

Eloá Rodrigues Luvizuto

**CO-LOCALIZAÇÃO DE OPG E RANKL DURANTE O PROCESSO DE REPARO
ALVEOLAR EM RATAS OVARIECTOMIZADAS TRATADAS COM
ESTRÓGENO OU COM RALOXIFENO.**

Araçatuba - 2007

Eloá Rodrigues Luvizuto

**CO-LOCALIZAÇÃO DE OPG E RANKL DURANTE O PROCESSO DE REPARO
ALVEOLAR EM RATAS OVARIETOMIZADAS TRATADAS COM
ESTRÓGENO OU COM RALOXIFENO.**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia do Câmpus de Araçatuba – Unesp,
para a obtenção do Grau de “Mestre em
Odontologia” – Área de Concentração Clínica
Integrada.

Orientadora: Profa. Dra. Roberta Okamoto

Co-orientadora: Profa. Dra. Rita Cássia M. Dornelles

Araçatuba - 2007

DEDICATÓRIA

A **Deus**, por me proporcionar paz interior, perseverança, fé, alegria e saúde.

Aos meus pais **José Clineu Luvizuto** e **Maria Aparecida Rodrigues Luvizuto**,
à minha irmã **Gisele Cristina Rodrigues Luvizuto**, ao meu irmão **Giovani Rodrigues
Luvizuto**, aos meus avós: **Izídio Luvizuto** e **Luizia Mestriner Luvizuto**, **João
Rodrigues da Costa** “*in memoriam*” e **Helena Lazarini Rodrigues** “*in memoriam*”
pelo amor incondicional, confiança, dedicação, apoio e inspiração para minha vida.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora **Roberta Okamoto** por acreditar em mim, sempre bem disposta a me ensinar dividindo experiências e oportunidades únicas, pela alegria, entusiasmo e principalmente pela amizade.

Ao professor **Idelmo Rangel Garcia Júnior** pelos conhecimentos clínicos divididos, oportunidades, dedicação e paciência.

À **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP**, na pessoa do seu Diretor, Prof.Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé pela oportunidade de realização do curso de mestrado em odontologia.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa e pela bolsa de treinamento técnico.

AGRADECIMENTOS

À professora da Disciplina de Ciências Básicas: **Rita Cássia Menegati Dornelles** pela co-orientação deste trabalho.

Ao professor **Tetuo Okamoto** pelo carinho e simpatia.

Aos professores da Disciplina de Clínica Integrada da FOA-UNESP: **Celso Koogi Sonoda, Daniela Atili Brandini, Denise Pedrini Ostini, José Carlos Monteiro, Sônia Regina Panzarini Barioni, Wilson Roberto Poi**, pelo convívio em harmonia compartilhando conhecimentos e filosofias.

Aos professores da Disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da FOA-UNESP: **Alessandra Marcondes Aranega, Cristiane Mara Ruiz Fattah, Michel Saad Neto, Osvaldo Magro Filho**.

Aos professores da FOA-UNESP: **Alaíde Gonçalves, Ana Maria Pires Soubhia, Edílson Ervolino, José Américo de Oliveira, Roelf Cruz Rizzolo**.

À colega **Tânia Madrid** pela dedicação e esforço em me ajudar a caminhar nessa jornada com mais simplicidade, tranquilidade e paciência.

Às colegas: **Beatriz Oliveira Marques, Carolina Perruzzi, Cristiane Chiantelli Cláudio, Giovana Cyrillo, Maria Fernanda Marques, Milena de Oliveira Xavier e Paola Cicarelli** pela amizade e companhia.

Às colegas da graduação: **Ana Paula Ayala de Macedo, Camyla Alle e Eliana Rodrigues.**

Ao meu cunhado **Jorge Barbosa Gutierrez da Silva.**

Aos estagiários: **Alexandre R. Freire e Thalyta Ribeiro Neves da Cruz.**

Às colegas de mestrado e doutorado em Clínica Integrada: **Célia Tomiko Matida Hamata Saito, Cláudia Letícia Vendrame dos Santos, Daniele Clapes Nunes, Lithiene Ribeiro Castilho, Luciene Campoli Alves, Márcia Regina Negri e Milena Silva Campos** pela amizade.

Aos colegas de mestrado e doutorado em Cirurgia: **Abraão Cavalcante Gomes de Souza Carvalho, Albanir Gabriel Borrasca, Carolina Chiantelli Cláudio Coutinho, Flávia Priscila Pereira, Francisley Ávila Souza, Jéssica Lemos Gulinelli, Marcos Heidy Guskuma, Paulo Esteves Pinto Faria, Rodolfo Valentini Neto e Thallita Pereira Queiroz.**

Aos colegas de mestrado e doutorado em Prótese: **Amílcar Chagas Freitas Júnior, Érica Alves Gomes, ÉriKa Oliveira de Almeida e Valentim Adelino Ricardo Barão.**

À colega **Sheila Mônica Damásio Dias** pela ajuda na parte experimental deste trabalho.

À funcionária **Cleide Lemes da Silva** pelo carinho e alegria.

Ao Funcionário **Arnaldo César dos Santos** pelo cuidado aos animais do biotério do departamento de fisiologia e alegria de viver.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada: **Antônia Ferreira Artioli, Aparecida Leontina Baiocchi de Carvalho, Bernadete Rodrigues Inácio, Claudiomiro Pereira, Dirce C. Boato, Gilmar Martins de Oliveira e Paulo Roberto Gratão.**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cronologia dos procedimentos experimentais.	42
Figura 2 - Cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina (HE) do Terço médio do alvéolo dos 4 grupos experimentais (Sham, OVX, OVX+E2, OVX+RLX), nos períodos de 7, 14, 21 e 42 dias pós-operatórios.	43
Figura 3 - Gráfico mostrando a quantidade de osso formado durante a cronologia do processo de reparo alveolar nos diferentes grupos estudados.	44
Figura 4 - Co-localização de OPG/RANKL nos grupos: Sham, OVX, OVX+E2, OVX+RLX, 7 dias pós-operatórios.	45
Figura 5 - Co-localização de OPG/RANKL nos grupos: Sham, OVX, OVX+E2, OVX+RLX, 14 dias pós-operatórios.	46
Figura 6 - Co-localização de OPG/RANKL nos grupos: Sham, OVX, OVX+E2, OVX+RLX, 21 dias pós-operatórios.	47
Figura 7 - Co-localização de OPG/RANKL nos grupos: Sham, OVX, OVX+E2, OVX+RLX, 42 dias pós-operatórios.	48
Figura 8 - Gráfico semi-quantitativo da co-localização dos diferentes períodos e grupos analisados.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

E2 - 17 β -estradiol, estrógeno

HE – Hematoxilina e eosina

OPG – Osteoprotegerina

OVX – Ovariectomia, ratas ovariectomizadas

OVX+E2 – Ratas ovariectomizadas com reposição de 17 β -estradiol

OVX+RLX – Ratas ovariectomizadas tratadas com raloxifeno

RANK – Receptor ativador de NF-Kappa B

RANKL – Receptor ativador de NF-Kappa B ligante

RLX – Raloxifeno

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

PBS – Solução salina tamponada com fosfato a 0,1M

PBS+Tx – Solução salina tamponada com fosfato a 0,1M associado ao triton X100

ANOVA – Análise de variância

Fitc – Isocianato de fluoresceína

Cy3- Fluorocromo cianina 3

LISTA DE SÍMBOLOS

kg – quilograma

mg – miligrama

μl - microlitro

μm – micrômetro

SUMÁRIO

Resumo	13
Abstract	14
Introdução	15
Materiais e métodos	18
Resultados	23
Discussão	27
Referências	34
Figuras	42
Anexos	50

Co-localização de OPG e RANKL durante o processo de reparo alveolar em ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno ou com raloxifeno.

Eloá Rodrigues LUVIZUTO¹

Tetuo OKAMOTO²

Sheila Mônica Damásio DIAS³

Rita Cássia Menegati DORNELLES⁴

Idelmo Rangel GARCIA-JR⁵

Roberta OKAMOTO⁶

¹ Mestrado em odontologia área de concentração Clínica Integrada, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brasil.

² Professor titular do Departamento de Cirurgia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brasil.

³ Mestrado em Implantodontia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brasil.

⁴ Professor Assistente do Departamento de Ciências Básicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brasil.

⁵ Professor Assistente do Departamento de Cirurgia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brasil.

⁶ Professora Voluntária Doutora do Departamento de Cirurgia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brasil.

Correspondência: Roberta Okamoto

Rua José Bonifácio, 1193. Vila Mendonça. 16015-050 – Araçatuba - SP

Telefone: (18) 3636 3270 - E-mail: robertaokamoto@foa.unesp.br

* Este artigo foi escrito de acordo com as normas do periódico *Archives of Oral Biology* (Anexo B).

Resumo:

Objetivos: Avaliar a interferência da ovariectomia (OVX) e seu tratamento com estrógeno (E2) ou com raloxifeno (RLX) no balanço entre RANKL/OPG na cronologia do processo de reparo alveolar em diferentes períodos (7, 14, 21 e 42 dias) através da imunofluorescência por co-localização e análise histomorfométrica.

Materiais e Métodos: Os grupos estudados foram: sham, OVX, OVX+E2, OVX+RLX. Após obtenção dos cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina e as reações de co-localização por imunofluorescência de RANKL/OPG, os resultados foram avaliados quantitativamente.

Resultados: Aos 7 dias: menor neoformação de trabéculas ósseas, o grupo OVX+RLX apresentou menor valor médio. O grupo OVX apresentou o maior turnover ósseo representado pelas co-localizações de OPG e RANKL. Aos 14 dias o grupo OVX+RLX apresentou menor formação óssea. O grupo sham apresentou intensa atividade celular representada pela alta imunorreatividade à OPG e RANKL observada nas células. Aos 21 dias os grupos experimentais apresentaram maiores níveis de ossificação; não apresentaram diferença estatística. O grupo OVX apresentou o menor turnover ósseo. Aos 42 dias houve diferença estatística na quantidade de formação óssea entre o grupo sham comparado aos demais grupos ($p < 0,05$) e o grupo OVX apresentou o maior turnover ósseo.

Conclusão: A ovariectomia atrasou o processo de reparo alveolar e alterou o turnover ósseo. A reposição do estrógeno e o tratamento com raloxifeno melhoraram as respostas, mas não restabeleceram completamente os valores da histometria e da co-localização do grupo sham.

