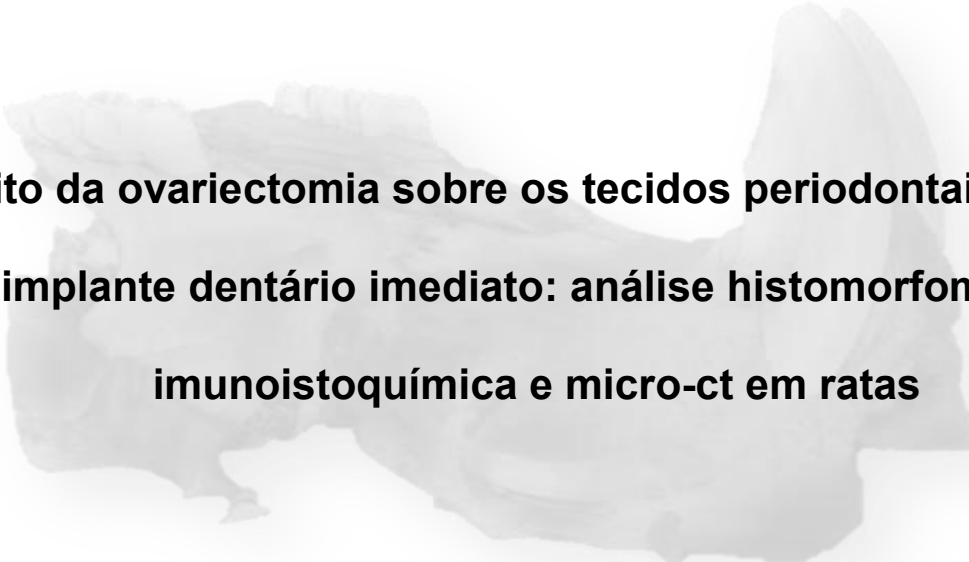


Heloisa Fonseca Marão



**Efeito da ovariectomia sobre os tecidos periodontais após o
reimplante dentário imediato: análise histomorfométrica,
imunoistoquímica e micro-ct em ratas**

2013

Heloisa Fonseca Marão

**Efeito da ovariectomia sobre os tecidos periodontais após
o reimplante dentário imediato: análise histomorfométrica,
imunoistoquímica e micro-ct 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
Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.**

Orientadora: Profa. Adj. Sônia Regina Panzarini Barioni

Co-orientador: Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti

Araçatuba – São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

M311e Marão, Heloisa Fonseca.
 Efeito da ovariectomia sobre os tecidos periodontais após
reimplante dentário : análise histomorfométrica, imunoistoquí-
mica e micro-ct em ratas / Heloisa Fonseca Marão.
– Araçatuba, 2013
 123 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Dra. Sônia Regina Panzarini Barioni
Coorientador: Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti

 1. Reimplante dentário 2. Ovariectomia 3. Imunoistoquímica
4. Micro CT I. T.

Black D7
CDD 617.64

Dados Curriculares

Heloisa Fonseca Marão

Nascimento : 05.07.1982

Filiação : Nelson Atônio Marão Júnior
Silvia Regina Fonseca Marão

- 2012 - 2013** **Visiting Scholar – College of Dental Medicine Columbia University.**
Visiting Scholar - Center for Craniofacial Regeneration College of Dental Medicine Columbia University. Orientador: Jeremy J. Mao. Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), nº 2012/08254-9.
- 2010 - 2013** **Doutorado em Cirurgia Traumatologia Buco Maxilo Facial.**
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil. Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), nº 2010/12593-8.
- 2011** **Especialista em Cirurgia Traumatologia Buco Maxilo Facial.**
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.
- 2008 - 2010** **Mestrado em Cirurgia Traumatologia Buco Maxilo Facial.**
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil. Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), nº 2008/07364-0.
- 2006 - 2008** **Especialização em Implantodontia.**
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.
- 2002 - 2005** **Graduação em Odontologia.**
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.



Dedicatória



Dedicatória

A Deus,

*No silêncio desta hora, Entrego-me em espírito
para o descanso de minha mente. Agradeço por
tudo que recebi nesta fase da minha vida, em
que tive oportunidade de ser testada.*

*Que seu nome seja benedito pelos benefícios que
me concedeu, deles seria indigno se os atribuísse
ao acaso dos acontecimentos ou ao meu próprio
mérito.*

Aos meus pais Nelson e Sílvia,

*Vocês são uma benção na minha vida, o alicerce
para o meu crescimento, tudo que tenho e que sou recebi
de vocês.*

Os seus exemplos me fazem uma pessoa melhor.

*Muito obrigada por tudo que me proporcionaram
principalmente os valores éticos, morais e espirituais
transmitidos, possibilitando que alcançasse meus sonhos
de maneira honesta e leal.*

Amo muito vocês!

À Vó Ercília,

*Por ser exemplos de vida, cumplicidade, liberdade, força
e muita garra... Sem o seu apoio eu não conseguiria.
Você acompanhou e vivenciou toda minha trajetória
durante esses 8 anos sempre me aconselhando e
ensinando o melhor caminho a trilhar. Você foi à luz!*

Muito Obrigado por tudo!

Ao meu irmão Rafael,

*Com seu jeito sincero de ser, demonstra toda a
confiança e afeto que tem por mim. Estarei sempre do
seu lado, onde estivermos. Obrigado por tudo!*



Agradecimentos Especiais



Agradecimento Especiais

À minha orientadora,

Profa. Sônia Regina Panzarini,

pelo exemplo de dedicação ao ensino universitário,

admirável pela humildade e desprendimento

com que transmite os seus valiosos ensinamentos...

... Não só profissionais, mas também de vida.

Com você pude iniciar e experimentar toda a seriedade com

que se deve tratar a pesquisa.

Muito obrigado pela confiança em mim depositada

durante estes anos. Obrigada por me guiar de maneira

generosa, oferecendo-me subsídios para enfrentar desafios e

acreditar em minha capacidade de superá-los.

*Ao Prof. Dr. Idelmo Rangel García Júnior,
pelo companheirismo, confiança, conhecimentos,
experiências transmitidas, pela oportunidade de
convivência, pelos ensinamentos cirúrgicos me
incentivando e alimetando ainda mais meu amor pela
Cirurgia Traumatologia Buco Maxilo facial. Muito
obrigada por me orientar em todas as minha etapas
profissionais. Carrego comigo sua formação e
ensinamentos.*

*Ao Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho,
pela amizade , preciosa contribuição,
dedicação
e ensinamentos durante a nossa
convivência. Muito obrigada.*

*A Profa. Dra. Alessandra que
participou da minha formação
durante a graduação e pós-
graduação, sempre disponível,
dedicada e acreditando na minha
capacidade. Obrigada pelos
ensinamentos e amizade.*

*Ao Professor Dr. Celso Koogi Sonoda,
pela sensibilidade humana e ética profissional,
pela segurança com que transmite seus conhecimentos
e pela convivência sempre encorajadora. Muito Obrigada
por tudo.*

*Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Poí,
exemplo de brilhantismo em sua carreira,
pautada em princípios sólidos e busca constante
de aperfeiçoamento pessoal e profissional.*

A Profa. Dra. Denise,

*pela infinita humildade, dedicação e amor ao ensino e
pesquisa. Obrigado atenção com que sempre me
atendeu.*

Ao prof. Cláudio Casatti,

*por sua contribuição como co-orientador, não
poupando esforços para que tudo ocorresse da melhor
maneira possível e principalmente pelo empenho para
que eu pudesse absorver todas as informações. Muito
obrigada pela oportunidade de trabalharmos juntos.*

Ao Dr. Jeremy J Mao,

*Inteligência, humildade, paciência e calma seriam as
palavras para descrever esse grande cientista. Muito
obrigada por poder participar do seu grupo e assim
ampliando meus horizontes sobre a biologia molecular
e ciência.*

*Aos membros do laboratório CCR,
Mo Chen, Millie Embree, Cevat Eriskan, Nan Jiang,
Martin Kín, Kími Kong, Chang H. Lee, Chris Rícupero,
Jían Zhou, Yíng Zheng, Guomíng Sun, Karen Song Song,
Guodong Yang. Colegas de admirável talento. Sem
dúvida vocês fazem parte dos grandes cientistas do
mundo. Muito obrigada pela paciência, ensinamento e
sugestões para minha pesquisa
durante este ano.*

*Ao laboratório Biomaterials and Biomimetics NYU,
que possibilitou análise de alguns dados do meu projeto.*

Muito obrigada Dr. Paulo G. Coelho.

*A Eloá Luvízuto , Erivan Gualberto e Lithiene Castilho
Padula, pela amizade e ajuda no desenvolvimento deste
projeto e pela maravilhosa oportunidade de
trabalharmos juntos para que essa pesquisa fosse
concretizada. Muito obrigada!*

As alunas de mestrado do Departamento de Clínica Integrada: Moriel Melo e Vanessa Ferreira da Silva. Alunas brilhantes, dedicadas e não mediram esforços para ajudar em algumas etapas deste trabalho.

A Secretária Cleide Lemos, pelo carinho, doação, amizade, respeito, ajuda e preocupação constante. Obrigada pelo momentos compartilhados, pela ajuda incansável, pela torcida, pensamentos positivos e estímulo constante. Você é um exemplo que o amor e a dedicação a profissão tornam a vida mais alegre, atenuam os problemas e conduzem ao sucesso. Obrigada por tudo. Você terá sempre em mim uma grande amiga.

Ao amigo irmão Pedro Ivo, Pelo carinho, por ouvir com paciência os meus desabaços, pela compreensão, pelo incentivo constante, pela torcida para minha vitória, sempre ao meu lado e disposto a me ajudar no que fosse necessário. Trabalhar

*com você foi um presente de Deus e tenha certeza que
minha amizade será sempre incondicional! Obrigada
por tudo!*

*Ao amigo Fernando Guastaldi,
obrigada pela amizade, carinho, atenção, torcida,
companheirismo, parceria nos trabalhos clínicos,
conselhos e sem dúvidas por todos os momentos que
compartilhamos juntos em Nova Iorque.*

Obrigada por tudo!

*Ao amigo Jonatas Caldeira Esteves,
Uma amizade que começou em 2002 durante a
graduação e que se estende até hoje. Meu amigo e
confidente, muito obrigada pela amizade,
cumplicidade, dedicação, pelos momentos de trabalho e
distração que compartilhamos, pelo seu apoio em todas
as horas e por ter em você um irmão enquanto estava
nos EUA. Obrigada.*

*As amigas da minha ex casa em Araçatuba,
Lamís Nogueira e Amália Moreno pelos momentos
maravilhosos que podemos compartilhar juntas.*

*Aos amigos que foram irmãos em Nova Iorque,
Fernando Guastaldi, Marcos Aurélio Paschoal, Patrícia
Zago, Carolina Ortigosa Cunha, Fernanda Araujo
Sampaio, Ying Zheng, Guoming Sun, Cevat Erissen, Erica
Maz, Gesiane Prazeres.*

Sem vocês teria sido muito difícil, obrigada por tudo!

*Aos amigos Roberto Ota e Daniela Souza,
que tornaram minha convivência em Araçatuba muito
mais feliz. Obrigada pelo apoio, amizade, carinho e
mesmo quando estive longe sempre preocupados comigo.*



Agradecimientos



Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba-UNESP, nas pessoas da Diretora Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhía e Vice-Diretor Prof. Dr. Wilson Roberto Poi por proporcionar a realização desta pesquisa.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia UNESP - Araçatuba, Profa. Dra. Maria José Hitomi Nagata pelo acolhimento e condições oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho.

A Fundação de Amparo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro e institucional durante minha pesquisa de mestrado, doutorado (2010/12593-8) e estágio no exterior (2012/08254-9).

Ao Prof. Dr. Michel Saad Neto, amizade que me engrandece e, inestimável contribuição para a minha formação profissional por meio dos conhecimentos transmitidos, desprendimento e disposição para ensinar.

À Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial, professores Tetuo Okamoto, Michel Saad Neto, Idelmo Rangel Garcia Júnior, Osvaldo Magro Filho e Alessandra Marcondes Aranega, Ana Paula Farnezi Bassi, Daniela Ponzoni, Francisley Avila Souza e o funcionário Paulo Gratão. Com vocês tive a felicidade de iniciar minha carreira clínica e acadêmica. Muito obrigada pela amizade, pelos ensinamentos compartilhados e pelo apoio. Este departamento foi minha casa durante 7 anos e para onde quer que eu vá, vou levar comigo os ensinamentos e lições que vivi neste período. Tudo fica mais fácil quando se está rodeado de pessoas que trabalham com competência e amor. Muito obrigada por tudo.

À Disciplina de Clínica Integrada, professores Wilson Roberto Poi, Sônia Regina Panzarini, Celso Koogi Sonoda, Denise Pedrini, Daniela Atili Brandini, José Carlos Monteiro de Castro e ao funcionário Odaír pela atenção e carinho.

À Disciplina de Periodontia, principalmente em nome do Erivan Gualberto e profa. Dra. Maria José Hitomi Nagata pela realização do trabalho e suporte no momento em que me ausentei do Brasil. Muita obrigada.

Ào departamento de ciências básicas, principalmente em nome do Prof. Cláudio Aparecido Casatti, Edilson Ervolino e aos funcionários André e Sandra pela realização do trabalho e suporte para que pudéssemos realizar o projeto. Muito obrigada.

À amiga do Serviço de Emergência: Célia Tomiko Hamata Matida Saito pelos ensinamentos, amizade e no suporte em relação as análises estatísticas.

As alunas de mestrado do Departamento de Clínica Integrada: Moriel Melo e Vanessa Ferreira da Silva. Alunas brilhantes, dedicadas e não mediram esforços para ajudar em algumas etapas deste trabalho.

Os funcionários do laboratório de Cirurgia, Dírce e Gilmar, por ajudar na realização da parte laboratorial deste trabalho e pela amizade que foi crescendo a cada dia. Foram 7 anos de excelente convivência, carregando comigo amigos e podem contar comigo hoje e sempre.

Ao Odaír, funcionário do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, que se tornou um amigo e sempre disposto a nos ajudar quando necessário.

Aos funcionários do Setor de Biotério, Camilo e João Batista, por abrir as portas e dar todo o apoio para a realização deste trabalho.

Aos amigos do curso de Doutorado em Cirurgia (2010-2013): Jéssica Lemos Gulinelli, Thallita Pereira Queiroz, Francisley Ávila de Souza, Paulo Esteves Pinto Faria, Albanir Gabriel Borrasca, Marcos Age Guskuma, Martha Alaíde Salim, Nicolas Homsí, Abrahão Cavalcante Gomes de Souza Carvalho e Rodolpho Valentini Neto, Cassiano Costa Silva Pereira, Walter, Fernando Guastaldí, Pedro Ivo e Marcelo Azenha . Fomos uma família, com divergências de pensamentos e atitudes, mas que buscaram um bem comum: crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos do curso de Mestrado em Cirurgia (2010-2013): Pamela Letícia dos Santos, Elisa Sartori e Ellen Cristina Gaetti Jardim, Gabriel, Leonardo, Igor Mariotto, Lamís Nogueira pelos ensinamentos e momentos agradáveis que compartilhamos juntos.

A amiga do curso de em Prótese: Amália Moreno e Rodolfo Anchieta pela grande amizade que desenvolvemos.

Aos colegas do curso de pós-graduação e alunos de graduação pela amizade e companheirismo no decorrer dos anos e que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para meu crescimento e a realização deste trabalho.

*Aos funcionários da secretaria de Pós-graduação,
Valéria, Cristina e Lílianí pela presteza e simpatia
concedida.*

*Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de
Odontologia de Araçatuba-Unesp.*

*A todos que direta ou indiretamente, contribuíram
para realização de mais esta etapa na minha vida.*



Epígrafe



Epígrafe

*O homem só fracassa,
quando desiste
de lutar.*

*Todos os dias,
me levanto para
vencer.*

Arístóteles



Resumo



^{*} *Resumo*

Marão HF. Efeito da ovariectomia nos tecidos periodontais após o reimplante dentário imediato: análise histomorfométrica, imunoistoquímica e micro-CT em ratas. (Tese). Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2013.

Recentes investigações sugerem que a deficiência de estrógeno, contribui para alteração nos tecidos periodontais. Considerando o estudo do traumatismo dento-alveolar em indivíduos com essa condição, o objetivo do trabalho foi analisar o efeito da ovariectomia sobre os tecidos periodontais após o reimplante dentário imediato por meio da análise histomorfométrica, imunoistoquímica e micro-ct em ratas. Oitenta ratas Wistar (*Rattus norvegicus, albinus*) com ciclos estrais normais foram divididas aleatoriamente em dois grupos: Grupo ovariectomizadas (OVX), e Grupo Sham (grupo controle). Após 2 meses da ovariectomia, foi realizada extração dos incisivos superiores seguido de reimplante dentário imediato e os animais sofreram eutanásia aos 28, 45 e 60 dias após o reimplante. Foi realizada a análise histomorfométrica e imunoistoquímica com avaliação das proteínas PCNA, OPG, CASPASE-3, RUNX-2 e TRAP. Em todos os grupos houve reinserção do ligamento periodontal no tecido ósseo e cimento e a imunorreatividade à PCNA foi evidente em células periodontais independente do grupo Sham ou OVX. A reabsorção

radicular externa esteve mais acentuada a partir dos 45 dias com células imunorreativas à TRAP presentes na superfície óssea e dentária. Todavia, uma considerável parcela também estava dispersa no ligamento periodontal em todos os grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para as proteínas PCNA e TRAP. Já a análise histomorfométrica revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos detalhes histomorfométricos do ligamento periodontal e raiz dentária para os sub-itens de intensidade do processo inflamatório crônico aos 60 dias ($p<0.01$), organização do ligamento periodontal aos 45 dias ($p<0.05$) e profundidade da reabsorção radicular aos 45 dias ($p<0.05$) e aos 60 dias ($p<0.001$). A análise da micro tomografia computadorizada (μ CT) revelou maior reabsorção óssea e dentária nos tempos tardios independente dos grupos e não houve diferença estatística entre os grupos. Esses dados permitem concluir que a ovariectomia não influenciou de forma significativa no processo de reparo do reimplante imediato.

Palavras-chave: avulsão dentária; reimplante dentário, ovariectomia, imunoistoquímica, osteoclasto, micro-ct.

* Normalização segundo a revista *Journal of Dental Research* (Anexo A).



Abstract



Abstract

Marão HF. Effects of ovariectomy on periodontal tissues following immediate tooth replantation: analysis histomorphometric, immunohistochemistry and μ -ct in rats. (Tesis) Araçatuba: Dentistry School of Estadual Paulista University; 2013.

Recent researchs suggest estrogen deficiency leads to changes in periodontal tissues. In order to study dental traumatology under this condition, the aim of the study was analyze the effects of ovariectomy on periodontal tissues following immediate tooth replantation through histomorphometric, immunohistochemistry and μ -ct analysis in rats. Eighty Wistar rats (*Rattus norvegicus albinos*) with normal estrous cycles were randomly divided into two groups (n = 20 per group): 1) Group ovariectomized (OVX), and 2) Sham group (control group). After two months, the rats were followed by extraction of upper right incisor and immediate replantation. The rats were sacrificed immediately 28, 45 and 60 days after tooth reimplantation. Histomorphometric and immunohistochemical analysis was performed by evaluation of PCNA, OPG, CASPASE-3, RUNX-2 and TRAP proteins. Periodontal ligament was reinseted in the bone and cementum and the immunohistochemical analysis revealed PCNA expression in the periodontal ligament independent of Sham or OVX group. At 45 days, the external root resorption was greater with expression of TRAP proteins in the bone and tooth surface. However, in

both groups, were also dispersed in the periodontal ligament. There was no statistically significant difference between the groups for the PCNA and TRAP proteins. The histomorphometric analysis showed statistically significant difference between groups in the histomorphological details of periodontal ligament and root resorption for the sub-items: intensity of chronic inflammatory infiltrate at 60 days ($p < 0.01$), the organization of the periodontal ligament at 45 days ($p < 0.05$) and depth of root resorption at 45 days ($p < 0.05$), and at 60 days ($p < 0.001$). The μ CT analysis showed multiple areas of bone resorption in association with OVX 30 and 60 days without statistically significant difference between groups. In conclusion, the ovariectomy did not have significant influence in immediate tooth replantation repair.

Key words: tooth avulsion, tooth replantation, ovariectomy, immunohistochemistry, osteoclast, micro-ct.



Lista de Figuras

Figura 1	Imagem da μ CT para identificar os cortes: corte distal	84
Figura 2	Imagem da μ CT para identificar os cortes: corte intermediário..	84
Figura 3	Imagem da μ CT para identificar os cortes: corte mesial.....	84
Figura 4	Grupo Sham 28 dias – Ligamento periodontal reparado, com preservação da integridade do cimento e da dentina. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). HE. 100 μ m.....	85
Figura 5	Grupo OVX 28 dias – Área de reabsorção radicular. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA) HE. 100 μ m.....	85
Figura 6	Grupo Sham 28 dias – Tecido pulpar degenerado. Tecido pulpar (TP). HE. 100 μ m.....	85
Figura 7	Grupo OVX 28 dias – – Tecido pulpar degenerado. Tecido pulpar (TP). HE. 100 μ m.....	85
Figura 8	Grupo Sham 28 dias – Células imunorreativas ao PCNA (seta) no ligamento periodonatal. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). PCNA. 100 μ m.....	85
Figura 9	Grupo OVX 28 dias – Células imunorreativas ao PCNA (seta) no osso alveolar. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). PCNA. 100 μ m.....	85

Figura 10	Grupo Sham 28 dias – Tecido pulpar com ausência de células imuno-reativas ao PCNA. Tecido pulpar (TP). PCNA. 100µm...	86
Figura 11	Grupo OVX 28 dias – Tecido pulpar com ausência de células imuno-reativas ao PCNA. Tecido pulpar (TP). PCNA. 100µm...	86
Figura 12	Grupo Sham 28 dias – Osteoclastos imuno-reativos a TRAP (seta) presentes na superfície do osso alveolar. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). TRAP. 100µm.....	86
Figura 13	Grupo OVX 28 dias – Osteoclastos imuno-reativos a TRAP (seta) presentes na superfície do osso alveolar e no ligamento periodontal. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). TRAP. 100µm.....	86
Figura 14	Grupo Sham 45 dias – Cimento e dentina íntegros. Ligamento periodontal reparado. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA).. HE. 100µm.....	86
Figura 15	Grupo OVX 45 dias – Área de reabsorção radicular. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA) HE. 100µm.....	86
Figura 16	Grupo Sham 45 dias – Tecido pulpar degenerado. Tecido pulpar (TP). HE. 100µm.....	87
Figura 17	Grupo OVX 45 dias – Tecido pulpar degenerado. Tecido pulpar (TP). HE. 100µm.....	87
Figura 18	Grupo Sham 45 dias – Ausência de células imuno-reativas ao PCNA. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso	

	alveolar (OA). PCNA. 100µm.....	87
Figura 19	Grupo OVX 45 dias – Células imunorreativas ao PCNA (seta) no ligamento periodontal. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). PCNA. 100µm.....	87
Figura 20	Grupo Sham 45 dias – Tecido pulpar com ausência de células imunorreativas ao PCNA. Tecido pulpar (TP). PCNA. 100µm...	87
Figura 21	Grupo OVX 45 dias – Tecido pulpar com ausência de células imunorreativas ao PCNA. Tecido pulpar (TP). PCNA. 100µm...	87
Figura 22	Grupo Sham 45 dias - Osteoclastos imunorreativos a TRAP (seta) presentes na superfície do osso alveolar. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). TRAP. 100µm.....	88
Figura 23	Grupo OVX 45 dias – Osteoclastos imunorreativos a TRAP (seta) presentes na superfície do osso alveolar e no ligamento periodontal. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). TRAP. 100µm.....	88
Figura 24	Grupo Sham 60 dias - Ligamento periodontal reparado e preservação do cimento e da dentina. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). HE. 100µm.....	88
Figura 25	OVX 60 dias - Área de reabsorção radicular. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA); tecido pulpar (TP). HE. 100µm.....	88
Figura 26	Sham 60 dias - Tecido pulpar degenerado. Tecido pulpar (TP). HE. 100µm.....	88
Figura 27	OVX 60 dias: Tecido pulpar degenerado. Tecido pulpar (TP).	

