

Sheila Mônica Damásio Dias

*Ação do estrógeno na expressão de proteínas
relacionadas ao metabolismo ósseo durante
regeneração alveolar em ratas*

Araçatuba – 2007

Sheila Mônica Damásio Dias

*Ação do estrógeno na expressão de proteínas
relacionadas ao metabolismo ósseo durante
regeneração alveolar em ratas*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, para a obtenção do grau de “MESTRE em Odontologia – Área de Implantodontia”.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior.

Co-orientadora: Profa. Ass. Dra. Rita Cássia Menegati Dornelles

Araçatuba – SP

- 2007 -

Dedicatória

Ao meu esposo Márcio, que com carinho, amor e dedicação
soube superar mais esta etapa de nossas vidas;

aos meus pais Mário e Natália, que com desprendimento
fundamentado no amor conduziram minha formação moral e
profissional,

dedico este trabalho.

Agradecimentos Especiais

Agradeço

à Deus, pois através deste curso foi possível fazer novos amigos, vivenciar situações antes desconhecidas e superar temores.

À minha irmã Patrícia e minha avó Benedita, pelos momentos de alegria, amizade e compreensão;

aos meus sogros e cunhados que me receberam de braços abertos em sua família;

à família Benez Ricieri que me adotou em Araçatuba;

à Cláudia Letícia por ter me ensinado o significado da palavra dividir;

à Thaís Rodrigues Silveira pelo companheirismo;

aos amigos, Lúcia Lima, Luciana, Cleirice, Vaninha, Maurício e Geraldo Kasbergen, pela torcida que tornou menor a distância entre Belo Horizonte e Araçatuba;

à Profa. Dra. Rita Cássia Menegati Dornelles, pela dedicação e esmero com que conduziu minha formação docente e pelos exemplos de honestidade, disciplina, segurança, responsabilidade e amizade que tanto contribuíram para minha formação pessoal.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior pela amizade e por ter assumido minha orientação junto ao programa de pós-graduação tornando possível a concretização de um sonho;

à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, nas pessoas do seu diretor Paulo Roberto Botacim e Vice-diretor Célio Percinoto pela oportunidade de realização do curso de mestrado em odontologia, área de Implantodontia;

à Prof. Dra. Roberta Okamoto pelo início de minha orientação e pela leitura das lâminas, seleção e aquisição das imagens;

à mestranda Eloá Rodrigues Luvizuto pela grande ajuda na execução dos procedimentos experimentais;

aos Professores, Funcionários, Pós-graduandos e Estagiários dos Departamentos de Ciências Básicas, de Cirurgia e Clínica Integrada e de Materiais Dentários e Prótese pela convivência agradável e auxílio na realização das atividades do curso de pós-graduação;

aos funcionários da Seção de Pós-graduação, do Biotério Central e da Biblioteca pela atenção e disponibilidade;

à Sra. Maria Antônia Piedade de Oliveira pela revisão de português;

ao mestrando Carlos Shimabucoro pelo auxílio durante os processos de edição e impressão;

à FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto, sem o qual, seria impossível realizar este estudo;

ao CNPq pela concessão de bolsa de estudo;

às ratas...

...muito obrigada!!!

Epígrafe

“A liberdade não consiste em fazer o que
queremos, mas em ter o direito de fazer o que
devemos”

Karol Wojtyła, 1995

Resumo

Dias SMD Ação do estrógeno na expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo ósseo durante regeneração alveolar em ratas [dissertação] Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2007.

Objetivo: Avaliar a atuação do E₂ durante a regeneração alveolar, utilizando a expressão das proteínas OPG, RANK e RANKL como indicadores celulares de predisposição à reabsorção ou formação de tecido ósseo. *Material e métodos:* Após 8 dias da cirurgia SHAM ou ovariectomia (OVX), as ratas (200g) OVX receberam implantes subcutâneos contendo óleo de milho (grupo OVX/óleo) ou E₂ (400µg) (grupo OVX/E₂). As exodontias dos incisivos superiores direitos foram realizadas no decorrer do tratamento e agendadas para que ao término de 60 dias fosse possível obter as peças referentes a 14, 28 e 42 dias de regeneração óssea alveolar. As peças foram submetidas a processamento imunohistoquímico. *Resultados:* Nos animais com ciclo estral regular (grupo SHAM), foi observada expressão baixa aos 14, média/alta aos 28 e a não expressão de OPG e RANKL aos 42 dias. A expressão de RANK iniciou alta e foi diminuindo até o último período analisado. No grupo OVX/Óleo a expressão de RANKL foi crescente até o término da análise aos 42 dias, enquanto que a

expressão de RANK diminuiu ao longo do período estudado. Foi observada expressão de OPG no início e ao final do período analisado. Os animais OVX/E₂ apresentaram marcação semelhante para OPG, RANK e RANKL aos 14 dias. A expressão de RANKL foi observada até o final do experimento, entretanto não foi detectada expressão de OPG e RANK aos 28 e 42 dias. *Conclusão:* Estes resultados evidenciam a participação do E₂ modulando o ciclo de remodelação óssea alveolar.

PALAVRAS-CHAVE: Estradiol; Regeneração óssea; Alvéolo dental; Imunoistoquímica; RANK ligante.

Abstract

Dias SMD Action of estrogen on expression of proteins related on bone metabolism during alveolar regeneration in rats [dissertation] Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2007.

Objective: To evaluate the role of E₂ during alveolar bone regeneration, using OPG, RANK and RANKL protein expression as cellular indicators of predisposition to resorption or bone tissue formation. *Methods:* Eight days after either SHAM surgery or ovariectomy (OVX), the OVX rats (200g) received subcutaneous implants with corn oil (OVX/oil group) or E₂ (400µg) (OVX/E₂ group). Extraction of the maxillary right incisors were performed during the course of the treatment and was scheduled in such a way that at the end of a 60-day period it would possible to retrieve anatomic pieces referring to 14, 28 and 42 days of alveolar bone healing. The pieces were submitted to immunohistochemical processing. *Results:* In the animals with regular estrous cycle (SHAM group), it was observed low expression at 14 days, medium/high expression at 28 days and no OPG and RANKL expression at 42 days. RANK expression started high and decreased continuously up to the last analyzed period. In the OVX/oil group, RANKL expression increased up to the completion of

the analysis at 42 days, whereas RANK expression decreased within the studied period. OPG expression was observed in the beginning and the end of the analyzed period. The animals OVX/E₂ showed similar labeling for OPG, RANK and RANKL at 14 days. RANKL expression was observed up to the end of the experiment. However, no OPG and RANK expression was detected at 28 and 42 days. *Conclusion:* These results demonstrate the role of E₂ modulating the alveolar bone remodeling cycle.

KEY WORDS: Estradiol; Bone regeneration; Dental socket; Immunohistochemistry; RANKL ligand.

Lista de Figuras

- Figura 1 Expressão das proteínas referentes aos animais do grupo SHAM e aos períodos após a exodontia. 14 dias: (A) OPG; (B) RANK; (C) RANKL. 28 dias: (D) OPG; (E) RANK; (F) RANKL. 42 dias: (G) OPG; (H) RANK; (I) RANKL. (original, DAB, 160x). p. 36
- Figura 2 Expressão das proteínas referentes aos animais do grupo OVX/Óleo e aos períodos após a exodontia. 14 dias: (A) OPG; (B) RANK; (C) RANKL. 28 dias: (D) OPG; (E) RANK; (F) RANKL. 42 dias: (G) OPG; (H) RANK; (I) RANKL. (original, DAB, 160x). p. 37
- Figura 3 Expressão das proteínas referentes aos animais do grupo OVX/E₂ e aos períodos após a exodontia. 14 dias: (A) OPG; (B) RANK; (C) RANKL. 28 dias: (D) OPG; (E) RANK; (F) RANKL. 42 dias: (G) OPG; (H) RANK; (I) RANKL. (original, DAB, 160x). p. 38
- Figura 4 Terço médio do alvéolo dental aos 14, 28 e 42 dias de reparo alveolar (vertical). (A, D e G) Grupo SHAM (B, E e H) Grupo OVX/Óleo (C, F e I) Grupo OVX/E₂ (original, HE 63x). p. 39

Setas em 1B e E, 2B e 3B, indicam marcações positivas de células semelhantes a OBs.

