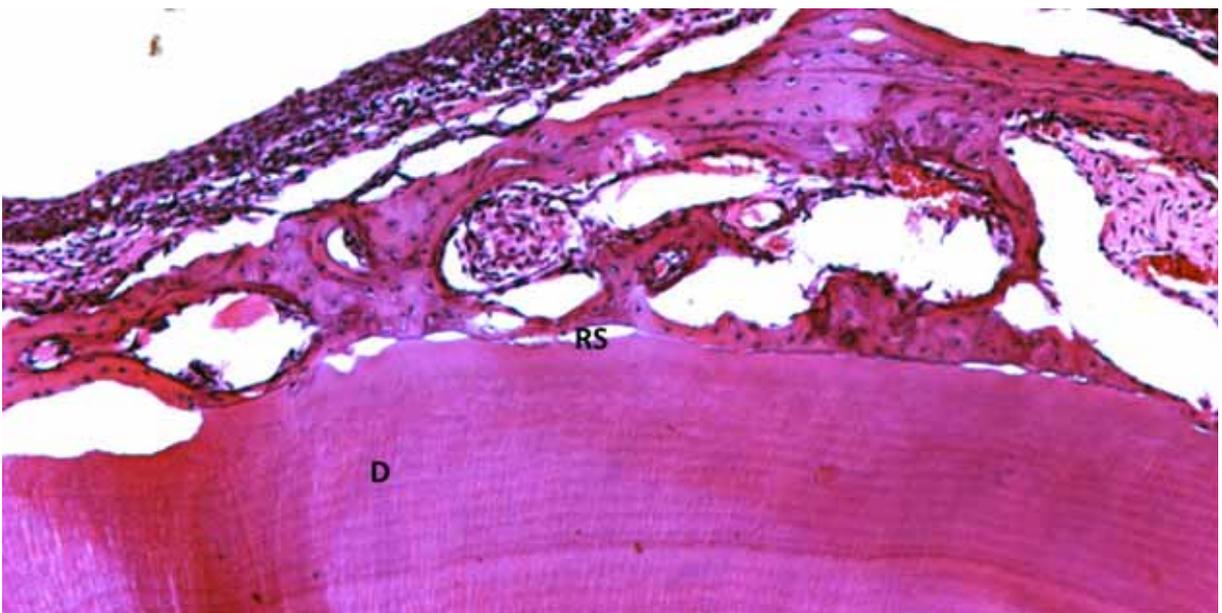


Figura 8 - Reabsorção por substituição (RS) comprometendo a camada mais superficial da dentina (D). H.E. 100X.

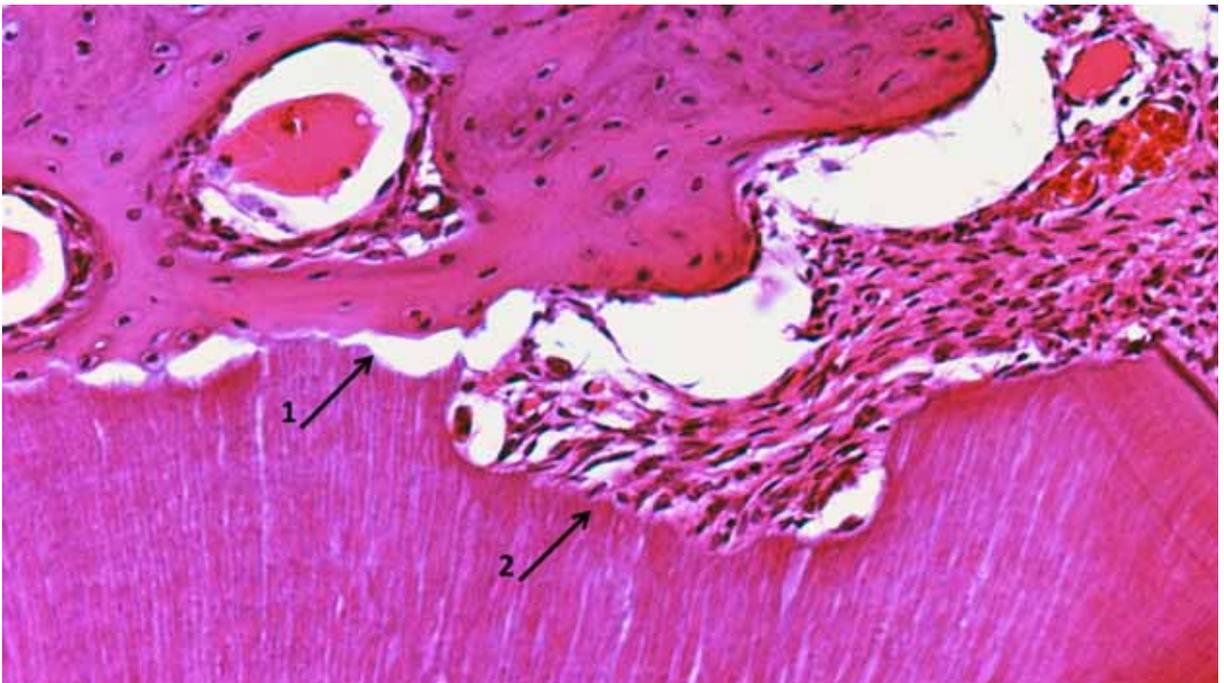


Figura 9 – Área de reabsorção por substituição (seta 1) ao lado de reabsorção inflamatória (seta 2) localizada mais superficialmente à camada de dentina. H.E.100X.

Grupo OVX/R

Foi o grupo onde as áreas de tecido conjuntivo fibroso foram encontradas em maior extensão na superfície radicular. Apresentava-se bem vascularizado e rico em fibras colágenas e fibroblastos. As fibras colágenas geralmente apresentavam disposição paralela à superfície radicular sem uma organização definida. Em alguns pontos, um infiltrado inflamatório leve estava presente. Extensas áreas de cemento íntegro foram encontradas nesse grupo. Parte dessas áreas estava recoberta por tecido ósseo alveolar formando anquilose (Figura 10).

Áreas de reabsorção radicular foram encontradas em todos os espécimes, sendo caracterizadas predominantemente pela reabsorção por substituição. Neste grupo, a maior parte das reabsorções envolvia apenas a camada mais superficial da raiz (Figura 11). A reabsorção inflamatória foi encontrada em 3 espécimes. Em um deles, grande parte da raiz foi comprometida enquanto nos demais, constatou-se pequenas áreas de anquilose (Figura 12). O tecido ósseo alveolar apresentava poucos pontos de reabsorção, apresentava-se maduro, tendo em sua periferia osteoblastos.

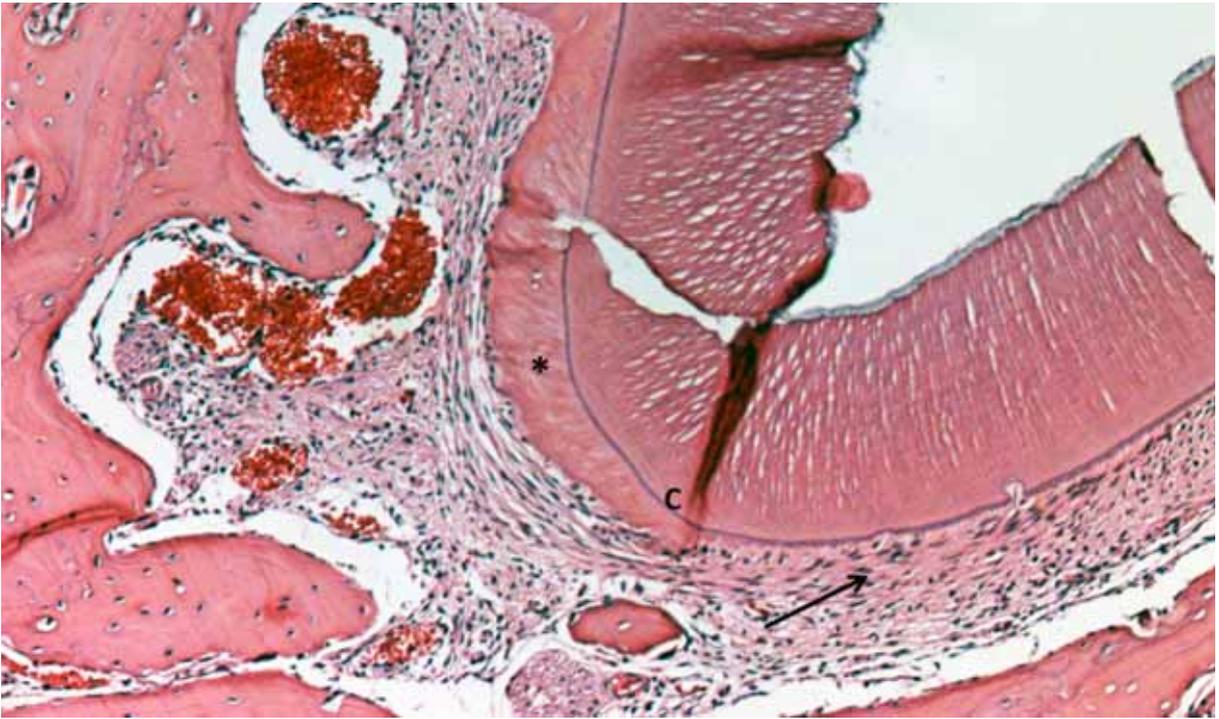


Figura 10 – Presença de tecido ósseo neoformado (asterisco) formando área de anquilose e tecido conjuntivo fibroso (seta), com manutenção da integridade da camada de cimento (C). H.E. 100X