	HE. 100µm.....	88
Figura 28	Sham 60 dias - Células imunorreativas ao PCNA (seta) no ligamento periodontal. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). PCNA. 100µm.....	89
Figura 29	OVX 60 dias - Células imunorreativas ao PCNA (seta) no ligamento periodontal. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA); tecido pulpar (TP). PCNA. 100µm.....	89
Figura 30	Sham 60 dias - Tecido pulpar com ausência de células imunorreativas ao PCNA. Tecido pulpar (TP). PCNA. 100µm...	89
Figura 31	OVX 60 dias - Tecido pulpar com ausência de células imunorreativas ao PCNA. Tecido pulpar (TP). PCNA. 100µm...	89
Figura 32	Sham 60 dias - Osteoclastos imunorreativos a TRAP (seta) presentes na superfície do osso alveolar. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). TRAP. 100µm.	89
Figura 33	OVX 60 dias - Osteoclastos imunorreativos a TRAP (seta) presentes na superfície do osso alveolar. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). TRAP. 100µm.	89
Figura 34	Fotomicrografias de corte histológico da maxila submetidos ao método da imuno-peroxidase indireta para identificação de PCNA e corado com "fast green".....	90
Figura 35	Fotomicrografias de corte histológico da maxila submetidos ao método da imuno-peroxidase indireta para identificação de TRAP e corado com hematoxilina.....	91

Figura 36	Fotomicrografias de cortes histológicos da maxila de ratas do grupo controle e ovariectomizadas, submetidos ao método da imuno-peroxidase indireta para identificação de caspase 3, RUNX2 e OPG, corado com hematoxilina.....	92
Figura 37	Grupo Sham 28 dias: Reabsorção radicular na região apical.....	93
Figura 38	Grupo Sham 28 dias: Reabsorção óssea na região de terço médio.....	93
Figura 39	Grupo Sham 28 dias: tecido mineralizado em contato com o tecido dentário no terço apical.....	93
Figura 40	Grupo OVX 28 dias: reabsorção radicular na região de terço apical.....	94
Figura 41	Grupo OVX 28 dias: reabsorção óssea na região do terço médio e reabsorção radicular no terço médio e apical	94
Figura 42	Grupo Sham 60 dias: reabsorção óssea na região do terço médio e reabsorção dentária no terço médio e apical.....	94
Figura 43	Grupo OVX 60: reabsorção óssea na região do terço apical e médio.....	95
Figura 44	Tricotomia	120
Figura 45	Exposição do ovário	120
Figura 46	Remoção do ovário	120
Figura 47	Sutura	120
Figura 48	Sindesmotomia	120
Figura 49	Extração dentária	120
Figura 50	Reimplante	121

Figura 51	Dente reimplantado	121
Figura 52	μCT 40, Scanco Medical, Basserdorf, Germany.....	121
Figura 53	Interior da máquina da μCT.....	121
Figura 54	Suporte utilizado para escanear os espécimes	121
Figura 55	Maxila escaneada	121
Figura 56	Preparação das imagens para transportar os arquivos DICOM para o programa Amira.....	122
Figura 57	Seleção das imagens para transportar os arquivos DICOM para o programa Amira.....	122
Figura 58	Seleção das imagens para transportar os arquivos DICOM para o programa Amira.....	122
Figura 59	Seleção das imagens para transportar os arquivos DICOM para o programa Amira.....	122
Figura 60	Sham 28 dias - Reinserção das fibras do ligamento periodontal no osso e cimento. TM. 100μm.....	123
Figura 61	OVX 28 dias - Áreas de reabsorção radicular. TM. 100μm.....	123
Figura 62	Sham 45 dias - Disposição perpendicular das fibra do ligamento periodontal reinseridas no osso e cimento. TM. 100μm.....	123
Figura 63	OVX 45 dias - Fibras do ligamento periodontal reinseridas no cimento e osso. TM. 100μm.....	123
Figura 64	Sham 60 dias - Fibras do ligamento periodontal inseridas no cimento e no osso alveolar. TM. 100μm.....	123
Figura 65	OVX 60 dias - Disposição perpendicular das fibras do ligamento periodontal. TM. 100μm.....	123



Lista de Tabelas

Tabela 1	Valores dos escores e análise estatística na inserção epitelial após análise histométrica do Grupo Sham e OVX	97
Tabela 2	Valores dos escores e análise estatística no ligamento periodontal após análise histométrica do Grupo Sham e OVX	98
Tabela 3	Valores dos escores e análise estatística na raiz dentária após análise histométrica do Grupo Sham e OVX.....	99
Tabela 4	Valores dos escores e análise estatística no tecido ósseo após análise histométrica do Grupo Sham e OVX.....	100
Tabela 5	Valores dos escores e análise estatística na referentes à anquilose após análise histométrica do Grupo Sham e OVX....	100
Tabela 6	Valores dos escores e análise estatística na polpa após análise histométrica do Grupo Sham e OVX	100



Lista de Gráficos

Gráfico 1	Valores da média e desvio padrão do número de células imuno-reativas ao PCNA no cemento, após o reimplante dentário imediato para o grupo Sham e OVX.....	102
Gráfico 2	Valores da média e desvio padrão do número de células imuno-reativas ao PCNA no ligamento periodontal, após o reimplante dentário imediato para o grupo Sham e OVX.....	102
Gráfico 3	Valores da média e desvio padrão do número de células imuno-reativas ao PCNA no osso alveolar, após o reimplante dentário imediato para o grupo Sham e OVX.....	103
Gráfico 4	Valores da média e desvio padrão do número de células imuno-reativas ao PCNA na polpa, após o reimplante dentário imediato para o grupo Sham e OVX.....	103
Gráfico 5	Valores da média e desvio padrão do número de células imuno-reativas a TRAP no cemento, após o reimplante dentário imediato para o grupo Sham e OVX.....	104
Gráfico 6	Valores da média e desvio padrão do número de células	

	imunorreativas a TRAP no ligamento periodontal, após o reimplante dentário imediato para o grupo Sham e OVX.....	104
Gráfico 7	Valores da média e desvio padrão do número de células imunorreativas a TRAP no tecido ósseo, após o reimplante dentário imediato para o grupo Sham e OVX.....	105
Gráfico 8	Valores da média e desvio padrão da área de extensão da reabsorção radicular, do espaço do ligamento periodontal, da reabsorção óssea e da profundidade da reabsorção radicular.....	106



Lista de abreviaturas

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

g - Grama.

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

T.M. – Expressa a técnica de coloração das lâminas - Tricrômico de Masson

IL-6 - Interleucina 6.

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa.

Kg - Unidade fundamental de medida de massa.

mg – Miligramas, equivalente à milésima parte do grama.

μ CT – Micro tomografia computadorizada

3D - Tridimensional

mg/Kg – Miligramas por quilo.

mL – Mililitros, equivalente à milésima parte do litro.

mm - Milímetro, equivalente a milésima parte do metro

OPG – Osteoprotegerina

PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular

CASPASE – Cysteine-aspartic-acid-proteases

RUNX-2 - Runt-related transcription factor 2

OVX – Ovariectomia, ratas ovariectomizadas

Sham – ratas controle

RANKL – Receptor ativador de NF-Kappa B ligante

TRAP – Tartrate-Resistent Acid Phosphatase

μ A – Micro ampere.

μ g/ml – Microgramas por mililitros

ml – Mililitros

Kv - quilovolts (10.000 V)

OAC – Osteoclastôgenese

RB – Reabsorção óssea

ELP – Espaço do ligamento periodontal

ERR – Extensão da reabsorção radicular

PRR – Profundidade da reabsorção radicular



Sumário

Introdução	43
Proposição	48
Material e Método	50
Resultado	61
Discussão	69
Conclusão	75
Referências	77
Figuras	84
Tabelas	97
Gráficos	102
Anexo A – Normas do periódico — “Journal of Dental Research”	108
Anexo B - Certificado do comitê de ética em experimentação animal (CEEAA)	119
Anexo C – Ilustração do material e método	120
Anexo D – Ilustração de figuras	123



Introdução



Introdução

A deficiência de estrógeno é uma condição sistêmica caracterizada por um desequilíbrio entre os processos de formação/absorção óssea. Pode ser causada pela ovariectomia e durante menopausa (Vico et al., 1992) e uma das suas conseqüências é a osteoporose que é uma doença óssea sistêmica caracterizada pela redução da massa óssea devido à deterioração da micro-arquitetura do tecido, com consequente aumento da fragilidade e susceptibilidade à fratura (Cummings and Melton 2002; NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy 2001).

O estrógeno é um hormônio que tem um importante papel no controle do metabolismo ósseo regulando a expressão de proteínas como a Osteoprotegerina (OPG) (Wang et al., 2008, Jabbar et al., 2009a) e RANKL (Jabbar et al., 2009b) e citocinas pró-inflamatórias (Shu et al., 2009, Zhou et al., 2009a). 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 (Zhou et al., 2009b).

Alterações nas estruturas orofaciais nas mulheres, como a perda de altura óssea, diminuição da densidade mineral óssea, reabsorção óssea alveolar após a extração de dentes, redução no volume de osso trabecular, além de aumento da perda do número de dentes são algumas alterações que podem estar associadas à deficiência de estrógeno (Burg et al., 2006; Luvizuto et al., 2010a).

A perda dentária é uma das principais sequelas do traumatismo dentário e identificar os mecanismos envolvidos neste processo continua a ser um desafio, especialmente após o reimplante dentário (Panzarini et al., 2013a).

O sucesso da manutenção do dente reimplantado está diretamente relacionado com a presença, tipo e velocidade do processo de reabsorção radicular (Andreasen, 1980a; Pohl et al., 2005a; Hammarström et al., 1989a) bem como a fatores locais como: tempo extra-alveolar, meio de armazenagem, a manipulação radicular inadequada e a necrose pulpar (Andreasen, 1980b; Andreasen, 1981a; Panzarini et al., 2005; Saad-Neto et al., 1986; Sonoda et al., 2000; Lustosa-Pereira et al., 2006). Além dos fatores locais existem algumas patologias sistêmicas como a osteoporose que também poderiam interferir nesse processo, porém ainda não foram estudadas.

Para estudar os mecanismos envolvidos no reparo celular em reimplante dentário como a influência da deficiência de estrógeno além da análise histomorfológica e imunoistoquímica a micro-ct é uma ferramenta metodológica que pode auxiliar na compreensão e justificativa dos eventos biológicos (Vandeweghe et al., 2013; Chang et al., 2012).

O periodonto de inserção é composto pelo ligamento periodontal, cimento e tecido ósseo. Seu crescimento, desenvolvimento e manutenção são processos altamente regulados (Nijweide et al., 1986). Proteínas, hormônios, fatores de crescimento e citocinas, estão ativamente envolvidos nestes processos e exerce atividade direta sobre células com atividade osteoblástica e osteoclástica, atuando em sua diferenciação e ativação metabólica (Ducy et al., 2000).

A sinalização celular, que envolve a remodelação óssea já possui alguns parâmetros definidos. A perda de massa óssea resultante tanto da reabsorção óssea osteoclástica quanto da redução formação óssea osteoblástica envolve a fase inicial

do processo de osteoclastogênese por meio de um processo sequencial de proliferação, diferenciação e ativação de precursores mononucleares (Smit et al., 2011; Liu HY et al., 2012, Hiroko et al., 2006).

Dentre essas proteínas destaca-se a OPG, também conhecida como fator inibitório de osteoclastogênese. A OPG é considerada um receptor solúvel secretado e é produzida por diferentes tecidos e tipos celulares, incluindo osteoblastos, células do estroma medular ósseo, fibroblastos e linfócitos T. Ela atua inibindo a maturação e a reabsorção óssea osteoclástica e, portanto, regulando a densidade óssea (Rogers and Eastell 2005a).

As proteínas PCNA é responsável por evidenciar a proliferação celular e a CASPASE-3 é presente na célula quando há a sinalização para o início da apoptose (Sato et al., 2010a). A proteína RUNX-2 é um fator de transcrição essencial para a diferenciação dos osteoblastos, além de desempenhar papel importante na maturação dos condrócitos e invasão vascular na cartilagem. Sendo assim, esta proteína é uma molécula chave para o desenvolvimento ósseo (Maruyama et al., 2007a).

A proteína TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato) também tem um papel importante no processo de reabsorção, sendo um excelente marcador das células clásticas (Halleen et al., 2006a).

Assim sendo, estes marcadores ósseos fornecem informações importantes sobre metabolismo ósseo, pois apresentam participação na proliferação, apoptose e reabsorção óssea (Rogers and Eastell, 2005b; Halleen et al., 2006b; Maruyama et al., 2007b; Min et al., 2007; Sato et al., 2010b).

Pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na regulação da proliferação celular, apoptose, maturidade óssea e atividade osteoclástica no ligamento periodontal após o reimplante dentário (Sato et al., 2010c) e particularmente na

deficiência de estrógeno. Portanto, a análise das proteínas poderá contribuir com o estudo.

Análises descritiva e quantitativa em relação à reabsorção radicular (Marão et al., 2012a; Saito et al., 2011a), reabsorção óssea (Marão et al., 2012b; Luvizuto et al., 2010b) e extensão de anquilose (Hammanstron 1989b; Saito et al., 2011c) são tipicamente realizadas por meio de microscopia de luz em cortes histológicos descalcificados. Essa técnica permite um número limitado de cortes bidimensionais e muitas vezes pode ser destrutiva aos tecidos. Como alternativa a técnica da μ CT pode ser utilizada (Muller et al., 1998; Vandeweghe et al., 2013).

Considerando que a técnica proporciona alta precisão e sensibilidade a partir da análise tridimensional dos espécimes (Intini, 2008; Al-Hezaimi 2011; Wilensky 2005) a utilização deste modelo de estudo contribui para auxiliar na compreensão e justificativa dos eventos biológicos.

Uma série de condições locais e sistêmicas interage e determina o resultado final do processo de reparo. Compreender os fenômenos biológicos que norteiam a reparação do reimplante dentário relacionados com a deficiência de estrogênio continua a ser um campo de interesse para a pesquisa de traumatologia dentária.



Proposição



Proposição

O objetivo do trabalho foi analisar o efeito da ovariectomia sobre os tecidos periodontais após o reimplante dentário imediato por meio da análise histomorfométrica, imunoistoquímica e micro-ct em ratas.



Material e Método



Material e Método

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 – 009289-2010, Anexo A). Todos os cuidados com os animais foram rigorosamente seguidos.

Foram utilizadas ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com peso de 180g a 200g, 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 a intervenção cirúrgica e água ad libitum.

Foi realizado estudo diário do ciclo estral pela técnica descrita por Long e Evans (Long and Evans 1922) e após a obtenção de 2 a 3 ciclos regulares, foram selecionados oitenta ratas para o experimento.

Delineamento do estudo e procedimento cirúrgico:

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos. Esses animais foram anestesiados com a associação de Cloridrato de Xilazina (Dopaser, Laboratório Calier do Brasil Ltda, Osasco, SP, Brasil) na dosagem de 0,6 mg para cada 100g de peso corporal e Cloridrato de Ketamina (Doálen AgriBands Ltda, Paulínea, SP, Brasil) na dosagem de 7mg para cada 100g de peso corporal para serem submetidos bilateralmente a exposição (grupo Sham) e/ou remoção dos ovários (Grupo OVX). As tubas uterinas foram ligadas com sutura (4,0 Catgut;

Ethicon, São Paulo, Brasil), e depois de os ovários foram removidos (anexo C). As incisões foram feitas com sutura interna (3,0 Catgut; Ethicon, São Paulo, Brasil) e sutura externa (Silk, Ethicon 4.0, Johnson e Johnson, São Paulo, SP, Brasil).

Cada animal recebeu, no pós-operatório imediato, dose única de antibiótico penicilina G benzatina (administração intramuscular de 0,2ml/animal).

Extração e reimplante dentário:

Quinze dias após a ovariectomia, todos os animais foram submetidos a um exame do ciclo estral através da coleta de líquido vaginal durante cinco dias consecutivos para confirmação da depleção de estrógeno.

Dois meses após o procedimento cirúrgico, sessenta animais foram submetidos a sindesmotomia, luxação e extração do incisivo superior direito que permaneceu por 5 minutos em meio ambiente sobre gaze estéril. A seguir, foi realizada a anti-sepsia da porção anterior da maxila com polivinilpirrolidona iodo (Riodeine – Ind. Farmac. Rioquímica Ltda) e o reimplante do dente (Anexo C).

Cada animal recebeu, no pós-operatório imediato, dose única de antibiótico penicilina G benzatina (administração intramuscular de 0,2ml/animal).

Preparação dos tecidos:

Decorridos 28 (n=20), 45 (n=20) e 60 (n=20) dias do reimplante dentário, os animais sofreram eutanásia por meio de overdose de anestésico seguido por perfusão para obter a maxila com o dente reimplantado. Após a perfusão, os espécimes obtidos foram fixados em solução de formaldeído a 4% por 24 horas e descalcificados em solução de EDTA a 10%, pH 7,0 (Sigma-Aldrich).

Após a descalcificação, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Nos blocos foram realizados cortes semi-seriados de cinco micrometros de espessura, no sentido longitudinal da raiz para análise histomorfométrica e imunoistoquímica.

μCT and 3D reconstruction:

Para a realização desta análise foi considerado o tempo pós-operatório inicial 28 dias (n=10) e o final 60 dias (n=10). Antes das maxilas serem descalcificadas, elas foram removidas do formaldeído, lavadas e armazenadas a álcool 70%. Em seguida, as amostras com tempo pós-operatório de 28 e 60 dias foram avaliadas usando μCT (μCT 40, Scanco Medical, Basserdorf, Germany) com 50 kV/160 μA com tempo de integração de 1x380 ms e alta resolução de 18 μm. Os dados volumétricos foram convertidos em formato de DICOM e importados para um software chamado Amira com o objetivo de descrever e quantificar a área da extensão da reabsorção radicular, do espaço do ligamento periodontal, da reabsorção óssea e da profundidade da reabsorção radicular.

Para análise descritiva foi avaliado todos os cortes longitudinais de todo o dente e foi adotada uma determinação para facilitar a descrição das imagens. Os cortes designados mesiais, foram aqueles do lado mesial do incisivo central superior direito. Os cortes intermediários foram os que se encontraram no meio do dente e os cortes distalizados foram aqueles correspondentes ao lado distal do incisivo central superior direito (Figs. 1-3).

Para quantificar esses eventos foi escolhido aleatoriamente cortes longitudinais em toda extensão do dente e com o auxílio do programa Amira foi obtido valores para quantificação de cada evento biológico. A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram analisados pelo teste Anova e em seguida

foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%.

Análise histomorfométrica:

Para a quantificação das ocorrências histomorfológicas foram atribuídos escores de 1 a 4 aos diferentes eventos abaixo listados, onde 1 corresponde ao melhor resultado e 4 ao pior, ocupando os escores 2 e 3 posições intermediárias (Holland et al., 1999; Panzarini et al., 2007; Marão et al., 2012c). A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram analisados pelo teste Anova e em seguida foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância foi de 5%.

Eventos considerados para a análise dos resultados:

1) Local da inserção epitelial

- 1- Junção cimento-esmalte;
- 2- Ligamento abaixo da junção cimento-esmalte;
- 3- Muito abaixo da junção cimento-esmalte (perto do terço médio);
- 4- Ausência do epitélio juncional.

2) Processo inflamatório agudo e crônico próximo do local da inserção epitelial.

2.1) Intensidade do processo inflamatório baseado no critério descrito por Wolfson and Seltzer (Wolfson and Seltzer 1975).

- 1- Ausência ou presença ocasional de células inflamatórias;
- 2- Pequeno número de células inflamatórias. Até 10 células por campo com aumento de 400x;

3- Moderado número de células inflamatórias. De 11 a 50 células por campo com aumento de 400x;

4- Grande número de células inflamatórias. Acima de 50 células inflamatórias por campo com aumento de 400x.

2.2) Extensão do processo inflamatório

1- Ausência ou presença ocasional de células inflamatórias;

2- Processo inflamatório restrito à lâmina própria da parte interna do epitélio;

3- Processo inflamatório extendendo-se apicalmente até a pequena porção do tecido conjuntivo subjacente à lâmina própria da porção interna do epitélio gengival;

4- Processo inflamatório atingindo proximidade da crista óssea alveolar.

3) Ligamento Periodontal

3.1) Organização do ligamento periodontal

1- Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em toda a extensão do ligamento;

2- Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em dois terços da extensão do ligamento;

3- Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em um terço da extensão do ligamento;

4- Ausência de fibras periodontais com inserção em osso e cimento.

3.2) Intensidade e extensão do processo inflamatório agudo e crônico do ligamento periodontal.

3.2.1) Intensidade – Mesmo critério empregado próximo à área da inserção epitelial.

3.2.2) Extensão do processo inflamatório

- 1- Ausência ou presença ocasional de células inflamatórias;
- 2- Processo inflamatório presente apenas no ligamento periodontal apical ou coronário ou pequena área lateral;
- 3- Processo inflamatório atingindo mais que a metade do ligamento periodontal lateral da raiz do dente;
- 4- Processo inflamatório em todo ligamento periodontal.

4) Raiz do dente

4.1) Reabsorção radicular ativa e inativa

- 1- Ausência de reabsorção radicular e ou reabsorções reparadas;
- 2- Áreas de reabsorção inativa (ausência de células clásticas);
- 3- Pequenas áreas de reabsorções ativas;
- 4- Extensas áreas de reabsorção ativa.

4.2) Extensão da reabsorção radicular. Em lâminas representativas serão feitas medidas (em micrometros) da extensão das áreas de reabsorção. A medida dos valores obtidos por vestibular e por lingual permitirá a atribuição dos seguintes escores.

- 1- Ausência de reabsorção;
- 2- Profundidade média de 1 a 1000 micrômetros;
- 3- Profundidade média de 1001 a 5000 micrômetros;
- 4- Profundidade média maior que 5001 micrômetros.

4.3) Profundidade de reabsorção radicular. Em lâminas representativas serão feitas medidas (em micrometros) das maiores profundidades das áreas

de reabsorção. A medida dos valores obtidos permitirá a atribuição dos seguintes escores.