Lista de Abreviaturas

OPG	=	Osteoprotegerina
RANK	=	Receptor ativador do fator nuclear kappaB
RANKL	=	RANK ligante
E ₂	=	Estrógeno
SHAM	=	cirurgia sham
OVX	=	Ovariectomia
OVX/Óleo	=	OVX + tratamento com óleo de milho
OVX/E ₂	=	OVX + tratamento com 17-β estradiol
OBs	=	Osteoblastos
OCs	=	Osteoclastos
TNF	=	fator de necrose tumoral
NF-κB	=	fator nuclear kappaB
JNK	=	Jun N-terminal Kinase
PBS	=	tampão sódio fosfato
IgG	=	Imunoglobulina G
DAB	=	Diaminobenzidina
HE	=	hematoxilina/eosina
IL-1	=	interleucina - 1
IL-6	=	interleucina - 6
M-CSF	=	fator estimulante de colônia de macrófagos
PGE ₂	=	Prostaglandina E ₂

TGF- β	=	fator de crescimento transformador - β
PTH	=	Paratormônio
IL-1ra	=	antagonista do receptor para interleucina - 1
PTHrP	=	Peptídeo relacionado ao paratormônio
TNFR	=	receptor de fator de necrose tumoral

Sumário

1 Introdução	24
2 Proposição	28
3 Material e Método	30
4 Resultados	35
5 Discussão	42
6 Conclusões	50
Referências	52
Anexo A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética	59
Anexo B – Normas para publicação	60

1 Introdução*

O metabolismo ósseo é dependente dos processos de formação e reabsorção que são regulados por sinalização molecular. A hipótese de que os osteoblastos (OBs), células especializadas responsáveis pela formação de tecido ósseo, exercem função importante na diferenciação e ativação de osteoclastos (OCs), células da linhagem hematopoiética que reabsorvem osso, foi confirmada pela descoberta do sistema osteoprotegerina (OPG), receptor ativador do fator nuclear κ B (RANK) e RANK ligante (RANKL), cujos elementos são proteínas, pertencentes à super família fator de necrose tumoral (TNF) (Simonet *et al.*, 1997; Riggs, 2000; Ikeda *et al.*, 2001; Katagiri e Takahashi, 2002; Lerner, 2004).

RANKL, produzida por células da linhagem osteoblástica, liga-se ao RANK, receptor localizado na membrana de pré-osteoclastos, desencadeando a ativação dos efetadores finais da osteoclastogênese, ou seja, o fator nuclear κ B (κ appaB) e o Jun N-terminal kinase (JNK) (Suda *et al.*, 1999). As células da linhagem osteoblástica produzem também a OPG, receptor solúvel que se liga a RANKL, tornando-a indisponível para ligar-se ao RANK, inibindo a

* Normalização segundo a Revista Archives of Oral Research (Anexo B)

diferenciação e ativação de OCs (Simonet *et al.*, 1997). A importância fisiológica deste sistema sugere a manutenção do equilíbrio entre formação e reabsorção ósseas (Hofbauer *et al.*, 2000; Teitelbaum, 2000; Katagiri e Takahashi, 2002; Bell, 2003; Lerner, 2004).

Após a demonstração, em 1988 por Eriksen e colaboradores, de que os OBs contêm receptores funcionais para estrógeno (E_2), estudos têm sido direcionados à explicação dos efeitos deste hormônio no metabolismo ósseo. A deficiência de E_2 por ovariectomia (OVX) cirúrgica ou perda de função ovariana provoca aumento na ativação da remodelação e desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea (Riggs, 2000; Riggs *et al.*, 2002).

A deficiência sistêmica de E_2 altera a remodelação óssea alveolar, possivelmente por interferir na diferenciação de OBs (Li e Nishimura, 1994), diminui a densidade óssea mandibular (Jiang *et al.*, 2003) e induz a expressão de RANKL (Kawamoto *et al.*, 2002) e a osteoclastogênese no periodonto (Kawamoto *et al.*, 2002). De acordo com Hsieh e colaboradores (1994), a reabsorção do rebordo residual é maior em exodontias realizadas em mulheres menopausadas. Em animais de laboratório com deficiência estrogênica, foi observada alteração significativa na formação e mineralização óssea durante o processo de regeneração alveolar pós-exodontia (Hsieh *et al.*, 1995). As alterações na arquitetura óssea decorrentes da deficiência de E_2 , podem ser antagonizadas pela reposição farmacológica deste hormônio, restaurando o equilíbrio do

metabolismo e prevenindo a perda óssea (Aubin e Boneye, 2000; Vincent *et al.*, 2003).

Considerando o curto período necessário para cicatrização e a relevância clínica, o modelo de regeneração tecidual pós-exodontia é interessante para verificar a expressão das proteínas do sistema OPG, RANK e RANKL em ratas com ciclo estral regular e ratas OVX submetidas ou não à reposição hormonal de E₂.

2 Proposição

Foi objetivo deste trabalho, avaliar a atuação do E₂ no metabolismo ósseo durante a regeneração alveolar, utilizando a expressão das proteínas OPG, RANK e RANKL como indicadores celulares de predisposição à reabsorção.

3 Material e Métodos

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP sob protocolo de número 38/05 (Anexo A).

Cirurgias:

Foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus albinus* - Wistar), com peso corporal de 200g, nulíparas, avaliadas por citologia vaginal (Evans e Long, 1922) e apresentando ciclo estral regular, mantidas em ambiente com controle de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz (12/12h), alimentadas com ração balanceada (Guabinutrilabor ratos e camundongos[®], Guabi, Campinas, Brasil) e água à vontade.

Para a realização das cirurgias, os animais foram anestesiados com Cloridrato de Cetamina (Vetaset[®], Fort Dodge saúde animal Ltda, Campinas, SP, Brasil/i.p.) e Xilasina (Dopaser[®], Laboratórios Calier S.A., Barcelona, Espanha/i.p.). O grupo controle (24 ratas) foi submetido à cirurgia sham (grupo SHAM) e os 48 animais restantes passaram pelo procedimento de OVX bilateral cirúrgica. Todos os animais receberam dose única (0,1ml/rata/i.m.) de antibiótico

veterinário polivalente (Pentabiótico[®] veterinário pequeno porte, Fort Dodge[®], Fort Dodge saúde animal Ltda, Campinas, SP, Brasil) imediatamente após as cirurgias. Decorridos 8 dias, 24 ratas OVXs receberam implantes subcutâneos de polietileno (Silastic[®], Dow Corning, Degania, Israel) contendo óleo de milho (grupo OVX/óleo) e outras 24 receberam implantes contendo 17 β -estradiol (400 μ g, Sigma[®], Sigma-Aldrich Corporation, ST. Louis, Missouri, USA) diluído em óleo de milho (grupo OVX/E₂). Os pellets foram mantidos por 60 dias com trocas na metade deste período. O esfregaço vaginal foi monitorado para certificar a efetividade do tratamento.

As exodontias dos incisivos superiores direitos (Okamoto e Russo, 1973) foram realizadas em períodos pré-determinados para obtenção das peças referentes a 14, 28 e 42 dias de regeneração óssea alveolar.

Coleta de sangue, eutanásia e obtenção das peças:

Sob anestesia geral, foi retirado 1ml de sangue venoso através da canulação da veia jugular (Harms e Ojeda, 1974), para dosagem hormonal posterior através de radioimunoensaio.

A perfusão transcardíaca (Eichhammer *et al.*, 1987), foi realizada com 600ml/rata de formaldeído 4%, pH 9,5 (4⁰C), utilizando bomba peristáltica Masterflex LS[®] (Cole Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL.)

As peças foram obtidas procedendo duas incisões: 1) na sutura intermaxilar e 2) perpendicular à primeira, tangente à distal do último molar.