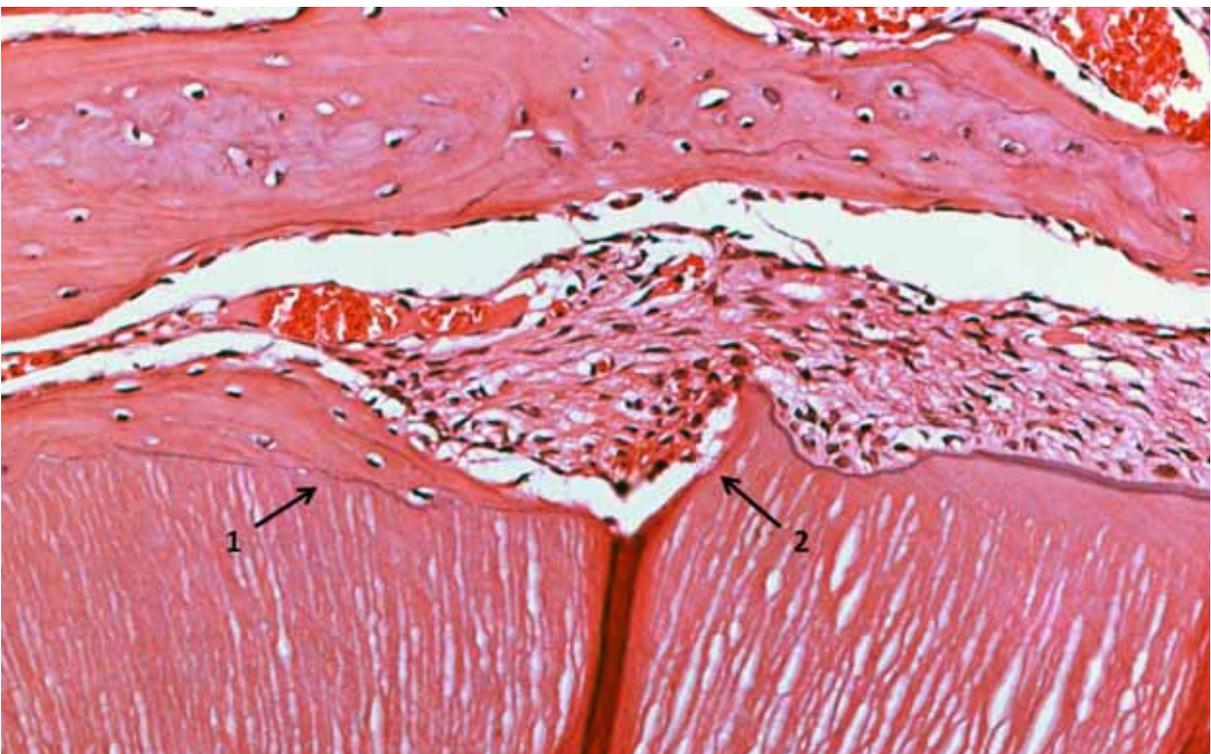


Figura 11 – Reabsorção por substituição (seta 1) e pequeno ponto de reabsorção inflamatória (seta 2) comprometendo a camada superficial da dentina. H.E. 100X.

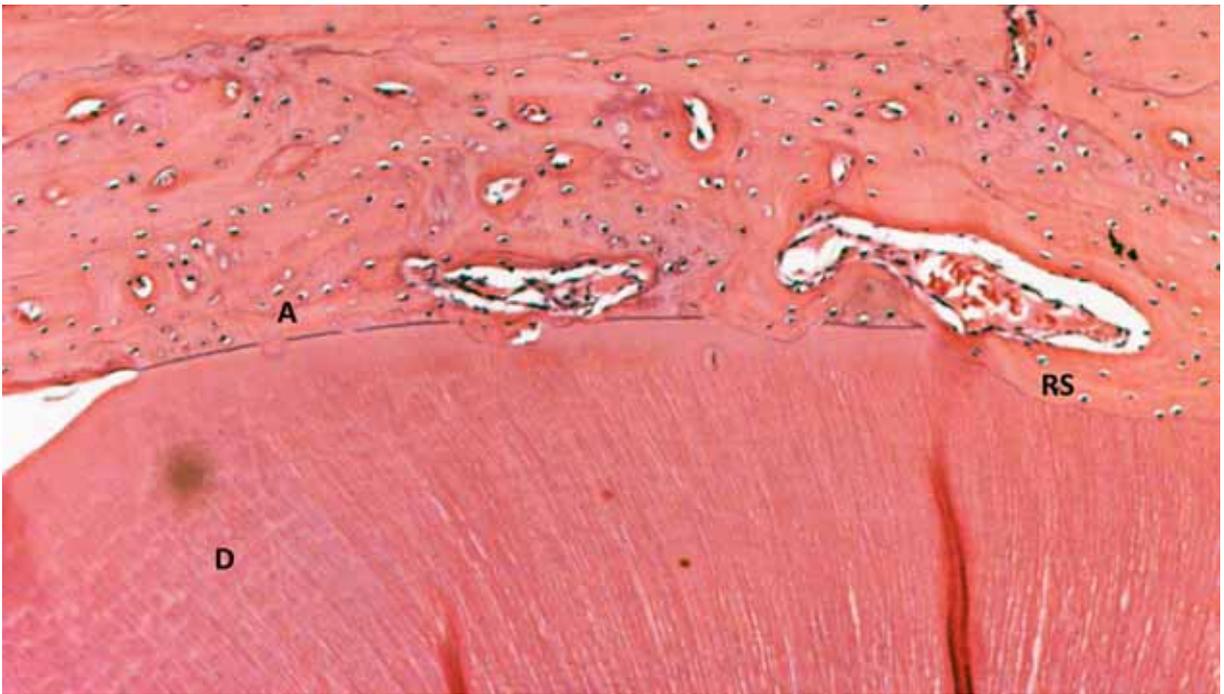


Figura 12 – Área de anquilose (A) e pontos de reabsorção por substituição (RS) na camada mais superficial da dentina (D). H.E. 100X

4.2 Análise Histomorfométrica

Foram obtidas duas médias, em porcentagem, de cada animal pela análise histomorfométrica, com relação aos parâmetros de resorção inflamatória, por substituição e total, perímetro de anquiose e de ligamento periodontal (Anexo D). Todas as amostras apresentaram comportamento não normal (teste de Kolmogorov-Smirnov, $P < 0,05$), de forma que se aplicou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando o nível de 5% de significância. Na Tabela 1 e Gráfico 1 estão distribuídos as médias, em porcentagem, das reabsorções investigadas.

Tabela 1 – Distribuição das médias e desvio padrão (DP) expresso em porcentagem de cada grupo, em relação às reabsorções radiculares avaliadas.

Grupos	Reabsorção Inflamatória (\pm DP)	Reabsorção por Substituição (\pm DP)	Reabsorção Total (\pm DP)
Sham	11,834 (\pm 16,504)	7,747 (\pm 11,203)	19,581 (\pm 17,574)
OVX/O	22,437 (\pm 18,271)	6,555 (\pm 5,632)	28,9925 (\pm 17,353)
OVX/E	5,1635 (\pm 7,236)	4,57 (\pm 1,962)	9,7335 (\pm 7,51)
OVX/R	3,8725 (\pm 2,786)	7,0965 (\pm 3,741)	10,969 (\pm 5,428)

Com relação à reabsorção inflamatória, foi observada diferença estatística ($P < 0,05$) entre os grupos Sham e OVX/O, entre os grupos Sham e OVX/E, entre os grupos OVX/O e OVX/E, entre os grupos OVX/O e OVX/R, e entre os grupos Sham e OVX/R. Não foram observadas diferenças estatísticas ($P \geq 0,05$) entre os grupos OVX/E e OVX/R. Não existiram diferenças estatísticas ($P \geq 0,05$) entre os grupos experimentais, com relação a variável reabsorção por substituição analisada.

Na reabsorção total, foram observadas diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos Sham e OVX/O, entre os grupos Sham e OVX/E, e entre os grupos Sham

e OVX/R. Também foram constatadas diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos OVX/O e OVX/E, e entre os grupos OVX/O e OVX/R. Não existiram diferenças estatísticas ($P \geq 0,05$) entre os grupos OVX/E e OVX/R. A distribuição dos dados da Tabela 1 são mostrados no Gráfico 1.

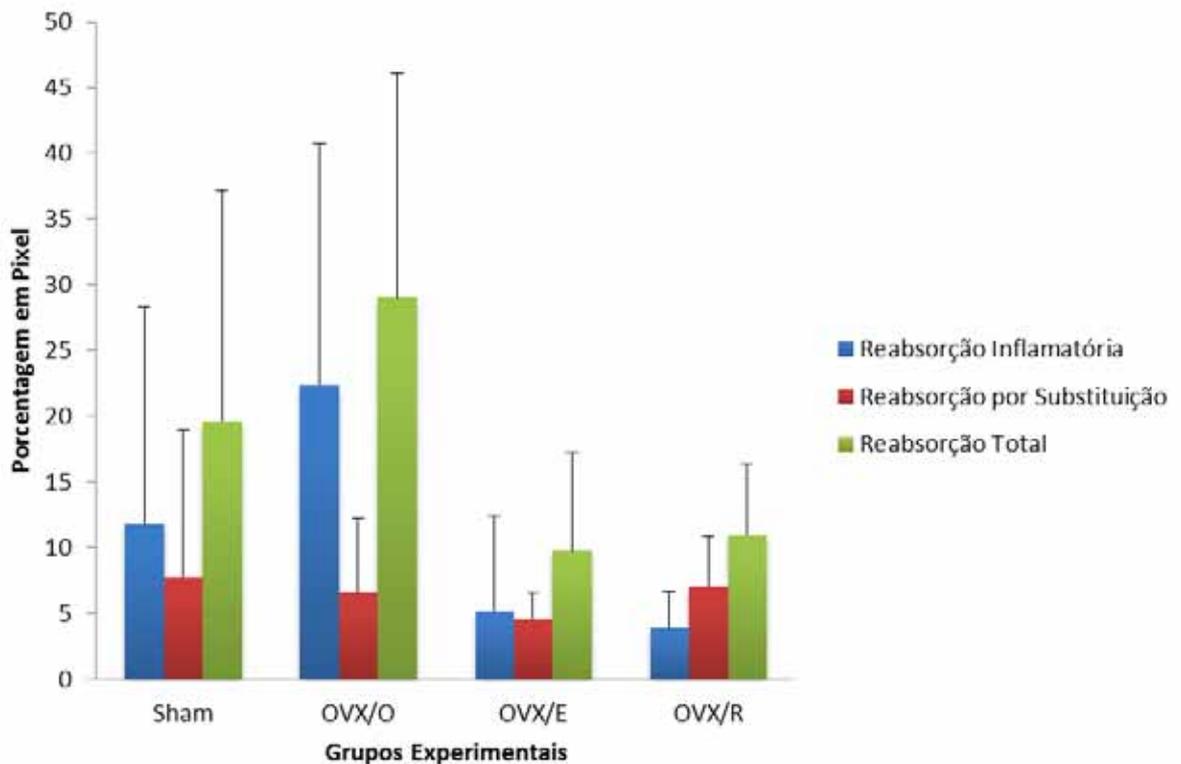


Gráfico 1 – Porcentagem das médias e desvio padrão dos valores de reabsorção inflamatória, reabsorção por substituição e reabsorção total de cada grupo experimental apresentado na Tabela 1.