- 1- Ausência de reabsorção;
- 2- Profundidade média de 1 a 100 micrômetros;
- 3- Profundidade média de 101 a 200 micrômetro;
- 4- Profundidade média maior que 201 micrômetro.

4.4) Reparo nas áreas de reabsorção radicular

- 1- Ausência de reabsorção ou deposição cemento neoformado em toda extensão das áreas reabsorvidas;
- 2- Deposição cemento neoformado em metade ou mais da extensão das áreas reabsorvidas;
- 3- Deposição cemento neoformado em menos da metade das áreas reabsorvidas;
- 4- Ausência de deposição de cemento neoformado junto às áreas reabsorvidas.

5) Tecido ósseo

Áreas de reabsorção ativa e inativa

- 1- Ausência de área de reabsorção;
- 2- Presença de área de reabsorção inativa (ausência de células clásticas);
- 3- Presença de pequenas áreas de reabsorção ativa;
- 4- Presença de extensas áreas de reabsorção ativa.

6) Anquilose

- 1- Ausência de anquilose;
- 2- Pequenos pontos de anquilose;

- 3- Um terço da raiz está anquilosada;
- 4- Mais de um terço da raiz está anquilosada.

7) Polpa

- 1- Normal
- 2- Presença de calcificação
- 3- Totalmente calcificada
- 4- Necrosada

Análise imunoistoquímica:

Os cortes histológicos coletados em lâminas silanizadas foram submetidos a banhos sucessivos de xilol e reidratados. Em seguida, submetidos às seguintes etapas de lavagens e incubações sob agitação a 20 rpm, descritas resumidamente:

- a) duas lavagens de 10 minutos em tampão fosfato de sódio (PB), pH 7.4, 0.1M, a temperatura ambiente;
- b) inibição da peroxidase endógena com 0,3% de H₂O₂ por 30 minutos em metanol;
- c) lavagens em PB à temperatura ambiente;
- d) recuperação antigênica com tampão citrato pH 6.0 em panela pressurizada, durante 15 minutos;
- e) lavagens em PB à temperatura ambiente;
- f) incubação por 24 horas a temperatura ambiente, com um dos seguintes anticorpos primários monoclonais ou policlonais anti-PCNA (1:500, VP980, Vector Laboratories, CA, USA), anti-RUNX-2 (1:100, H000000860-M06, Abnova, USA), anti-CASPASE-3 (1:100, 9664, Cell Signaling Technology, USA), anti-TRAP (1:150, sc7628, Santa Cruz Biotechnology, USA) ou anti-OPG (1:100, sc8468, Santa Cruz Biotechnology, USA) diluídos em solução contendo 0,3% de triton X-100 Tween-20 (Sigma), soro normal de cabra/albumina de soro bovino - BSA (1:200, Sigma) e PB;
- g) duas lavagens de 10 minutos em PB a temperatura ambiente;
- h) incubação por 1 hora, em uma solução contendo anticorpo

secundário biotinilado universal obtido em suíno (LSAB kit, K0679, Dako laboratories, USA), 0.3% de triton X-100, soro normal de cabra e PB; h) duas lavagens de 10 minutos em PB a temperatura ambiente; i) incubação por 1 hora, com o complexo avidina-biotina peroxidase (LSAB kit, K0679, Dako Laboratories, USA) em PB e temperatura ambiente; j) duas lavagens de 10 minutos em PB a temperatura ambiente; l) revelação com uma solução de incubação contendo diaminobenzidina e intensificadores (LSAB kit, K0679, Dako laboratórios); bloqueio da reação com lavagens em água destilada seguido de lavagens em KPBS. Os cortes histológicos foram desidratados em soluções crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e montados com meio de montagem e lâminulas.

As marcações imunoistoquímicas foram analisadas qualitativamente e quantitativamente no tecido ósseo, tecido dentário, ligamento periodontal e polpa, através de microscopia de campo claro. Para quantificação da PCNA e TRAP no periodonto; três regiões (cervical, médio e apical) foram capturadas por meio da objetiva de 10x e câmera digital axiovision (Carl Zeiss, USA) e quantificadas com o auxílio do programa ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012).

O número de células imunorreativas a TRAP foi expresso em valores absolutos médios $/1 \times 10^2 \mu\text{m}$, em relação ao perímetro das superfícies dentárias e do osso alveolar. O número de células imunorreativas a PCNA no ligamento periodontal e na polpa foi expresso em valores absolutos médios $/1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ em relação à área do ligamento periodontal e da polpa selecionada para quantificação.

Para a quantificação das proteínas PCNA e TRAP no cemento, ligamento periodontal e osso alveolar foram selecionados os terços cervical, médio e apical. Os dados foram submetidos ao teste estatístico Análise de Variância (One way Anova) ao nível significância de 5% entre os grupos Sham e OVX nos períodos estudados.

Para quantificação de PCNA na polpa dentária, duas regiões foram selecionadas (médio e apical) nas mesmas condições anteriores. Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade e em seguida foi utilizado o teste estatístico One-Way ANOVA com nível de significância de 5% para comparação entre os grupos no mesmo período.



Resultado



Resultado

1. Análise histomorfométrica e Imunoistoquímica

28 dias - Ratas Sham e (OVX)

O epitélio da mucosa gengival estava reinserido e coberto com paraqueratina. O tecido conjuntivo sub-epitelial apresentava um pequeno infiltrado inflamatório, junto à superfície do dente e sobre a crista óssea alveolar. A reinserção epitelial encontrava-se no nível da junção amelocementária e o tecido conjuntivo próximo ao local da reinserção apresentava-se com poucas células inflamatórias. O ligamento periodontal estava reparado e na porção mediana, a disposição das fibras é perpendicular à superfície radicular e há reinserção no tecido ósseo e no cimento (Fig. 4). O cimento e a dentina estavam íntegros na maior parte de superfície radicular. Nos dois grupos foi possível observar algumas áreas de reabsorção comprometendo o cimento e a dentina (Fig. 5). O tecido pulpar na sua maior parte estava amorfo, com presença de um tecido conjuntivo substituindo o estroma pulpar e a camada odontoblástica no terço médio e cervical apresentava-se irregular (Fig. 6 e 7). Na região apical observou-se intenso infiltrado inflamatório agudo, que invadia o canal radicular. A quantificação das ocorrências histomorfológicas estão expressas nas tabelas 1 à 6.

As células imunorreativas ao PCNA nos dois grupos foram mais evidentes no ligamento periodontal (Fig. 8). Houve marcação positiva na superfície do tecido ósseo (Fig. 9). Já no cimento e na polpa o número de células positivas ao PCNA foi

menor (Fig. 10 e 11). As células imunorreativas a TRAP estavam presentes no ligamento periodontal e superfície do osso alveolar (Fig. 12 e 13).

45 dias - Ratas Sham e (OVX)

Em todos os espécimes, a inserção do epitélio da mucosa gengival encontrou-se próximo da junção cimento-esmalte. O tecido conjuntivo sub-epitelial apresentava infiltrado inflamatório em toda extensão, com presença de maior intensidade no terço médio junto à superfície do dente e sobre a crista óssea alveolar. O ligamento periodontal apresentava-se reparado no terço médio na maior parte dos espécimes. A disposição das fibras na porção mediana era perpendicular à superfície radicular e havia reinserção no tecido ósseo e no cimento (Fig.14). Notava-se presença de reabsorção radicular de pouca profundidade e extensão (Fig.15). Na maior parte da superfície radicular a dentina e o cimento encontravam-se íntegros (Fig.14). O tecido pulpar estava amorfo com presença de um tecido conjuntivo substituindo o estroma pulpar (Fig. 16 e 17). Na região apical havia presença de infiltrado inflamatório com presença de neutrófilos que invadia o canal radicular, apenas em 3 espécimes o infiltrado inflamatório não invadia o canal radicular. A quantificação das ocorrências histomorfológicas estão expressas na tabela 1 à 6.

As células imunorreativas ao PCNA, assim como aos 28 dias, foram mais evidentes no ligamento periodontal (Fig. 18 e 19) e no osso alveolar as marcações positivas foram mais evidentes no grupo OVX (Fig. 19), porém com menor número de células positivas ao PCNA quando comparado aos 28 dias. No cimento e na polpa a imunomarcacão ao PCNA foi menor (Fig. 20 e 21). As células imunorreativas a TRAP estavam presentes no ligamento periodontal e superfície do osso alveolar (Fig. 22 e 23), e em alguns casos na superfície da reabsorção radicular (Fig. 23).

60 dias - Ratas Sham e (OVX)

A reinserção epitelial ocorreu no nível da junção cimento-esmalte em todos os espécimes analisados e o tecido conjuntivo sub-epitelial apresentou um pequeno infiltrado inflamatório com presença de maior intensidade no terço médio junto a superfície do dente e sobre a crista óssea alveolar. Em alguns espécimes o ligamento periodontal encontrava-se reparado e as fibras colágenas apresentavam dispostas perpendicularmente à superfície radicular na sua porção mediana e havia inserção no tecido ósseo e cimento (Fig. 24). Em alguns espécimes, ocorreu a diminuição do espaço do ligamento periodontal pela neoformação óssea (Fig. 24 e 25). Em 4 espécimes no grupo OVX na dentina e no cimento notou-se presença de reabsorção radicular no terço cervical e médio (Fig. 25). Na região apical, na maior parte dos espécimes havia infiltrado inflamatório invadindo o canal radicular e um tecido conjuntivo pulpar encontra-se degenerado (Fig. 26 e 27). A quantificação das ocorrências histomorfológicas estão expressas na tabela 1 à 6.

Houve menor número de células positivas ao PCNA, neste grupo. Foi notado maior quantidade de imunomarcação ao PCNA no ligamento periodontal (Fig. 28 e 29). O número de células positivas no osso alveolar, cimento e tecido pulpar foi menor e em alguns casos, na polpa, foi ausente (Fig. 30 e 31). As células imunorreativas a TRAP estavam presentes no ligamento periodontal e superfície do osso alveolar (Fig. 32 e 33), e em alguns casos na superfície da reabsorção radicular (Fig. 33).

As imunomarcações para PCNA e TRAP foram específicas e permitiram uma adequada análise qualitativa e quantitativa. A imunorreatividade a PCNA estava restrita ao núcleo celular das células periodontais (Fig. 34A-C). A imunorreatividade a TRAP estava restrita ao compartimento citosólico das células clásticas, tanto

multinucleadas assim como mononucleadas (Fig. 35A-C). Células imunorreativas a TRAP estavam associadas à superfície óssea ou dentária e uma considerável parcela também estava dispersas no ligamento periodontal (Fig. 35C). Esta última disposição revelou uma população de células que poderiam estar migrando dos vasos sanguíneos em direção as superfícies mineralizadas ou que finalizaram o processo de reabsorção óssea.

CASPASE 3, OSTEOPROTEGERINA E RUNX2

As imunomarcações para caspase 3, osteoprotegerina (OPG) e RUNX2 não foram adequadas para permitir uma fidedigna avaliação qualitativa e quantitativa (Figura 36A-E). Foram realizadas diferentes titulações dos anticorpos (1:50; 1:100; 1:250; 1:500; 1:1000; 1:2000); entretanto não se obteve um padrão aceitável.

A imunorreação para caspase 3 foi negativa nas áreas do periodontal, com possível imunorreatividade nas células hematocitopoética dos espaços de medula óssea da maxila, que foram estabelecidas como controle positivo da caspase 3 (Figura 36A-B). Entretanto, mesmo nestas áreas a imunomarcação foi discreta em células da linhagem hemocitopoética; inviabilizando sua avaliação nas áreas de interesse, como o tecido periodontal (Figura 36A-B).

A imunomarcação para RUNX2 revelou áreas no corte histológico cuja positividade aparentemente mostrou especificidade, haja vista que a imunorreatividade estava restrita ao núcleo celular de células associadas a áreas de crescimento ósseo, em particular em suturas ósseas (Figura 36C). Entretanto, análise do ligamento periodontal, mostrou marcações inconsistentes, sendo que alguns animais mostraram marcação restrita, enquanto outros revelaram marcações disseminadas em quase todos os tipos celulares (Figura 36D). Disto posto, as

avaliações qualitativas e quantitativas ficaram prejudicadas, impedindo uma análise segura.

Os cortes histológicos submetidos à imuno-histoquímica para OPG revelaram inconsistente, sendo algumas vezes observada uma intensa marcação de fundo (background) com marcações falso-positivas que não foram eliminadas com a diluição do anticorpo primário (Figura 36E-F). Comumente a imunomarcação para OPG é restrita ao compartimento citosólico dos osteoblastos e menos frequentemente em células semelhantes a fibroblastos.

2. Análise estatística das ocorrências histomorfológicas

Após a quantificação das ocorrências histomorfológicas os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade seguido pelo teste não paramétrico de Mean-Whitney, utilizando o programa Graph Pad Prism® 5.0. Foram realizadas comparações entre os grupos no mesmo período, considerando cada evento histomorfológico descrito no material e método (tabela 1-6).

Houve diferença estatisticamente significativa no detalhe histomorfométrico do ligamento periodontal e raiz dentária . No sub-item organização do ligamento periodontal houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos aos 28 dias ($p<0.04$) (tabela 2) e no sub-item intensidade do processo inflamatório crônico a diferença estatística encontrada foi aos 60 dias ($p<0.005$) (tabela 2). Já na profundidade da reabsorção radicular houve diferença estatisticamente significativa aos 45 dias ($p<0.017$) (tabela 3) e aos 60 dias ($p<0.0006$) (tabela 3).

3. Análise estatística da Imunoistoquímica

Houve maior número de células imunorreativas ao PCNA presente no cimento e no ligamento periodontal no grupo Sham aos 28 dias (gráfico 1 e 2). No

osso alveolar houve maior número de imunomarcacão celular no grupo Sham aos 28 dias (gráfico 3) e no grupo OVX houve positividade celular nos três tempos pós-operatórios com maior quantidade de imunomarcacão aos 28 dias (gráfico 3). Na polpa dentária houve maior positividade celular no grupo OVX aos 28 dias (gráfico 4).

Houve maior número de células imunorreativas a TRAP no cemento no grupo Sham aos 28 dias. Em alguns tempos pós-operatórios deste grupo a positividade celular não foi observada. No grupo OVX houve maior positividade celular aos 45 dias, mas assim como no grupo Sham, em alguns tempos pós-operatórios deste grupo a marcação celular não foi observada (gráfico 5). O número de células positivas a TRAP presentes no ligamento periodontal e osso alveolar foram observadas no grupo OVX (gráfico 6 e 7).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o Sham e OVX nos períodos estudados (gráficos 1-7)

4. Análise da μ -ct

Grupo Sham 28 dias:

Foi observada reabsorção radicular na maioria das amostras no terço apical (Fig. 37) e reabsorção óssea no terço médio do dente (Fig. 38). Em 2 amostras não houve reabsorção radicular e óssea. Em uma das amostras no terço apical foi notado que o tecido mineralizado estava em contato com a dentina (Fig 39), podendo ser este tecido cemento ou tecido ósseo já que com estudo da micro-ct se torna difícil a distinção dos tecidos mineralizados.

Grupo OVX 28 dias:

Em 2 amostras foram notadas reabsorção radicular no terço apical na região

intermediária do corte se estendendo para direção distalizada do dente (Fig. 40). Foi observada reabsorção óssea na maioria das amostras (Fig. 41). Essas reabsorções foram evidenciadas na região apical do dente assim como no terço médio nos cortes mesiais, intermediários e distais.

Grupo Sham 60 dias:

A grande maioria dos espécimes apresentou reabsorção óssea no terço médio do dente, normalmente que se estendia da região intermediária do dente em direção as camadas mais profundas dos cortes (Figura 42). A maioria dos espécimes apresentaram reabsorção radicular no terço médio e apical (Figura 42), exceto em 2 amostras não houve reabsorção radicular no terço apical.

Grupo OVX 60 dias :

Todas as amostras apresentaram reabsorção óssea, principalmente na região apical e terço médio do dente (Figura 43). Notou-se reabsorção radicular na maioria das amostras. A presença da reabsorção foi na região de terço apical e médio (Figura 44).

Análise estatística:

Houve maior extensão de reabsorção radicular no período de 60 dias (gráfico 8A), assim como na profundidade da reabsorção radicular (gráfico 8D). A distância do ligamento periodontal foi maior no grupo Sham para os períodos de 28 e 60 dias (gráfico 8B). Houve maior reabsorção óssea no período de 60 dias independente dos grupos (gráfico 8C) e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos dentro do mesmo períodos para todos os eventos avaliados (gráfico 8AD).



Discussão



Discussão

Pesquisas em animais e em humanos mostram resultados contraditórios sobre a influência da deficiência do estrógeno na perda óssea alveolar (Dervis, 2005, Aydin et al., 2013). Um dos motivos pode ser devido ao fato de que os efeitos da ovariectomia sobre o tecido ósseo não são imediatos e geralmente leva mais de três meses para ser evidenciado (Kuroda et al., 2003) embora Yoon et al., (2012a) tenham relatado aumento do turnover ósseo e significativa perda óssea trabecular em ratas ovariectomizadas após 8 semanas na região da coluna vertebral.

Luvizuto et al., (2010c) também relatam que a ovariectomia reduz o processo de mineralização óssea alveolar e que a deficiência de estrógeno contribui para o atraso processo de cicatrização alveolar.

Os resultados desse estudo mostraram que a deficiência de estrógeno causada pela ovariectomia não interferiu significativamente no processo de reparo do reimplante dentário imediato, apesar de alguns itens avaliados mostrarem diferença estatisticamente significante entre os grupos (tabela 2 e 3).

Um dos motivos pode ter sido o tempo que os animais foram submetidos à deficiência de estrógeno, dois meses e ainda a idade. Como são animais adultos jovens pode ter ocorrido algum mecanismo de compensação por não apresentarem, por exemplo, dificuldade na absorção de minerais como o cálcio já que recebiam uma dieta balanceada.

Outro ponto é que as forças oclusais decorrentes do comportamento roedor também podem ter uma influência atenuada no efeito esperado da ovariectomia

sobre os ossos da mandíbula (Mavropoulos et al., 2007a, Ejiri et al., 2008). A carga mecânica no processo alveolar durante a mastigação pode proteger o osso alveolar dos efeitos prejudiciais observados em outros locais do esqueleto, tais como a tíbia (Mavropoulos et al., 2007b) e coluna vertebral (Yoon et al., 2012b).

Diferenças morfológicas e embriológicas entre os locais do esqueleto também podem ter uma influência porque Mavropoulos et al. (2007) relataram maior perda óssea na tíbia quando comparada ao osso alveolar em ratas ovariectomizadas (Mavropoulos et al., 2007c). Do-Gyoon Kim et al. (2012a) afirmam que o aumento da variabilidade da densidade mineral das trabéculas ósseas resultante da remodelação óssea elevada nas ratas ovariectomizadas influencia no comportamento da deformação das vertebra desses animais (Gyoon Kim et al., 2012b).

O peridonto de inserção composto pelo ligamento periodontal, cemento, e osso alveolar desempenha um papel importante na manutenção da estabilidade mecânica dos dentes. Forças mastigatórias aplicadas aos dentes são transferidas diretamente ao osso alveolar através do ligamento periodontal estimulando a remodelação óssea. Essa remodelação óssea altera as propriedades desse tecido quando comparado a outras áreas da mandíbula que não recebem essa força (Ames et al., 2010).

HO SP et al., (2007) estudaram o ligamento periodontal com relação a composição química, propriedades mecânicas das fibras colágenas na interface osso alveolar – ligamento periodontal – cemento e cemento-dentina e concluíram que as propriedades mecânicas destas diferentes regiões são semelhantes. Os mesmos autores concluíram em outro estudo que o alto módulo de elasticidade do cemento ligado ao osso alveolar pelo ligamento periododntal é maior quando

comparado à junção cimento-dentina o que explicaria a absorção das forças mastigatórias pelo ligamento periodontal (HO SP et al., 2009a).

Com relação ao processo de reparo do reimplante nos três grupos o reparo foi favorável com reinserção do ligamento periodontal no osso e no cimento e poucas áreas de reabsorção radicular aos 28 dias foram evidenciadas. Ao passo que a partir dos 45 dias as áreas de reabsorções foram mais evidentes.

A reinserção do ligamento periodontal é devido à viabilidade das suas células no momento do reimplante o que possibilitou a sua regeneração em grande parte da raiz (Andreasen, 1980c, Andreasen, 1981b, Hammarstron et al., 1989c, Pohl et al., 2005b) fato evidenciado pela imunorreatividade à PCNA que indica proliferação celular, tanto no cimento, no osso alveolar e também no ligamento periodontal, mais evidente aos 28 dias independente de pertencerem ao grupo Sham ou OVX.

A imunomarcagem para a TRAP foi mais evidente nos tempos mais longos 45 e 60 dias principalmente no tecido ósseo e ligamento periodontal com poucas marcações no cimento evidenciando que há preservação dos cementoblastos, os quais não possuem receptores para as células clásticas e são fundamentais para a preservação radicular (Andreasen, 1980, Andreasen, 1981, Hammarstron et al., 1989, Pohl et al., 2005, Consolaro, 2005).

Em reimplante dentário imediato de dentes com rizogênese incompleta é possível de ocorrer a revascularização pulpar tanto que não se preconiza o tratamento endodôntico no momento do reimplante (Andreasen, 2001, Andersson et al., 2012) e neste estudo todos os espécimes nos períodos 28, 45 e 60 dias apresentaram degeneração do tecido pulpar, porém sem contaminação por isso a ausência de infiltrado inflamatório agudo e conseqüentemente da reabsorção radicular externa do tipo inflamatória. Na prática clínica dentes nessas condições devem ser acompanhados periodicamente pelo risco de degeneração e

contaminação pulpar levando ao desenvolvimento da reabsorção radicular externa do tipo infalmatória que pode levar a perda rápida do dente.

A análise dos cortes longitudinais por meio da μ CT e da reconstrução 3D possibilitaram a avaliação de toda a raiz dentária, do tecido ósseo e do ligamento periodontal.

Foi possível identificar no Grupo Sham e OVX independente do período que as áreas de reabsorção radicular se concentravam na região apical, as áreas de reabsorção óssea no Grupo Sham foram evidentes no terço médio e no Grupo OVX se concentravam no terço médio e apical. Em geral essas são as regiões mais atingidas pela reabsorção em consequência do processo inflamatório gerado pelo próprio trauma da avulsão e do reimplante e posteriormente pela degeneração pulpar (Andreasen et al., 1995) que pôde ser observada na análise histomorfométrica e imunoistoquímica.

O espaço do ligamento periodontal foi maior no grupo Sham, tal fato pode ser explicado devido a manutenção do ligamento periodontal entre o osso alveolar e o cimento (HO SP et al., 2009b) . Entretanto, no grupo OVX o espaço foi menor devido ao estreitamento do ligamento periodontal em virtude reparo ósseo.