Processamento histológico:

As peças foram submetidas à pós-fixação (formaldeído 4%), lavagem em tampão sódio fosfato (PBS), descalcificação em EDTA 5% (Titriplex[®], Merck, Damstadt, Alemanha) e crioproteção em Sacarose 20% (Merck, Damstadt, Alemanha). Cortes ao longo eixo do alvéolo, com 14 µm de espessura, feitos em criostato (Mícron, Zeiss, Alemanha), foram montados em lâminas gelatinizadas.

Os anticorpos primários (1:100) foram contra a OPG (Rabbit anti-opg – Santa Cruz Biotechnology – SC11383), RANK (Rabbit anti-rank – Santa Cruz Biotechnology – SC9072) e RANKL (Goat anti-rankl – Santa Cruz Biotechnology – SC7627). Os anticorpos secundários (1:200) foram anti-coelho biotinilado produzido em burro (Biotin-SP-conjugated AffiniPure donkey anti-rabbit IgG - Jackson Immunoresearch Laboratories – 711.065.152) e anti-cabra biotinilado produzido em burro (Biotin-SP-conjugated AffiniPure donkey anti-Goat IgG - Jackson Immunoresearch Laboratories - 705-065-147).

O sinal da reação foi amplificado com o sistema avidina-biotina (Kit ABC-Vectastain Elite ABC – Peroxidase Standard, reagent A and B only – PK6100 – Vector Laboratories) e a reação foi revelada utilizando a diaminobenzidina (DAB) (Sigma[®], Sigma-Aldrich Corporation, ST. Louis, Missouri, USA) como cromógeno.

A especificidade das marcações foi confirmada através da exclusão do anticorpo primário em lâminas controle. Todas as incubações dos anticorpos foram realizadas em câmara úmida à temperatura de 25°C. A coloração em hematoxilina/eosina (HE) foi realizada como referência para a citoarquitetura dos cortes analisados.

O terço médio dos alvéolos dentais foi examinado com o auxílio de microscópio de luz.

4 Resultados

Grupo SHAM:

14 dias – Foi observada marcação alta de RANK (Fig. 1B) em células com morfologia semelhante a osteoblastos localizadas na interface do tecido ósseo, próximas ao osteóide. Os poucos osteócitos e células de revestimento ósseo presentes apresentaram expressão baixa de OPG e RANKL (Fig. 1A e C).

28 dias – A expressão de OPG e RANKL (1D e F) por osteócitos e células de revestimento ósseo foi média/alta, enquanto a disponibilidade do receptor RANK marcado em células semelhantes à OBs foi média (Fig. 1E).

42 dias – Neste período observou-se expressão baixa de RANK (Fig. 1H), enquanto a expressão de OPG e RANKL não foi perceptível (Fig. 1G e I).

No decorrer do processo de regeneração alveolar, houve variação proporcional entre a expressão de OPG e RANKL. Foi observada expressão baixa no primeiro período analisado (fig. 1A e C), expressão média/alta aos 28 dias (Fig. 1D e F) e nenhuma expressão aos 42 dias de regeneração alveolar (Fig. 1G e I).

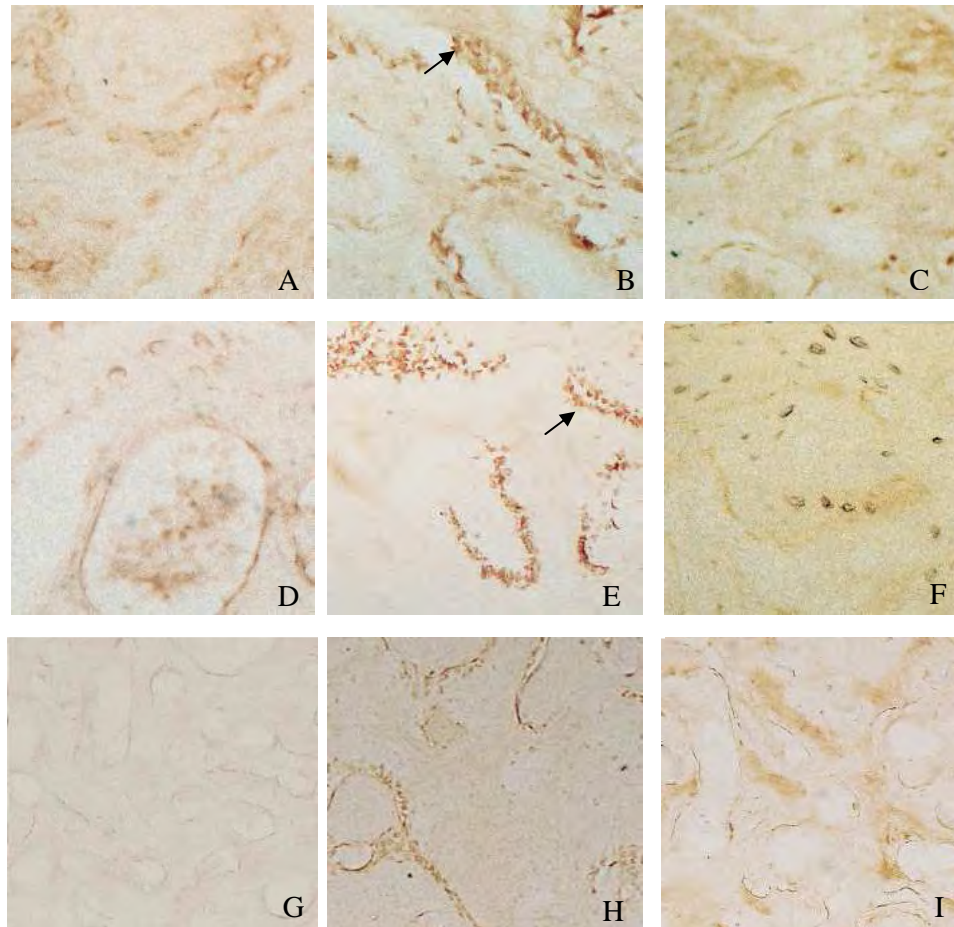


Fig. 1: Expressão das proteínas referentes aos animais do grupo SHAM e aos períodos após a exodontia. 14 dias: (A) OPG; (B) RANK; (C) RANKL. 28 dias: (D) OPG; (E) RANK; (F) RANKL. 42 dias: (G) OPG; (H) RANK; (I) RANKL. As setas indicam marcações positivas em células semelhantes a OBs. (original, DAB, 160x).

Grupo OVX/Óleo:

14 dias – Células semelhantes à OBs marcaram positivamente para RANK, RANKL e OPG, sendo considerada média a expressão de OPG e RANK (Fig. 2A e B) e média/baixa para RANKL (Fig. 2C).

28 dias – Não foi observada marcação de OPG neste período (Fig. 2D), enquanto células semelhantes à OBs apresentaram expressão baixa para RANK (Fig. 2E) e células da linhagem

osteoblástica localizadas no interior do tecido ósseo, apresentaram expressão média/alta para RANKL (Fig. 2F).

42 dias – Foi evidenciada imunomarcacão discreta contra OPG (Fig. 2G) e expressão alta de RANKL em células maduras da linhagem osteoblástica (Fig. 2I). Não foi detectada expressão de RANK (Fig. 2H).