Palavras-chaves: processo alveolar, osteoblastos, RANKL, osteoprotegerina, ovariectomia, raloxifeno, estradio

Abstract:

Objectives: To evaluate the influence of the ovariectomy (OVX), and its treatments with estrogen (E2) or with raloxifene (RLX) on the RANKL/OPG balance during the periods in the chronology of the alveolar wound healing process (7, 14, 21 and 42 pos operative days) in female rats by means of immunocolocalization and histomorphometric analysis.

Methods: The studied groups were: sham, OVX, OVX with E2 replacement, OVX with (RLX) treatment. After obtaining the histological tissue pieces colored in hematoxylin and eosin and the immunocolocalization reaction for RANKL and OPG, the results were quantitatively evaluated.

Results: At 7 days, was observed lesser neoformed trabeculae bone, the smaller medium value was observed to the OVX+RLX group. The OPG and RANKL immunocolocalization showed larger bone turnover to OVX group. At 14 days there was a larger quantity of neoformed trabeculae bone, the smaller medium value was observed to the OVX+RLX group, the sham group presented an intense cellular activity. At 21 days the experimental groups had a greater ossification levels; no statistical significance was observed. The OVX group had the lowest bone turnover. At 42 days there were statistically differences on the quantity of ossification within sham group compared to the other groups ($p < 0.05$). The OVX group showed the largest bone turnover.

Conclusions: Ovariectomy delays the alveolar wound healing process and interferes with the bone turnover. The E2 replacement and the RLX treatment improved the healing but not enough to reach histomorphometric and immunocolocalization values of the sham group.

Keywords: alveolar process, osteoblasts, RANKL, osteoprotegerin, ovariectomy, raloxifene, estradiol.

Introdução

O osso é um tecido mineralizado que está em constante remodelação através das interações entre osteoclastos, osteoblastos e osteócitos¹, os quais são influenciados por fatores sistêmicos, locais e ambientais². Esses fatores regulam a proliferação, diferenciação, função e sobrevivência das células ósseas³. Entre os fatores sistêmicos, o estrogênio é um hormônio que apresenta uma função inibitória da reabsorção óssea⁴⁻⁶. Estudos na literatura mostram que a queda dos níveis de estrogênio promove intensa atividade reabsortiva no processo de reparo alveolar^{7,8}.

Baseado no efeito protetor que o estrogênio possui sobre o tecido ósseo, o tratamento com reposição hormonal tem sido usado com frequência para tratar sintomas da menopausa e prevenir a osteoporose^{9,10}. Entretanto, as possíveis contra-indicações clínicas e o risco dos efeitos colaterais têm aumentado o número de pesquisas relacionadas a terapias alternativas¹¹. Portanto, o raloxifeno (SERM- modulador seletivo de receptores de estrogênio) foi proposto como uma terapia alternativa promissora para o tratamento da osteoporose pós-menopausa¹²⁻¹⁴. O raloxifeno (RLX) é usado para tratar ou prevenir várias condições hormonais dependentes, como o câncer de mama, a osteoporose e as doenças cardiovasculares. Ele é um análogo do benzotiofeno, o único SERM aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para tratamento e prevenção da osteoporose nos Estados Unidos e em vários outros países devido seu efeito preventivo na incidência de fraturas vertebrais em mulheres com osteoporose pós-menopausa¹². O RLX também reduz a incidência de câncer de mama¹³ e altera a concentração de lipídio na corrente sanguínea que talvez seja favorável para prevenção de doenças cardiovasculares em indivíduos de alto risco; possui pouquíssimo efeito no endométrio¹⁴.

Em uma remodelação óssea normal, a formação óssea pelos osteoblastos segue à reabsorção osteoclástica e ocorre de maneira precisa e quantitativa. A molécula ativadora e receptora do fator kappa B da família do fator de necrose tumoral (RANKL: expressada pelos osteoblastos e seus precursores)¹⁵ e seu receptor RANK (expressado em precursores de osteoclastos e osteoclastos maduros)¹⁶ são reguladores chaves da remodelação óssea e essenciais para o desenvolvimento e ativação da reabsorção óssea¹⁷. A homeostasia óssea é alcançada pelo balanço dos efeitos da reabsorção óssea de RANKL e seu receptor chamariz, osteoprotegerina (OPG: expressada pelos osteoblastos e seus precursores)¹⁸. OPG se liga à RANKL limitando a interação entre RANKL e RANK que inibe a sinalização dos eventos que modulam a diferenciação osteoclástica e o desenvolvimento de linfócitos.

O balanço entre RANKL e OPG é regulado por citocinas e hormônios que determinam às funções osteoclásticas, a alteração desse balanço é crítica nas patologias ósseas resultando em um aumento da reabsorção óssea. O termo osteoprotegerina resultou dos efeitos observados em animais os quais protegiam contra perda óssea¹⁸.

O processo de reparo alveolar é um interessante modelo para estudar a dinâmica do tecido ósseo, pois representa uma situação na qual o organismo cria condições para produção de tecido ósseo com o objetivo de preenchimento total do alvéolo previamente ocupado pelo dente. Os eventos histológicos que ocorrem no processo de reparo alveolar foram investigados em várias espécies animais, assim como em humanos. Esses estudos utilizaram diferentes técnicas como fluorescência microscópica¹⁹, autoradiografias^{20,21}, histoquímica²² e técnica histológica²³ e mostraram que o processo de reparação alveolar ocorre de forma dinâmica, e envolve várias etapas celulares, iniciando-se pela proliferação fibroblástica, principalmente, a partir do ligamento periodontal remanescente, originando um tecido conjuntivo sobre o qual ocorre a

deposição de cálcio, levando à formação de trabéculas ósseas, que preencherão o alvéolo^{23,24}. No entanto, só é considerado completo quando o alvéolo encontra-se totalmente preenchido por tecido ósseo neoformado e a crista alveolar adjacente remodelada, o que ocorre, em ratos, aos 28 dias pós-exodônticos²³ e aos 64 dias em humanos²⁵.

Além de sustentar o elemento dentário, o processo alveolar da maxila e da mandíbula permite a sustentação das reabilitações protéticas, como os implantes osseointegráveis e as próteses parciais removíveis. Já se sabe que o sucesso desses tratamentos está relacionado com a qualidade óssea do processo alveolar.

Apesar do processo de reparo alveolar estar bem definido, o surgimento de técnicas, como a imunofluorescência pela técnica de co-localização, tem possibilitado a obtenção de mais respostas quanto ao papel desempenhado por células, proteínas, fatores de crescimento. Esta técnica permite a marcação de duas ou mais citocinas no mesmo tecido preservando a estrutura tecidual e análise histológica.

Um importante questionamento que se faz é se o balanço das expressões de RANKL/OPG na cronologia do processo de reparo alveolar é alterado quando o indivíduo apresenta alterações sistêmicas. Portanto, no presente trabalho, a imunocolocalização foi utilizada para avaliar o balanço entre esses dois fatores na dinâmica do processo de reparo alveolar na tentativa de melhor entender a relação entre RANKL/OPG e comparar as possíveis variações desse balanço que ocorrem com a ovariectomia (OVX), com a reposição de estrógeno e com o tratamento com raloxifeno.

Considerando as peculiaridades do processo de reparo alveolar e a necessidade de obter melhores entendimentos da formação do tecido ósseo até o término do processo, o presente estudo tem o objetivo de avaliar a interferência da ovariectomia e seu tratamento com estrógeno ou com raloxifeno no balanço entre RANKL/OPG, duas

citocinas importantes que sinalizam as diferentes situações na remodelação óssea, e também estudar o mecanismo pelo qual E2 e RLX exercem seus efeitos anti-reabsortivos no tecido ósseo, através da imunocolocalização e análise histomorfométrica durante diferentes períodos da cronologia do processo de reparo alveolar.

Material e Métodos

Animais

Foram usadas ratas adultas wistar (*Rattus norvegicus albinus*), pesando entre 200-220g. Princípios laboratoriais de cuidado animal (NIH publication 85-23, 1985) e leis nacionais referentes ao uso de animais em experimentos científicos foram seguidas neste estudo, o qual foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Estadual Paulista, Brasil (Protocolo número 38/05).

Ciclo estral

O ciclo estral das ratas foram monitorados e somente as ratas que atingiram 3 ciclos estrais regulares foram selecionadas para o experimento. Para confirmar o sucesso da OVX, da administração do estrógeno e da administração do raloxifeno o ciclo estral foi monitorado durante todo o experimento.

Esboço do experimento

120 ratas foram selecionadas aleatoriamente para cada um dos quatro grupos abaixo:

- grupo sham (n=32): cirurgia sham
- grupo OVX (n=32): OVX bilateral com cápsulas de óleo de milho no subcutâneo.
- grupo OVX+E2 (n=32): OVX bilateral com cápsulas de estrógeno no subcutâneo por 60 dias.
- grupo OVX+RLX (n=32): OVX bilateral com terapia de raloxifeno (Evista; Lilly, São Paulo, SP, Brasil) por gavagem diária (1mg/kg peso corporal/dia) por 60 dias.

Grupos OVX+E2, OVX+RLX e OVX com cápsulas de óleo de milho começaram o tratamento com estrógeno ou raloxifeno 8 dias após a OVX até o dia em que os animais foram sacrificados.

Cirurgia de ovariectomia e cirurgia sham

No início do experimento, as ratas receberam injeção intramuscular de 0,03ml para 100 gramas de peso corporal de Coopazine (Xilazine Coopers, Brasil, Ltda) e 0,07ml por 100 gramas de peso corporal de Vetaset (Ketamine Chloridrate – Fort Dodge Saúde Animal Ltda). Foi realizada a anti-sepsia com Polivinilpirrolidona iodada (Riodeine Indústria Química e Farmacêutica Rioquímica, Brasil, Ltda) e as ovariectomias bilaterais (OVXs) foram realizadas em 96 ratas com incisões em ambos os flancos, exposição dos ovários e remoção cirúrgica dos mesmos. As cirurgias sham (as quais os ovários são expostos no campo cirúrgico e retornados intactos para a posição original) foram realizadas em 32 ratas. Após a cirurgia os animais receberam

dose única de 20.000 U.I. de penicilina G benzatina (Pentabiótico®; Wyeth-Whitehall Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

Reposição de estrógeno

Implantes de 1,2 cm de comprimento de tubo de silastic foram confeccionados (diâmetro interno: 1,6mm; diâmetro externo: 3,2mm; Dow Corning, Grand Rapids, MI, USA). Os tubos de silastic foram previamente selados com 3 mm de cola de silicone em uma ponta e preenchido com 17 β -estradiol (Sigma, Sant Louis, Missouri, USA) 5 mm de comprimento (400 μ g) e selado com 3mm de cola de silicone na outra extremidade. Os implantes foram inseridos, subcutaneamente, no dorso do animal e trocado uma vez durante o experimento. Este mesmo procedimento também foi adotado pelo grupo OVX porém contendo apenas óleo de milho.