Tabela 2 – Distribuição das médias e desvio padrão (DP) expresso em porcentagem de cada grupo, em relação aos perímetros de anquilose e remanescentes do ligamento periodontal.

Grupos	Perímetro de Anquilose (±DP)	Perímetro de Ligamento Periodontal (±DP)
Sham	10,053 (± 9,677)	21,996 (± 11,222)
OVX/O	7,909 (± 7,155)	17,0895 (± 12,211)
OVX/E	18,79 (± 13,469)	19,6025 (± 7,943)
OVX/R	15,129 (± 8,833)	30,602 (± 8,529)

Com relação ao perímetro de anquilose, observaram-se diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos Sham e OVX/E, e entre os grupos OVX/O e OVX/E, e entre os grupos OVX/O e OVX/R. Nas demais associações entre os grupos, não existiram diferenças estatísticas ($P \geq 0,05$).

Nos dados de perímetro de ligamento periodontal, constatou-se diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos Sham e OVX/R, e entre os grupos OVX/O e OVX/R. Também existiu diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os grupos OVX/E e OVX/R. Nas demais associações entre os grupos, não existiram diferenças estatísticas ($P \geq 0,05$). A distribuição dos dados da Tabela 2 são mostrados no Gráfico 2.

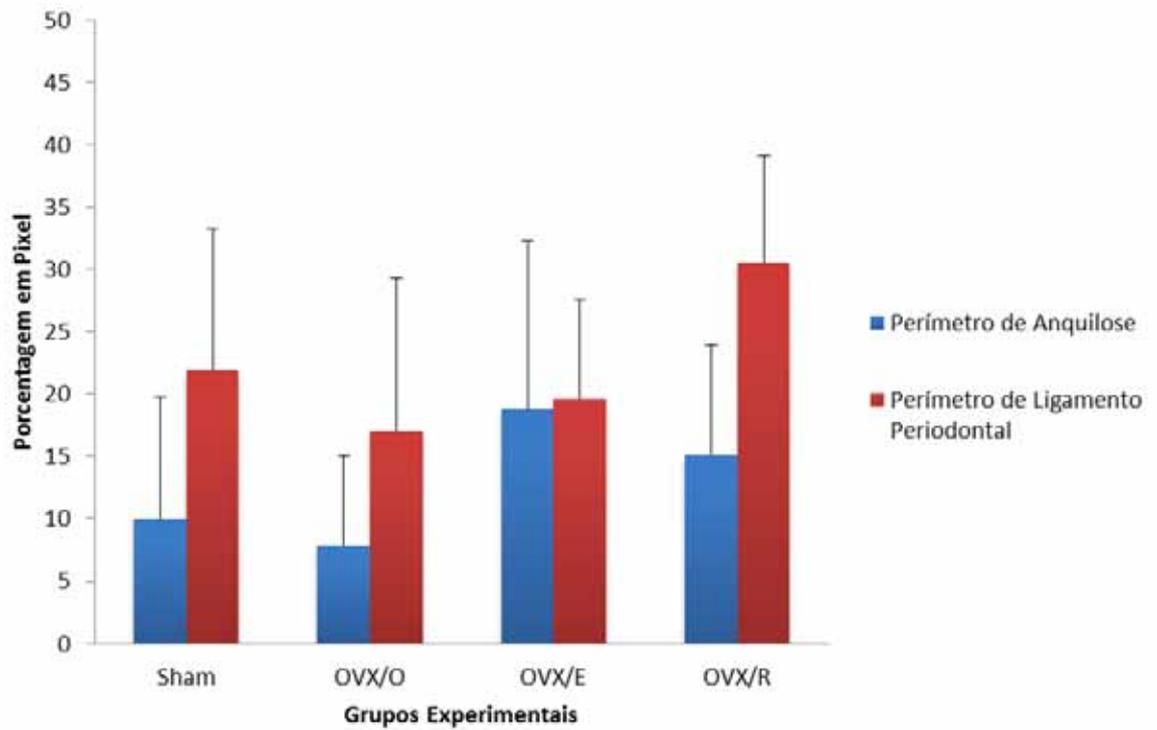


Gráfico 2 – Porcentagem das médias e desvio padrão dos valores do perímetro de anquilose e perímetro dos remanescentes do ligamento periodontal de cada grupo experimental apresentados na Tabela 2.

Discussão

4. *Discussão*

Dentre os traumatismos dentários, a avulsão é a condição clínica que produz maiores consequências à permanência do elemento dentário em longo prazo, e fatores locais e sistêmicos podem determinar o sucesso do reimplante dentário. Assim, o sucesso da manutenção do dente reimplantado está diretamente relacionado com a presença, tipo e velocidade do processo de reabsorção radicular (7-9) bem como a fatores locais como: tempo extra-alveolar, meio de armazenagem, manipulação radicular inadequada e a necrose pulpar (5,7,10-13). Admite-se que fatores sistêmicos, como a deficiência de estrógeno, pode determinar o sucesso do reimplante dentário, contudo observa-se na Literatura escassez sobre esse tema no estudo da traumatologia dentária, o que justifica a realização do presente estudo que objetivou investigar a influência no processo de reparo de reimplante dentário tardio com a terapia com 17β -estradiol ou raloxifeno em ratas ovariectomizadas.

O modelo animal de ratas ovariectomizadas têm se tornado útil por se assemelhar a diminuição de massa óssea observada nas mulheres após a menopausa, e é recomendado pela FDA (Food and Drug Administration - EUA) nas pesquisas de osteoporose humana (24). Estudos recentes de fármacos de atuação óssea, como o estrógeno e raloxifeno, em ratas ovariectomizadas têm se assemelhado à eficácia clínica em mulheres pós-menopausa (20,25). No presente estudo foi utilizado as dosagens de 400 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ por dia de estrógeno e 1 mg/Kg por dia de raloxifeno, pois estudos prévios mostraram eficácia máxima dessas dosagens quando empregadas nesse modelo animal (21,26-28).

A deficiência de estrógeno é uma condição sistêmica caracterizada por um desequilíbrio entre os processos de formação e reabsorção óssea. Pode ser

causada pela ovariectomia e durante a menopausa; também existem outras situações em que a deficiência de estrogênio ocorre em pacientes jovens como nos casos de falência ovariana prematura, tratamentos de quimioterapia e radioterapia, o uso de medicações que podem gerar a menopausa química, como no tratamento das doenças auto-imunes e inflamações na tireóide (14,15).

Em ratas ovariectomizadas pode-se constatar a perda de osso trabecular em 4 a 6 semanas, com mudanças em várias citocinas, fatores de crescimento e marcadores de remodelação óssea (29,30). Em outros estudos, diferenças significativas foram observadas no volume de tecido ósseo, 08 semanas após a ovariectomia (27,31). No entanto, em reimplante dentário imediato, não se constatou diferenças significativas na ocorrência de reabsorção radicular quando se comparou ratas ovariectomizadas e normais, mesmo 120 dias após a ovariectomia (32). A presença dos cementoblastos na superfície radicular pode ter contribuído para o resultado. Essas células não seriam susceptíveis às alterações consequentes da redução do estrogênio (33).

No presente estudo foram evidenciadas diferenças significantes na reabsorção inflamatória e reabsorção total entre os grupos Sham e OVX/O, sugerindo alguma influência da ovariectomia no reparo dos dentes reimplantados. De acordo com o método deste estudo, como os dentes avulsionados foram mantidos em meio seco por 1 hora, a vitalidade de grande parte dos cementoblastos é perdida (34). Essa condição leva a anquilose e a reabsorção por substituição após o reimplante, uma vez que células ósseas repovoam a superfície radicular (8,35). Isso tornaria o processo de reabsorção óssea e dentária semelhante (36).

No presente estudo a reabsorção inflamatória foi encontrada em todos os grupos experimentais. Cuidados como tratamento endodôntico com o uso do curativo de hidróxido de cálcio (37) e o uso de antibiótico sistêmico (38) foram

implementados em todos os grupos com o objetivo de se obter um controle desse tipo de reabsorção. Contudo, os grupos OVX/E e OVX/R apresentaram menores porcentagens de reabsorção inflamatória, com diferenças significantes quando comparados aos demais grupos.

O estrógeno é um hormônio que tem um importante papel no controle do metabolismo ósseo regulando a expressão de proteínas como a OPG e RANKL (18,39). Segundo Cheng & Fong (40) a deficiência de estrógeno favorece a sinalização de RANKL/RANK, levando à diferenciação e desenvolvimento de células do sistema imunológico, como os linfócitos. Por outro lado, a terapia de reposição hormonal favorece a sinalização de OPG/RANKL, inibindo a ativação, diferenciação e o desenvolvimento dos linfócitos. Isso poderia explicar o resultado encontrado. A deficiência do estrógeno leva também à liberação de citocinas pró-inflamatória, como a IL-6 e TNF- α , que desempenham um papel destrutivo ao tecido ósseo (18,19,39). Por outro lado, estudos demonstraram que o uso do Raloxifeno reduziu os níveis dos marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo, restaurou os níveis de RNAm, TGF β e de interleucina-6 para níveis semelhantes às ratas normais (29,30).