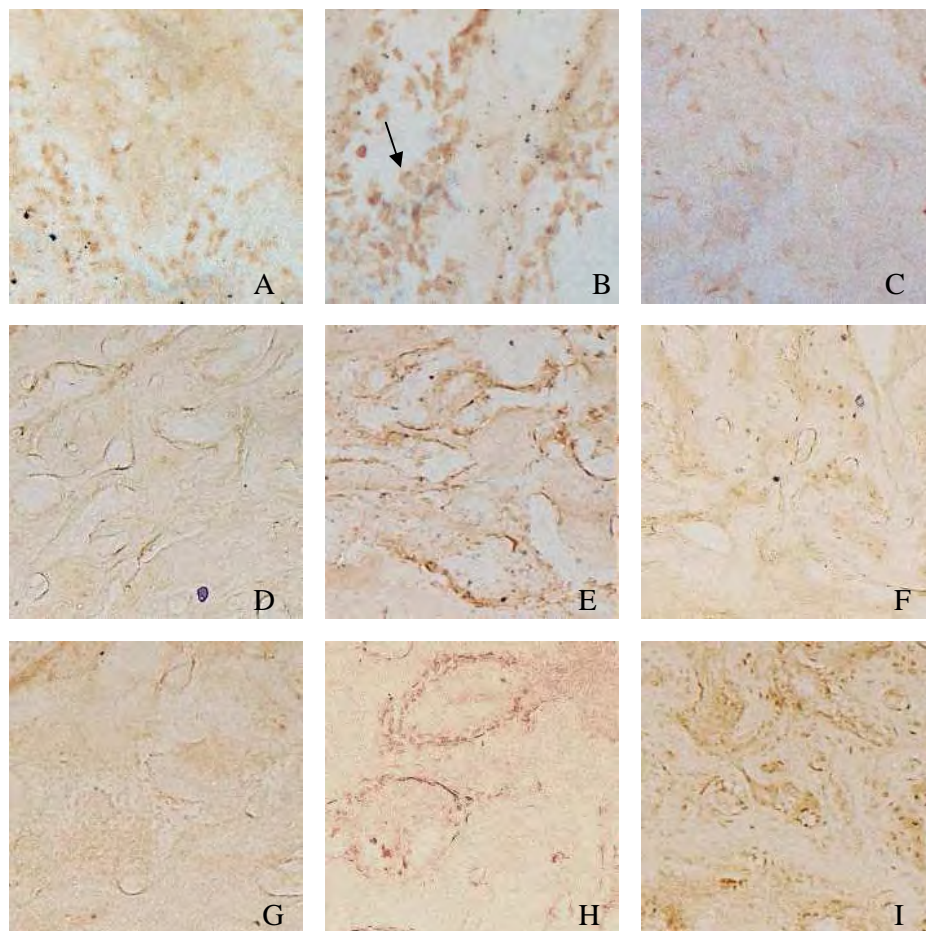


Fig. 2: Expressão das proteínas referentes aos animais do grupo OVX/Óleo e aos períodos após a exodontia. 14 dias: (A) OPG; (B) RANK; (C) RANKL. 28 dias: (D) OPG; (E) RANK; (F) RANKL. 42 dias: (G) OPG; (H) RANK; (I) RANKL. A seta indica marcação positiva em células semelhantes a OBs. (original, DAB, 160x).

Grupo OVX/E₂:

14 dias – Marcações consideradas de expressão média para OPG, RANK e RANKL, foram identificadas em células que

apresentavam localização e citoarquitetura semelhante à de células da linhagem osteoblástica (Fig. 3A, B, C).

28 dias – Foi observada expressão alta de ligante (Fig. 3F) em células maduras no interior do trabeculado ósseo, enquanto que a disponibilidade dos dois receptores foi nula (Fig. 3D e E).

42 dias – Os receptores OPG e RANK (Fig. 3G e H) também não apresentaram marcações neste período. Entretanto, foi constatada expressão média de RANKL (Fig. 3I) nos osteócitos.

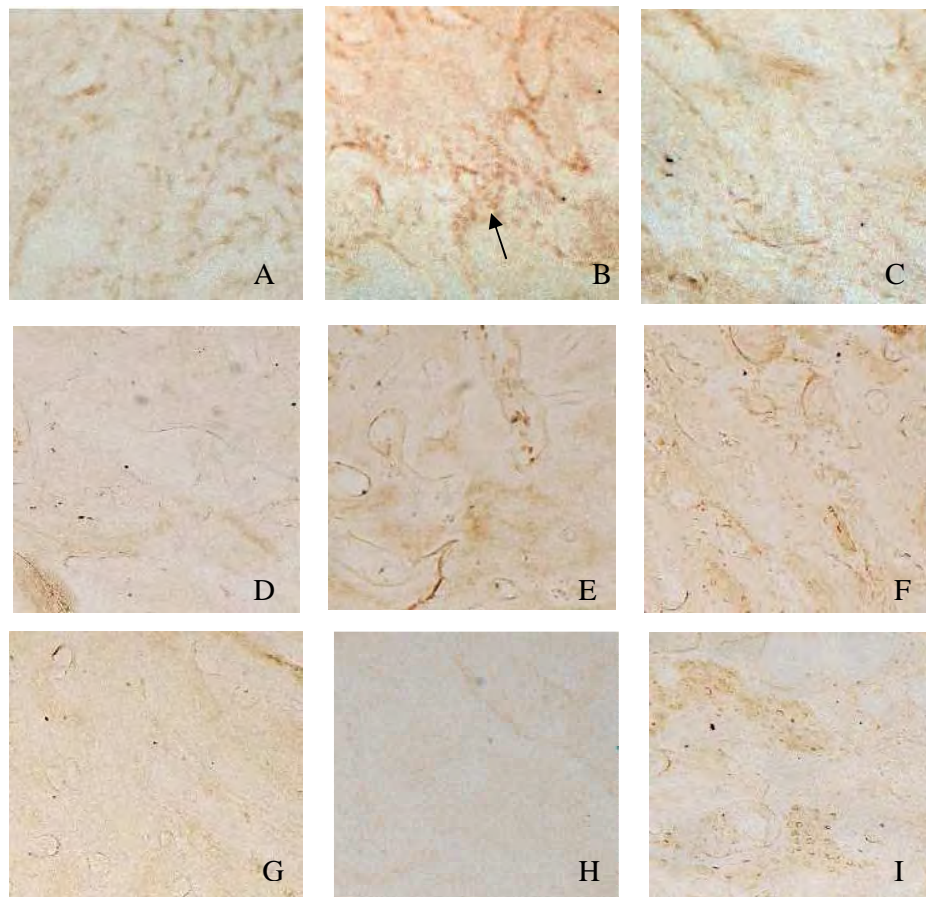


Fig. 3: Expressão das proteínas referentes aos animais do grupo OVX/E₂ e aos períodos após a exodontia. 14 dias: (A) OPG; (B) RANK; (C) RANKL. 28 dias: (D) OPG; (E) RANK; (F) RANKL. 42 dias: (G) OPG; (H) RANK; (I) RANKL. A seta indica marcação positiva em células semelhantes a OBs. (original, DAB, 160x).

Os cortes destinados ao controle da especificidade da reação imunohistoquímica que foram submetidos à seqüência de procedimentos, com exclusão do anticorpo primário, não apresentaram marcações.

Controles histológicos, corados pela HE, foram úteis para comparação da citoarquitetura e avaliação das condições da regeneração óssea (Fig. 4).