Administração de Raloxifeno

Com as ratas imobilizadas, uma cânula foi introduzida no trato gastrointestinal via oral e a droga diluída em água liberada no estômago (1mg/kg/dia). A gavagem foi realizada diariamente até o término do experimento.

Extração Dental

Após a indução da anestesia por infiltração intramuscular de Coopazine (Xilazine Coopers, Brazil, Ltda) e Vetaset (Ketamine Chloridrate – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Brasil), realizou-se a anti-sepsia do campo operatório com

polivinilpirrolidona iodada (Riodeine Indústria Química e Farmacêutica Rio Química, Ltda, Brasil) e na seqüência, a exodontia do incisivo superior direito, utilizando instrumental especialmente adaptado para este fim²³. A mucosa gengival foi suturada com fio de seda (Ethicon 4.0, Johnson and Johnson, São Paulo SP, Brasil) (Figura 1).

Remoção da hemi-maxila direita

Após os períodos experimentais de 7, 14, 21 e 42 dias pós-operatórios, os animais foram perfundidos com formaldeído 4% (Acros Organics, New Jersey, USA), utilizando bomba perfusora Masterflex® LS (Cole-Parmer Instrumet Company, Vernon Hills, IL, USA). Ao término da perfusão, a maxila direita de cada animal contendo os alvéolos em processo de reparação, foi removida. As peças obtidas passaram pelas etapas de pós-fixação em formaldeído 4% (mesmo fixador utilizado na perfusão), descalcificação em EDTA (Merck, Darmstadt, Germany) e crioproteção em sacarose (Merck, Darmstadt, Germany). Ao término da crioproteção, as peças foram cortadas em criostato (Mícron – Zeiss, Berlin, Germany) para obtenção de cortes longitudinais ao longo eixo do alvéolo, com a espessura de 14µm, que foram montados em lâminas previamente gelatinizadas.

Análise histométrica

Dois cortes de cada animal foram corados em hematoxilina e eosina (HE) para análise histométrica. O alvéolo foi didaticamente dividido em terço cervical, médio e apical para realizar a análise histológica. Os eventos foram observados no terço médio, onde o processo de reparo alveolar ocorre de maneira mais homogênea^{23,24}.

A análise histométrica foi feita pelo método da planimetria de pontos. Para isto, os cortes dos alvéolos foram primeiramente fotografados com câmera digital (Leica® DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) acoplada a um microscópio óptico binocular Leica DMLS com objetiva de aumento 5X e processadas pelo software IM 50-Leica Image Manager V1.20. Utilizando o programa gráfico Software Adobe Photoshop versão 6.0, foram sobrepostas 8 grades de Merz²⁷ em cada terço médio do alvéolo para estimar o volume de tecido ósseo formado. Cada grade contém 100 pontos equidistantes, portanto foram um total de 800 pontos. Esta análise foi realizada sem o conhecimento do examinador e realizada em dois cortes histológicos de cada animal. Para análise estatística foi realizada a análise de variância (ANOVA) por meio do pós teste de Tukey (valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes).

Reações co-localização por imunofluorescência

As lâminas foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato a 0,1M (PBS) em seguida foram realizados dois bloqueios, um com glicina e outro com albumina bovina e soro de burro (espécie hospedeira do anticorpo secundário). Os anticorpos primários e secundários foram diluídos em solução salina tamponada com fosfato associado ao triton X100 (PBS+Tx) contendo albumina bovina e soro de burro. Para o anticorpo primário, utilizou-se a mistura dos anticorpos anti-OPG (Rabbit anti-OPG polyclonal – Santa Cruz, California, USA), e anti-RANKL (Goat anti-RANKL polyclonal – Santa Cruz, California, USA) na proporção de 1:100 cada, durante 16 horas em temperatura ambiente. Para os anticorpos secundários foram utilizados anti-coelho conjugado ao Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) e o anti-cabra conjugado ao FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West

Grove, PA, USA) durante 2 horas em temperatura ambiente. Ao término da incubação dos anticorpos secundários, as lâminas foram lavadas em PBS por 1 hora (6 x 10 minutos) e tiveram as lamínulas montadas utilizando-se óleo mineral (Nujol – Ind. Quím. e Farm. Schering-Pough S.A., São Paulo, SP, Brasil).

A análise das lâminas foi realizada através de microscopia de epifluorescência (Leica[®] DMLB, Heerbrugg, Switzerland), acoplada a uma fonte de luz externa para excitação dos fluorocromos (Leica[®] EL 6000, Heerbrugg, Switzerland), utilizando filtros com fotomultiplicador específicos para fitc (filtro de excitação – *band pass filter* BP 450-490; filtro de supressão – *long pass filter* LP 515) e para cy3 (filtro de excitação – *band pass filter* BP 515-560; filtro de supressão – *long pass filter* LP 590) correspondentes ao comprimento de onda excitado por cada fluorocromo.

Para a aquisição das imagens utilizou-se uma câmera digital (Leica[®] DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) acoplada a um microscópio de fluorescência e conectada ao computador pelo programa Leica[®] DC 300F “onboard”. As imagens foram capturadas em um aumento de 25x.

A análise dos dados foi realizada de forma semi-quantitativa, com “scores” variando de 0 para as lâminas que não apresentaram nenhuma marcação, até 3 nas lâminas que apresentavam marcações intensas. Esta análise também foi padronizada para o terço médio do alvéolo e realizada para as co-localizações.

Resultados

Observações clínicas e microscópicas

A característica clínica dos cornos uterinos e a análise do ciclo estral confirmaram o sucesso da OVX e da reposição de estrógeno. Os grupos OVX e OVX+RLX apresentaram-se em diestro, caracterizado pela predominância de leucócitos, e seus úteros atróficos. Em contraste, os animais submetidos à cirurgia sham apresentaram as 4 fases do ciclo estral (diestro, proestro, estro, metaestro) e os animais submetidos à cirurgia de OVX+E2 apresentaram em Proestro e Estro; esses animais também apresentaram útero normal.

Análise qualitativa em HE

A análise dos eventos histológicos mostrou que em todos os grupos experimentais os passos do processo de reparo alveolar ocorreram conforme descrito na literatura^{23,24}.

Aos 7 dias pós-operatórios, observou-se a presença de coágulo sanguíneo sendo invadido por fibroblastos, células endoteliais e macrófagos, caracterizando a formação do tecido de granulação. Observa-se também a presença de tecido ósseo neoformado (osso trabecular). Há presença de hemosiderina em todos os alvéolos dentais.

Aos 14 dias pós-operatórios, observou-se uma maior quantidade de osso trabecular, grande número de osteoblastos, em atividade de síntese, localizados ao redor de trabéculas ósseas neoformadas. Aos 21 dias pós-operatórios pôde-se observar a presença de osteócitos no interior das trabéculas ósseas neoformadas. Aos 42 dias pós-operatórios, observou-se trabéculas ósseas maduras, preenchendo grande parte do alvéolo (figura 2).

Análise histométrica

Aos 7 dias o grupo OVX+RLX apresentou o menor valor médio e o grupo OVX+E2, o maior valor médio. A análise estatística mostrou significância entre a quantidade de osso formado do grupo OVX+E2 e do grupo sham, comparado à quantidade de osso formado do grupo OVX+RLX ($p<0,05$), também houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos OVX+E2 e OVX ($p<0,05$).

Aos 14 dias o menor valor médio observado foi para o grupo OVX+RLX e o maior valor médio para o grupo sham. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo sham e o grupo OVX+RLX ($p<0,05$) e entre o grupo OVX+E2 e o grupo OVX+RLX ($p<0,05$). Aos 21 dias não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Aos 42 dias, vale destacar que todos os grupos experimentais, exceto o grupo OVX apresentaram mais de 50% do terço médio do alvéolo preenchido por osso. O grupo sham apresentou o maior valor médio apresentando diferença estatisticamente significativa comparado aos demais grupos. Os grupos OVX+RLX e OVX+E2 apresentaram valores de ossificação muito próximos. Os resultados da análise histométrica estão descritos na forma de gráfico (figura 3).

O gráfico mostra que o grupo de ratas sham mostrou a melhor porcentagem de ossificação ao longo dos períodos avaliados e aos 42 dias, foi observado o maior índice de formação óssea neste grupo. A análise gráfica também mostra que os valores de ossificação ao longo dos períodos avaliados nos grupos OVX e OVX+E2 apresentam um perfil muito parecido, embora o grupo OVX apresentou menores valores de ossificação, exceto aos 21 dias.

Ainda analisando o gráfico quanto ao grupo OVX+RLX, pôde-se notar que a curva representativa deste grupo apresenta um crescimento contínuo e homogêneo

quanto à quantidade de osso formado ao longo da evolução temporal durante o processo de reparo alveolar.

Resultados semi-quantitativos da imunocolocalização de RANKL/OPG

A sobreposição dos cortes mostrou a presença de OPG e RANKL nos grupos estudados, onde a cor amarela é representante da sobreposição dos campos capturados com os dois filtros com comprimento de onda para visualização do fluorocromo fitc (verde) e cy3 (vermelho). A dupla marcação de OPG e RANKL nos osteoblastos ao redor das trabéculas ósseas neoformadas sugere o grau de turnover ósseo bem como de atividade de síntese das duas proteínas pelos osteoblastos durante o processo de reparo alveolar.

A sobreposição das imagens foi considerada a representação da atividade celular e o turnover ósseo, com o intuito de avaliar o grau de produção de OPG e RANKL simultaneamente pelas células.

Aos 7 dias pós operatório o grupo OVX apresentou maior turnover ósseo (representado pela co-localização de OPG/RANKL) seguido do grupo sham. Enquanto os grupos OVX+E2 e OVX+RLX apresentaram menor turnover ósseo, porém o grupo OVX+RLX apresentou o turnover ósseo ligeiramente maior que o grupo OVX+E2 (Figura 4).