Com a diminuição das áreas de reabsorção, maior extensão de cimento íntegro foi encontrado nos grupos OVX/E e OVX/R, que se apresentaram ora recobertos por tecido ósseo, ora recobertos por tecido conjuntivo fibroso.

A reabsorção inflamatória se desenvolve de forma rápida e se manifesta já na fase inicial do reparo e o controle da reabsorção inflamatória permite que a integridade da camada de cimento seja mantida (7,41). A manutenção da camada de cimento, ainda que anquilosada, proporciona maior resistência ao processo de reabsorção (42).

Em geral, admite-se que o sucesso do reimplante dentário está diretamente relacionado à preservação dos restos do ligamento periodontal em estado viável (7-

10). No presente estudo, foi observado que o grupo OVX/R apresentou significativamente maior perímetro de ligamento periodontal evidenciado pela análise histométrica comparado aos demais grupos. Provavelmente, esse resultado seja explicado pelo melhor efeito do raloxifeno na sinalização de OPG/RANKL do que o 17β -estradiol, atuando de forma mais eficiente na diminuição de apoptose de osteoblastos e inibição da osteoclastogênese (28). Além de atuar na inativação da diferenciação e desenvolvimento de células do processo inflamatório (40), mantendo maior perímetro de camada de cemento na presença de células remanescentes do ligamento periodontal.

Para um melhor entendimento do efeito do tratamento do raloxifeno ou da terapia de reposição hormonal com o 17β -estradiol em ratas ovariectomizadas no reimplante dentário tardio, sugerimos a realização de outros estudos, aplicando metodologias de análise de reparação óssea, como o emprego de estudo imunohistoquímico, e a avaliação da expressão oteogênica e osteoclastogênica *in situ* e em laboratório de cultura de células.

Conclusão

5. Conclusão

De acordo com a metodologia empregada, pode-se concluir que em ratas ovariectomizadas a utilização de estradiol e raloxifeno proporcionou melhor reparo aos dentes reimplantados por conta da menor ocorrência da reabsorção inflamatória. O tratamento com raloxifeno foi mais efetivo na manutenção do ligamento periodontal que o 17β -estradiol.

Referências

Referências

1. Cavalleri G, Zerman N. Traumatic crown fractures in permanente incisors with immature roots: a follow-up study. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11:294-6.
2. Marcenes W, Zabet NE, Traebert J. Socio-economic correlates of traumatic injuries to the permanent incisors in schoolchildren aged 12 years in Blumenau, Brazil. *Dent Traumatol* 2001; 17:222-6.
3. Fakhruddin KS, Lawrence HP, Kenny DJ, Locker D. Impact of treated and untreated dental injuries on the quality of life of Ontario school children. *Dent Traumatol* 2008; 24:309-13.
4. Panzarini SR, Saad-Neto M, Sonoda C, Poi WR, Perri de Carvalho AC. Dental avulsion in young and adult patients in the region of Araçatuba. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 2003; 57:27-31.
5. Panzarini SR, Gulinelli JL, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, Brandini DA. Treatment of root surface in delayed tooth replantation: a review of literature. *Dent Traumatol* 2008; 24:277-82.
6. Andreasen FM, Andreasen JO. Avulsions. In: Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L, (eds.). *Textbook and Color Atlas of Traumatic Injuries to the Teeth* (4th ed.). Oxford, Blackwell 2007. 444-488.
7. 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.
8. Hammarström L, Blomlöf L, Lindskog S. Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. *Endod Dent Traumatol* 1989; 5:163-75.

9. Pohl Y, Filippi A, Kirschner H. Results after replantation of avulsed permanent teeth. II. Periodontal healing and the role of physiologic storage and antiresorptive-regenerative therapy. *Dent Traumatol* 2005; 21:93-101.
10. Andreassen JO. Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Int J Oral Surg* 1981; 10:43-53.
11. Sonoda CK, Poi WR, Okamoto T, Toyota E, Takeda RH. Mediate teeth reimplantation after root treatment with 1%, 2,5%, 5% and 10% sodium hypochlorite solution. *Rev Bras Odontol* 2000; 57:293-6.
12. Lustosa-Pereira A, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N, Bramante CM, Bortoluzzi EA. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rats' teeth. *Dent Traumatol* 2006; 22:30-5.
13. Panzarini SR, Pedrini D, Brandini DA, Poi WR, Santos MF, Correa JP, Silva FF. Physical education undergraduates and dental trauma knowledge. *Dent Traumatol* 2005; 21:324-8.
14. 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; 2:153-8.
15. Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fracture. *Lancet* 2002; 359:1761-7.
16. 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 Xue Za Zhi* 2008; 88:1715-8.

17. Jabbar S, Drury J, Fordham JN, Datta HK, Francis RM, Tuck SP. Osteoprotegerin, RANKL and bone turnover in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Pathol* 2011; 64:354-7.
18. Shu L, Guan SM, Fu SM, Guo T, Cao M, Ding Y. Estrogen Modulates Cytokine Expression in Human Periodontal Ligament Cells. *J Dent Res* 2008; 87:142-7.
19. 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; 29:507-13.
20. Wronski TJ, Cintrón M, Doherty AL, Dann LM. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1988; 123:681-6.
21. Helvering LM, Liu R, Kulkarni NH, Wei T, Chen P, Huang S, et al. Expression profiling of rat femur revealed suppression of bone formation genes by treatment with alendronate and estrogen but not raloxifene. *Mol Pharmacol* 2005; 68:1225-38.
22. Panzarini SR, Okamoto R, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, da Silva PE, et al. Histological and immunohistochemical analyses of the chronology of healing process after immediate tooth replantation in incisor rat teeth. *Dent Traumatol* 2013; 29:15-22.
23. Long JA, Evans HM. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem Univ Calif* 1922; 6:1-148.
24. Bauss F, Wagner M, Hothorn LH. Total administered dose of ibandronate determines its effects on bone mass and architecture in ovariectomized aged rats. *J Rheumatol* 2002; 29:990-8.

25. Sato M, Rippy MK, Bryant HU. Raloxifene, tamoxifen, nafoxidine, or estrogen effects on reproductive and nonreproductive tissues in ovariectomized rats. *FASEB J* 1996; 10:905-12.
26. Schenk R, Egli P, Fleisch H, Rosini S. Quantitative morphometric evaluation of the inhibitory activity of new aminobisphosphonates on bone resorption in the rat. *Calcif Tissue Int* 1986; 38:342-9.
27. 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; 55:52-9.
28. Luvizuto ER, Dias SS, Okamoto T, Dornelles RC, Okamoto R. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. *Arch Oral Biol* 2011; 56:984-90.
29. Yang NN, Hardikar S, Sato M, Galvin RJS, Glasebrook AL, Bryant HU, et al. Estrogen and raloxifene stimulate transforming growth factor- β_3 expression in rat bone: a potential mechanism for estrogen- or raloxifene-mediated bone maintenance. *Endocrinology* 1996; 137:2075-84.
30. Glasebrook AL, Short LL, Cole HW, Magee DE, Bryant HU. Regulation of serum IL-6 by raloxifene in an ovariectomized rat model (Abstract). *Bone* 1995; 16:99S.
31. Yoon KH, Cho DC, Yu SH, Kim KT, Jeon Y, Sung JY. The Change of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats: Analyses of MicroCT Scan and Biochemical Markers of Bone Turnover. *J Korean Neurosurg Soc* 2012; 51:323-7.
32. Marão HF. Effects of ovariectomy on periodontal tissues following immediate tooth replantation: analysis histomorphometric, immunohistochemistry and μ -

- ct in rats. (Thesis) Araçatuba: Dentistry School of Estadual Paulista University; 2013.
- 33.Consolaro A. Reabsorções dentárias na movimentação ortodôntica. Maringá: Dental Press; 2002. cap. 12: Reabsorções dentárias nas especialidades clínicas, p. 259-89.
- 34.Andreasen JO, Kristerson L. The effect of limited drying or removal of the periodontal ligament. Periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Acta Odontol Scand* 1981; 39:1-13.
- 35.Hammarstrom L, Pierce A, Blomlof L, Feiglin B, Lindskog S. Tooth avulsion and replantation. A review. *Endod Dent Traumatol* 1986; 2:1-8.
- 36.Rodan GA, Martin TJ. Role of the osteoblast in hormonal control of bone resorption – a hypothesis. *Calcif Tissue Res.* 1981; 33:349-51.
- 37.Blomlöf L, Lengheden A, Lindskog S. Endodontic infection and calcium hydroxide treatment: effects on periodontal healing in mature and immature replanted monkey teeth. *J Clin Periodontol* 1992; 19:652-8.
- 38.Hammarström L, Blomlöf L, Feiglin B, Andersson L, Lindskog S. Replantation of teeth and antibiotic treatment. *Endod. Dent. Traumatol* 1986; 2:51-7.
- 39.Sigl V, Penninger JM. RANKL/RANK - from bone physiology to breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014; 25:205-14.
- 40.Cheng ML, Fong L. Effects of RANKL-Target therapy in immunity and cancer. *Front Oncol* 2014; 3:329.
- 41.Andreasen JO. Relationship between surfasse and inflammatory resorption and changes in the pulp after replantation of permanent incisors in monkeys. *J Endod* 1981; 7:294-301.

- 42.Lindskog S, Pierce AM, Blomlof L, Hammarstrom L. The role of the necrotic periodontal membrane in cementum resorption and ankylosis. *Endod Dent Traumatol* 1985, 1:96-101.