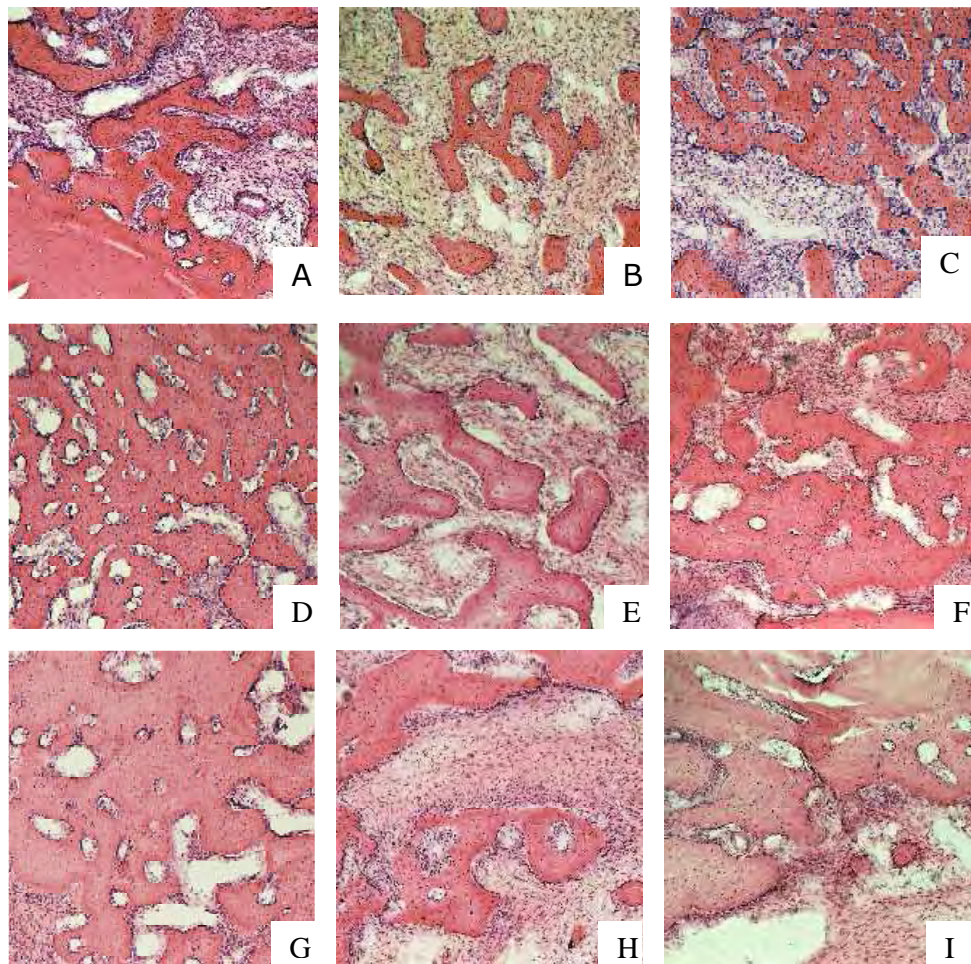


Fig. 4: Terço médio do alvéolo dental aos 14, 28 e 42 dias de reparo alveolar (vertical). (A, D e G) Grupo SHAM (B, E e H) Grupo OVX/Óleo (C, F e I) Grupo OVX/E₂ (original, HE 63x).

A citologia esfoliativa realizada durante o tratamento mostrou que os animais do grupo SHAM apresentaram ciclo estral regular,

enquanto o grupo OVX/Óleo, cuja dosagem hormonal foi 10,71 (\pm 0,54) pg/ml de E₂, permaneceu em diestro e o grupo OVX/ E₂ que apresentou 50,40 (\pm 2,46) pg/ml de E₂, oscilou entre proestro e estro.

5 Discussão

A retirada da secreção cíclica do esteróide gonadal alterou a expressão das proteínas OPG, RANK e RANKL nos 14, 28 e 42 dias pós-exodontia.

Estudos evidenciam que E₂ modula a síntese de substâncias relacionadas diretamente com o metabolismo ósseo, como interleucina-1 (IL1), interleucina-6 (IL6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF), prostaglandina E₂ (PGE₂), fator de crescimento transformador- β (TGF- β) e paratormônio (PTH), bem como atua diretamente nas respostas celulares a estas substâncias (Manolagas, 2000, Riggs, 2000). Compston (2001) e Riggs 2000 verificaram aumento de substâncias osteoclastogênicas após a OVX ou menopausa, sendo estes efeitos revertidos pela terapia de reposição de E₂ (Aubin e Boneyle, 2000; Vincent *et al.*, 2003).

As expressões de OPG, RANK e RANKL detectadas em células da linhagem osteoblástica, nas ratas com ciclo estral regular (Fig. 1), demonstram o equilíbrio dinâmico entre formação e reabsorção ósseas. Em condições fisiológicas, a formação dos osteoclastos requer contato com as células estromais e osteoblásticas, as quais expressam as proteínas RANKL e M-CSF em resposta a vários fatores de reabsorção óssea (Katagiri e Takahashi, 2002). Os resultados

obtidos (Fig. 1) corroboram com o que está descrito, ou seja, a participação do E₂ na homeostasia óssea através da diminuição da produção de fatores pró-osteoclastogênicos, como IL-1, IL-6, TNF, M-CSF e PGE₂ e estimulação da produção de fatores antiosteoclastogênicos, como o antagonista do receptor para interleucina-1 (IL-1ra) (Pacifici *et al.*, 1993), OPG (Hofbauer *et al.*, 2000) e TGF- β (Oursler *et al.*, 1991).

Embora o anticorpo anti-RANK seja citado na literatura (Jimi, *et al.*, 1996; Suda *et al.*, 1999; Khosla, 2001; Ikeda *et al.*, 2001) como específico para pré-osteoclastos e OCs maduros, no alvéolo em regeneração, as células com morfologia semelhante a OBs, localizados na periferia do osteóide, apresentaram marcações contra RANK. Pettit e colaboradores (2006), utilizando anticorpos contra RANK em estudo de erosão óssea na artrite reumatóide em humanos, identificaram marcações em células com morfologia de OBs em 6 do total de 14 amostras examinadas. Coutinho (2005), que estudou o processo de regeneração alveolar em ratos, confirmou a localização topográfica das células semelhantes a OBs imunomarcadas por RANK no tecido ósseo através de coloração HE associada à imunistoquímica. Além disso, realizou experimentos de controle positivo nos quais, células semelhantes a fibroblastos do ligamento periodontal e macrófagos da cavidade nasal de ratos, mostraram-se imunorreativos para RANK, garantindo a especificidade do anticorpo utilizado. Ao reagir cortes de fetos de ratos com 21 dias (Coutinho,

2005), observou marcações desta proteína em osso primário. Esses resultados sugerem, que o trauma cirúrgico desencadeia aumento do “turnover” ósseo durante a regeneração alveolar e pode causar alterações no metabolismo celular resultando em osteoblastos com elevadas propriedades osteoclastogênicas, fato que foi verificado de maneira intensa aos 14 (Fig. 1B) e decrescente dos 28 aos 42 dias pós-exodônticos (Fig. 1E e H), pois a evolução do processo de cicatrização (Fig. 4 A, D, G) resultou na diminuição da frequência de ativação das unidades ósseas multicelulares.

Células que expressam RANK (Fig. 1B, E e H) estiveram presentes durante todo o período analisado e devido a esta marcação, é possível afirmar que havia receptores disponíveis à osteoclastogênese, mas a expressão do receptor isca (OPG), que foi equivalente à do ligante (RANKL) minimizou o contato célula-a-célula, a formação do complexo RANK-RANKL e ativação de NF κ B e JNK (Fig. 1A, C, D, F, G e I).

As expressões de OPG (Fig. 2A, D e G) e RANK (Fig. 2B, E e H) foram diminuindo ao longo dos períodos analisados, no tecido ósseo alveolar dos animais castrados sem reposição hormonal. Entretanto, a expressão de RANKL, nos mesmos períodos, foi inversamente proporcional (Fig. 2C, F e I). Provavelmente, a expressão baixa de OPG (Fig. 2D) resulta da não ativação dos receptores de E₂ presentes nos pré-osteoblastos e inibição conseqüente da sinalização autócrina para produção de TGF- β (Riggs, 2000; Bell, 2003). A produção de

TGF- β está diretamente relacionada com a proliferação e diferenciação de pré-osteoblastos (Spelsberg *et al.*, 1999), com a síntese de OPG e com a apoptose de OCs (Compston, 2001).

Além disso, a deficiência de E₂ para ativar receptores específicos existentes nas células T (Cenci *et al.*, 2000) e B do sistema imune e pelas células da linhagem osteoblástica (Bell, 2003), pode ter desencadeado aumento na produção de RANKL por esses tipos celulares (Fig. 2C, F e I). Sabe-se que a concentração plasmática baixa de E₂ desencadeia aumento da produção de IL-1 (estimulador potente da reabsorção óssea) e TNF- α pelos monócitos e células T (Bell, 2003). Estas substâncias atuam também em OBs e células do estroma aumentando a síntese de M-CSF, que é fator responsável pela proliferação de pré-osteoclastos, pelo estímulo para expressão de RANK e pelo retardo da apoptose de OCs (Lee e Lorenzo, 2006), e de PGE₂, que inibi a produção de OPG (Suda *et al.*, 1999 e Hofbauer *et al.*, 2000).