Aos 14 dias pós operatório o grupo sham apresentou o maior turnover ósseo seguido do grupo OVX+RLX. Enquanto os grupos OVX+E2 e OVX apresentaram menor turnover ósseo, porém o grupo OVX+E2 apresentou o turnover ósseo ligeiramente maior que o grupo OVX (Figura 5).

Aos 21 dias pós operatório o grupo OVX+RLX apresentou o maior turnover ósseo comparado aos demais grupos, porém este aumento foi pequeno comparado aos grupos OVX+E2 e sham. O grupo OVX+E2 também se apresentou ligeiramente maior que o grupo sham. O grupo OVX apresentou o menor turnover ósseo comparado aos demais grupos (Figura 6).

Aos 42 dias pós operatório o grupo OVX apresentou o maior turnover ósseo seguido do grupo OVX+E2 o qual se apresentou apenas ligeiramente inferior ao grupo OVX, enquanto o grupo OVX+RLX apresentou o menor turnover ósseo e o grupo sham apresentou turnover ósseo ligeiramente maior que o grupo OVX+RLX (Figura 7).

Os resultados da análise de co-localização pela atribuição de “scores” estão descritos na forma de gráfico, comparando-se os grupos experimentais ao longo dos períodos analisados da cronologia do processo de reparo alveolar (Figura 8).

Discussão

O estudo do processo de reparo alveolar traz contribuições para o melhor entendimento da biologia óssea, uma vez que envolve eventos em que o organismo visa produzir osso com o intuito de preencher o alvéolo dental. Além disso, caracteriza-se pela presença de uma fonte de células mesenquimais que se diferenciam e originam as principais células responsáveis pela evolução do processo de reparo alveolar²⁴. O estudo realizado nesse trabalho, num organismo onde há deficiência de estrógeno, sabendo-se do efeito deste hormônio no metabolismo do tecido ósseo, torna-se bastante interessante, uma vez que uma das patologias que acometem a população com incidência considerável é a osteoporose, que pode apresentar como um dos fatores etiopatogênicos, a deficiência de estrógeno endógeno.

Utilizou-se a ovariectomia com o intuito de avaliar o efeito do estrógeno e do raloxifeno sobre o metabolismo ósseo, pois tem se mostrado particularmente útil para investigar a perda de osso trabecular em decorrência da deficiência de estrógeno, uma vez que as perdas de osso cortical decorrentes são mínimas²⁹. Este aspecto é bastante importante, se considerarmos o modelo experimental utilizado em nosso estudo.

O efeito do raloxifeno sobre o tecido ósseo, sem afetar o tecido uterino pôde ser observado, uma vez que após o sacrifício dos animais experimentais, foi realizada a pesagem do útero das ratas e os valores observados no grupo OVX+RLX foi igual ao valor observado no grupo OVX. Estudos na literatura mostram que o raloxifeno pode evitar a perda óssea e reduzir o colesterol no soro, sem causar a hipertrofia uterina, em ratas ovariectomizadas³⁰.

O grupo OVX apresentou o maior turnover ósseo no início do processo de reparo alveolar representado pela co-localização de OPG/RANKL, porém apresentou uma brusca diminuição aos 14 e 21 dias (períodos de intensa atividade celular observado no grupo sham). Esta diminuição observada talvez seja resultante da apoptose osteoblástica que a ovariectomia induz tendo como consequência a diminuição da liberação de OPG e RANKL por essas células. Apenas após o período de 21 dias de reparo esta atividade celular tentou se restabelecer.

Foi no período de 14 dias do processo de reparo alveolar que o grupo sham apresentou a associação simultânea da maior neoformação de trabéculas ósseas com o maior turnover ósseo comparado aos demais grupos enquanto que o grupo OVX apresentou a mesma associação aos 42 dias observou-se uma similaridade do aumento do turnover ósseo do período anterior, porém uma brusca redução da quantidade de trabéculas ósseas sugerindo intensa reabsorção óssea neste período. Estas observações

evidenciam o atraso do processo de reparo alveolar e o aumento do turnover ósseo induzido pela ovariectomia.

Duarte e colaboradores³¹⁻³³ observaram que a OVX aumenta a perda óssea em periodontites induzidas por ligaduras e afeta negativamente o tecido ósseo de sustentação dental, Nociti e col.³⁴ observaram que a OVX diminui o reparo ósseo e sua densidade ao redor de implantes de titânio. Já outros pesquisadores³⁵⁻⁴⁰ observaram que o declínio de estrógeno induzido pela ovariectomia afeta o turnover ósseo após extração dental com aumento da reabsorção óssea e redução da formação corroborando com nossos resultados no qual mesmo aos 42 dias de reparo alveolar o grupo OVX apresentou menos de 50% do terço médio do alvéolo preenchido por osso e afetou o turnover ósseo representado pelas co-localizações de OPG/RANKL.

A via de administração do estrógeno está de acordo com os relatos na literatura visto que Khastgir e col.⁴¹ mostraram melhores resultados de densidade óssea mineralizada (BMD) utilizando implantes de estradiol no subcutâneo. Entretanto, talvez a administração diária de raloxifeno por gavagem tenha possibilitado um melhor controle da dosagem da droga que se refletiu nos resultados observados durante o processo de reparo alveolar das ratas tratadas com RLX quando comparado ao grupo OVX+E2, tendo uma formação óssea e um turnover ósseo de forma mais contínua e regular enquanto que o grupo OVX+E2 teve uma ligeira oscilação do turnover ósseo e da quantidade de formação óssea durante a cronologia do processo de reparo alveolar. Talvez pelo meio de administração da droga no qual as cápsulas permaneciam no tecido subcutâneo por um período de 30 dias e após este período, elas eram substituídas, pois a quantidade de estrógeno liberada já não era suficiente para manter as ratas ciclando normalmente.

O grupo OVX+RLX apresentou ligeira melhora dos resultados comparado ao grupo OVX+E2 visto que este grupo apresentou ligeira diminuição do turnover ósseo apresentado pelas co-localizações de OPG/RANKL porém ambos os grupos não conseguiram atingir os níveis de ossificação do grupo sham promovendo um ligeiro atraso no processo de reparo alveolar. Este atraso está melhor evidenciado observando o gráfico da co-localização no qual o maior turnover ósseo no grupo OVX+RLX foi observado entre os períodos de 14 à 21 dias e no grupo OVX+E2 nos períodos de 21 e 42 dias enquanto que no grupo sham o maior turnover ósseo foi observado aos 14 dias de reparo alveolar, período da cronologia do processo de reparo alveolar em que ocorre a maior proliferação celular em ratos fisiologicamente normais corroborando com os achados da literatura²³.

As manobras de retirada e reposição de estrógeno foram importantes para uma avaliação completa do papel fisiológico deste hormônio no metabolismo ósseo. Entretanto, a manobra de ovariectomia provocou a retirada tanto de estrógeno quanto progesterona, mas durante a manobra de reposição, apenas o estrógeno foi administrado. Acreditamos ser esta uma das razões pelas quais, mesmo após a reposição com estrógeno ou raloxifeno, a quantidade de osso formado nestes dois grupos ainda foi inferior ao grupo sham.

A associação da histometria com a imuno-colocalização de RANKL e OPG traz dados bastante relevantes aos nossos questionamentos. A técnica da imunocolocalização marca as proteínas já sintetizadas atuando no local simultaneamente, permitindo a análise espacial das células no tecido. Vale destacar que nem sempre a expressão gênica do RNAm de uma determinada proteína significa que a proteína será sintetizada. Em relação às técnicas de avaliações sorológicas, elas muitas vezes não mostram se as proteínas apresentam-se ativas ou não, pois segundo Rogers e Eastell⁴² é possível que

OPG no soro esteja ligada a alguma(s) proteína(s) plasmática(s) e com isso apresenta(m)-se inativa(s) e também RANKL é produzida por uma variedade de tipos celulares e sua expressão é regulada por vários fatores fisiológicos e patológicos⁴³ portanto a quantidade sorológica de RANKL não se refere apenas ao tecido ósseo.

Teófilo e col.⁴⁰ mostraram que o implante de biomateriais no interior de alvéolo pós-exodôntico de ratas osteoporóticas promove uma melhora no volume de osso trabecular neoformado, quando comparado ao volume de tecido conjuntivo e remanescentes de coágulo sanguíneo, mostrando que na atualidade, há disponibilidade de materiais que agem localmente podendo auxiliar a contornar situações desfavoráveis ao processo de reparo alveolar promovidas por alterações sistêmicas.

A importância de RANKL e OPG na regulação da homeostasia foi demonstrado pelo fenótipo de ratos geneticamente modificados. Os ratos com ausência do gene da OPG desenvolveu osteoporose severa⁴⁴ pelo aumento do número e da atividade dos osteoclastos, enquanto que a alta expressão de OPG resultou em osteopetrose pela diminuição do número de osteoclastos e diminuição de suas atividades¹⁸.

O sistema OPG/RANKL/RANK possui um papel importante na regulação do “turnover” ósseo⁴⁵⁻⁴⁷. Anormalidades neste sistema implicam na patogênese da osteoporose pós-menopausa⁴⁸. Contudo, um elevado balanço entre RANKL/OPG promove perda da massa óssea, enquanto se este balanço for restaurado ou se a expressão de RANK diminuir a ativação dos osteoclastos a reabsorção óssea deixa de ocorrer¹⁵. Diferentes estratégias terapêuticas podem ser desenvolvidas com o melhor entendimento dos diferentes mecanismos ósseos existentes. Estudos em “vitro” e em vivo sugerem que a expressão de RANKL é suprimida pelo 17-β estradiol⁴⁹, e os efeitos de RANKL podem ser bloqueados pela fusão protéica de OPG sintética⁵⁰⁻⁵⁴, fusão protéica de RANK solúvel^{16,55} ou anticorpos de RANKL. O ativador RANK pode ser

suprimido pelos peptidiomiméticos que previnem a ligação de RANKL à RANK⁵⁶ ou pelo bloqueio da sinalização pós-receptores⁵⁷. A produção de OPG pode ser estimulada por 17- β estradiol⁵⁸, raloxifeno⁵⁹, bifosfanatos em vitro, estímulos mecânicos⁶⁰ e micromoléculas seletivas estimuladoras⁶¹ em vivo.