Mesmo com grande parte do ligamento periodontal viável algumas áreas podem sofrer necrose levando à perda de importantes estruturas como os cementoblastos e o pré-cimento. A substituição de cementoblastos por osteoblastos, durante o processo de reparo, permitirá que na presença de uma concentração mais elevada de mediadores local ou sistêmico da inflamação essas células gerenciem unidades osteoremodeladoras sobre a superfície radicular fazendo com que o dente participe do processo de remodelação óssea iniciando gradualmente sua substituição por osso (Consolaro, 2005).

O estrógeno é um hormônio que tem um importante papel no controle do

metabolismo ósseo regulando a expressão de proteínas como a Osteoprotegerina (OPG) (Wang et al., 2008, Jabbar et al., 2009) e RANKL (Jabbar et al., 2009) e citocinas pró-inflamatórias (Shul et al., 2008, Zhou et al., 2009). 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 (Zhou et al., 2009). Outra ligação do estrógeno com a destruição do tecido ósseo está relacionado com o fato do estrógeno apresentar importante papel na destruição dos osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea (Kameda et al., 1997). O que poderia explicar as diferenças entre o grupo Sham e OVX com relação ao processo inflamatório, profundidade de reabsorção radicular e osteoclastogenese revelada pelos diferentes métodos de análise.

Diante do exposto observa-se neste estudo que a ovariectomia não produziu uma alteração significativa nos tecidos periodontais a ponto de provocar grandes mudanças no processo de reparo do reimplante imediato.



Conclusão



Conclusão

Após análise histomorfométrica, imunoistoquímica e por micro-ct foi possível concluir que a ovariectomia não influenciou de forma significativa no processo de reparo do reimplante imediato.



Referências



*

Referências

- 1 Al-Hezaimi K, Salameh Z, Al-Fouzan K, Al Rejaie M, Tay FR (2011). Histomorphometric and micro-computed tomography analysis of pulpal response to three different pulp capping materials. *J Endo* 37: 507-12.
- 2 Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, DiAngelis AJ, et al., (2012) International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dental Traumatology*:28: 88–96.
- 3 Ames MS, Hong S, Lee HR, Fields HW, Johnston WM, Kima DG (2010). Estrogen deficiency increases variability of tissue mineral density of alveolar bone surrounding teeth. *Archives of Oral Biology* 55:599–605.
- 4 Andreasen JO (1980). A time-related study of periodontal healing and root resorption activity after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Swed Dent J* 4:101-10.
- 5 Andreassen JO (1981). 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* 10:43-53.
- 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 Aydim A, Kenar H, Atmaca H, Alici T, Gacar G, Müezzinoğlu US, et al. (2013). The Short- and Long- term Effects of Estrogen Deficiency on Apoptosis in Musculoskeletal Tissues: An Experimental Animal Model Study. *Arch Iran Med* 16:271-6.

* Normalização segundo a revista *Journal of Dental Research* (Anexo A).

- 8 Burg MA, Fraser K, Gui S, Grant K, Kosch SG, Nierenberg B, *et al.* (2006) Treatment of menopausal symptoms in family medicine settings following the Women's Health Initiative Findings. *J Am Board Fam Med* 19:122–31.
- 9 Chang PC, Lim LP, Chon LY, Dovban AS, Chien LY, Chung MC, *et al.* (2012) PDGF-simvastatin delivery stimulates in heat induced osteonecrosis. *J Dent Res* 91(6):618-24.
- 10 Cumming SR, Melton LJ (2002). Epidemiology and outcomes of osteoporotic fracture. *Lancet* 359(9319):1761-7.
- 11 Dangaria SJ, Ito Y, Yin L, Valdré G, Luan X, Diekwisch TG (2011). Apatite microtopographies instruct signaling tapestries for progenitor-driven new attachment of teeth. *Tissue Eng Part A* 17(3-4):279-90.
- 12 Dervis E (2005). Oral implications of osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100:349-56.
- 13 Ducy P, Schinke T, Karsenty G (2000). The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289:1501-1504.
- 14 Ejiri S, Toyooka E, Tanaka M, Anwar RB, Kohno S (2006). Histological and histomorphometrical changes in rat alveolar bone following antagonistic tooth extraction and/or ovariectomy. *Arch Oral Biol* 51: 941-950.
- 15 Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Väänänen HK (2006). Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab* 52:499-509.
- 16 Ho SP, Marshall SJ, Ryder MI, Marshall GW (2007). The tooth attachment mechanism defined by structure, chemical composition and mechanical properties of collagen fibers in the periodontium. *Biomaterials* 28:5238-45.
- 17 Ho SP, Yu B, Yun W, Marshall GW, Ryder MI, Marshall SJ (2009). Structure, chemical composition and mechanical properties of human and rat cementum and its interface with root dentin. *Acta Biomater* 5:707-18.
- 18 Hammarström L, Blomlöf L, Lindskog S (1989). Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. *Endod Dent Traumatol* 5:163-75.

- 19 Intini G, Andreana S, Buhite RJ, Bobek LA (2008). A comparative analysis of bone formation induced by human demineralized freeze-dried bone and enamel matrix derivative in rat calvaria critical-size bone defects. *J Periodontol* 79:1217-24.
- 20 Jabbar S, Drury J, Fordham JN, Datta HK, Francis RM, Tuck SP (2011). Osteoprotegerin, RANKL and bone turnover in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Pathol* 64:354-7.
- 21 Kuroda S, Mukohyama H, Hondo H, Aoki K, Ohyama T, Kasugai S (2003). Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual x-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral Dis* 9:24-28.
- 22 Liu HY, Chiou JF, Wu AT, Tsai CY, Leu JD, Ting LL, et al. (2012). The effect of diminished osteogenic signals on reduced osteoporosis recovery in aged mice and the potential therapeutic use of adipose-derived stem cells. *Biomaterials* 33:6105-12.
- 23 Long JA, Evans HM (1922). The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem Univ Calif* 6:1-148.
- 24 Lustosa-Pereira A, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N, Bramante CM, Bortoluzzi EA (2006). Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rats' teeth. *Dent Traumatol* 22:30-5.
- 25 Luvizuto ER, Dias SM, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia IR Jr, Okamoto R, et al. (2010). Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone* 46:1021-9.
- 26 Marão HF, Panzarini SR, Aranega AM, Sonoda CK, Poi WR, Esteves JC, et al. (2012). Periapical tissue reactions to calcium hydroxide and MTA after external root resorption as a sequela of delayed tooth replantation. *Dent Traumatol* 28:306-13.
- 27 Mavropoulos A, Rizzoli R, Ammann P (2007). Different responsiveness of alveolar and tibial bone to bone loss stimuli. *J Bone Miner Res* 22:403-410.

- 28 Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T, Amizura N, Ito M, Fukuyama R, *et al.* (2007). Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Dev Dyn* 236:1876-90.
- 29 Min HJ, Lee MJ, Kim JY, Cho SW, Park HD, Lee SI, *et al.* (2007). Alteration of BMP-4 and Runx2 expression patterns in mouse temporomandibular joint after ovariectomy. *Oral Dis* 13:220-7.
- 30 Muller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der Perre G, Dequeker J, Hildebrand T, *et al.* (1998) Morphometric analysis of human bone biopsies: A quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 23:59-66.
- 31 Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JH (1986). Cells of the bone: proliferation, differentiation and hormonal regulation. *Physiol Rev* 66:855-886.
- 32 NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy (2001). Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 285:785-95.
- 33 Panzarini SR, Pedrini D, Brandini DA, Poi WR, Santos MF, Correa JP, *et al.* (2005). Physical education undergraduates and dental trauma knowledge. *Dent Traumatol* 21:324-8.
- 34 Panzarini SR, Holland R, de Souza V, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D *et al.* (2007). Mineral trioxide aggregate as a root canal filling material in reimplanted teeth. Microscopic analysis in monkeys. *Dental Traumatol* 23:265-72.
- 35 Panzarini SR, Okamoto R, Poi WR, Sonoda CK, Pedrini D, da Silva PE, *et al.* (2013). Histological and immunohistochemical analyses of the chronology of healing process after immediate tooth replantation in incisor rat teeth. *Dent Traumatol* 29:15-22.
- 36 Pohl Y, Filippi A, Kirschner H (2005). Results after replantation of avulsed permanent teeth. II. Periodontal healing and the role of physiologic storage and antiresorptive-regenerative therapy. *Dent Traumatol* 21:93-101.

- 37 Rogers A, Eastell R (2005). Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kB ligant: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metabol* 90:6323-6331.
- 38 Holland R, Mazuqueli L, de Souza V, Murata SS, Dezan Júnior E, Suzuki P (2007). Influence of the type of vehicle and limit of obturation on apical and periapical tissue response in dogs' teeth after root canal filling with mineral trioxide aggregate. *J Endod* 33:693-7.
- 39 Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med*. 1997; 186: 489-95.
- 40 Saad-Neto M, Carvalho ACP, Okamoto T, Callestini EA (1986). Immediate dental replantation with root surface treatment with phosphoric acid and calcium hydroxide: histological study in rats. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 40:314-20.
- 41 Saito CT, Gulinelli JL, Panzarini SR, Garcia VG, Okamoto R, Okamoto T, et al. (2011). Effect of low-level laser therapy on the healing process after tooth replantation: a histomorphometrical and immunohistochemical analysis. *Dent Traumatol* 27(1):30-9.
- 42 Sato K, Muramatsu T, Tsuchiya Y, Masaoka T, Enokiya Y, Hashimoto S, et al. (2010). Proliferation, migration and apoptosis of periodontal ligament cells after tooth replantation. *Oral Dis* 16:263-8.
- 43 Shu L, Guan SM, Fu SM, Guo T, Cao M, Ding Y (2008). Estrogen Modulates Cytokine Expression in Human Periodontal Ligament Cells. *J Dent Res* 87:142-147.
- 44 Sonoda CK, Poi WR, Okamoto T, Toyota E, Takeda RH (2000). Mediate teeth reimplantation after root treatment with 1%, 2,5%, 5% and 10% sodium hypochlorite solution. *Rev Bras Odontol* 57:293-6.
- 45 Tsukamoto-Tanaka H, Ikegame M, Takagi R, Harada H, Ohshima H (2006). Histochemical and immunocytochemical study of hard tissue formation in dental pulp during the healing process in rat molars after tooth replantation. *Cell Tissue Res* 325:219-29.

- 46 Vandeweghe S, Coelho PG, Vanhove C, Wennerberg A, Jimbo R (2013). Utilizing micro-computed tomography to evaluate bone structure surrounding dental implants: A comparison with histomorphometry. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* doi: 10.1002/jbm.b.32938.
- 47 Van Oosterwyck H, Duyck J, Vander Sloten J, Van der Perre G, Jansen J, Wevers M, *et al.* (2000) Use of microfocus computerized tomography as a new technique for characterizing bone tissue around oral implants. *J Oral Implantol* 26:5-12.
- 48 Vico L, Prallet B, Chappard D, Pallot-Prades B, Pupier R, Alexandre C (1992). Contributions of chronological age, age at menarche and menopause and of anthropometric parameters to axial and peripheral bone densities. *Osteoporos Int* 2:153-158.
- 49 Wang YL, Fei LS, Jin CX, Liu SY (2008). Effect of estrogen-deficiency on expression of osteoprotegerin in alveolar bone: experiment with rats with periodontitis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 88:1715-8.
- 50 Wilensky A, Gabet Y, Yumoto H, Houry-Haddad Y, Shapira L. (2005). Three-dimensional quantification of alveolar bone loss in *Porphyromonas gingivalis*-infected mice using micro-computed tomography. *J Periodontol* 76:1282-6.
- 51 Wolfson EM, Seltzer S (1975). Reaction of rat connective tissue to some gutta-percha formulations. *J Endod* 1:395-402.
- 52 Yoon KH, Cho DC, Yu SH, Kim KT, Sung JY (2012). The Change of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats: Analyses of MicroCT Scan and Biochemical Markers of Bone Turnover. *J Korean Neurosurg Soc* 51:323-327.
- 53 Zhou Y, Fu Y, Li JP, Qi LY (2009). The role of estrogen in osteogenetic cytokine expression in human periodontal ligament cells. *Int J Periodontics Restorative Dent* 29:507-513.



Figuras

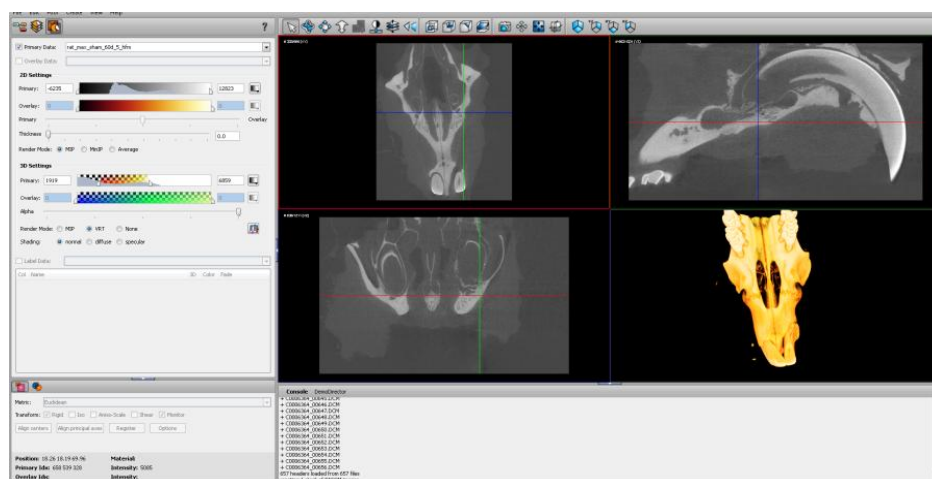


Fig. 1. Imagem da micro-ct para identificar os cortes: corte distal.

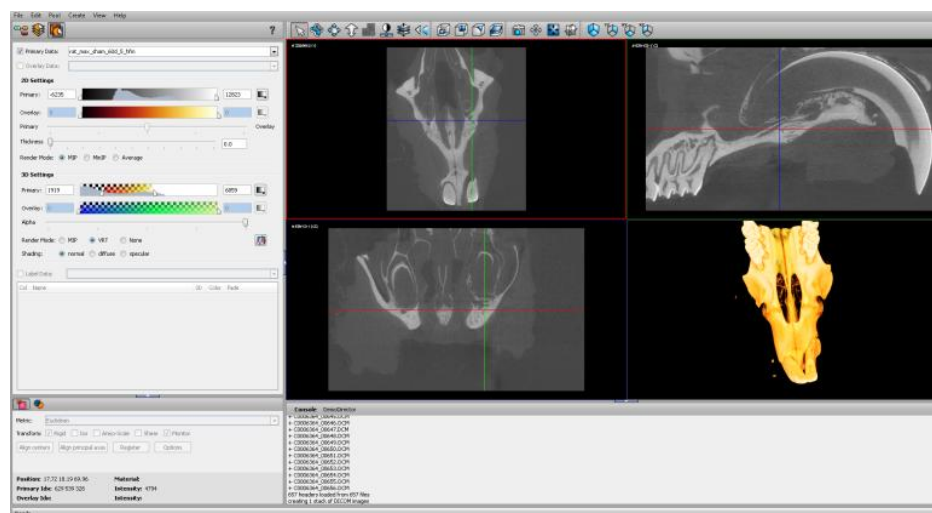


Fig. 2. Imagem da micro-ct para identificar os cortes: corte intermediário.

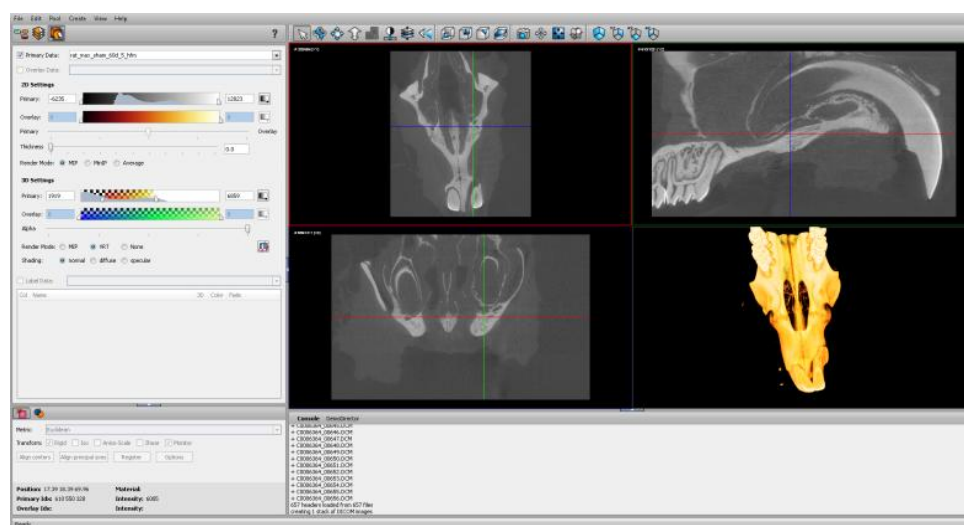


Fig. 3. Imagem da micro-ct para identificar os cortes: corte mesial.

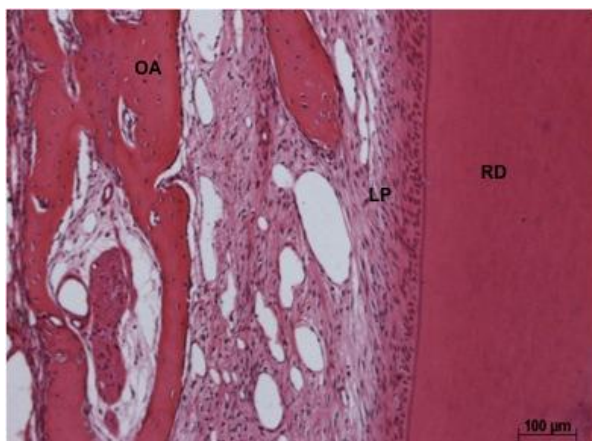


Fig.4 Sham 28 dias – Ligamento periodontal reparado, com preservação da integridade do cemento e da dentina. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). HE. 100µm.

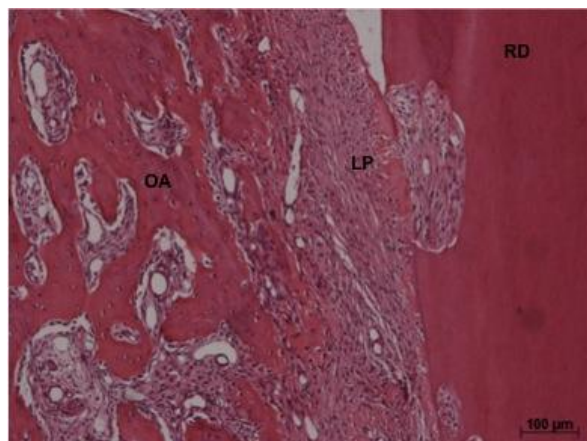


Fig.5 OVX 28 dias – Área de reabsorção radicular. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). HE. 100µm.

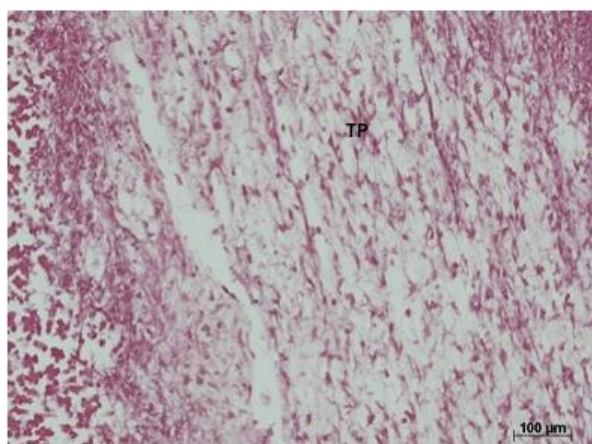


Fig.6 Sham 28 dias – Tecido pulpar degenerado. Tecido pulpar (TP). HE. 100µm.

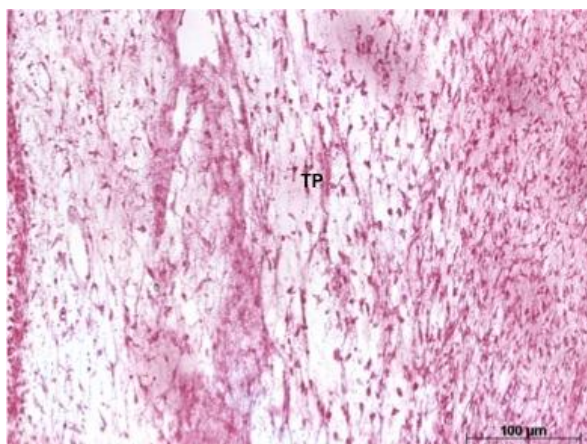


Fig.7 OVX 28 dias – Tecido pulpar degenerado. Tecido pulpar (TP). HE. 100µm.

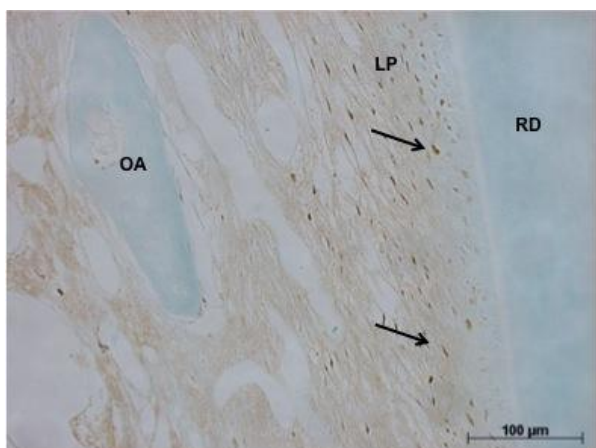


Fig.8 Sham 28 dias – Células imunorreativas ao PCNA (seta) no ligamento periodontal. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). PCNA. 100µm.

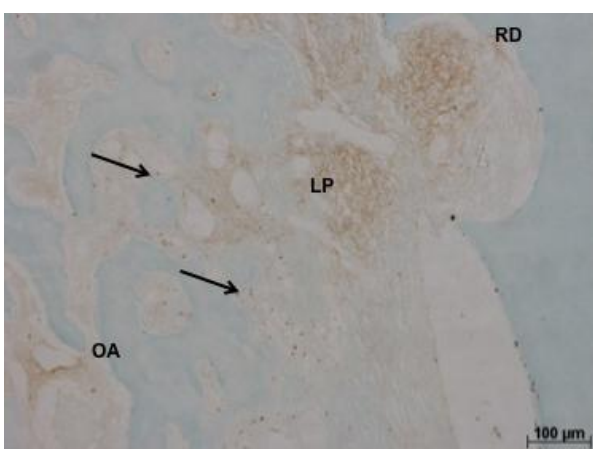


Fig.9 OVX 28 dias – Células imunorreativas ao PCNA (seta) no osso alveolar. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). PCNA. 100µm.



Fig.10 Sham 28 dias – Tecido pulpar com ausência de células imuno-reativas ao PCNA. Tecido pulpar (TP). PCNA. 100µm.