De acordo com Kimble e colaboradores (1996), a OVX desencadeia aumento na concentração de IL-1 e TNF- α , que atuam na diferenciação de células do estroma com fenótipo para produção maior de M-CSF. Associando as informações da literatura com os resultados obtidos, pode-se sugerir que o atraso na regeneração alveolar dos animais OVX sem reposição hormonal (Fig. 4 B, E e H) ocorreu devido: 1) ao aumento no número de OCs; 2) à síntese insuficiente de OPG para prevenir a formação do complexo RANK-

RANKL, permitindo a diferenciação e ativação de pré-osteoclastos; 3) à ocorrência de osteoclastogênese através da ligação de TNF- α ao seu receptor (TNFR) (Riggs, 2000; Katagiri e Takahashi, 2002); 4) ao aumento do tempo de vida de OC maduros devido ação da IL-1; 5) à redução da produção TGF- β . Além disso, o aumento crescente da expressão de RANKL detectada nos animais OVX (Fig. 2C, F,I) pode ser resultado de aumento da secreção de PTH, pois autores verificaram que este hormônio estimula expressão maior de RNAm de RANKL em OBs e células do estroma (Lee e Lorenzo, 1999; Suzawa *et al.*, 2000).

No tecido ósseo dos animais OVX com reposição hormonal, as células com morfologia semelhante à OBs expressaram de maneira equivalente OPG, RANK e RANKL (Fig. 3A, B e C), aos 14 dias de regeneração óssea. A diminuição da reabsorção óssea constatada, quando comparada ao grupo OVX/óleo, pode ser resultado da ação de OPG que diminuiu a ligação RANK/RANKL e deixou os OCs expostos à ação do TGF- β . Estes resultados estão de acordo com Oursler e colaboradores (1991), que afirmam ser o mecanismo de ação de TGF- β , o primeiro exemplo dos efeitos positivos do estrógeno no osso, pois resulta na diminuição do "turnover" ósseo.

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho evidenciou marcações pelo anticorpo anti RANKL em todos os períodos estudados nos grupos OVXs, independente da presença do E₂ (Fig. 2-3C, F e I). Nas fêmeas OVX tratadas com E₂, as imunomarcações

positivas para RANKL durante os períodos de 28 e 42 dias se apresentaram em osteócitos localizados no interior das trabéculas ósseas (Fig. 3F e I), fazendo alusão à maturidade tecidual compatível com os períodos avaliados e o tratamento proposto, apresentando correspondência com a cicatrização óssea alveolar em fêmeas naturalmente estrogenizadas (Fig. 4D, F, G e I).

Células de revestimento ósseo (Philbrick *et al.*, 1998), OBs e células estromais (Suda *et al.*, 1999) possuem receptores para PTH/peptídeo relacionado ao PTH (PTHrP). Além do E₂ modular a produção do PTH, a reposição com 17- β estradiol, diminui a afinidade dos receptores para PTH, interferindo na produção de citocinas envolvidas no metabolismo ósseo, exercendo a função de osteoprotetor (Aubin e Boney, 2000), o que pode ter sido causa da ausência da expressão de RANK nos períodos de 28 e 42 dias (Fig. 3E e H). A ausência de expressão de RANK e conseqüentemente de sinalização para reabsorção óssea nos períodos de 28 e 42 dias (Fig. 3E e H; 4F e I) pode estar relacionada às mudanças ocorridas nos OCs em resposta a administração de 17- β estradiol. Gruber e colaboradores (2001) analisaram a ultra-estrutura de OCs de camundongos submetidos a tratamento com 17- β estradiol e perceberam mudanças morfológicas que impossibilitavam a organização de seu citoesqueleto para originar borda franjada semelhante às dos OCs do grupo controle. Os OCs também se

tornaram incapazes de formar a zona de selamento com o tecido ósseo.

O E₂ leva à geração de células do estroma com bloqueio funcional para produção de IL-1 e TNF, acarretando produção baixa de M-CSF (Kimble *et al.*, 1996). Pode-se inferir que os efeitos da reposição hormonal com E₂ causaram menor proliferação, diferenciação e ativação de OCs, favorecendo arquitetura trabecular semelhante aos do grupo SHAM e mais compacta que nos animais OVX/Óleo (Fig. 4). Apesar da não expressão de OPG (Fig. 3D e G) e pela acentuada expressão de RANKL (Fig. 3F e I) a reabsorção de tecido ósseo é contida nestes dois períodos, pois não há disponibilidade de RANK para a osteoclastogênese (Fig. 3E e H).

Estes resultados demonstram a importância da interação hipotálamo-hipófise-gônada-osso, sugerindo a correlação da ritmicidade da secreção esteroidal e a expressão das proteínas ósseas, pois o balanço (grupo SHAM) na expressão de OPG, RANK e RANKL foi alterado após a retirada dos ovários (grupos OVXs) e não foi restabelecido com a administração intermitente de E₂ (grupo OVX/E₂), evidenciado a importância do esteróide gonadal no metabolismo ósseo.

6 Conclusões

Os resultados encontrados sugerem participação do E_2 na modulação da expressão das proteínas relacionadas ao ciclo de remodelação óssea, por ação direta ou indireta sobre células do tecido ósseo.

A deficiência de E_2 provoca atraso na regeneração óssea alveolar por propiciar o estabelecimento de condições que favorecem a osteoclastogênese e a redução da apoptose de OCs.

A correspondência da citoarquitetura óssea do terço médio do alvéolo dental de SHAM e OVX/ E_2 em todos os períodos analisados está relacionada à ação do E_2 circulante sobre a produção de substâncias que interferem no metabolismo ósseo dos animais destes grupos. A equivalência e o balanço das expressões de OPG e RANKL no decorrer dos períodos analisados nos animais SHAM, garantiram manutenção do equilíbrio entre reabsorção e formação. Apesar do efeito benéfico da administração constante do 17- β estradiol, sobre o processo de regeneração alveolar, a falta de ritimicidade na liberação de esteróides, parece ter sido o fator responsável pela ausência de balanço entre as expressões de RANKL e OPG no grupo OVX/ E_2 .

Referências*

1. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; **89**: 309-19.
2. Riggs BL. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest* 2000; **106**: 1203-4.
3. Ikeda T, Utsuyama M, Hirokawa K. Expression profiles of receptor activator of nuclear factor κ B ligand, receptor activator of nuclear κ B, and osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones. *J Bone Miner Res* 2001; **16**: 1416-25.
4. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral dis* 2002; **8**: 147-59.
5. Lerner UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; **15**: 64-81.
6. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr rev* 1999; **20**: 345-57.

* Normalização segundo a Revista Archives of Oral Research (Anexo B)

7. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000; **15**: 2-12.
8. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; **289**: 1504-8.
9. Bell NH. RANK ligand and the regulation of skeletal remodeling. *J Clin Invest* 2003; **111**: 1120-2.
10. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, *et al.* Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988; **241**: 84-6.
11. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr rev* 2002; **23**: 279-302.
12. Li X, Nishimura I. Altered bone remodeling pattern of the residual ridge in ovariectomized rats. *J Prosthet dent* 1994; **72**: 324-30.
13. Jiang G, Matsumoto H, Fujii A. Mandible bone loss in osteoporosis rats. *J Bone Miner Metab* 2003; **21**: 388-95.
14. Kawamoto S, Ejiri S, Hoshi K, Nagaoka E, Ozawa H. Immunolocalization of osteoclast differentiation factor in rat periodontium. *Arch Oral Biol* 2002; **47**: 55-8.
15. Kawamoto S, Ejiri S, Nagaoka E, Ozawa H. Effects of oestrogen deficiency on osteoclastogenesis em the rat periodontium. *Arch Oral Biol* 2002; **47**: 67-73.