Bord e col.⁶², estudando a síntese de OPG e RANKL pelos megacariócitos(MKs) concluíram que essas duas importantes citocinas são moduladas pelo estrógeno. Eles acharam que as marcações de OPG nos MKs apresentaram-se mais intensas nas células tratadas com estrógeno comparada com as células sem tratamento, enquanto que as marcações de RANKL foram ligeiramente suprimidas pelo tratamento com estrógeno. Também, Maschen e col.⁶³ estudando o sistema RANKL/OPG em doenças inflamatórias(IBM) e relacionando à perda óssea demonstrou que IBM está associada com alteração do sistema RANKL/OPG que talvez contribua para a atividade de perda óssea em IBM.

Este estudo é o primeiro a demonstrar a influencia da ovariectomia e seu tratamento com raloxifeno ou com reposição de estrógeno no turnover ósseo representado pela co-localização de RANKL/OPG durante a cronologia do processo de reparo alveolar. Os experimentos de co-localização de OPG com RANKL confirmam a especificidade da síntese celular. Ademais, foi possível mostrar que o estrógeno e o raloxifeno modulam a expressão de OPG e RANKL nas células de linhagem osteoblásticas no processo de reparo alveolar alterando o turnover ósseo. Esses achados são pertinentes assim como o balanço de OPG/RANKL é importante na regulação da homeostasia óssea. Os resultados deste estudo sugerem que a reposição de estrógeno e o tratamento com raloxifeno mantêm a atividade osteoblástica ao longo do processo de reparo alveolar a qual não pôde ser observado com a ovariectomia.

Este trabalho mostrou que as células envolvidas no processo de reparo alveolar apresentaram a expressão conjunta de OPG e RANKL que foi se alterando no decorrer de sua cronologia. Esta expressão conjunta representa o turnover ósseo e a atividade osteoblástica, refletindo-se na quantidade de tecido ósseo formado durante os períodos do processo de reparo alveolar avaliados. O grupo sham exerceu efeito inibitório diretamente em RANKL-indução da diferenciação osteoclástica. O aumento da quantidade de trabéculas ósseas foi associado com a diminuição do turnover ósseo (balanço de OPG e RANKL).

Conclusão

A reposição do estrógeno e o tratamento com raloxifeno melhoraram as respostas, mas não restabeleceram completamente os valores da histometria e da co-localização do grupo sham e a OVX atrasa o processo de reparo alveolar e altera o turnover ósseo.

.

Referências

1. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. Il-6, RANKL, TNF- α /Il-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;**15**:49-60.
2. Raisz LG, Rodan GA. Embryology and cellular biology of bone. In: Avioli LV, Krane SM, eds. *Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders*. New York: Academic Press, 1998:1-22.
3. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000;**21**:115-137.
4. Bernick S, Ershoff BH. Histochemical study of bone in estrogen-treated rats. *J Dent Res* 1963;**42**:981-989.
5. Tapp E. The effects of hormones on bone in growing rats. *J Bone Joint Surg Br* 1966;**48**:526-531.
6. Liu CC, Howard GA. Bone-cell changes in estrogen-induced bone-mass increase in mice: dissociation of osteoclasts from bone surfaces. *Anat Rec* 1991;**229**:240-250.
7. Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Periodont Res* 2002;**37**:161-165.
8. Duarte MP, de Assis DR, Casati MZ, Sallum AW, Sallum EA, Nociti FH Jr. Alendronate may protect against increased periodontitis-related bone loss in estrogen-deficient rats. *J Periodontol* 2004;**75**:1196-202.
9. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000;**289**:1508-1514.

10. Burg MA, Fraser K, Gui S, Grant K, Kosch SG, Nierenberg B et al. Treatment of menopausal symptoms in family medicine settings following the Women's Health Initiative Findings. *J Am Board Fam Med* 2006;**19**:122-131.
11. Regan MM, Emond SK, Attardo MJ, Parker RA, Greenspan SL. Why do older women discontinue hormone replacement therapy? *J Womens Health Gend Based Med* 2001;**10**:343-350.
12. Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, et al. Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: Results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *JAMA* 1999;**282**:637-645.
13. Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley JÁ, et al. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: Results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *JAMA* 1999;**281**:2189-2197.
14. Barrett-Connor E, Grady D, Sashegyi A, Anderson PW, Cox DA, Hosszowski K, et al. Raloxifene and cardiovascular events in osteoporotic postmenopausal women: Four-year results from the MORE (Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation) randomized trial. *JAMA* 2002;**287**:847-857.
15. Lacey DL, Timms E, Tan H-L, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;**93**:165-176.
16. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, et al. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl*

- Acad Sci USA*. 1999;**96**:3540-3545.
17. Theill LE, Boyle Wj, Penninger JM. RANK-Land RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol* 2002;**20**:795-823.
 18. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;**89**:309-319.
 19. Åstrand P, Carlsson GE. Changes in the alveolar process after extractions in the white rat: a hystologic and fluorescence microscopic study. *Acta Odontol Scand* 1969;**27**:113-127.
 20. Johansen JR, Gilhuus-Moe O. Repair of the post-extraction alveolus in the guinea pig: a histological and autoradiographic study. *Acta Odontol Scand* 1969;**27**:249-262.
 21. Johansen JR. Repair of the post-extraction alveolus in the Wistar rat: a histologic and autoradiographic study. *Acta Odontol Scand* 1970;**28**:441-461.
 22. Amler MH, Johnson PL, Salman I. Histological and histochemical investigation of human alveolar socket healing in undisturbed extraction wounds. *J Am Dent Assoc* 1960;**61**:32-44.
 23. Okamoto T, Russo MC. Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats. *Rev Fac Odontol Araçatuba* 1973;**2**:153-169.
 24. Carvalho ACP, Okamoto T. Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados a clínica. São Paulo: Panamericana; 1987.
 25. Amler MH. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1969;**27**:309-318.
 26. Oliveira PT, Zalzal SF, Irie K, Nanci A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. *J Histochem Cytochem* 2003;**51**:633-641.

27. Merz WA. Distance measurement of directed structures in the microscope and its use in the determination of surface and volume relationship in bone tissue. *Mikroskopie* 1968;**22**:132-142.
28. Okamoto T, Fialho ACV. Estudo histológico comparativo entre dois métodos de obtenção de cortes de alvéolos de ratos. *Rev Odont UNESP* 1990;**19**:63-74.
29. Geddes A. Animal models of bone disease. In: Principles of bone biology. San Diego, Academic Press,p.1343,1996.
30. Black LJ, Sato M, Rowley ER, Magee DE, Bekele A, Williams DC, et al. Raloxifene (L¹³⁹⁴⁸¹ HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J. Clin. Invest.* 1994; **93**:63-69.
31. Duarte MP, de Assis DR, Casati MZ, Sallum AW, Sallum EA, Nociti FH Jr. Alendronate may protect against increased periodontitis-related bone loss in estrogen-deficient rats. *J Periodontol* 2004;**75**:1196-1202.
32. Duarte PM, Gonçalves PF, Sallum AW, Sallum EA, Casati MZ, Humberto Nociti F Jr. Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. *J Periodont Res* 2004;**39**:107-110.
33. Duarte PM, Gonçalves PF, Casati MZ, de Toledo S, Sallum EA, Nociti FH Jr. Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodont Res* 2006;**41**:541-546.
34. Nociti FH, Sallum AW, Sallum EA, Duarte PM. Effect of estrogen replacement and calcitonin therapies on bone around titanium implants placed in ovariectomized rats: a histometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants*

- 2002;**17**:786-792.
35. Elovic RP, Hipp JA, Hayes WC. Maxillary molar extraction causes increased bone loss in the mandible of ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 1995;**10**:1087-1093.
 36. Shimizu M, Sasaki T, Ishihara A, Furuya R, Kawawa T. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats. *J Electron Microsc* 1995;**47**:517-526.
 37. Shimizu M, Furuya R, Kawawa T, Sasaki T. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats: quantitative backscattered electron image analysis. *Anat Rec* 2000;**259**:76-85.
 38. Hsieh YD, Devlin H, Mccord F. The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. *Arch Oral Biol* 1995;**40**:529-31.
 39. Jahangiri L, Kim A, Nishimura I. Effect of ovariectomy on the local residual ridge remodeling. *J Prosthet Dent* 1997;**77**:435-443.
 40. Teófilo JM, Brentegani LG, Lamano-Carvalho TL. Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. *Arch Oral Biol* 2004;**49**:755-762.
 41. Khastgir G, Studd J, Holland N, Alaghband-Zadeh J, Fox S, Chow J. Anabolic effect of estrogen replacement on bone in postmenopausal women with osteoporosis: Histomorphometric evidence in a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;**86**:289-295.
 42. Rogers A, Eastell R. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;**90**:6323-6331.
 43. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis*

Res Ther 2007;9 Suppl 1:S1.

44. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. Osteoprotegerin deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;**12**:1260-1268.
45. Quinn JM, Elliott J, Gillespie MT, Martin TJ. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* 1998;**139**:4424-4427.
46. Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;**234**:137-142.
47. Yasuda E, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;**95**:3597-3602.
48. Hofbauer LC, Heufelder AE. Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;**85**:2355-2363.
49. Eghballi-Fatourehchi G, Klosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 2003;**111**:1221-1230.
50. Kong Y-Y, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999;**402**:304-309.