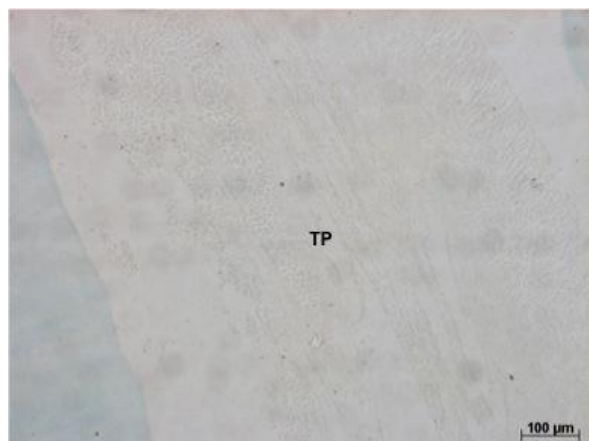


Fig.11 OVX 28 dias – Tecido pulpar com ausência de células imuno-reativas ao PCNA. Tecido pulpar (TP). PCNA. 100µm.

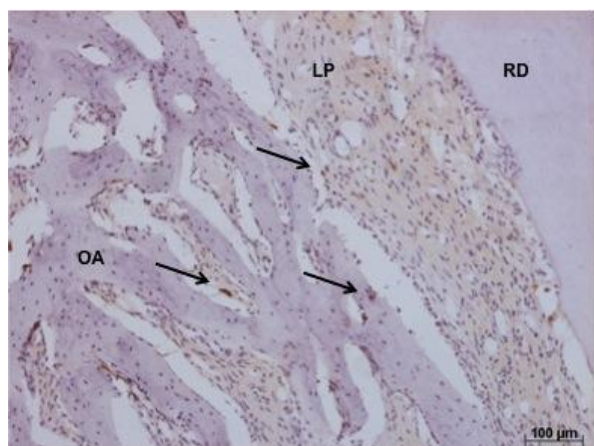


Fig.12 Sham 28 dias – Osteoclastos imuno-reativos a TRAP (seta) presentes na superfície do osso alveolar. Raiz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). TRAP. 100µm.

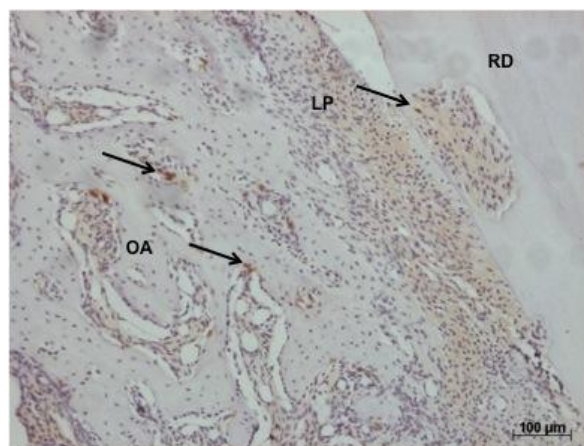


Fig.13 OVX 28 dias – Osteoclastos imuno-reativos a TRAP (seta) presentes na superfície radicular e no osso alveolar. Raiz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). TRAP. 100µm.

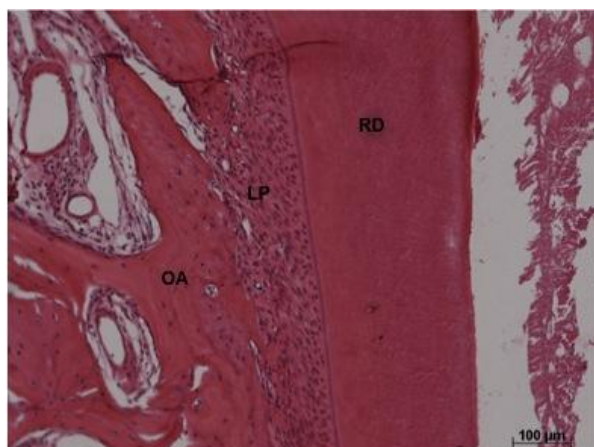


Fig.14. Sham 45 dias – Cimento e dentina íntegros. Ligamento periodontal reparado. Raiz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA).. HE. 100µm.

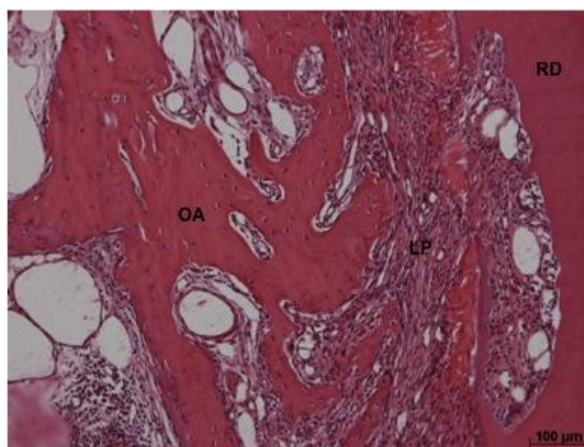


Fig.15. OVX 45 dias – Área de reabsorção radicular. Raiz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA) HE. 100µm.

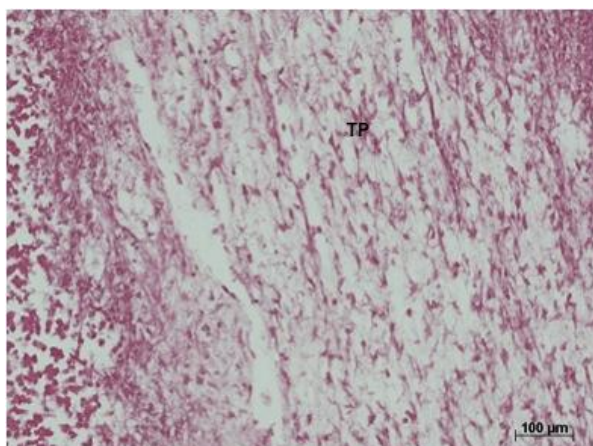


Fig.16 Sham 45 dias – Tecido pulpar degenerado. Tecido pulpar (TP). HE. 100μm.

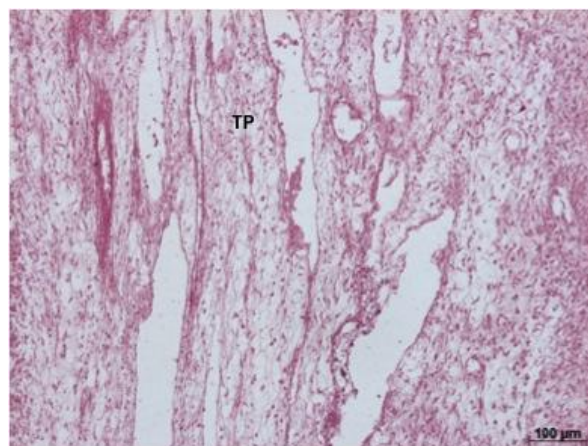


Fig.17 OVX 45 dias – Tecido pulpar degenerado. Tecido pulpar (TP). HE. 100μm.

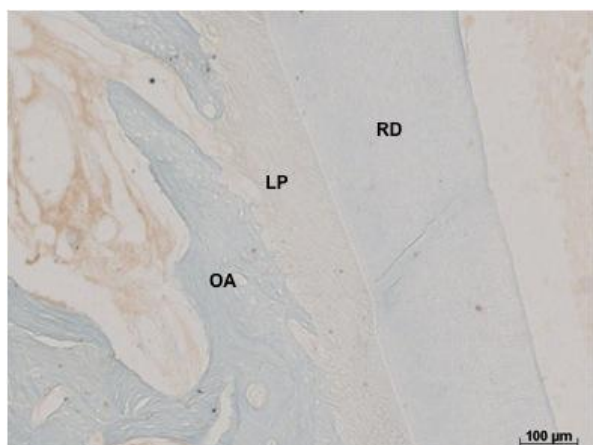


Fig.18 Sham 45 dias – Ausência de células imunorreativas ao PCNA. Raiz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). PCNA. 100μm.

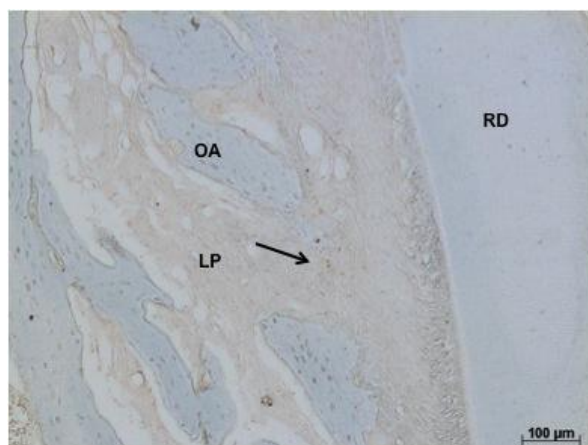


Fig.19 OVX 45 dias – Células imunorreativas ao PCNA (seta) no ligamento periodontal. Raiz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). PCNA. 100μm.

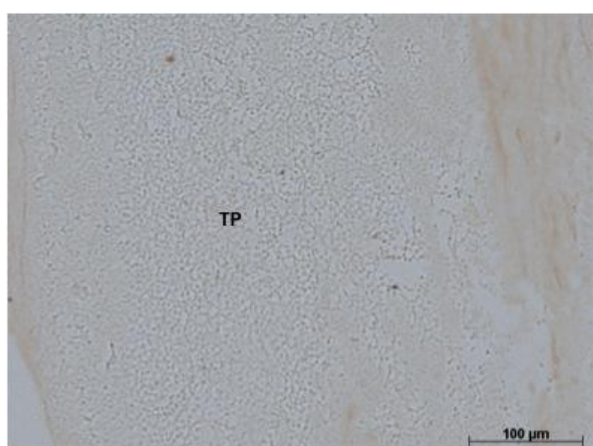


Fig.20 Sham 45 dias – Tecido pulpar com ausência de células imunorreativas ao PCNA. Tecido pulpar (TP). PCNA. 100μm.

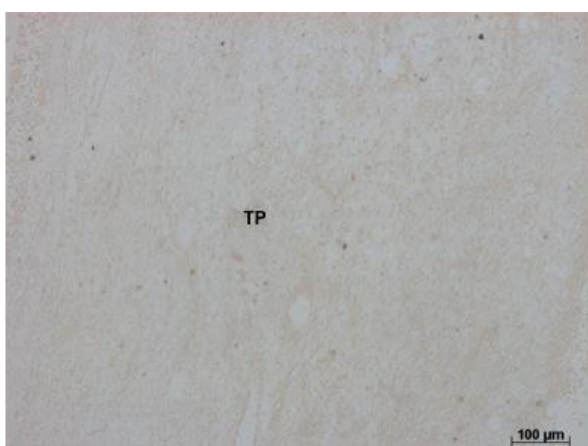


Fig.21 OVX 45 dias – Tecido pulpar com ausência de células imunorreativas ao PCNA. Tecido pulpar (TP). PCNA. 100μm.

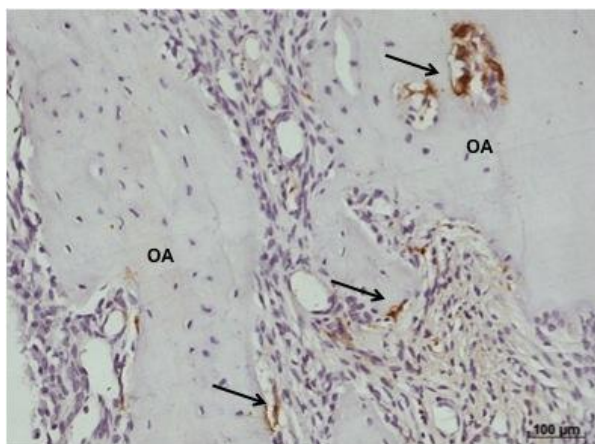


Fig.22 Sham 45 dias – Osteoclastos imunorreativos a TRAP (seta) presentes na superfície do osso alveolar. Raiz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). TRAP. 100µm.

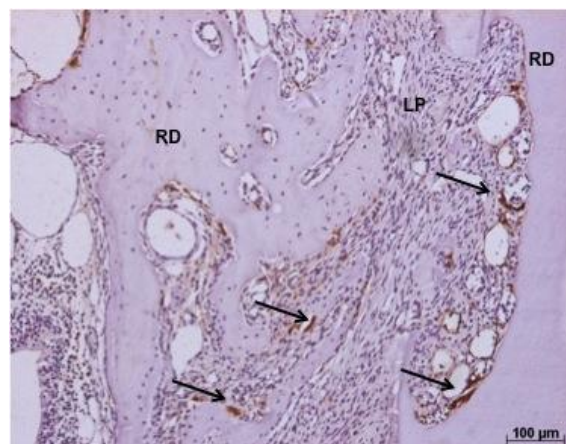


Fig.23 OVX 45 dias – Osteoclastos imunorreativos a TRAP (seta) presentes na superfície do osso alveolar e no ligamento periodontal. Raiz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). TRAP. 100µm.

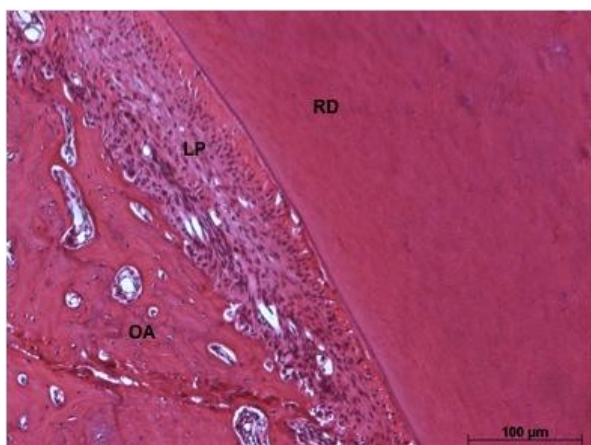


Fig.24 Sham 60 dias – Ligamento periodontal reparado e preservação do cimento e da dentina. Raiz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). HE. 100µm.

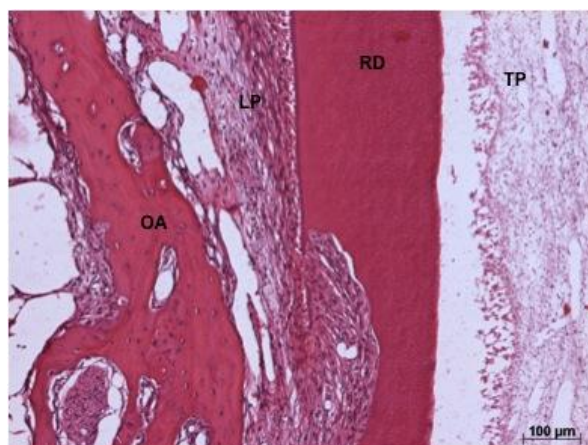


Fig.25 OVX 60 dias – Área de reabsorção radicular. Raiz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA); tecido pulpar (TP). HE. 100µm.

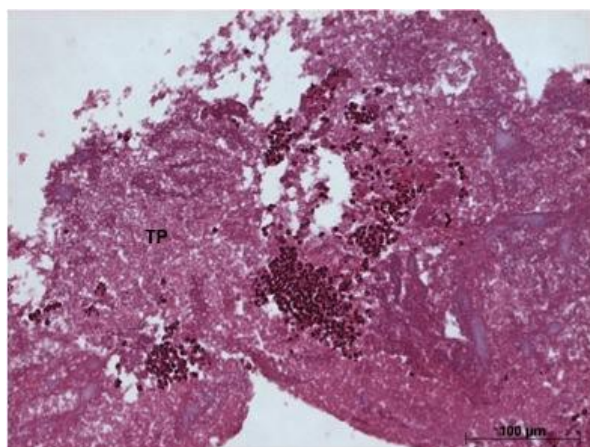


Fig.26 Sham 60 dias – Tecido pulpar degenerado. Tecido pulpar (TP). HE. 100µm.

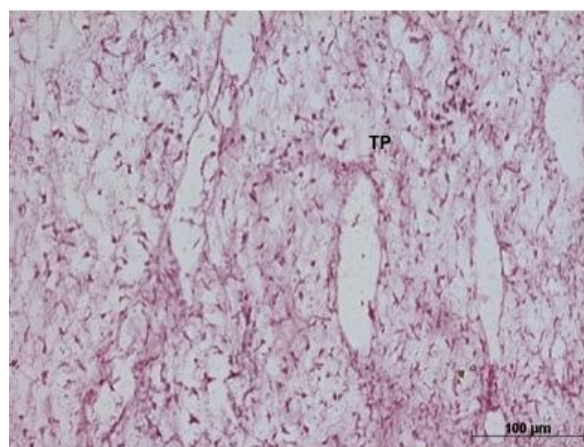


Fig.27 OVX 60 dias – Tecido pulpar degenerado. Tecido pulpar (TP). HE. 100µm.

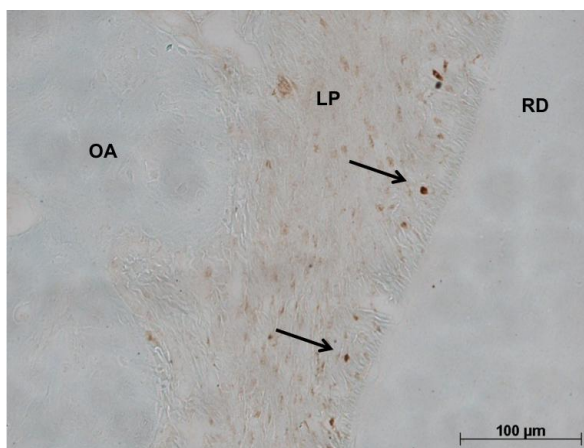


Fig.28 Sham 60 dias – Células imunorreativas ao PCNA (seta) no ligamento periodontal. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). PCNA. 100µm.

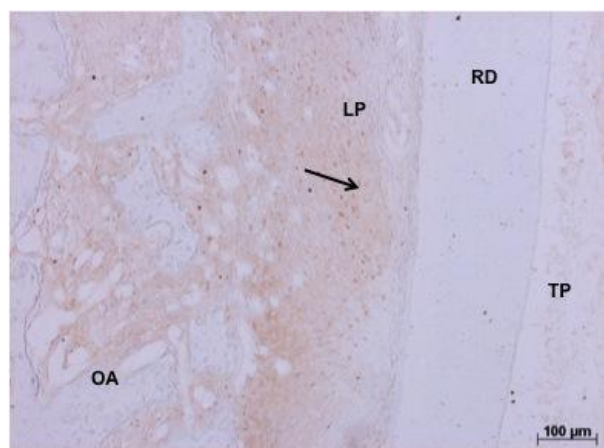


Fig.29 OVX 60 dias – Células imunorreativas ao PCNA (seta) no ligamento periodontal. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA); tecido pulpar (TP). PCNA. 100µm.

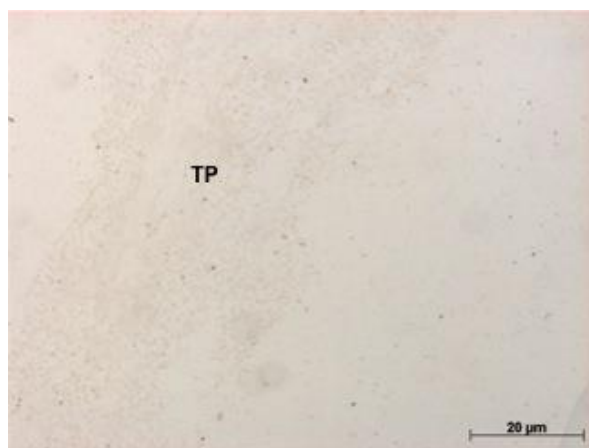


Fig.30 Sham 60 dias – Tecido pulpar com ausência de células imunorreativas ao PCNA. Tecido pulpar (TP). PCNA. 100µm.

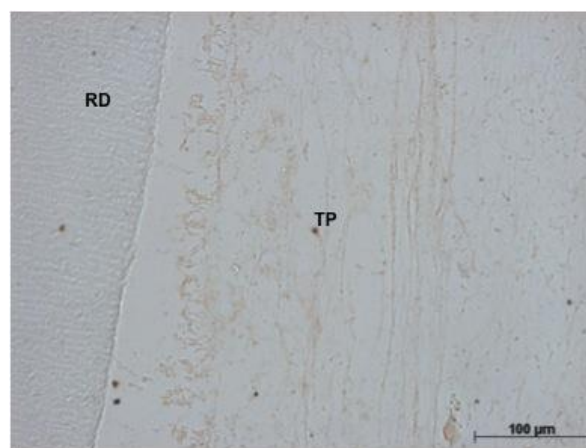


Fig.31 OVX 60 dias – Tecido pulpar com ausência de células imunorreativas ao PCNA. Tecido pulpar (TP). PCNA. 100µm.

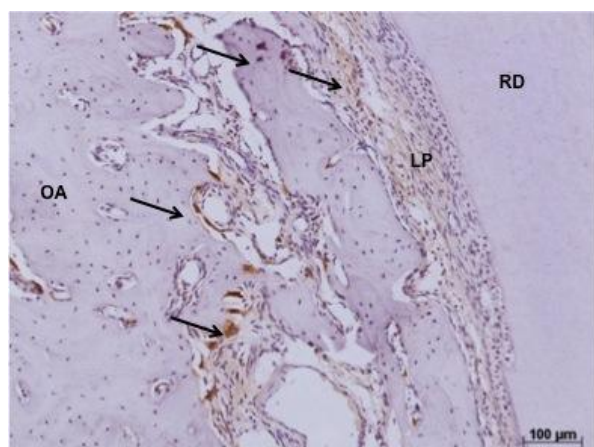


Fig.32 Sham 60 dias – Osteoclastos imunorreativos a TRAP (seta) presentes na superfície do osso alveolar. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). TRAP. 100µm.

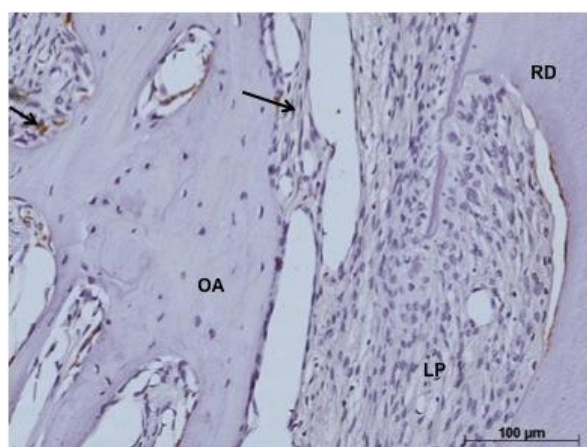


Fig.33 OVX 60 dias – Osteoclastos imunorreativos a TRAP (seta) presentes na superfície do osso alveolar. Raíz dentária (RD); ligamento periodontal (LP); osso alveolar (OA). TRAP. 100µm.