Anexos

Anexos

Anexo A – Normas do periódico “*Dental Traumatology*”.

1. GENERAL

Dental Traumatology is an international journal which aims to convey scientific and clinical progress in all areas related to adult and pediatric dental traumatology. It aims to promote communication among clinicians, educators, researchers, administrators and others interested in dental traumatology. The journal publishes original scientific articles, review articles in the form of comprehensive reviews or mini reviews of a smaller area, short communication about clinical methods and techniques and case reports. The journal focuses on the following areas related to dental trauma:

Epidemiology and Social Aspects Tissue, Periodontal, and Endodontic Considerations Pediatrics and Orthodontics Oral and Maxillofacial Surgery/ Transplants/ Implants Esthetics / Restorations / Prosthetics Prevention and Sports Dentistry

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

2. ETHICAL GUIDELINES

Dental Traumatology adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal. ALL named authors must have made an active contribution to the conception and design and/or analysis and interpretation of the data and/or the drafting of the paper and ALL must have critically reviewed its content and have approved the final version submitted for publication. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship.

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

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration (version, 2008

<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. In the online submission process we also require that all authors submitting manuscripts to Dental Traumatology online must answer in the affirmative to a statement 'confirming that all research has been carried out in accordance with legal requirements of the study country such as approval of ethical committees for human and/or animal research or other legislation where applicable.' Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

2.3 Clinical Trials

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

All manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website, e.g., www.clinicaltrials.gov.

2.4 DNA Sequences and Crystallographic Structure Determinations

Papers reporting protein or DNA sequences and crystallographic structure determinations will not be accepted without a Genbank or Brookhaven accession number, respectively. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

2.5 Conflict of Interest

Dental Traumatology requires that sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Acknowledgements should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors. The Conflict of Interest Statement should be included as a separate document uploaded under the file designation 'Title Page' to allow blinded review.

2.6 Appeal of Decision

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

2.7 Permissions

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

2.8 Copyright Transfer Agreement

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

For authors signing the copyright transfer agreement

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

For authors choosing OnlineOpen

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

Creative Commons Attribution License OAA Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA Creative Commons Attribution Non-Commercial - NoDerivs License OAA

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

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For

more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Wiley-Blackwell if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.

Upon acceptance of a paper, authors are required to assign the copyright to publish their paper to Wiley-Blackwell. Assignment of the copyright is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form still has to be signed. A completed Copyright Transfer Agreement must be completed online before any manuscript can be published upon receiving notice of manuscript acceptance.

Kuthsiyya Peer Mohamed Production Editor John Wiley & Sons Singapore Pte Ltd
1 Fusionopolis Walk, #07-01 Solaris South Tower, Singapore 138628
Email: edt@wiley.com Fax: +65 6643 8599

2.9 OnlineOpen

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

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

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

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/dt>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from Editorial Assistant Karin Andersson at dtoffice@qualitynet.net.

3.1. Getting Started

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site:<http://mc.manuscriptcentral.com/dt>
- Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user.
- If you are creating a new account.
 - After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.
- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/dt> and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Author Centre.'

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your 'Author Centre', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next

screen.

- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- To allow double blinded review, please submit (upload) your main manuscript and title page as separate files. Please upload:
 - Your manuscript without title page under the file designation 'main document'
 - Figure files under the file designation 'figures'.
 - The title page, Acknowledgements and Conflict of Interest Statement where applicable, should be uploaded under the file designation 'title page'
- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing. All documents uploaded under the file designation 'title page' will not be viewable in the html and pdf format you are asked to review in the end of the submission process. The files viewable in the html and pdf format are the files available to the reviewer in the review process.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files uploaded as main manuscript documents will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The files uploaded as title page will be blinded from review and

not converted into HTML and PDF. The main manuscript document file must contain the entire manuscript including abstract, text, references, tables, and figure legends, but *no* embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to *Dental Traumatology* will be reviewed by two experts in the field. *Dental Traumatology* uses double blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper and the name(s) of the author(s) will not be disclosed to the reviewers. To allow double blinded review, please submit (upload) your main manuscript and title page as separate files.

Please upload:

- Your manuscript without title page under the file designation 'main document'
- Figure files under the file designation 'figures'
- The title page, Acknowledgements and Conflict of Interest Statement where applicable, should be uploaded under the file designation 'title page'

All documents uploaded under the file designation 'title page' will not be viewable in the html and pdf format you are asked to review in the end of the submission process. The files viewable in the html and pdf format are the files available to the reviewer in the review process.

3.5. Suggest a Reviewer

Dental Traumatology attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process,

please suggest the names and current email addresses of a potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the journal editor will choose one or two reviewers as well. When the review is done you will be notified under 'Manuscripts with decision' and through e-mail.

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

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

3.7. E-mail Confirmation of Submission

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

3.8. Manuscript Status

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

3.9. Submission of Revised Manuscripts

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

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Research Articles in all areas related to adult and pediatric dental traumatology are of interest to *Dental Traumatology*. Examples of such areas are Epidemiology and Social Aspects, Tissue, Periodontal, and Endodontic Considerations, Pediatrics and Orthodontics, Oral and Maxillofacial Surgery/ Transplants / Implants, Esthetics / Restorations / Prosthetics and Prevention and Sports Dentistry.

Review Papers: *Dental Traumatology* commissions review papers of comprehensive areas and mini reviews of small areas. The journal also welcomes uninvited reviews. Reviews should be submitted via the online submission site and are subject to peer-review.

Comprehensive Reviews should be a complete coverage of a subject discussed with the Editor in Chief prior to preparation and submission. Comprehensive review articles should include a description of search strategy of relevant literature, inclusion criteria, evaluation of papers and level of evidence.

Mini Reviews are covering a smaller area and may be written in a more free format.

Case Reports: *Dental Traumatology* accepts Case Reports but these will only be published online and will not be included in the printed version unless specifically requested by the Editor-in-Chief.

Case Reports illustrating unusual and clinically relevant observations are acceptable, but their merit needs to provide high priority for publication in the journal. They should be kept within 3-4 printed pages and need not follow the usual division into material and methods etc, but should have an abstract. The introduction should be kept short. Thereafter the case is described followed by a discussion.

Short Communications of 1-2 pages are accepted for quick publication. These papers need not follow the usual division into Material and Methods, etc., but should have an abstract. They should contain important new information to warrant publication and may reflect improvements in clinical practice such as introduction of new technology or practical approaches. They should conform to a high scientific and a high clinical practice standard.

Letters to the Editor, if of broad interest, are encouraged. They may deal with material in papers published in *Dental Traumatology* or they may raise new issues, but should have important implications.

Meetings: advance information about and reports from international meetings are welcome, but should not be submitted via the online submission site, but send directly to the journal administrator Karin Andersson at dtooffice@qualitynet.net

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Format

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

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: Abbreviations should be kept to a minimum, particularly those that are not standard. Non-standard abbreviations must be used three or more times and written out completely in the text when first used. Consult the following sources for additional abbreviations: 1) CBE Style Manual Committee. Scientific style and format: the CBE manual for authors, editors, and publishers. 6th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1994; and 2) O'Connor M, Woodford FP. Writing scientific papers in English: an ELSE-Ciba Foundation guide for authors. Amsterdam: Elsevier-Excerpta Medica; 1975.

Font: When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation. Use double spacing when writing.

5.2. Structure

All papers submitted to *Dental Traumatology* should include: Title Page, Abstract, Main text, References and Tables, Figures, Figure Legends, Conflict of Interest Statement and Acknowledgements where appropriate. Title page, Conflict of Interest Statement and any Acknowledgements must be submitted as separate files and uploaded under the file designation Title Page to allow blinded review. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal style will be returned to the author(s).

Title Page: should be uploaded as a separate document in the submission process under the file designation 'Title Page' to allow blinded review. It should include: Full title of the manuscript, author(s)' full names (Family names should be underlined) and institutional affiliations including city, country, and the name and address of the corresponding author. If the author does not want the e-mail address to be published this must be clearly indicated. The title page should also include a running title of no more than 60 characters and 3-6 keywords.

Abstract is limited to 250 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as inserted separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For original articles the abstract should be structured with the following headings: Background/Aim, Material and Methods, Results and Conclusions. For other article types, please choose headings appropriate for the article.

Main Text of Original Articles should be divided into Introduction, Material and

Methods, Results and Discussion. During the editorial process reviewers and editors frequently need to refer to specific portions of the manuscript, which is difficult unless the pages are numbered. Authors should number all of the pages consecutively.

Introduction should be focused, outlining the historical or logical origins of the study and not summarize the results; exhaustive literature reviews are inappropriate. Give only strict and pertinent references and do not include data or conclusions from the work being reported. The introduction should close with the explicit statement of the specific aims of the investigation or hypothesis tested.

Materials and Methods must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. Describe your selection of observational or experimental participants clearly. Identify the method, apparatus and procedures in sufficient detail. Give references to established methods, including statistical methods, describe new or modify methods. Identify precisely all drugs used including generic names and route of administration.

(i) Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material. All manuscripts reporting results from a clinical trial must indicate that the trial was fully registered at a readily accessible website, e.g., www.clinicaltrials.gov.

(ii) Experimental subjects: experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration (version, 2008 <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

(iii) Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

Results should present the observations with minimal reference to earlier literature or to possible interpretations. Present your results in logical sequence in the text, tables and illustrations giving the main or most important findings first. Do not duplicate data in graphs and tables.

Discussion may usually start with a brief summary of the major findings, but repetition of parts of the Introduction or of the Results sections should be avoided. The section should end with a brief conclusion and a comment on the potential clinical relevance of the findings. Link the conclusions to the aim of the study.

Statements and interpretation of the data should be appropriately supported by original references.

Main Text of Review Articles comprises an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledgements should be brief and should not include thanks to anonymous referees and editors.

Conflict of Interest Statement: All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. The Conflict of Interest Statement should be included as a separate document uploaded under the file designation 'Title Page' to allow blinded review.