51. Teng Y-TA, Nguyen H, Gao X, Kong YY, Gorczynski RM, Singh B, et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 2000;**106**:R59-R67.
52. Honore P, Luger NM, Sabino MA, Schwei MJ, Rogers SD, Mach DB, et al. Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Nat Med* 2000;**6**:521-528.
53. Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan CR, Capparelli C, Scully S, et al. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J exp Med* 2000;**192**:463-474.
54. Price PA, June HH, Buckley JR, Williamson Mk. Osteoprotegerin inhibits artery calcification induced by warfarin and by vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;**21**:1610-1616.
55. Oyajobi BO, Anderson DM, Traianedes K, Williams PJ, Yoneda T, Mundy GR. Therapeutic efficacy of a soluble receptor activator of nuclear factor kappaB-IgG Fc fusion protein in suppressing bone resorption and hypercalcemia in a model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res* 2001;**61**:2572-2578.
56. Cheng X, Kinosaki M, Takami M, Choi Y, Zhang H, Murali R. Disabling of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK) receptor complex by novel osteoprotegerin-like peptidomimetics restores bone loss in vivo. *J Biol Chem* 2004;**279**:8269-8277.
57. Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW. Estrogen suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent

- mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:7829-7834.
58. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lancey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 1999;**140**:4367-4370.
59. Viereck V, Grundker C, Blaschke S, Niederkleine B, Siggelkow H, Frosch KH, et al. Raloxifene concurrently stimulates osteoprotegerin and inhibits interleukin-6 production by human trabecular osteoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;**88**:4206-4213.
60. Kobayashi Y, Hashimoto F, Miyamoto H, Kanaoka K, Miyazaki-Kawashita Y, Nakashima T, et al. Force-induced osteoclast apoptosis in vivo is accompanied by elevation in transforming growth factor beta and osteoprotegerin expression. *J Bone Miner Res* 2000;**15**:1924-1934.
61. Onyia JE, Galvin RJ, Ma YL, Halladay DL, Miles RR, Yang X, et al. Novel and selective small molecule stimulators of osteoprotegerin expression inhibit bone resorption. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;**309**:369-379.
62. Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone* 2003;**32**:136-141.
63. Maschen AR, Kaser A, Enrich B, Ludwiczek O, Gabriel M, Obrist P, et al. The RANKL/OPG system is activated in inflammatory bowel disease and relates to the state of bone loss. *Gut* 2005;**54**:479-487.

Figuras

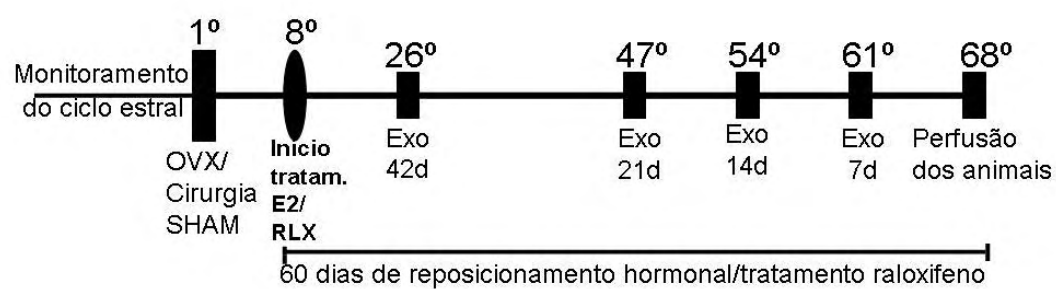


Figura 1: Cronologia dos procedimentos experimentais.

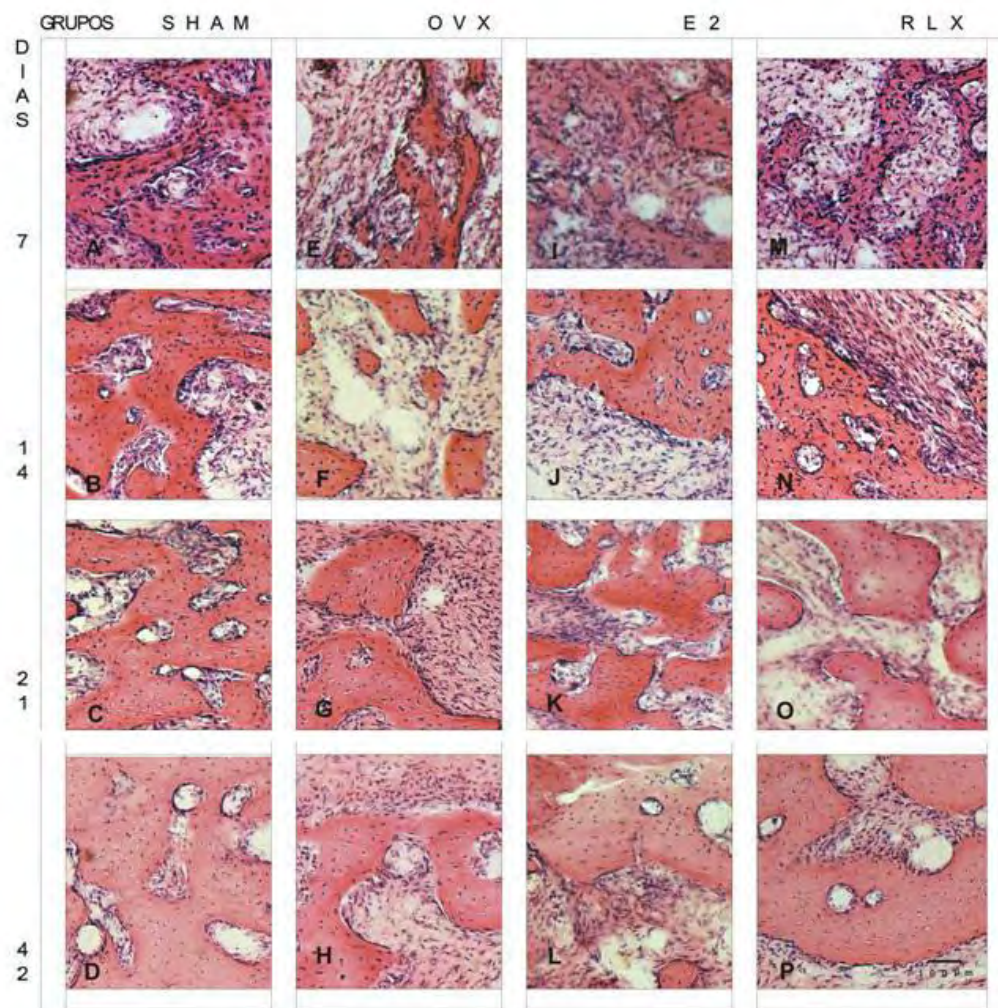


Figura 2: Cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina (HE) do terço médio do alvéolo do grupo sham (imagens A, B, C, D), do grupo OVX (imagens E, F, G, H), do grupo OVX+E2 (imagens I, J, K, L), do grupo OVX+RLX (imagens M, N, O, P), nos períodos de 7, 14, 21 e 42 dias pós-operatórios. É importante notar que apesar dos eventos descritos ocorrerem em todos os grupos experimentais, houve um atraso no processo de reparo alveolar do grupo OVX. A reposição de estrógeno e o tratamento com raloxifeno não foram suficientes para atingir os eventos histológicos observados no grupo sham.

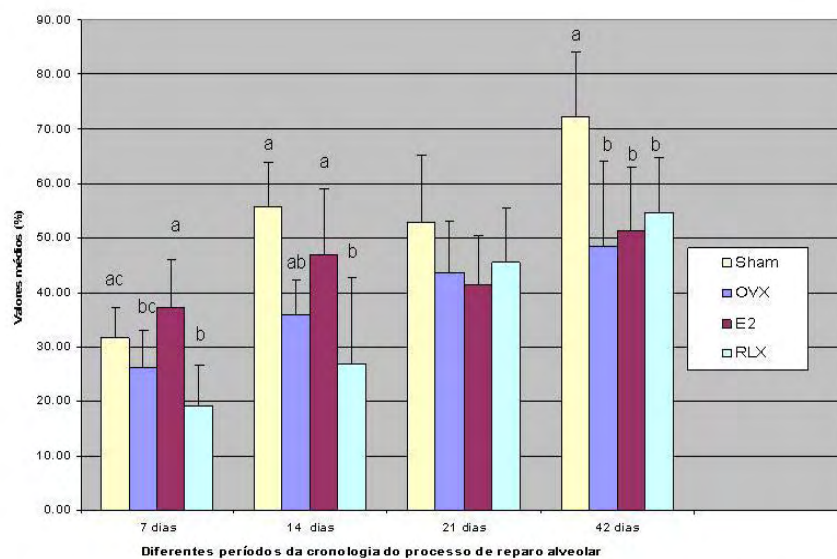


Figura 3: Gráfico da quantidade de osso formado dos 4 grupos experimentais (Sham, OVX, OVX+E2, OVX+RLX), nos períodos de 7, 14, 21 e 42 dias pós-operatórios. Aos 7 dias observa-se diferença estatística entre os grupos OVX+E2 e OVX+RLX, sham e OVX+RLX, OVX+E2 e OVX. Aos 14 dias observa-se diferença estatística entre os grupos sham e OVX+RLX, OVX+E2 e OVX+RLX. No período de 21 dias não existe diferença estatística. Aos 42 dias o grupo sham apresenta o maior valor médio e é estatisticamente significativo comparado com os demais grupos. Dados (valores médios $\pm$ 50, n = 8, * $p < 0.05$).