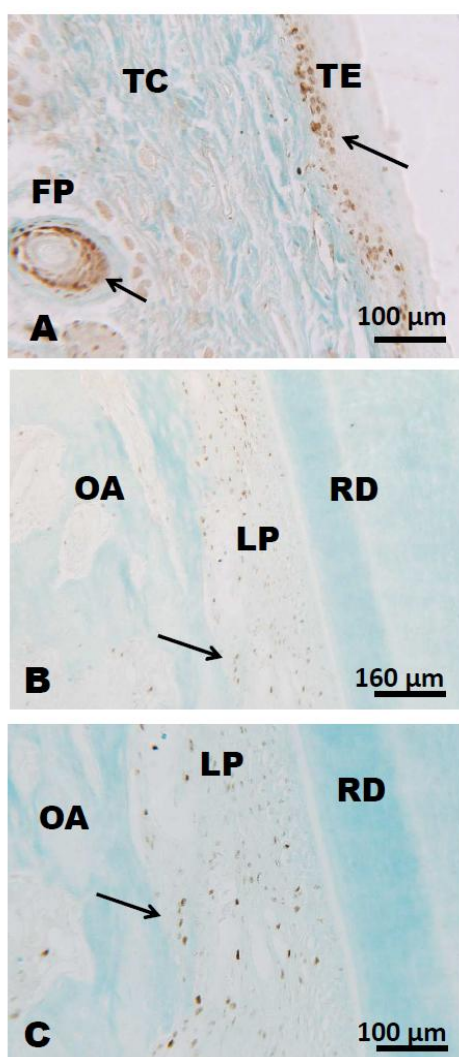


Figura 34A-C. Fotomicrografias de corte histológico da maxila submetidos ao método da imuno-peroxidase indireta para identificação de PCNA e corado com “fast green”. Em A, observar a adequada e específica imunomarcção dos núcleos de células da camada basal do epitélio bucal (seta maior) e de folículo piloso da pele perilabial (seta maior). Em B, observar a região média do ligamento periodontal de animal do grupo ovariectomizado (28 dias). Observar a presença de inúmeras células imunorreativas (seta). Em C, fotomicrografia anterior em maior resolução mostrando células imunorreativas (seta). LP, ligamento periodontal; AO, osso alveolar; RD, raiz dentária. A: 100μm; B: 160μm; C: 100μm.

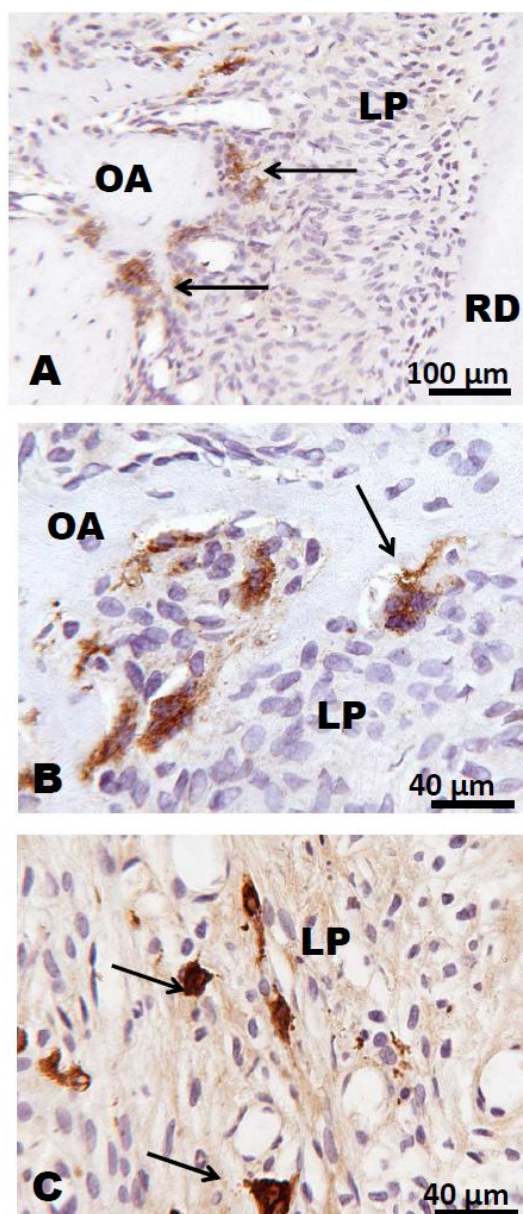


Figura 35A-C. Fotomicrografias de corte histológico da maxila submetidos ao método da imuno-peroxidase indireta para identificação de TRAP e corado com hematoxilina. Em A, observar a adequada e específica imunomarcção restrita ao compartimento citosólico das células clásticas (osteoclastos) na superfície do osso alveolar associado ao dente incisivo (setas). Em B, observar a identificação de inúmeros osteoclastos imunorreativos a TRAP, dispersos na superfície do osso alveolar. Em C, observar células clásticas distribuídas no ligamento periodontal não exibindo relação com superfícies mineralizadas (setas). LP, ligamento periodontal; AO, osso alveolar; RD, raiz dentária. A: 100µm; B: 40µm; C: 40µm.

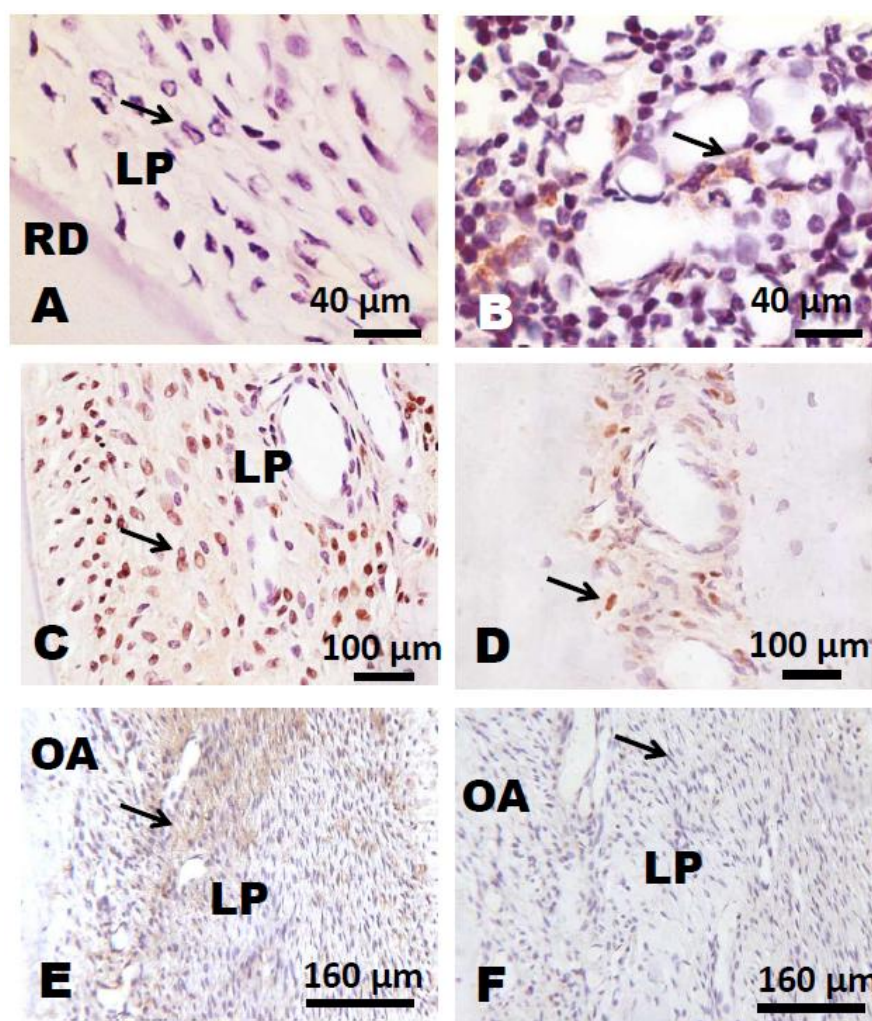


Figura 36A-F. Fotomicrografias de cortes histológicos da maxila de ratas do grupo controle (A-B) e ovariectomizadas (C-F), submetidos ao método da imuno-peroxidase indireta para identificação de caspase 3 (A-B), RUNX2 (C-D) e OPG (E-F) corado com hematoxilina. Em A, observar a ausência de imunorreatividade a caspase 3 nas células (seta) do ligamento periodontal. Em B, observar que algumas poucas células da medula óssea exibe possível imunorreatividade a caspase 3 (seta). Em C, observar a presença de inúmeras células com imunorreatividade nuclear para RUNX2 no ligamento periodontal, sendo que algumas células (linhagem fibroblástica) exibem marcação inespecífica (seta). Em D, a imunorreatividade a RUNX2 foi mais específica, restringindo a células da linhagem osteogênica (seta) visualizadas em uma das suturas da maxila. Em E, observar a imunorreatividade inespecífica a OPG no ligamento periodontal do incisivo (seta). Em F, observar ausência de imunorreatividade a OPG em corte histológico de animal do mesmo grupo experimental (seta). LP, ligamento periodontal; AO, osso alveolar; RD, raiz dentária. A-B: 40μm; CD: 100μm; E-F: 160μm.

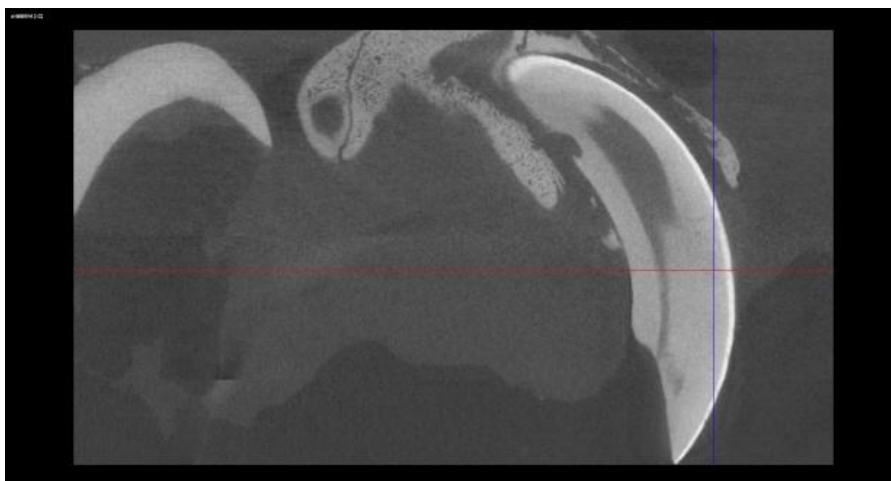


Fig. 37. Grupo Sham 28 dias: Reabsorção radicular na região apical.

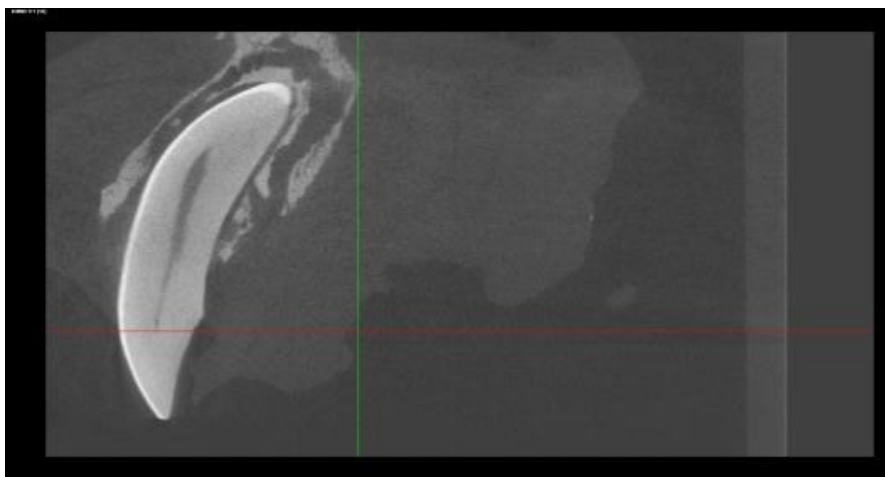


Fig. 38. Grupo Sham 28 dias: Reabsorção óssea na região de terço médio.

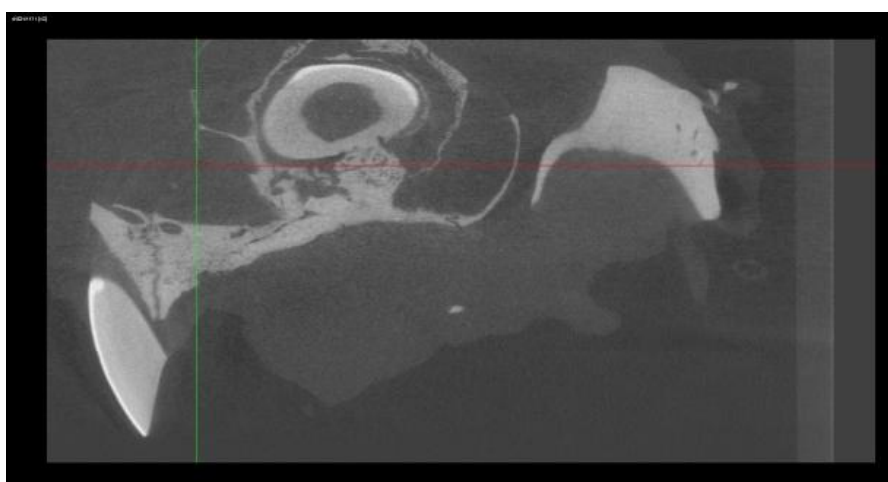


Fig. 39. Grupo Sham 28 dias: tecido mineralizado em contato com o tecido dentário no terço apical.

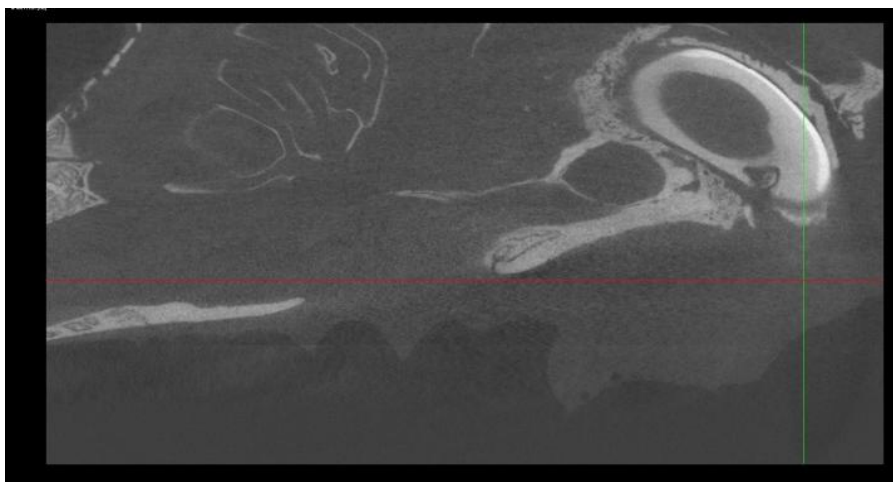


Fig. 40. Grupo OVX 28 dias: reabsorção radicular na região de terço apical.

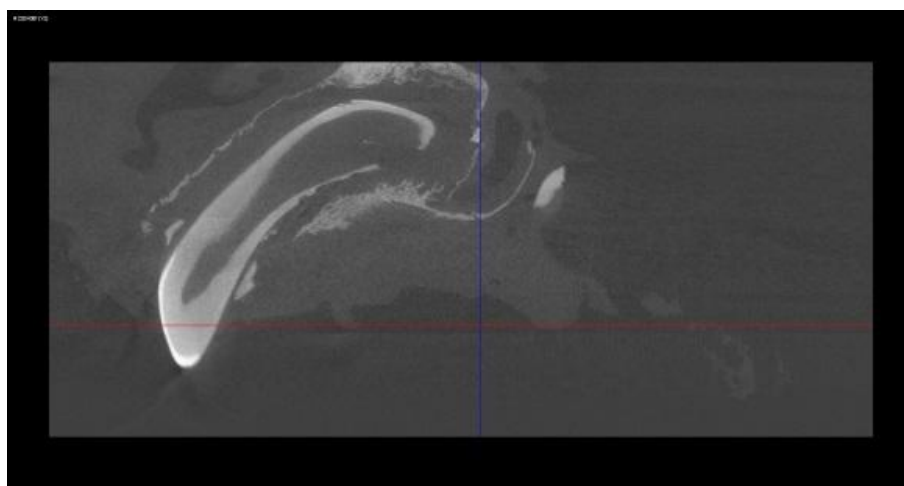


Fig. 41. Grupo OVX 28 dias: reabsorção óssea na região de terço médio e reabsorção radicular no terço médio e apical.

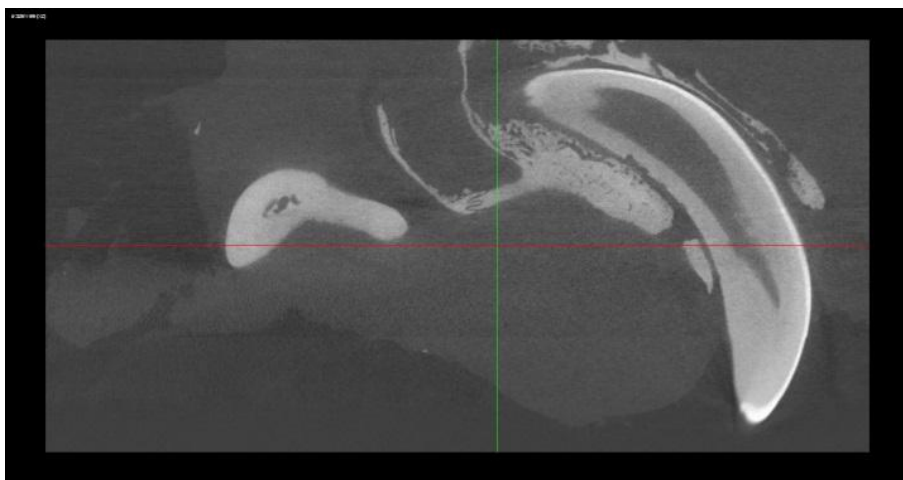


Fig. 42. Grupo Sham 60 dias: reabsorção óssea na região de terço médio e reabsorção dentária no terço médio e apical.

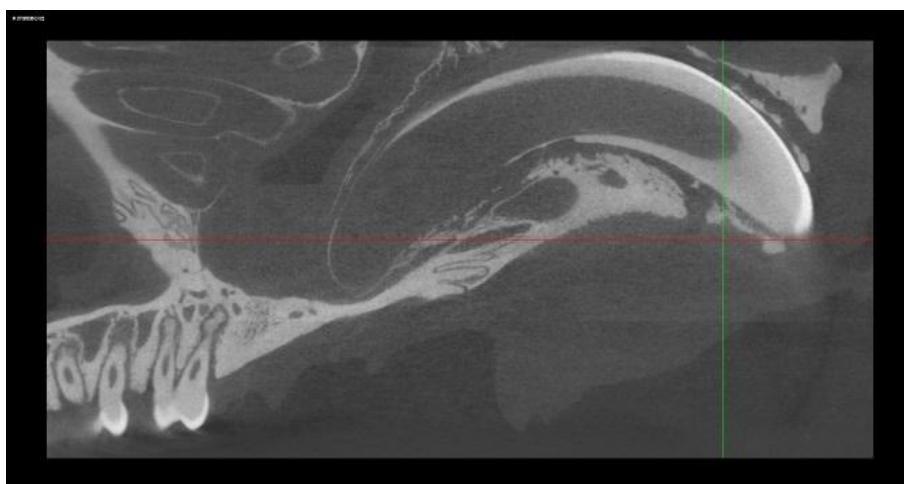


Fig. 43. Grupo OVX 60 dias: reabsorção óssea no terço apical e médio.



Tabelas

Tabela 1: Escores e análise estatística dos detalhes histomorfométricos na inserção epitelial após o reimplante dentário imediato aos 28, 45 e 60 dias. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney com nível de significância de 5%.

<i>Inserção Epitelial</i>						
<i>Detalhes histomorfométricos Itens avaliados/Scores</i>	<i>SHAM (28 dias)</i>	<i>OVX (28 dias)</i>	<i>SHAM (45 dias)</i>	<i>OVX (45 dias)</i>	<i>SHAM (60 dias)</i>	<i>OVX (60 dias)</i>
<i>Área</i>						
1	4/8	3/7	2/8	3/9	5/7	3/8
2	4/8	4/7	6/8	6/9	2/7	4/8
3	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	1/8
4	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
Comparação intergrupos no mesmo período	a	a	a	a	a	a
<i>Intensidade do processo inflamatório agudo</i>						
1	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
2	2/8	0/7	4/8	7/9	6/7	3/8
3	6/8	7/7	4/8	2/9	1/7	5/8
4	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
Comparação intergrupos no mesmo período	a	a	a	a	a	a
<i>Extensão do processo inflamatório agudo</i>						
1	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
2	4/8	1/7	4/8	6/9	6/7	8/8
3	4/8	6/7	4/8	3/9	1/7	0/8
4	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
Comparação intergrupos no mesmo período	a	a	a	a	a	a
<i>Intensidade do processo inflamatório crônico</i>						
1	1/8	0/7	1/8	0/9	0/7	0/8
2	7/8	7/7	7/8	9/9	7/7	8/8
3	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
4	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
Comparação intergrupos no mesmo período	a	a	a	a	a	a
<i>Extensão do processo inflamatório crônico</i>						
1	1/8	0/7	0/8	0/9	2/7	0/8
2	7/8	7/7	8/8	9/9	5/7	8/8
3	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
4	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
Comparação intergrupos no mesmo período	a	a	a	a	a	a

Tabela 2: Escores e análise estatística dos detalhes histomorfométricos no ligamento periodontal após o reimplante dentário imediato aos 28, 45 e 60 dias. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney com nível de significância de 5%.

Ligamento Periodontal						
Detalhes histomorfométricos Itens avaliados/Scores	SHAM (28 dias)	OVX (28 dias)	SHAM (45 dias)	OVX (45 dias)	SHAM (60 dias)	OVX (60 dias)
Organização						
1	6/8	1/7	1/8	0/9	0/7	0/8
2	1/8	3/7	6/8	8/9	6/7	3/8
3	1/8	3/7	1/8	1/9	1/7	5/8
4	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
Comparação intergrupos no mesmo período	a	b	a	a	a	a
Intensidade do processo inflamatório agudo						
1	1/8	1/7	1/8	0/9	2/7	0/8
2	6/8	3/7	4/8	8/9	3/7	8/8
3	1/8	3/7	3/8	1/9	2/7	0/8
4	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
Comparação intergrupos no mesmo período	a	a	a	a	a	a
Extensão do processo inflamatório agudo						
1	0/8	0/7	1/8	0/9	0/7	0/8
2	7/8	4/7	4/8	8/9	7/7	8/8
3	1/8	3/7	3/8	1/9	0/7	0/8
4	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
Comparação intergrupos no mesmo período	a	a	a	a	a	a
Intensidade do processo inflamatório crônico						
1	6/8	3/7	3/8	3/9	5/7	0/8
2	2/8	4/7	5/8	6/9	2/7	8/8
3	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
4	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
Comparação intergrupos no mesmo período	a	a	a	a	a	b
Extensão do processo inflamatório crônico						
1	8/8	1/7	1/8	0/9	0/7	0/8
2	0/8	6/7	7/8	9/9	7/7	8/8
3	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
4	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
Comparação intergrupos no mesmo período	a	a	a	a	a	a

Tabela 3: Escores e análise estatística dos detalhes histomorfométricos na raiz dentária após o reimplante dentário imediato aos 28, 45 e 60 dias. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney com nível de significância de 5%.