16. Hsieh YD, Devlin H, Roberts C. Early alveolar ridge osteogenesis following tooth extraction in the rat. *Arch Oral Biol* 1994; **39**: 425-28.
17. Hsieh YD, Devlin H, McCord F. The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. *Arch Oral Biol* 1995; **40**: 529-31.
18. Aubin JE, Bonnelye E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption. *Osteoporos Int* 2000; **11**: 905-13.
19. Vincent A, Riggs, BL, Atkinson EJ, Oberg AL, Khosla S. Effect of estrogen replacement therapy on parathyroid hormone secretion in elderly postmenopausal women. *Menopause* 2003; **10**: 165-71.
20. Evans HM, Long JA. Characteristic effects upon growth, oestrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1922; **8**: 38-9.
21. Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Araçatuba* 1973; **2**: 153-69.
22. Harms PG, Ojeda SR. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J appl physiol* 1974; **36**: 391-92.
23. Eichhammer P, Zeller R, Rohkamm R. Fixation of neural tissue for electron microscopy with an electronically controlled perfusion pump. *Tissue Cell* 1987; **19**: 153-7.

24. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; **21**: 115-37.
25. Compston J E. Sex steroids and bone. *Physiol Rev* 2001; **81**: 419-47.
26. Pacifici R, Vannice JL, Rifas L, Kimble RB. Monocytic secretion of interleukin-1 receptor antagonist in normal and osteoporotic women: Effects of menopause and estrogen/progesterone therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; **77**: 1135-41.
27. Hofbauer L, Khosla S, Dunstan CR, Lacey D, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 2000; **140**: 4367-70.
28. Oursler MJ, Cortese C, Keeting P, Anderson MA, Bonde SK, Riggs BL, *et al*. Modulation of transforming growth factor-beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta-estradiol and parathyroid hormone. *Endocrinology* 1991; **129**: 3313-20.
29. Jimi E, Nakamura I, Amano H, Taguchi Y, Tsurukai T, Tanura M, *et al*. Osteoclast function is activated by osteoblastic cells through a mechanism involving cell-to-cell contact. *Endocrinology* 1996; **137**: 2187-90.
30. Khosla S, Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology* 2001; **142**: 5050-55.

31. Pettit AR, Walsh NC, Manning C, Goldring SR, Gravallesse EM. RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2006; **45**: 1068-76.
32. Coutinho CCC. Expressão das proteínas osteoprotegerina, RANK e RANKL durante o processo de reparo alveolar em ratos: estudo imunohistoquímico [dissertação] Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2005.
33. Spelsberg TC, Subramaniam M, Riggs BL, Khosla S. The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. *Mol Endocrinol* 1999; **13**: 819-28.
34. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novac D, Woodring J, et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF- α . *J Clin Invest* 2000; **106**: 1229-37.
35. Lee SK, Lorenzo J. Cytokines regulating osteoclast formation and function. *Curr Opin Rheumatol* 2006; **18**: 411-18.
36. Kimble RB, Srivastava S, Ross FP, Matayoshi A, Pacifici R. Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production. *J Biol Chem* 1996; **271**: 28890-7.
37. Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in

murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 1999; **140**: 3552-61.

38. Suzawa T, Miyaura C, Inada M, Maruyama T, Sugimoto Y, Ushikubi F, *et al.* The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs. *Endocrinology* 2000; **141**: 1554-9.

39. Philbrick WM, Dreyer BE, Nakchbandi IA, Karaplis AC. Parathyroid hormone-related protein is required for tooth eruption. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 11846-51.

40. Gruber HE, Puzanov IJ, Bennett M, Kumar V, Gordon B. Alterations in osteoclast morphology following long-term 17beta-estradiol administration in the mouse, *BMC Cell Biol* 2001 **2**:3.

Anexos

Anexo A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética



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



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "INTERFERÊNCIA DO ESTRÓGENO NO METABOLISMO ÓSSEO DURANTE PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR. ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO E HISTOMORFOMÉTRICO EM RATOS" sob responsabilidade de Tetuo Okamoto, Roberta Okamoto, Rita de Cássia Menegati Dornelles, Wilson Roberto Poi, Sônia Regina Panzarini Barioni está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 26 de abril de 2005, de acordo com o protocolo nº 38/05.

Araçatuba, 26 de abril de 2005.


Prof.ª Ass. Dr.ª Maria Gisela Laranjeira
Presidente

Anexo B – Normas Para Publicação



ELSEVIER

ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

A Multidisciplinary Journal of Oral & Craniofacial Sciences

Guide for Authors

Announcement

Please note that Dr David B Ferguson retired in May 2002 as Editor-in-Chief for *Archives of Oral Biology* and is succeeded by Professor Paul M Speight. All future paper submissions to Professor Speight should be sent to the new Editorial Office address following.

Submissions

Authors are requested to submit their original manuscript and figures online via Editorial Manager. Editorial Manager is a web-based submission and review system. Authors may submit manuscripts and track their progress through the system to publication. Reviewers can download manuscripts and submit their opinions to the editor. Editors can manage the whole submission/review/revise/publish process.

Please register at: <http://aob.edmgr.com>

The Editors will accept paper submissions until 30 June 2004. Authors are requested to submit their original manuscript and figures with four copies to:

Editors-in-Chief:

Dr G R Holland and Professor P M Speight

c/o Libby Calvert, Administrative Editor, *Archives of Oral Biology*, Elsevier, The Boulevard, Langford Lane, Kidlington, Oxford OX5 1GB, UK. Tel: +44 (0)1865 843418; fax: +44 (0)1865 843992; Email: AOB@elsevier.com.

Submission of a paper implies that it has not been published previously, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that if accepted it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the publisher. Each manuscript must be accompanied by a statement signed by the corresponding author that the manuscript in its submitted form has been read and approved by all authors. Authors should supply details of related papers submitted or recently published elsewhere.

If the manuscript reports experiments or observations using animals or human subjects a statement must be included in the letter of submission indicating that the protocol has been examined and approved by an institutional review board.

Authors are invited to suggest upto three referees they consider suitable to review their submission. Full postal and Email addresses should be included. The editors may or may not, at their discretion, utilise these suggestions.

Scientific Standards

The aim of Editors and referees is to maintain a high standard of scientific communication. Normally papers are assessed by two referees selected by the Editor, and decisions regarding acceptance are based mainly upon the advice of the referees. Where appropriate, the referees' views are forwarded to the authors for their consideration. Authors may occasionally consider referees' suggestions to be ill-conceived but if their text is misunderstood by referees it is likely to be misunderstood by readers of the journal.

Types of Contributions

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. All submissions will be refereed. Reviews may be submitted in outline prior to full submission.

Manuscript Preparation

Papers should be as concise as possible and, in view of the international character of the journal. English usages that may present difficulties to readers whose first language is not English should be avoided. The spellings used can be in English or American, but must be consistent within the manuscript. Authors should express their own findings in the past tense and use the present tense where reference is made to existing knowledge, or where the author is stating what is known or

concluded. Original papers should follow the pattern of: Introduction, Materials and Methods, Results or Findings, Discussion.

Authors will gain much assistance by consulting: Edward J. Huth, *Scientific Style and Format* (Sixth Edition). The Council of Biology Editors Manual for Authors, Editors and Publishers, Cambridge.

Editors reserve the right to revise the wording of papers in the interest of the Journal's standards of clarity and conciseness.

General

Manuscripts must be word processed (preferably in Word format), double-spaced with wide margins and a font size of 12 or 10 pt. For hardcopy submissions, good quality printouts are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Please check the current style of the journal, particularly the reference style (Vancouver), and avoid excessive layout styling as most formatting codes will be removed or replaced during the processing of your article. In addition, do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering (especially for numbered references). The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain copies of all versions of their manuscript submitted to the journal. Authors are especially requested to be vigilant over the submission of the correct version of the manuscript at the various stages of the editorial process.

Text

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgments, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Title page

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and

it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic or histochemical etc. A "running title" with not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Structured abstracts

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995;273: 27- 34). In brief, the abstract should be divided into sections including the following: (1) Objective; (2) Design -if clinical to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Received/Accepted Dates

A received date will be added to all papers when they are received by the Accepting Editor. An accepted date will also be added when the papers are received at the publishing office.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal experiments were humane; for instance, the mode of anaesthesia and of killing should be specified. In human experimentation, authors should state briefly that the subjects gave informed consent, and preferably that the work was approved by an appropriate ethics committee or review board.

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

It is usually necessary to analyze numerical results statistically. A statement of the number, their mean value and some appropriate measure of their variability is usually sufficient. The method of analysis followed should be indicated. A statement that the difference between the mean values of two groups of data is statistically significant should give the probability level set as significant by the investigator and indicate the statistical test used. It is not sufficient to quote the use of a statistical package without naming the tests used.