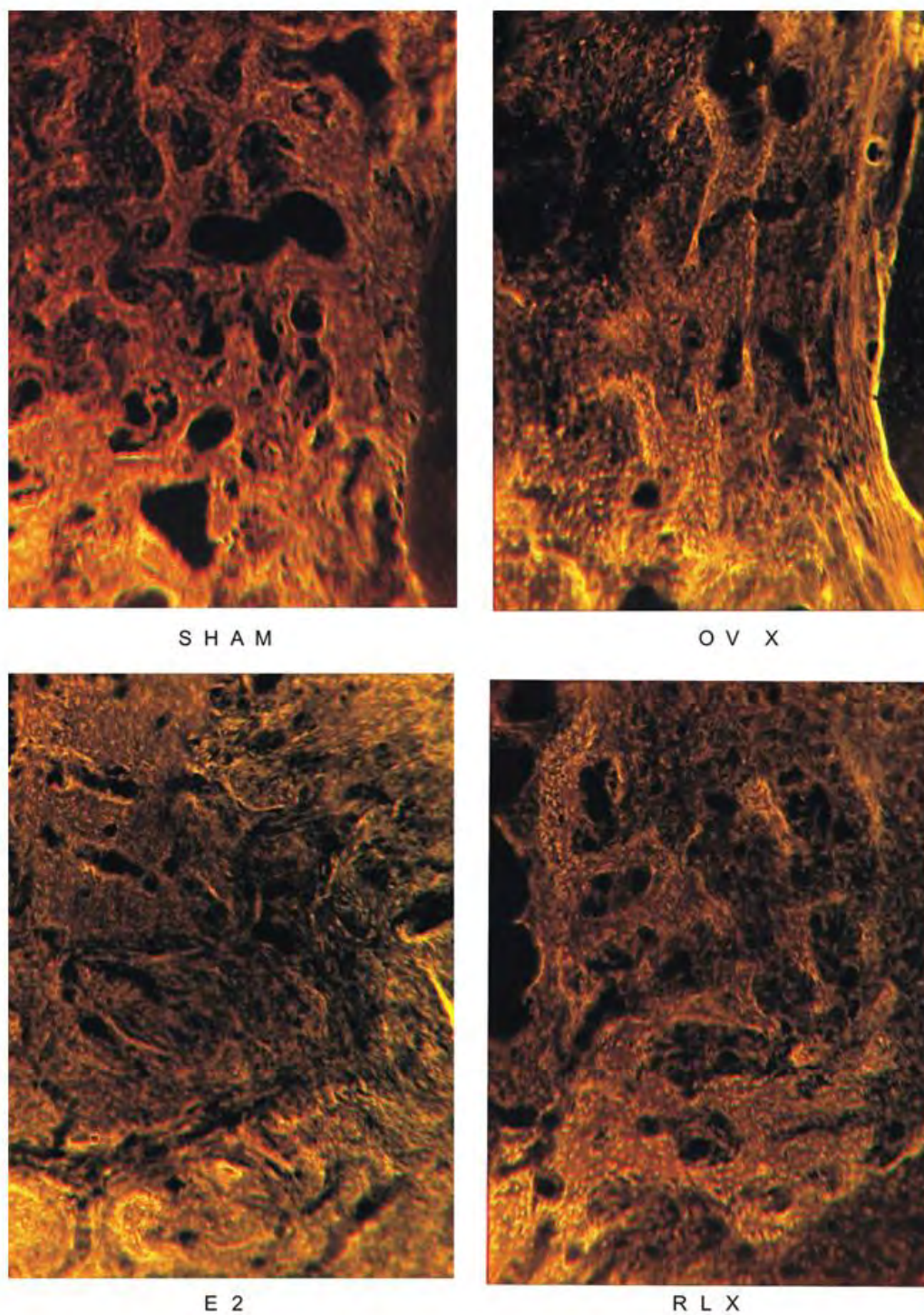


Figura 4: Co-localização de OPG e RANKL sobreposta no terço médio do processo de reparo alveolar dos 4 grupos experimentais (Sham, OVX, OVX+E2, OVX+RLX) aos 7 dias pós operatórios.

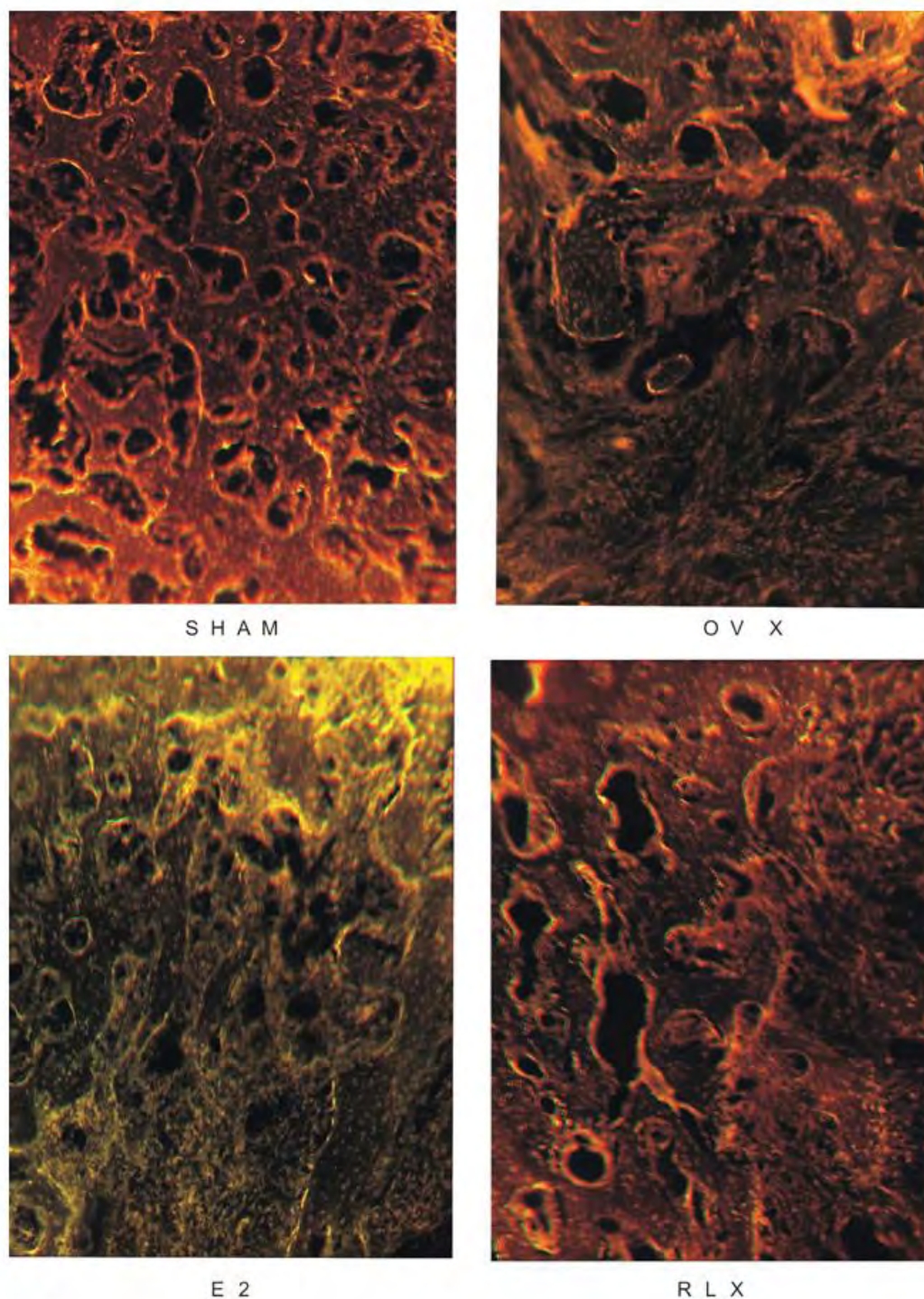


Figura 5: Co-localização de OPG e RANKL sobreposta no terço médio do processo de reparo alveolar dos 4 grupos experimentais (Sham, OVX, OVX+E2, OVX+RLX) aos 14 dias pós operatórios.

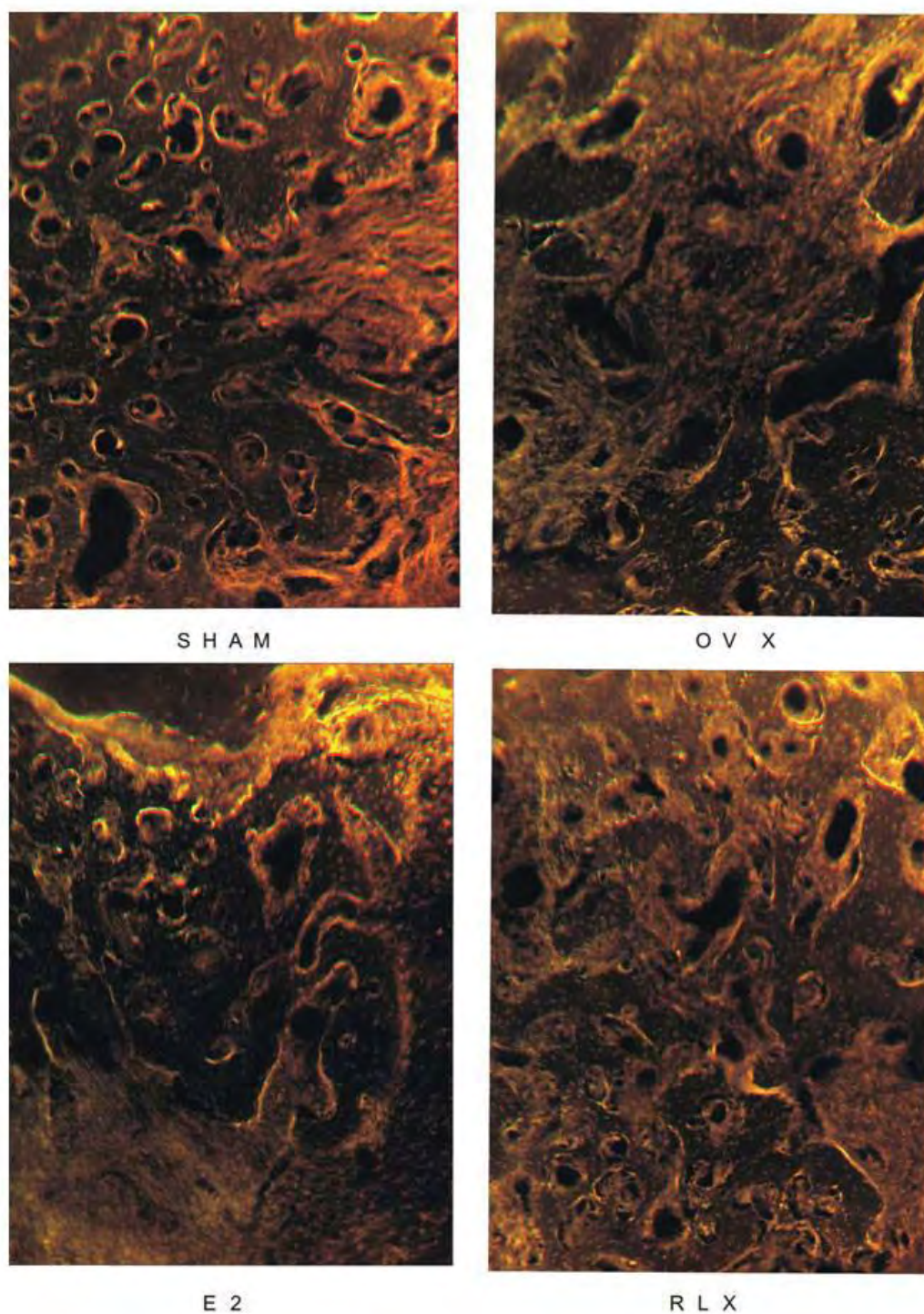


Figura 6: Co-localização de OPG e RANKL sobreposta no terço médio do processo de reparo alveolar dos 4 grupos experimentais (Sham, OVX, OVX+E2, OVX+RLX) aos 21 dias pós operatórios.