<i>Raíz Dentária</i>						
<i>Detalhes histomorfométricos Itens avaliados/Scores</i>	<i>SHAM (28 dias)</i>	<i>OVX (28 dias)</i>	<i>SHAM (45 dias)</i>	<i>OVX (45 dias)</i>	<i>SHAM (60 dias)</i>	<i>OVX (60 dias)</i>
<i>Reabsorção radicular</i>						
1	1/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
2	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
3	7/8	7/7	8/8	9/9	7/7	8/8
4	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
Comparação intergrupos no mesmo período	a	a	a	a	a	a
<i>Extensão da reabsorção radicular</i>						
1	1/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
2	7/8	7/7	8/8	9/9	7/7	8/8
3	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
4	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
Comparação intergrupos no mesmo período	a	a	a	a	a	a
<i>Profundidade da reabsorção radicular</i>						
1	1/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
2	7/8	7/7	8/8	4/9	7/7	0/8
3	0/8	0/7	0/8	5/9	0/7	4/8
4	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	4/8
Comparação intergrupos no mesmo período	a	a	a	b	a	b
<i>Reparo da reabsorção radicular</i>						
1	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
2	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
3	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
4	8/8	7/7	8/8	9/9	7/7	8/8
Comparação intergrupos no mesmo período	a	a	a	a	a	a

Tabela 4: Escores e análise estatística dos detalhes histomorfométricos no tecido ósseo após o reimplante dentário imediato aos 28, 45 e 60 dias. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney com nível de significância de 5%.

<i>Tecido Ósseo</i>						
<i>Detalhes histomorfométricos Itens avaliados/Scores</i>	<i>SHAM (28 dias)</i>	<i>OVX (28 dias)</i>	<i>SHAM (45 dias)</i>	<i>OVX (45 dias)</i>	<i>SHAM (60 dias)</i>	<i>OVX (60 dias)</i>
<i>Reabsorção ativa e inativa</i>						
1	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
2	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
3	8/8	7/7	8/8	9/9	7/7	8/8
4	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
Comparação intergrupos no mesmo período	a	a	a	a	a	a

Tabela 5: Escores e análise estatística dos detalhes histomorfométricos referentes à anquilose após o reimplante dentário imediato aos 28, 45 e 60 dias. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney com nível de significância de 5%.

<i>Anquilose</i>						
<i>Detalhes histomorfométricos Itens avaliados/Scores</i>	<i>SHAM (28 dias)</i>	<i>OVX (28 dias)</i>	<i>SHAM (45 dias)</i>	<i>OVX (45 dias)</i>	<i>SHAM (60 dias)</i>	<i>OVX (60 dias)</i>
<i>Anquilose</i>						
1	8/8	7/7	8/8	9/9	7/7	7/8
2	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	1/8
3	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
4	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
Comparação intergrupos no mesmo período	a	a	a	a	a	a

Tabela 6: Escores e análise estatística dos detalhes histomorfométricos na polpa após o reimplante dentário imediato aos 28, 45 e 60 dias. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney com nível de significância de 5%.

<i>Polpa</i>						
<i>Detalhes histomorfométricos Itens avaliados/Scores</i>	<i>SHAM (28 dias)</i>	<i>OVX (28 dias)</i>	<i>SHAM (45 dias)</i>	<i>OVX (45 dias)</i>	<i>SHAM (60 dias)</i>	<i>OVX (60 dias)</i>
<i>Polpa</i>						
1	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
2	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
3	0/8	0/7	0/8	0/9	0/7	0/8
4	8/8	7/7	8/8	9/9	7/7	8/8
Comparação intergrupos no mesmo período	a	a	a	a	a	a



Gráficos

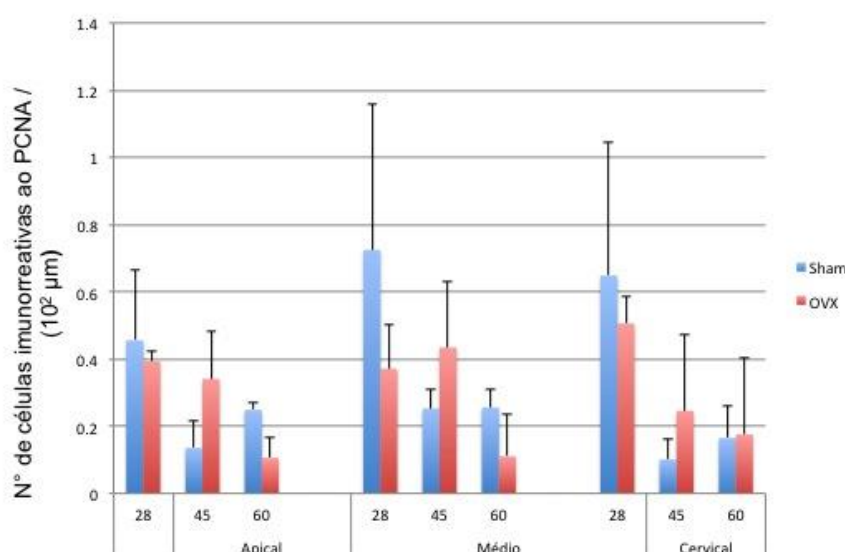


Gráfico 1: Valores da média e desvio padrão do número de células imuno-reativas ao PCNA no terço apical, médio e cervical no cimento, após o reimplante dentário imediato para o grupo Sham e OVX, nos tempos pós-operatórios de 28, 45 e 60 dias. A análise estatística foi realizada entre os grupos nos mesmos períodos pelo teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5%. Não houve diferença estatística entre os grupos.

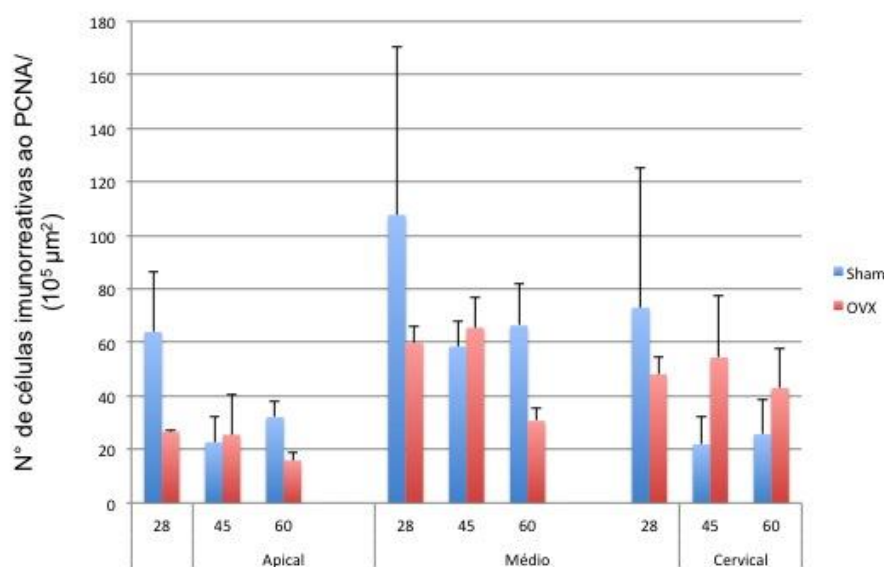


Gráfico 2: Valores da média e desvio padrão do número de células imuno-reativas ao PCNA no terço apical, médio e cervical no ligamento periodontal, após o reimplante dentário imediato para o grupo Sham e OVX, nos tempos pós-operatórios de 28, 45 e 60 dias. A análise estatística foi realizada entre os grupos nos mesmos períodos pelo teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5%. Não houve diferença estatística entre os grupos.

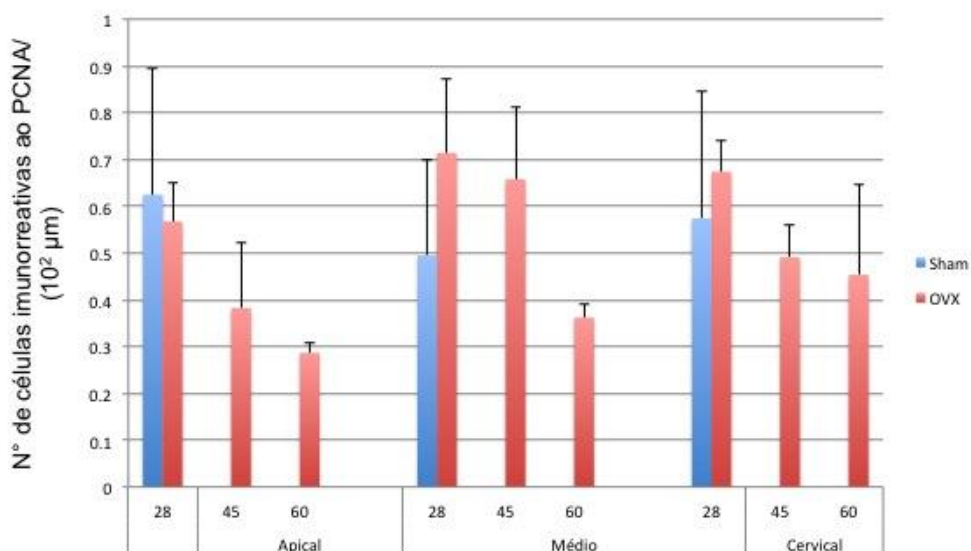


Gráfico 3: Valores da média e desvio padrão do número de células imunorreativas ao PCNA no terço apical, médio e cervical no osso alveolar, após o reimplante dentário imediato para o grupo Sham e OVX, nos tempos pós-operatórios de 28, 45 e 60 dias. A análise estatística foi realizada entre os grupos nos mesmos períodos pelo teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5%. Não houve diferença estatística entre os grupos.

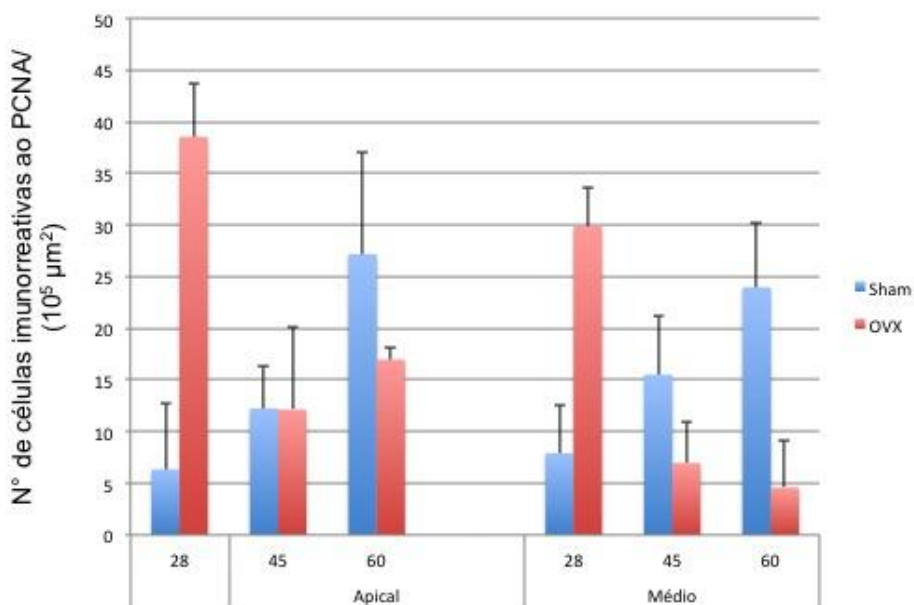


Gráfico 4: Valores da média e desvio padrão do número de células imunorreativas ao PCNA no terço apical, médio e cervical na polpa, após o reimplante dentário imediato para o grupo Sham e OVX, nos tempos pós-operatórios de 28, 45 e 60 dias. A análise estatística foi realizada entre os grupos nos mesmos períodos pelo teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5%. Não houve diferença estatística entre os grupos.

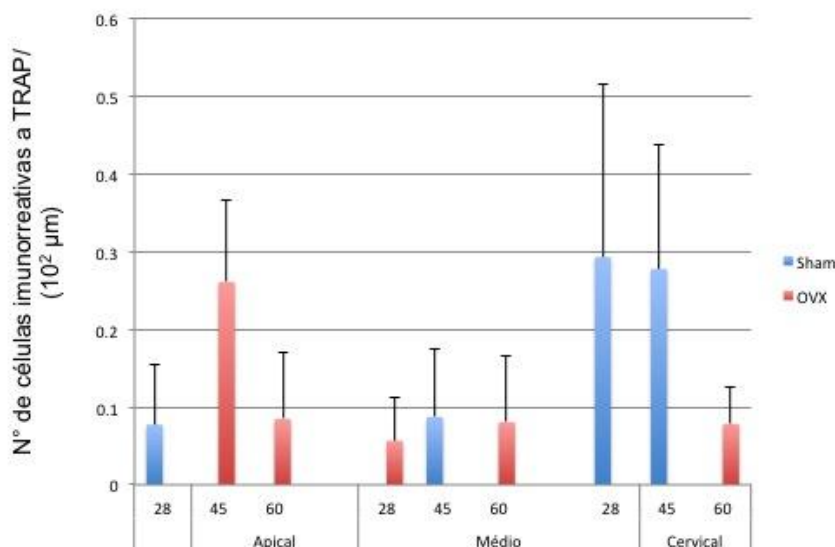


Gráfico 5: Valores da média e desvio padrão do número de células imuno-reativas a TRAP no terço apical, médio e cervical no cimento, após o reimplante dentário imediato para o grupo Sham e OVX, nos tempos pós-operatórios de 28, 45 e 60 dias. A análise estatística foi realizada entre os grupos nos mesmos períodos pelo teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5%. Não houve diferença estatística entre os grupos.

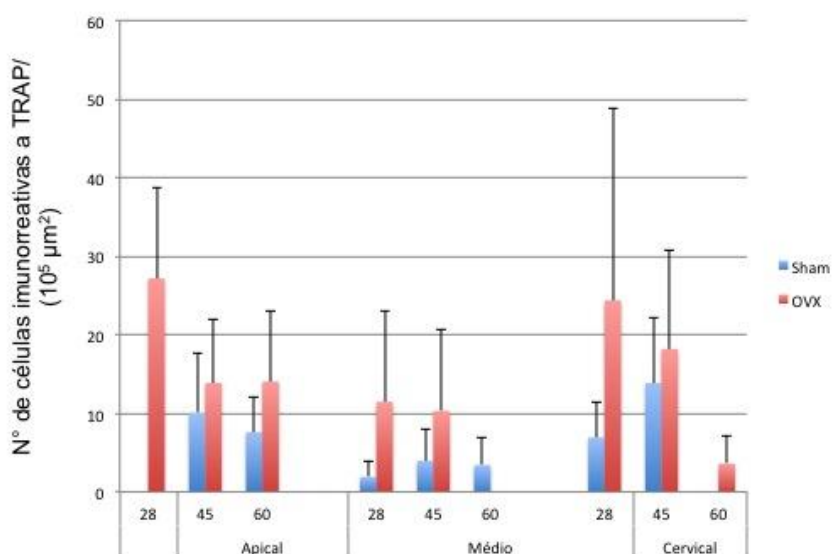


Gráfico 6: Valores da média e desvio padrão do número de células imuno-reativas a TRAP no terço apical, médio e cervical no ligamento periodontal, após o reimplante dentário imediato para o grupo Sham e OVX, nos tempos pós-operatórios de 28, 45 e 60 dias. A análise estatística foi realizada entre os grupos nos mesmos períodos pelo teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5%. Não houve diferença estatística entre os grupos.

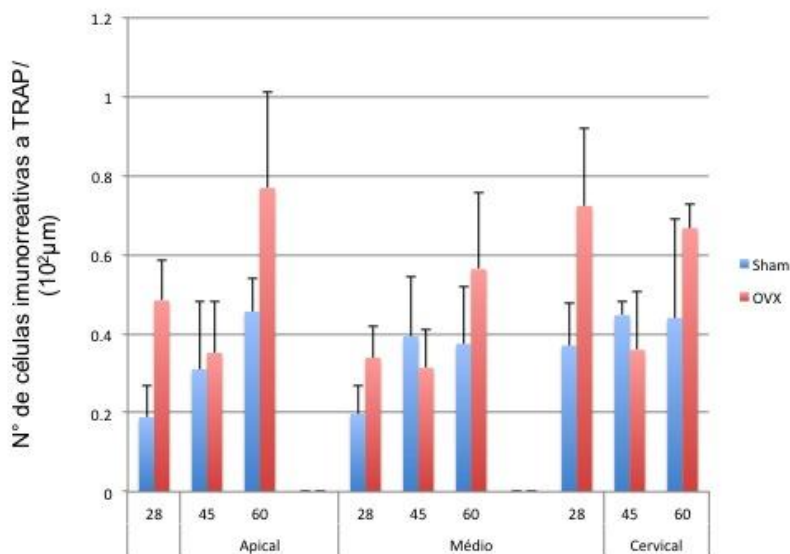


Gráfico 7: Valores da média e desvio padrão do número de células imuno-reativas a TRAP no terço apical, médio e cervical no tecido ósseo, após o reimplante dentário imediato para o grupo Sham e OVX, nos tempos pós-operatórios de 28, 45 e 60 dias. A análise estatística foi realizada entre os grupos nos mesmos períodos pelo teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5%. Não houve diferença estatística entre os grupos.

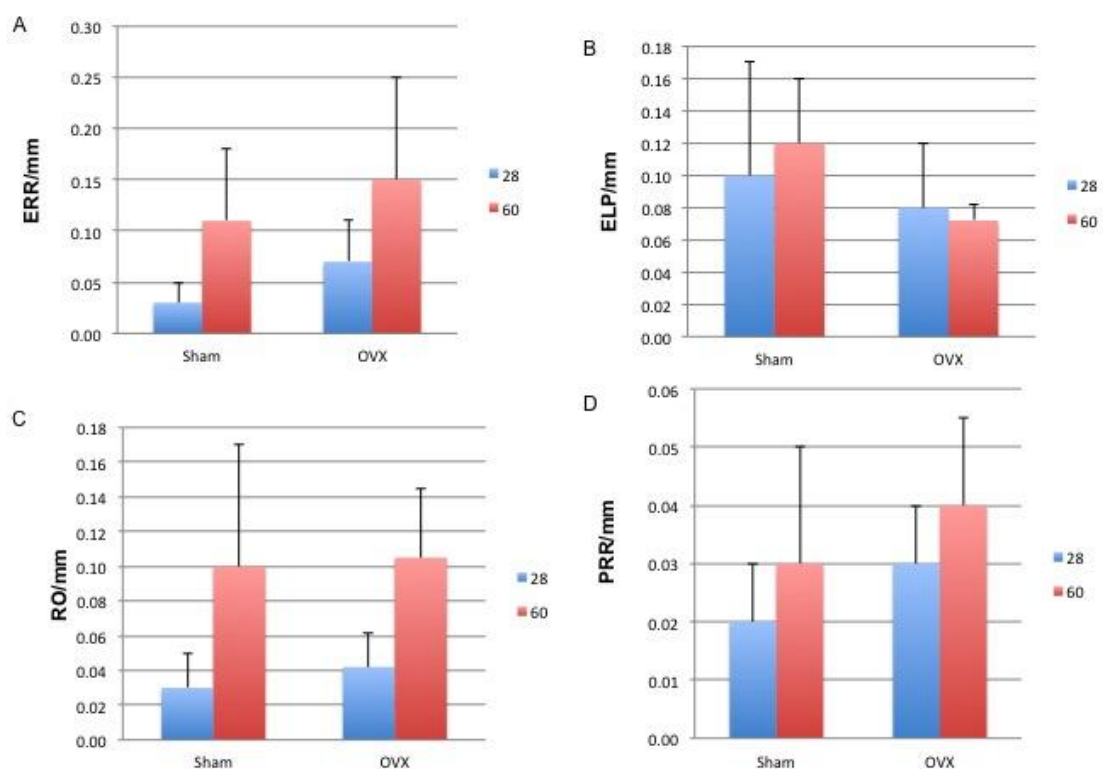


Gráfico 8: Valores da média e desvio padrão da área de extensão de reabsorção radicular (gráfico 8A), do espaço do ligamento periodontal (gráfico 8B), da reabsorção óssea (gráfico 8C) e da profundidade de reabsorção radicular (gráfico 8D) após o reimplante dentário imediato para o grupo Sham e OVX, nos tempos pós-operatórios de 28 e 60 dias. A análise estatística foi realizada entre os grupos no mesmo períodos pelo teste de Mann Whitney com nível de significância de 5%. ERR, extensão da reabsorção radicular; ELP, espaço do ligamento periodontal; RO, reabsorção óssea; PRR, profundidade da reabsorção radicular.



Anexos

Anexos

Anexo A – Normas do periódico “Journal of Dental Research”

The *Journal of Dental Research* (JDR) is a peer-reviewed scientific journal dedicated to the dissemination of new knowledge and information on all science relevant to dentistry and to the oral cavity and associated structures in health and disease. The *Journal of Dental Research*'s primary readership consists of oral, dental and craniofacial researchers, clinical scientists, hard-tissue scientists, dentists, dental educators, and oral and dental policy-makers. The *Journal* is published monthly, allowing for frequent dissemination of its leading content. The *Journal of Dental Research* also offers OnlineFirst, by which forthcoming articles are published online before they are scheduled to appear in print.

Authors of all types of articles should be aware of the following guidelines when submitting to JDR.

ONLINE SUBMISSION

Submissions to the Journal of Dental Research are only accepted for consideration via the SAGETrack online manuscript submission site at <http://mc.manuscriptcentral.com/jdr>. Authors who do not have an active account within the system are required to create a new account by clicking, “Create Account,” on the log-in page. The system will prompt the authors through a step by step process to create their account. Once created authors can submit their manuscripts by entering their “Author Center” and clicking the button by “Click Here to Submit a New Manuscript.”

If any difficulty is encountered at anytime during the account creation or submission process, authors are encouraged to contact the Journal of Dental Research Publications Coordinator, Kourtney Skinner, at kskinner@iadr.org.

MANUSCRIPT REQUIREMENTS BY TYPE

The *Journal of Dental Research* accepts the following types of manuscripts for consideration:

Original Research Reports: These manuscripts are based on clinical, biological, and biomaterials and bioengineering subject matter. Manuscripts submitted as research reports have a limit of 2,700 words (including abstract, introduction, materials, methods results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references); a total of 4 figures or tables; 30 references; and must contain a 200 words abstract.

Letters to the Editor*: Letters must include evidence to support a position about the scientific or editorial content of the JDR. Manuscripts submitted as a letter to editor have a limit of 250 words. No figures or tables are permitted. Letters on published articles must be submitted within 3 months of the article's print publication date.

Guest Editorials*: A clear and substantiated position on issues of interest to the readership community can be considered for this manuscript type. Guest Editorials are limited to 1,000 words. No figures or tables are permitted.

Discovery!: Essays that explore seminal events and creative advances in the development of dental research are considered for the "Discovery!" section of the *Journal*. Manuscripts are to be submitted by invitation only. Questions regarding "Discovery!" should be directed to Dr. Marty Taubman, at mtaubman@forsyth.org.