Discussion

This section presents the inferences drawn from the Results: these should be recapitulated only sparingly, sufficient to make the argument clear.

Acknowledgments As appropriate.

References:

All manuscripts should use the 'Vancouver' style for references, which should be numbered consecutively in the order in which they are first cited in the text and listed at the end of the paper.

For journal references, all authors should be included when there are six or fewer (first six followed by 'et al.' when seven or more), followed by the title of article, name of journal abbreviated according to British Standard 4148: 1975 (or left in full), year, volume, and first and last pages.

For example:

1. Dezan CC, Nicolau J, Souza DN, Walter LRF. Flow rate, amylase activity, and protein and sialic acid concentrations of saliva from children aged 18, 30 and 42 months attending a baby clinic. *Arch Oral Biol* 2002; **47**: 423-427.

For book references, the author(s) should be followed by the chapter title (if appropriate), editor(s) (if applicable), book title, place of publication, publisher,

year and page numbers. For example:

2. Gorlin RJ, Pindborg JJ, Cohen MM Jr. *Syndromes of the Head and Neck*, 2nd Edition. New York: McGraw-Hill, 1976.

Papers in the course of publication should only be entered in the references if the paper has been accepted by a journal, and then given in the standard manner in the text and list of references but with the words "In press" following the name of the journal.

Units and Symbols

In general, *Archives of Oral Biology* will use the recommended SI (Systeme Internationale) units and symbols. The use of the litre, usually better written in full, in place of SI dm³ and ml³ in place of SI cm, will continue to be accepted. For details of the SI symbols, authors are referred to: Symbols, Signs and Abbreviations (1969) by the Royal Society of Metric and Decimal Systems in Council of Biology Editors Style Manual (1978) 4th edn, published by Council of Biology Editors Inc. Units of enzyme activity must be clearly defined, preferably using SI units. Centrifugal force should be stated in multiples of g, rather than as rev/min.

Units and abbreviations

As *Archives of Oral Biology* is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below should be avoided if possible. Examples of abbreviations which maybe used without definition:

ADP,

AMP,

ATP

DEAE-cellulose

DNA,

RNA

EDTA

EMG

tris

Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page.

Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles.

Bacterial nomenclature. Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and underlined to denote italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not '*Staph. aureus*'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the *Int J Syst Bacteriol* since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case roman not underlined, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to underline e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case roman e.g. 'meningococcus'.

Numbers, measurements and statistics. Numbers one to nine are spelled unless they are measurements (e.g. 5 mL). Numbers greater than nine are spelled out if they begin in a sentence, or when clarity requires it. Numbers above and including 10 000 have a space, not a comma. A decimal point is preceded by a number or cypher e.g. '0.5'. Decimal points in columns should be aligned vertically. Dates are usually provided in full: 14 April 1949. Measurements may be expressed in SI or non-metric units. Use 10 ml/h rather than -1 or per.

Abbreviations. Use capitals for: MIC, MBC, WBC, RBC, DNA, RNA, Group A, B etc. for antigenic or other groups, PHLS, CDSC, CDC, WHO, CSF, MSU, EMU, CSU. Use cfu, pfu, mm, m, min, h, in, ft, g, kg, mL, L, im, iv, iu, P(probability). Use sp. and spp. (species, singular and plural). Use Gram's stain and Gram-negative bacillus. Use in-vitro (adjective) but in vitro (adverb), post-mortem (adjective) but post mortem (adverb). Spelling. Use British spellings: Haemophilus, haematology,

paediatrics, leucocyte, leukaemia, bacteraemia, sulphonamides, aetiology; but note neutropenia, fetal. Please note the journal uses UK 'z' spelling (e.g., colonizes).

Drugs. These should be referred to by their approved and not proprietary names; for guidance, see the British National Formulary.

Proprietary Names

So far as possible, proper names should be used instead of proprietary names. Where it is desirable to indicate a particular brand of preparations, the proprietary name and source should be given in parentheses after the proper name, e.g. Testicular hyaluronidase (Testovase, Bovine Enterprises Ltd, 327 Farm Road, London E23).

Illustrations

In the initial online submission and review stage, authors are required to provide electronic versions of their illustrations. When an article has been accepted, authors must be prepared to provide all illustrations in electronic and camera-ready format, (suitable for reproduction, which may include reduction, without retouching).

The Artwork Quality Control Tool is now available to users of the online submission system. To help authors submit high-quality artwork early in the process, this tool checks the submitted artwork and other file types against the artwork requirements outlined in the Artwork Instructions to Authors on <http://authors.elsevier.com/artwork>. The Artwork Quality Control Tool automatically checks all artwork files when they are first uploaded. Each figure/file is checked only once, so further along in the process only new uploaded files will be checked.

General: Information relating to the preferred formats for Artwork and Illustrations may be found at <http://authors.elsevier.com>. Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All hard copy illustrations should be clearly marked on the back with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

Line drawings: All lettering, graph lines and points on graphs should be sufficiently large and bold to permit reproduction when the diagram has been

reduced to a size suitable for inclusion in the journal. Dye-line prints or photocopies are not suitable for reproduction. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

Photographs: Original photographs must be supplied as they are to be reproduced (e.g. black and white or colour). If necessary, a scale should be marked on the photograph. Please note that photocopies of photographs are not acceptable.

Colour: Certain illustrations will be approved for publication in colour but only if, in the opinion of the Editors, the figures convey information not apparent in monochrome.

Please note that if figures are supplied in colour, they will automatically be available online in colour at no extra charge, even if the print version is monochrome.

Tables: Tables should be numbered consecutively and given a suitable caption and each table typed on a separate sheet. Footnotes to tables should be typed below the table and should be referred to by superscript lowercase letters. No vertical rules should be used. Tables should not duplicate results presented elsewhere in the manuscript, (e.g. in graphs).

Acceptance

After acceptance, authors **may** be requested to provide Elsevier with hard-copy and electronic versions of their manuscript and their figures. The electronic copy, on floppy disk, CD-ROM or ZIP, should match the hardcopy exactly, therefore always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Full details of electronic submission and formats can be obtained from

<http://authors.elsevier.com>

Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Full details of electronic submission and formats can be obtained from

<http://authors.elsevier.com>

Hardcopy submissions

Authors should submit an electronic copy of their paper with the final version of the manuscript. The electronic copy should match the hardcopy exactly. Always keep a backup copy of the electronic file for reference and safety. Full details of electronic submission and formats can be obtained from Author Services at Elsevier.

Proofs

Proofs will be sent to the author (first-named author if no corresponding author is identified on multiauthored papers) by PDF wherever possible and should be returned within 48 hours of receipt, preferably by e-mail. Corrections should be restricted to typesetting errors; any other amendments made may be charged to the author. Any queries should be answered in full. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are returned to us in one all-inclusive e-mail or fax. Subsequent additional corrections will not be possible, so please ensure that your first communication is complete. Should you choose to mail your corrections, please return them to: Log-in Department, Elsevier, Stover Court, Bampfylde Street, Exeter, Devon EX1 2AH, UK.

Offprints

Twenty-five offprints will be supplied free of charge. Offprints and copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding author after the manuscript has been accepted. Orders placed late (after publication) for reprints will incur a 50% surcharge.

Copyright

All authors must sign the "Transfer of Copyright" agreement before the article can be published. This transfer agreement enables Elsevier Ltd to protect the copyrighted material for the authors, but does not relinquish the author's proprietary rights. The copyright transfer covers the exclusive rights to reproduce and distribute the article, including reprints, photographic reproductions, microfilm or any other reproductions of similar nature and translations. Includes the right to adapt the article for use in conjunction with computer systems and programs, including reproduction or publication in machine-readable form and incorporation in retrieval systems. Authors are responsible for obtaining from the copyright holder permission to reproduce any figures for which copyright exists.

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the Author Gateway from Elsevier at <http://authors.elsevier.com>. The Author Gateway also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information,

frequently asked questions and more.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.