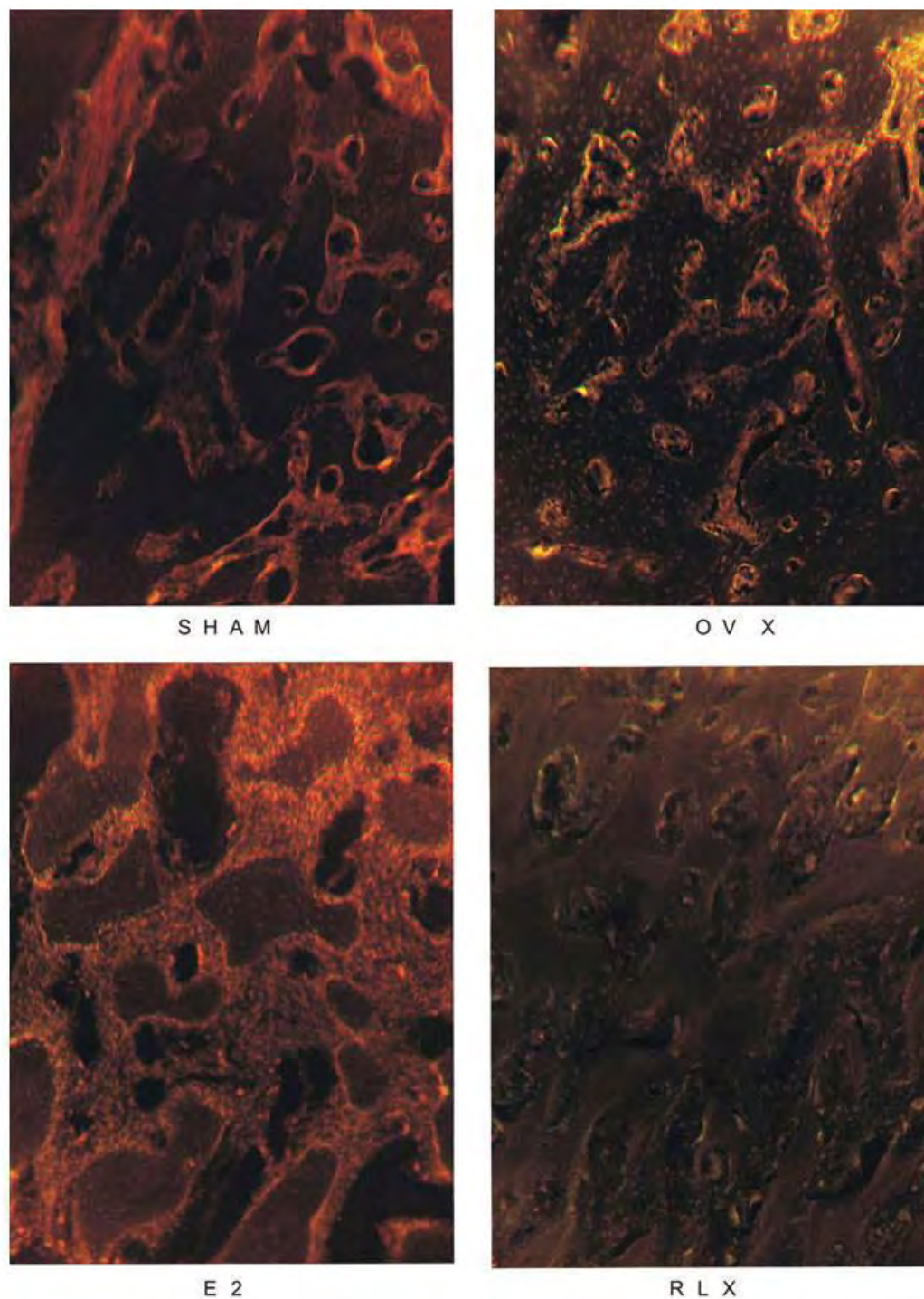


Figura 7: Co-localização de OPG e RANKL sobreposta no terço médio do processo de reparo alveolar dos 4 grupos experimentais (Sham, OVX, OVX+E2, OVX+RLX) aos 42 dias pós operatórios.

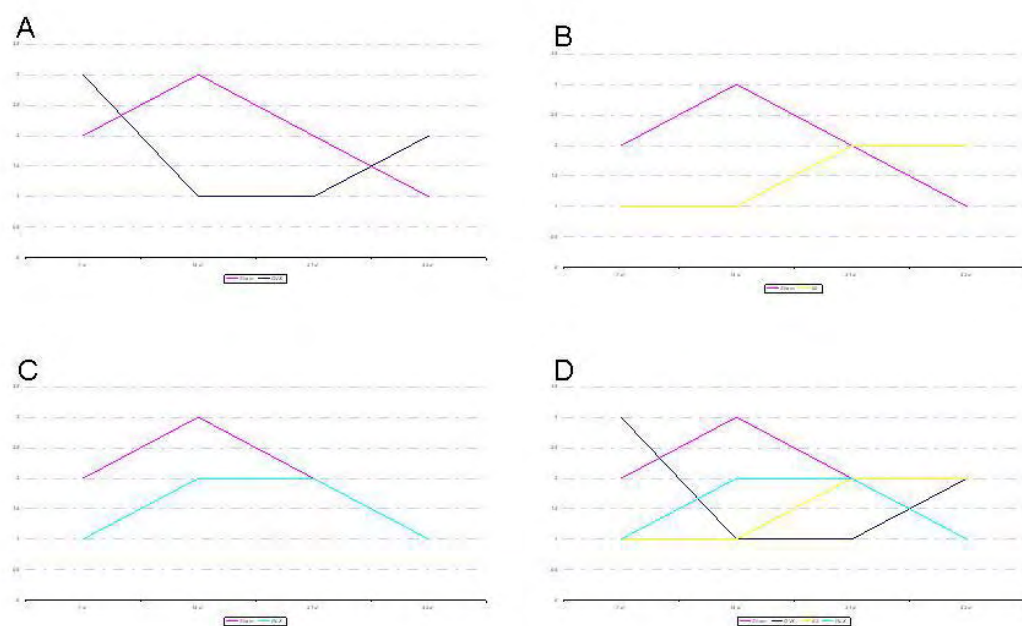


Figura 8: Gráficos da análise semi-quantitativa da co-localização de OPG e RANKL pela atribuição de “scores” dos 4 grupos experimentais nos períodos analisados (7, 14, 21 e 42 dias pós-operatórios). A) grupos: sham e OVX; B) sham e OVX+E2; C) sham e OVX+RLX; D) sham, OVX, OVX+E2, OVX+RLX.

ANEXO A

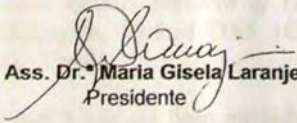
unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba 

**COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)**

CERTIFICADO

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

Araçatuba, 26 de abril de 2005.


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

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – DEPARTAMENTO DE CLÍNICA, CIRURGIA
E REPRODUÇÃO ANIMAL – Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636-3295 Fax (18) 3622-4542 E-mail: laranjeira@fmvz.unesp.br

ANEXO B



<http://www.elsevier.com>

ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY

A Multidisciplinary Journal of Oral & Craniofacial Sciences

Guide for Authors

Submissions

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

Please register at: ➡ <http://ees.elsevier.com/aob>

Editors-in-Chief:

Dr G R Holland and Professor P M Speight

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

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

If the manuscript reports experiments or observations using animals or human subjects a

statement must be included in the letter of submission indicating that the protocol has been examined and approved by an institutional review board.

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

Scientific Standards

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

Types of Contributions

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

Manuscript Preparation

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

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

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

General

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

requested to be vigilant over the submission of the correct version of the manuscript at the various stages of the editorial process.

Text

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

Title page

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic or histochemical etc. A "running title" with not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Structured abstracts

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

Received/Accepted Dates

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

Introduction

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

Materials and Methods

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

Authors are requested to make plain that the conditions of animal experiments were humane; for instance, the mode of anaesthesia and of killing should be specified. In

human experimentation, authors should state briefly that the subjects gave informed consent, and preferably that the work was approved by an appropriate ethics committee or review board.

Results or Findings

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

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

Discussion

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

Acknowledgments

As appropriate.

References:

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

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

For example:

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

For book references, the author(s) should be followed by the chapter title (if appropriate), editor(s) (if applicable), book title, place of publication, publisher, year and page numbers. For example:

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

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

Units and Symbols

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

Units and abbreviations

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

ADP,
AMP,
ATP
DEAE-cellulose
DNA, RNA
EDTA
EMG
tris

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

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

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

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

Abbreviations. Use capitals for: MIC, MBC, WBC, RBC, DNA, RNA, Group A, B etc. for antigenic or other groups, PHLS, CDSC, CDC, WHO, CSF, MSU, EMU, CSU. Use cfu, pfu, mm, m, min, h, in, ft, g, kg, mL, L, im, iv, iu, P(probability). Use sp. and spp. (species, singular and plural). Use Gram's stain and Gram-negative bacillus. Use in-vitro (adjective) but in vitro (adverb), post-mortem (adjective) but post mortem (adverb). Spelling. Use British spellings: Haemophilus, haematology, paediatrics, leucocyte, leukaemia, bacteraemia, sulphonamides, aetiology; but note neutropenia, fetal. Please note the journal uses UK 'z' spelling (e.g., colonizes).

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

Proprietary Names

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

Illustrations

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

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

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

Line drawings: All lettering, graph lines and points on graphs should be sufficiently

large and bold to permit reproduction when the diagram has been reduced to a size suitable for inclusion in the journal. Dye-line prints or photocopies are not suitable for reproduction. Do not use any type of shading on computer-generated illustrations.

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

Colour:Certain illustrations will be approved for publication in colour but only if, in the opinion of the Editors, the figures convey information not apparent in monochrome. Please note that if figures are supplied in colour, they will automatically be available online in colour at no extra charge, even if the print version is monochrome.

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

Acceptance

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

Hardcopy submissions

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

Proofs

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

Offprints

Twenty-five offprints will be supplied free of charge. Offprints and copies of the issue can be ordered at a specially reduced rate using the order form sent to the corresponding

author after the manuscript has been accepted. Orders placed late (after publication) for reprints will incur a 50% surcharge.

Copyright

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

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit www.elsevier.com/authors. This website provides information on article submission as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more.

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