Critical Reviews in Oral Biology & Medicine: These manuscripts should summarize information that is well known and emphasize recent developments over the last three years with a prominent focus on critical issues and concepts that add a sense of excitement to the topic being discussed. Manuscripts are to be submitted by invitation only. Authors interested in submitting to this section must contact the Editor of Critical Reviews in Oral Biology & Medicine, Dr. Dana Graves, at dgraves@iadr.org for submission approval and instructions. Manuscripts submitted as Critical Reviews have a limit of 4,000 words; a total of 6 figures or tables; 60 references; and must contain a 200 word abstract.

Additional Instructions for Critical Reviews:

-It is important to include several illustrations or diagrams to enhance clarity. Manuscripts that lack figures or diagrams typically receive a low priority score.

-Summarize important concepts in tables or flow charts or show critical data in the form of figures. NOTE: authors will need to obtain permission to reproduce a previously published figure or table.

-Due to the broad readership, abbreviations commonly recognized in one field may not be readily apparent to those in a different field. Keep abbreviation use to a minimum.

-The cover page, abstract, text, summary, figure legends, and tables should be combined into a single Word document. Figures should be submitted as a separate document.

-To view examples of recent Critical Reviews in the Journal, please click the following links:<http://jdr.iadrjournals.org/cgi/content/full/86/9/800> or
<http://jdr.iadrjournals.org/cgi/content/full/85/7/584>

***Brief responses to Letters to the Editor or Guest Editorials will be solicited for concurrent publication.**

Clinical Reviews (formerly Concise Reviews): These manuscripts are generally systematic reviews of topics of high clinical relevance to oral, dental and craniofacial research. Meta-analyses should be considered only when sufficient numbers of studies are available. Manuscripts that include investigations of limited study quality of understudied areas are typically not acceptable as topics for a clinical review. Although some systematic reviews may be well done, those that receive highest scientific priority will only be considered given the very limited space allowed for these reviews in the Journal.

Manuscripts submitted as Clinical Reviews have a strict limit of 4,000 words (including abstract, and the main text of the manuscript including acknowledgments; excluding figure legends and references); a total of 6 figures or tables; up to a maximum of 60 references; and must contain a 200 word abstract. Manuscripts above the 4,000 word/figure or table limit may use supplemental appendices for other supporting information that would be available online only.

Additional Instructions for Clinical Reviews:

-It is important to include illustrations or diagrams to enhance clarity. Manuscripts that lack figures or diagrams typically receive a low priority score.

-Summarize important concepts in tables or flow charts or show critical data in the form of figures. NOTE: authors will need to obtain permission to reproduce a previously published figure or table.

-Due to the broad readership, abbreviations commonly recognized in one field may not be readily apparent to those in a different field. Keep abbreviation use to a minimum.

-The cover page, abstract, text, summary, figure legends, and table(s) should be combined into a single Word document. Figures should be submitted as a separate document.

- To view examples of recent Clinical Reviews in the Journal, please click the following links: <http://jdr.sagepub.com/content/90/3/304.full.pdf+html> or <http://jdr.sagepub.com/content/90/5/573.full.pdf+html>

All submissions must include a title page and be accompanied by a cover letter and list of suggested reviewers. Cover letters should certify the research is original, not under publication consideration elsewhere, and free of conflict of interest. Title pages should include: abstract word count, total word count (Abstract to Acknowledgments), total number of tables/figures, number of references, and a minimum of 6 keywords. Keywords cannot be words that have been included in the manuscript title. Key words should be selected from Medical Subject Headings (MeSH) to be used for indexing of articles. See: www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html for information on the selection of key words.

Please submit the names and email addresses of four preferred reviewers when prompted by the SAGETrack system. Preferred reviewers cannot be colleagues at the contributors' institution or present or former collaborators.

TITLES

Titles can consist of a maximum of 75 characters (including spaces). Titles do not normally include numbers, acronyms, abbreviations or punctuation. The title should include sufficient detail for indexing purposes but be general enough for readers outside the field to appreciate what the paper is about.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors are required to report all sources of support for their project or study, including but not limited to: grant funds, commercial sources, funds from a contributors' institution. Do

not refer to a study being partially funded by the cited sources.” Consultancies and funds paid directly to investigators must also be listed. Authors are required to specify during the submission process if their paper received funding from NIH, NIDCR, or any other NIH Institute or Center and provide the grant number. To comply with the NIH Public Access Mandate, for qualifying NIHfunded papers, the Journal of Dental Research will deposit the final, copyedited paper to PubMed Central on behalf of the authors.

Any perceived or actual conflicts of interest need to be identified in the acknowledgments section. The JDR abides by the International Committee of Medical Journal Editors guidelines for the Ethical Considerations in the Conduct and Report of Research (www.icmje.org/ethical_4conflicts.html). Authors are requested to include this information in the acknowledgments section and the corresponding author must confirm that all co-authors have reported any potential conflicts.

FIGURE AND TABLE REQUIREMENTS

These guidelines are intended to aid authors in providing figures that will reproduce well in both print and online media. Submitting digital image files that conform to these guidelines will prevent delays in the review and publication processes, and maximize the published quality of your figures.

Figure Types

JDR figures can fall into one of three categories: Continuous-tone images, Line-art images, and **Combination images**. Each image type has specific requirements in terms of the resolution needed for publication and the file types best suited for the figure. See the following panels for examples and requirements.

Resolution

In order for a figure to be used in publication, its Digital Image File must have the required resolution when it is created. The resolution cannot be raised after the original image is made. Attempting to do so (for example, with Adobe Photoshop's® “Image Size” command) results in the addition of artificial pixels that distort the image and lower its sharpness. The figures on the right show an example of this reduced sharpness.

Fonts

Limit fonts used in any figure to Times, Times New Roman, Arial, Frutiger, and Sabon. Other fonts cannot be guaranteed to reproduce properly.

Files containing figures and tables should be clearly labeled to indicate their placement in the text or appendix. Tables should be viewable in a portrait view. Tables that are created in a landscape view are more suitable for an appendix.

If the online version is in color and the printed version in black and white, please submit separate files for each version. Figures should be identical except in color or grayscale. The cost of color figures in the print version will be borne by the authors. Rates for color reproduction are \$300 per initial page of color and \$150 for each additional page of color. However, there are no charges for figures and diagrams printed in black and white. Color figures may be included in the online version of JDR with no extra charges.

REFERENCES

Citations should be arranged in alphabetical order by last name of the first author without numbering. When citing a reference in the text, provide attribution for the subject under discussion. “Et al” should be used when the cited work is by six or more contributors. When the cited work is by two contributors, use both surnames cited in the following manner: Last Name1, First Name1, Last Name2, First Name2. When citing multiple references by the same author(s) in the same year, use “a,” “b,” etc. (e.g., Jones, 1980b). Multiple references should be listed in chronological order of publication, separated by semi-colons. Avoid using abstracts as references.

When citing a website, list the authors and title if known, then the URL, include the date it was accessed in parentheses. Include among the reference papers accepted but not yet published; designate the journal and add “in press.” Information from manuscripts submitted but not yet accepted should be cited in the text as “unpublished observations” in parentheses. The references must be verified by the author(s) against the original documents and checked for correspondence between references cited in the text and listed in the “References” section.

All items should be listed alphabetically by the author’s last name. For multiple entries by the same author/authors, they should be cited as follows:

1. One author: chronologically by year of publication
2. Two authors: alphabetical by last names
3. Three or more authors: chronologically by year of publication
4. Same author, same publication, chronologically by date of publication, using a), b),

etc., to designate order “Unpublished observations” and “personal communications” may be inserted into and cited in the text with written permission from the correspondents, but are not to be used as references.

For examples of reference citation formats, please visit:
www.iadr.org/files/public/JDR_ReferenceExamples.pdf.

SUPPLEMENTAL FILES

Additional supporting data may be referenced as a supplemental appendix for publication online only. All supplemental appendix files must be submitted with the manuscript for review. Supplemental files may include additional figures or tables that exceed the Journal’s limit. Material intended for the supplemental appendix must have “supplemental” or “appendix” in the file name upon upload.

For additional information on formatting manuscripts please visit
www.iadr.org/files/public/ManuscriptComponents.pdf for a detailed description of required manuscript components.

Language Editing: Manuscripts submitted for publication consideration should be written in English. Prior to submission, if a manuscript would benefit from professional editing, authors may consider using a language-editing service. Suggestions for this type of service can be found at www.iadr.org/EditingServices. The Journal of Dental Research does not take responsibility for, or endorse these services, and their use has no bearing on acceptance of a manuscript for publication.

GENERAL INFORMATION FOR AUTHORS SUBMITTING A MANUSCRIPT PRIOR PUBLICATION

Manuscripts submitted to the Journal of Dental Research are accepted for consideration giving the understanding that it contains original material that has not been submitted for publication or has been previously published elsewhere. Any form of publication other than an abstract only constitutes prior publication.

ICMJE COMPLIANCE STATEMENT

Manuscript submission guidelines for the Journal of Dental Research follow the “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals” set forth by the

International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). For additional information please visit the ICMJE website at www.icmje.org/.

CONSORT 2010 CHECKLIST COMPLETION RANDOMIZED CLINICAL TRIALS POLICY

Manuscripts reporting a randomized clinical trial should follow the CONSORT guidelines. The Journal requires authors of pre-clinical animal studies submit with their manuscript the Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines. Authors of human observations studies in epidemiology are required to review and submit a STROBE statement. When uploaded to the SAGETrack system, any checklists completed by authors should be given a supplementary file designation.

The CONSORT checklist can be downloaded from: <http://mc.manuscriptcentral.com/societyimages/jdr/CONSORT+2010+checklist%5b1%5d.doc>.

The ARRIVE guidelines can be found here: www.nc3rs.org.uk/downloaddoc.asp?id=1206&page=1357&skin=0

The STROBE checklists can be found here:

www.strobe-statement.org/index.php?id=strobe-home

The *Journal of Dental Research* encourages authors to register their clinical trials in a public trials registry. Authors of manuscripts describing such studies are asked to submit the name of the registry and the study registration number prior to publication. Authors are asked to include their clinical trial registration number at the end of their abstracts. In accordance with the aforementioned “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals,” clinical trials will only be considered for publication if they are registered.

INSTITUTIONAL REVIEW BOARD AND WRITTEN INFORMED CONSENT

For protocols involving the use of human subjects, authors should indicate in their Methods section that subjects’ rights have been protected by an appropriate Institutional Review Board and written informed consent was granted from all subjects. When laboratory animals are used, indicate the level of institutional review and assurance that the protocol ensured humane practices.

PUBLIC GENE DATA

Prior to submission, the Journal of Dental Research asks that novel gene sequences be deposited in a public database and the accession number provided to the Journal. Authors may want to use the following Journal approved databases:

GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit.html

EMBL: www.ebi.ac.uk/embl/Submission/index.html

DDBJ: www.ddbj.nig.ac.jp/sub-e/html

Manuscript submissions including microarray data should include the information recommended by the MIAME guidelines in their submission, and/or identify the submission details for the experiments details to one of the publicly available databases such as Array Express or GEO. Information on MIAME, Array Express and GEO can be found by clicking on the corresponding links below:

MIAME: www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html

ArrayExpress: www.ebi.ac.uk/arrayexpress/

GEO: www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/

OPEN ACCESS COMPLIANCE STATEMENT

Effective April 7, 2008 the National Institutes of Health (NIH) Revised Policy on Enhancing Public Access to Archived Publications Resulting from NIH-Funded Research (Public Access Policy) requires all studies funded by NIH to submit or have submitted for them their final peerreviewed manuscript upon acceptance for publication to the National Library of Medicine's PubMed Central (PMC) to be made publicly available no later than 12 months after the official date of publication. Only final, copyedited manuscripts are uploaded.

Manuscripts by authors whose work is funded by the Wellcome Trust will be released from access control immediately upon publication. Members of the IADR/AADR will be invoiced \$3,800; non-Members will be billed \$4,300 for this immediate access. No separate page or color charges will be assessed.

Authors are required to specify during the submission process if their paper received funding from NIH or NIDCR and provide the grant number.

The *Journal of Dental Research* will deposit final, copyedited papers to PubMed Central on behalf of the authors.

DEFINITION OF CONTRIBUTORSHIP IN JDR

As stated in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, put forth by the ICMJE, the Journal considers the following as an accurate definition of contributorship:

Contributors Listed in Acknowledgments

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgments section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chairperson who provided only general support. Editors should ask corresponding authors to declare whether they had assistance with study design, data collection, data analysis, or manuscript preparation. If such assistance was available, the authors should disclose the identity of the individuals who provided this assistance and the entity that supported it in the published article. Financial and material support should also be acknowledged.

Groups of persons who have contributed materially to the paper but whose contributions do not justify authorship may be listed under such headings as “clinical investigators” or “participating investigators,” and their function or contribution should be described—for example, “served as scientific advisors,” “critically reviewed the study proposal,” “collected data,” or “provided and cared for study patients.” Because readers may infer their endorsement of the data and conclusions, these persons must give written permission to be acknowledged.

CONTRIBUTOR FORMS

All rights to manuscripts will be transferred to the Journal of Dental Research upon submission. Submission of a manuscript will constitute each author’s agreement that the Journal holds all propriety rights in the manuscript submitted, including all copyrights. Upon acceptance, the corresponding author will be asked to sign a formal transfer of copyright. Only the corresponding author is required to complete a contributor form unless any co-authors are work-for-hire or government employees. If co-authors fall into either of these categories, the corresponding author should contact the editorial office at jdr@iadr.org for additional instruction.

Please note that the Journal of Dental Research secures completed contributor forms electronically via the SAGETrack online submission and review system.

Without the completion of the contributor form for all co-authors listed, accepted manuscripts cannot continue into production, delaying publication.

CHARGES ASSOCIATED WITH PUBLICATION

Page Charges

There is a charge of \$40 (U.S.) for every printed page in the Journal of Dental Research. There is a charge of \$25 (U.S.) for every electronic page in a Web appendix. You will receive an invoice with your page proofs.

Color Figure Charges

The cost of color figures in the print version will be borne by the authors. Rates for color reproduction are \$300 per initial page of color and \$150 for each additional page of color. However, there are no charges for figures and diagrams printed in black and white. Color figures may be included in the online version of JDR with no extra charges.

Reprint Charges

Reprints can be ordered for material printed in the Journal of Dental Research and online only appendices. Quantities of reprints can be purchased with the reprint order form sent with page proofs to the contributors. Pre-payment is required for reprints. Visa, MasterCard, American Express and check are all acceptable forms of payment. Authors must pay for color figures in reprints. Reprints will be mailed from 6 to 8 weeks after the article appears in the Journal. To contact SAGE for additional information or to order reprints, visit the SAGE site at www.sagepub.com/journalsReprints.nav.

Anexo B – Certificado do comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA)



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **“EFEITO DA OVARIECTOMIA NO REIMPLANTE DENTÁRIO : ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E IMUNOISTOQUÍMICA EM RATAS”** sob responsabilidade da **Profa. Dra. Sônia Regina Panzarini Barioni** e colaboração de **Prof. Dr. Wilson Roberto Poi e Roberta Okamoto** de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA número de protocolo número 009289-2010

Araçatuba, 18 de Fevereiro de 2010

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

Anexo C – Ilustração do material e método



Fig.44: Tricotomia



Fig.45: Exposição do ovário



Fig.46: Remoção do ovário



Fig.47: Sutura



Fig.48: Sindesmotomia



Fig.49: Extração dentária



Fig.50: Reimplante dentário



Fig.51: Dente reimplantado



Fig.52: μ CT 40, Scanco Medical, Basserdorf, Germany

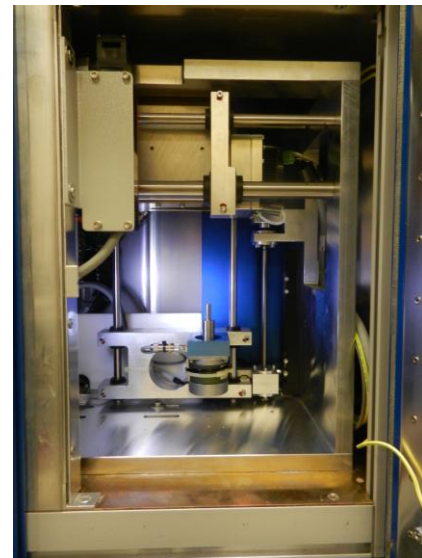


Fig.53: Interior da máquina da μ CT



Fig.54: Suporte para escanear aos espécimes em diferentes resoluções



Fig.55: Maxila escaneada

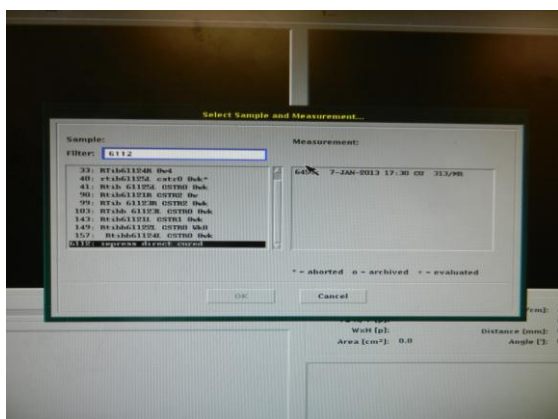


Fig.56: Preparação das imagens para transportar os arquivos DICOM para o programa Amira.

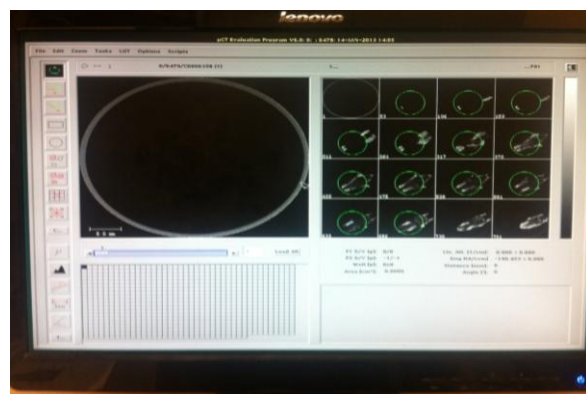


Fig.57: Seleção das imagens para transportar os arquivos DICOM para o programa Amira.



Fig.58: Seleção das imagens para transportar os arquivos DICOM para o programa Amira.



Fig.59: Seleção das imagens para transportar os arquivos DICOM para o programa Amira.

Anexo D – Ilustração de figuras

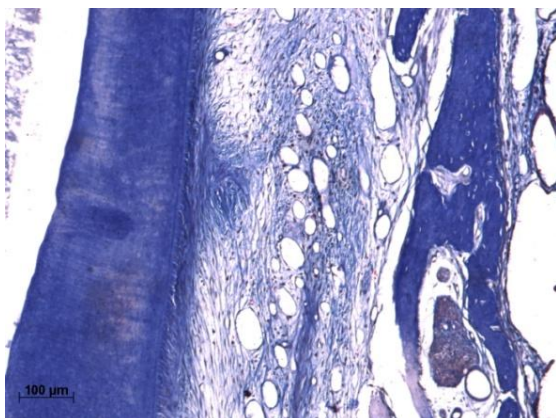


Fig.60 Sham 28 dias – Reinserção das fibras do ligamento periodontal no osso e cimento. TM. 100μm

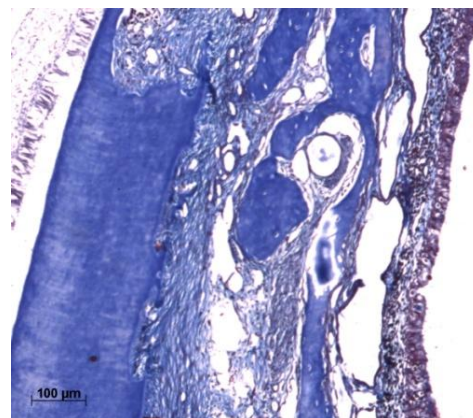


Fig.61 OVX 28 dias – figura

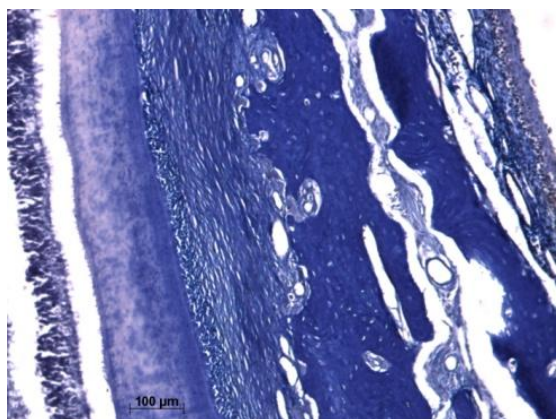


Fig.62 Sham 45 dias – Disposição perpendicular das fibra do ligamento periodontal reinseridas no osso e cimento. TM. 100μm

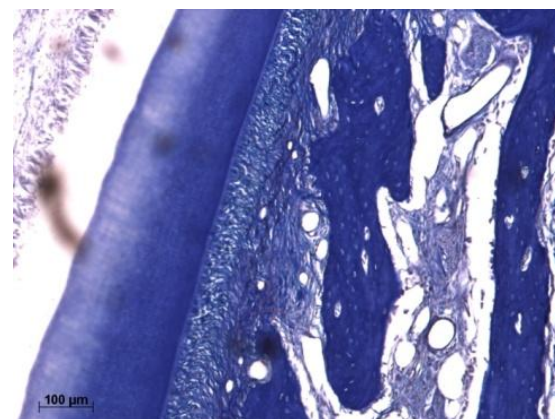


Fig.63 OVX 45 dias – Fibras do ligamento periodontal reinseridas no cimento e osso. TM. 100μm

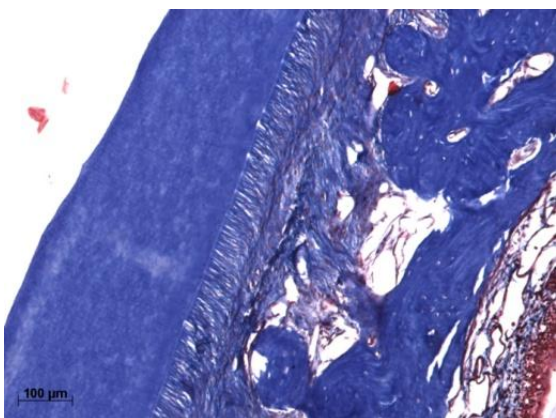


Fig.64 Sham 60 dias – Fibras do ligamento periodontal inseridas no cimento e no osso alveolar. TM. 100μm

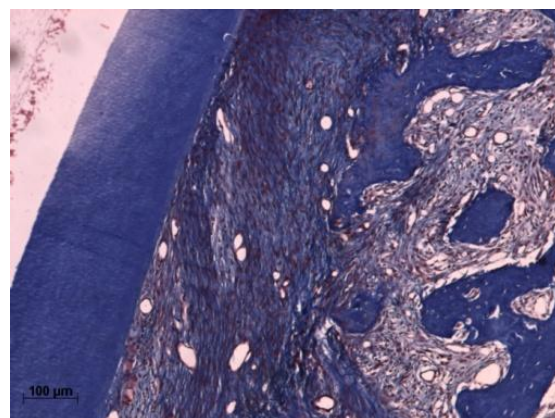


Fig.65 OVX 60 dias – Disposição perpendicular das fibras do ligamento periodontal. TM. 100μm