5.3. References

As the Journal follows the Vancouver system for biomedical manuscripts, the author is referred to the publication of the International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Int Med* 1997;126:36-47.

Number references consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in texts, tables, and legends by Arabic numerals (in parentheses). Use the style of the examples below, which are based on the format

used by the US National Library of Medicine in Index Medicus. For abbreviations of journals, consult the 'List of the Journals Indexed' printed annually in the January issue of Index Medicus.

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

Anexo B – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).



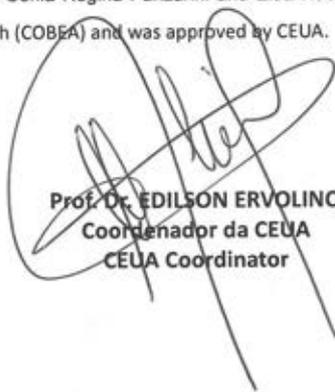
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Efeito do tratamento com Raloxifeno sobre o processo de reparo do reimplante dentário tardio. Estudo histológico em ratos" sob responsabilidade do Pesquisador **CELSO KOOGI SONODA** e colaboração de Willian Moraes de Melo, Roberta Okamoto, Sônia Regina Panzarini e Eloá Rodrigues Luvizuto está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo FOA-00517-2013.

CERTIFICATE

We certify that the research "Effect of Raloxifene therapy on the healing process after delayed tooth replantation. Histomorphometric analysis on rats", process number FOA-00517-2013, under responsibility of **CELSO KOOGI SONODA** and with collaboration of Willian Moraes de Melo, Roberta Okamoto, Sônia Regina Panzarini and Eloá Rodrigues Luvizuto agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. EDILSON ERVOLINO
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

Anexo C – Ilustração do Procedimento Cirúrgico



Figura 13 - Tricotomia.



Figura 14 - Exposição do ovário.

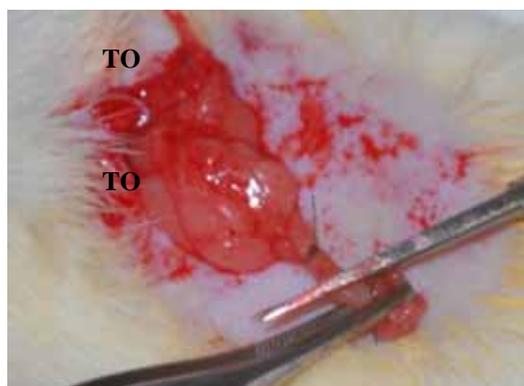


Figura 15 - Remoção do ovário.



Figura 16 - Sutura, após a ovariectomia.



Figura 17 - Sindesmotomia.



Figura 18 - Luxação do incisivo superior direito.



Figura 19 - Extração dentária.



Figura 20 - Aspecto clínico do incisivo extraído.



Figura 21 - Dentes mantidos em bancada em meio seco por 60'.



Figura 22 - Remoção da papila dentária e órgão do esmalte.



Figura 23 - Remoção do ligamento periodontal por fricção com gaze.



Figura 24 - Remoção da polpa radicular por via retrógrada.



Figura 25 - Irrigação com soro fisiológico.



Figura 26 - Secagem do canal com cone de papel absorvente.



Figura 27 - Pó de cimento de hidróxido de cálcio PA para obtenção do cimento obturador.



Figura 28 - Preenchimento do conduto radicular com pasta de hidróxido de cálcio.



Figura 29 - Reimplante dentário.



Figura 30 - Dente reimplantado.

Anexo D – Ilustração da Análise Histomorfométrica.

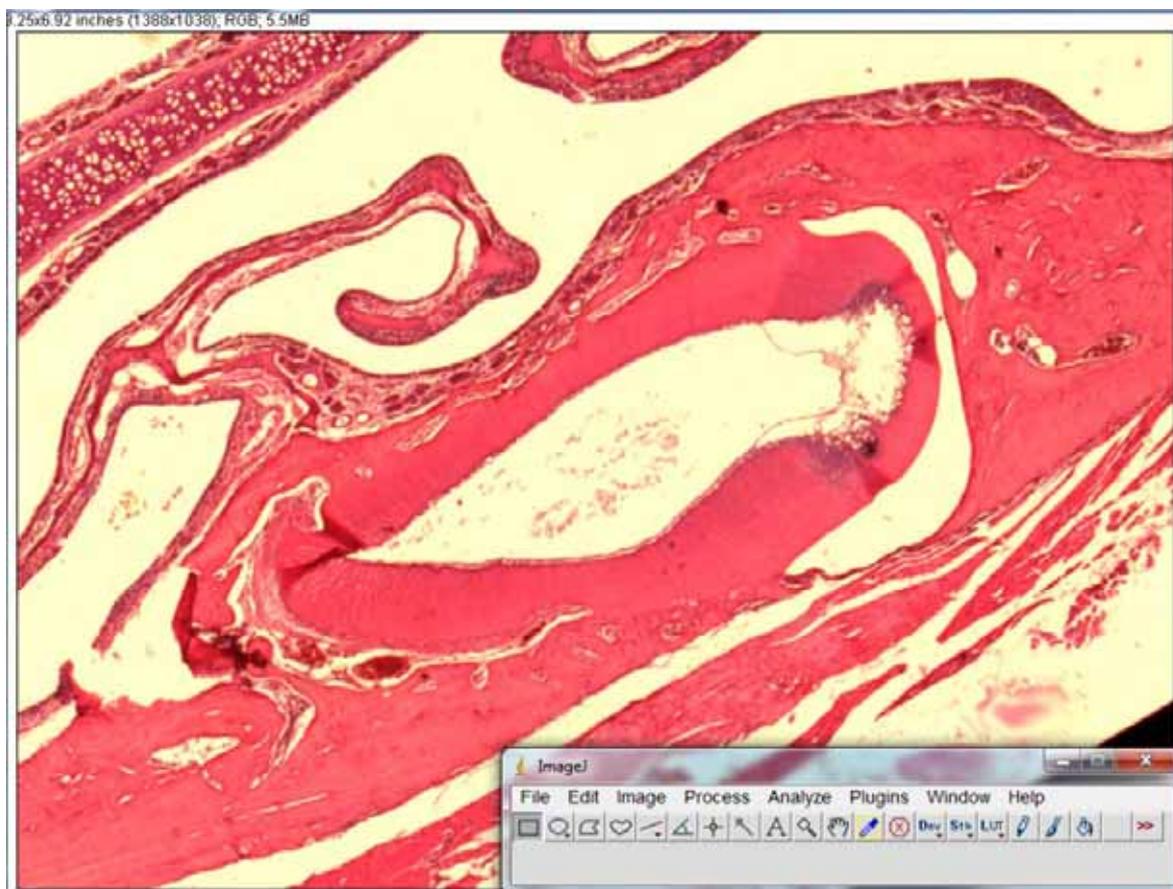


Figura 31 – Fotomicrografia digitalizada é exibida na área de trabalho do software Image J.

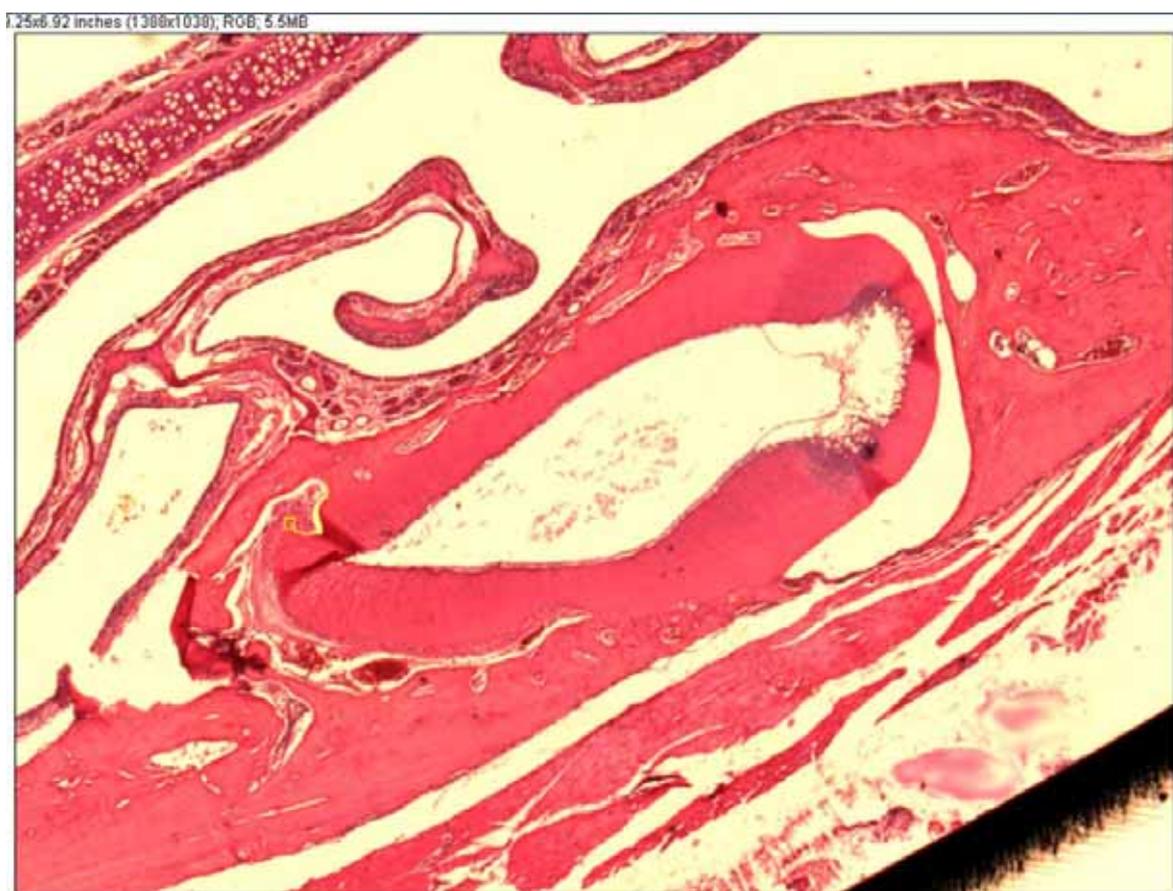


Figura 32 - Início da delimitação da área de reabsorção inflamatória da raiz, utilizando a ferramenta "Selecionar regiões".

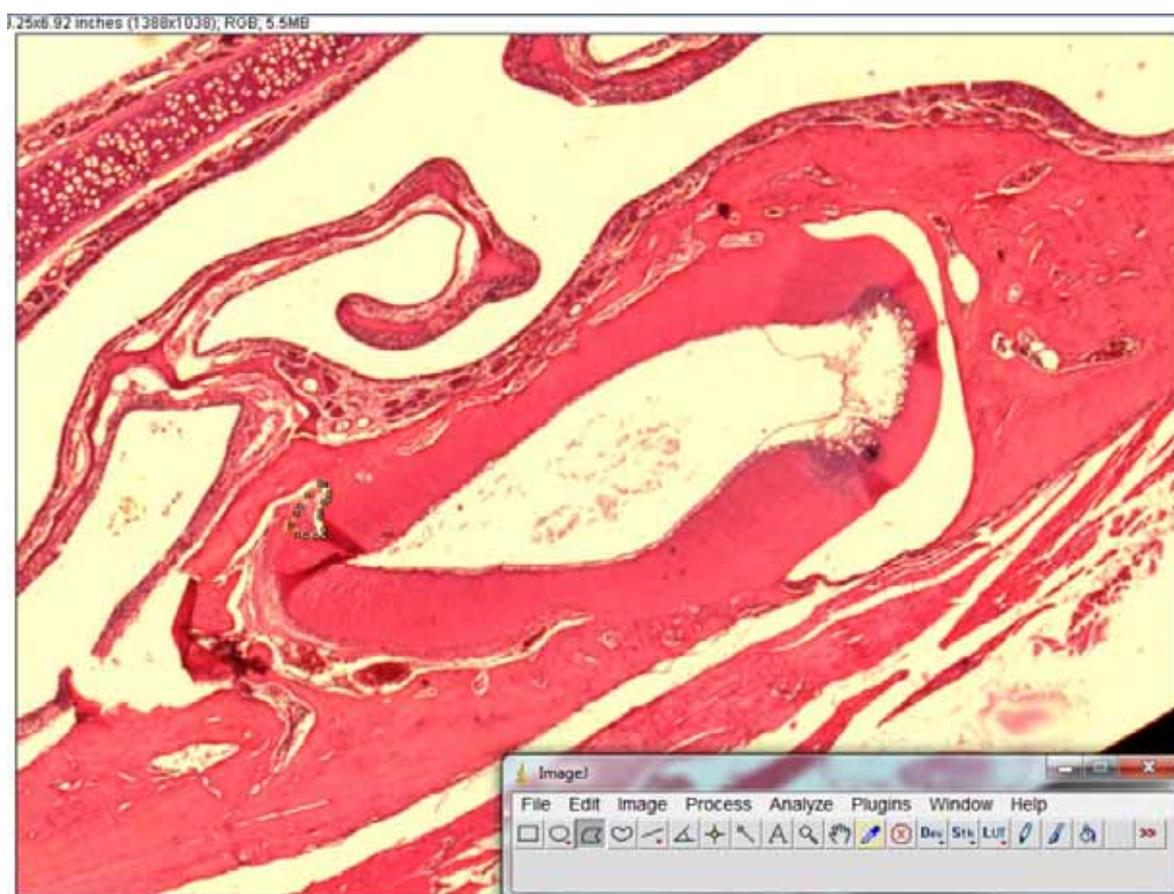


Figura 33 – Demarcação da área delimitada por meio da ferramenta “Cálculo de regiões”.

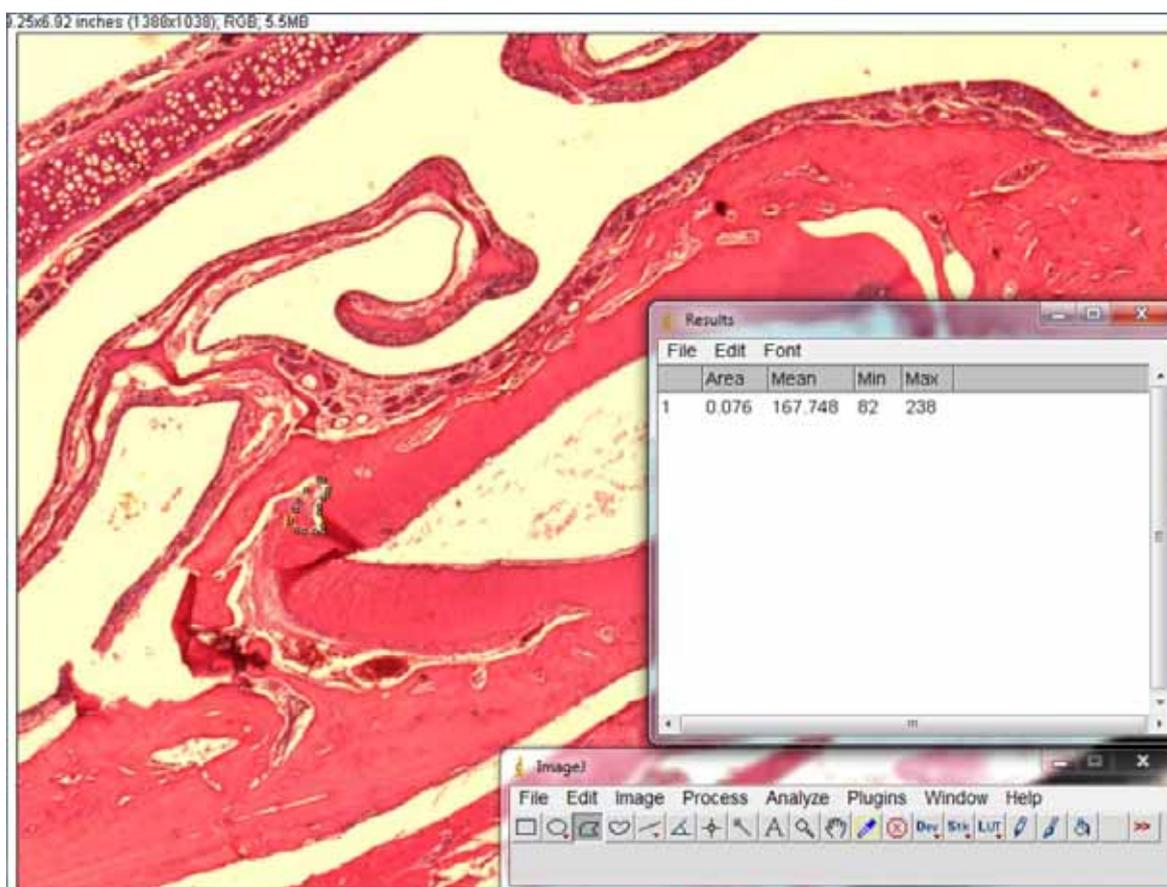


Figura 34 – Obtenção da “Planilha de cálculos” exibindo o valor, em pixels, da área de reabsorção inflamatória.

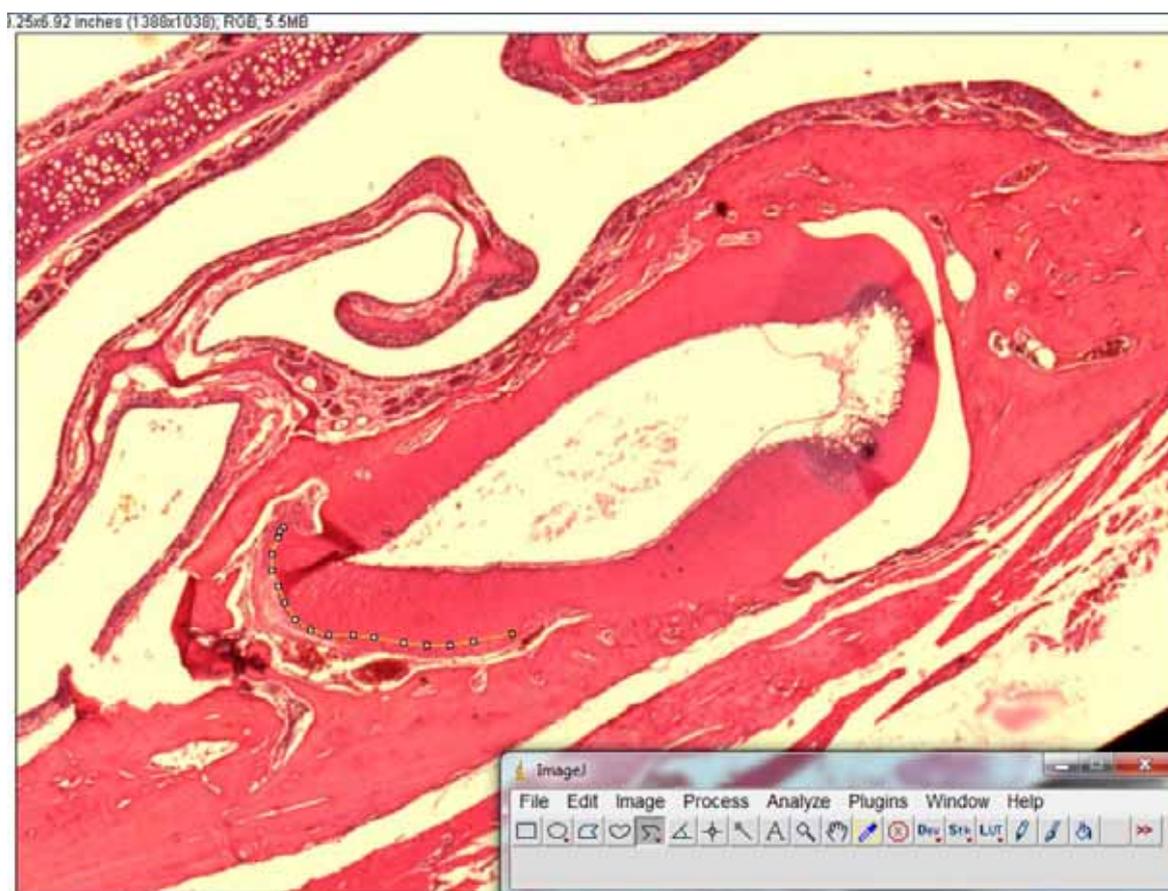


Figura 35 – Delimitação do perímetro de remanescentes do ligamento periodontal.

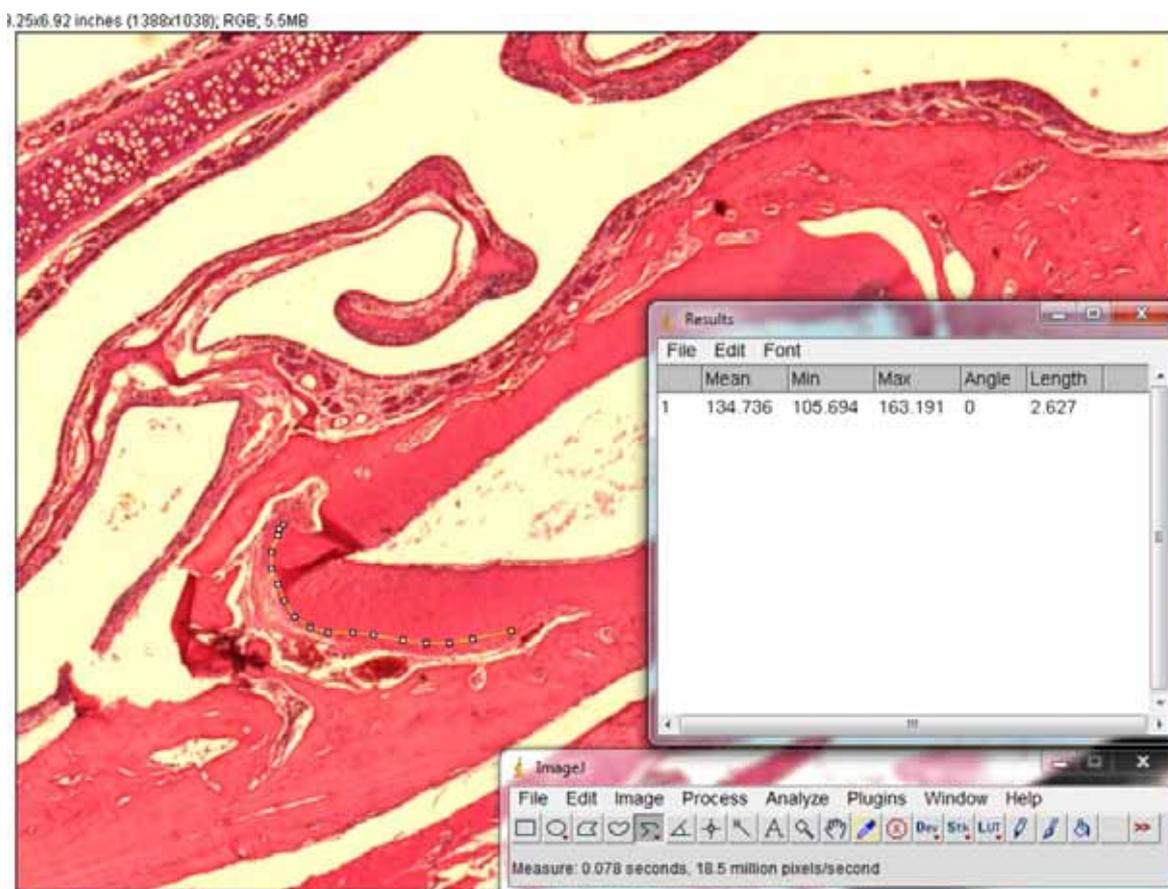


Figura 36 – “Planilha de cálculos” exibindo o perímetro de remanescentes de ligamento periodontal.

Anexo E – Tabela de Valores da Histomorfometria.

Tabela 3 – Porcentagem das médias e desvio padrão (DP) da reabsorção inflamatória (RI), reabsorção por substituição (RS), reabsorção total (RT), perímetro de anquilose (PA) e perímetro de ligamento periodontal (PLP) obtida em cada espécime.

		RI	RS	RT	PA	PLP
	Animal 1	20,72	5,86	26,58	0	46,58
		59,57	0	59,57	0	28,77
	Animal 2	11,33	0	11,33	3,93	17,43
		49,31	0	49,31	0	17,69
	Animal 3	31,61	13,22	44,83	9,4	13,58
		8,12	11,76	19,88	13,89	18,52
	Animal 4	0	51,87	51,87	35,78	0
		3,09	1,81	4,9	15,15	12,72
SHAM	Animal 5	3,29	4,15	7,44	0	24,29
		0,58	1,55	2,13	8,8	34,37
	Animal 6	2,12	2,33	4,45	21,5	31,49
		2,5	6,09	8,59	9,66	35,95
	Animal 7	5,94	1,68	7,62	6,58	15,12
		11,44	6,02	17,46	12,09	26,66
	Animal 8	2,39	7,6	9,99	29,16	32,26
		9,84	7,64	17,48	8,36	3,23
	Animal 9	7,25	10,72	17,97	6,24	13,99
		1,69	6,76	8,45	9,29	19,69
	Animal 10	2,45	3,47	5,92	11,23	22,25
		3,44	12,41	15,85	0	25,33
	Média	11,834	7,747	19,581	10,053	21,996
	DP	16,50423595	11,20351876	17,57451082	9,67697109	11,22215122
	Animal 1	19,07	4,21	23,28	16,32	5
		14,34	3,15	17,49	21,21	0
	Animal 2	24,46	25,43	49,89	12,56	16,97
		11,94	8,57	20,51	3,93	10,78
	Animal 3	6,15	4,59	10,74	2,52	27,57
		4,31	15,23	19,54	0	14,77
	Animal 4	50,84	2,82	53,66	0	42,07
		62,74	3,53	66,27	1,54	4,17
OVX/O	Animal 5	9,71	8,15	17,86	15,46	12,16
		20,35	5	25,35	1,57	9,36
	Animal 6	14,59	8,37	22,96	2,41	31,39
		3,23	7,23	10,46	5,32	9,89

	Animal 7	11,19	8,17	19,36	14,08	15,92
		47,24	0	47,24	0	17,69
	Animal 8	4,86	5,55	10,41	13,22	36,58
		6	2,2	8,2	11,18	27,35
	Animal 9	21,72	7,93	29,65	18,98	22,78
		29,31	7,37	36,68	4,94	0
	Animal 10	31,37	1,03	32,4	12,94	30,76
		55,32	2,58	57,9	0	6,58
	Média	22,437	6,5555	28,9925	7,909	17,0895
	DP	18,27071689	5,632527221	17,35302609	7,155282112	12,21134911
	Animal 1	7,76	2,79	10,55	19,18	19,88
		1,97	5,71	7,68	30,95	16,07
	Animal 2	5,44	8,5	13,94	1,68	14
		27,17	4,67	31,84	6,38	7,34
	Animal 3	1,97	3,09	5,06	37,63	21,18
		1,11	3,95	5,06	28,16	10
	Animal 4	3,81	2,93	6,74	25,3	22,04
		1,97	3,84	5,81	8,7	11,63
OVX/E	Animal 5	1,22	4,76	5,98	13,76	21,25
		7,45	6,45	13,9	0	34,21
	Animal 6	1,14	8,14	9,28	11,85	22,43
		3,69	3,4	7,09	10,83	19,7
	Animal 7	2,6	1,24	3,84	6,77	11,5
		23,83	4,15	27,98	11,89	37,67
	Animal 8	1,5	3,39	4,89	21,73	23,91
		2,28	4,56	6,84	6,09	11,14
	Animal 9	2,25	4,51	6,76	42,04	19,31
		1,27	1,82	3,09	36,43	28,96
	Animal 10	2,89	6,84	9,73	14,36	24,71
		1,95	6,66	8,61	42,07	15,12
	Média	5,1635	4,57	9,7335	18,79	19,6025
	DP	7,236567429	1,96213364	7,51032922	13,46914251	7,942855032
	Animal 1	3,41	6,58	9,99	12,79	25,23
		2,27	5,3	7,57	15,9	34,31
	Animal 2	10,4	15,83	26,23	6,51	36,75
		4,34	14,4	18,74	5,27	19,78
	Animal 3	1,48	5,95	7,43	32,98	24,94
		1,9	4,57	6,47	27,55	25,51
	Animal 4	3,78	12,37	16,15	13,65	27,83
		3,68	4,12	7,8	18,49	27,68
OVX/R	Animal 5	2,84	3,62	6,46	27,95	30,1
		2,63	5,52	8,15	21,59	35,68
	Animal 6	3	1,89	4,89	10,82	29,17
		1,15	6,56	7,71	10,42	43,15

	Animal 7	2,76	2,76	5,52	7,52	52,94
		4,37	4,79	9,16	6,81	34,2
	Animal 8	3,14	6,74	9,88	7,69	36,94
		4,82	5,51	10,33	0	39,39
	Animal 9	4,5	9,22	13,72	13,19	19,84
		12,41	6,54	18,95	16,24	22,57
	Animal 10	2,6	9,8	12,4	21,21	23,43
		1,97	9,86	11,83	26	22,6
	Média	3,8725	7,0965	10,969	15,129	30,602
	DP	2,786179945	3,741497413	5,42855016	8,83271306	8,529840253