

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS

Juliana Heckler Mello

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES PERIAPICAIS
EM RATAS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA**

Santa Maria, RS
2016

Juliana Heckler Mello

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES PERIAPICAIS EM RATAS
COM OSTEOPOROSE INDUZIDA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Odontologia, Ênfase em Endodontia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM - RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Odontológicas**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Souza Bier

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Heckler Mello, Juliana

Avaliação do desenvolvimento de lesões periapicais em ratas com osteoporose induzida / Juliana Heckler Mello.- 2013.

50 p.; 30 cm

Orientador: Carlos Alexandre Souza Bier
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, RS, 2013

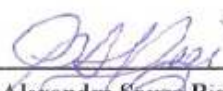
1. Endodontia 2. Osteoporose 3. Lesão Periapical I. , Carlos Alexandre Souza Bier II. Título.

Juliana Heckler Mello

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES PERIAPICAIS EM RATAS
COM OSTEOPOROSE INDUZIDA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Odontologia, Ênfase em Endodontia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM - RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Odontológicas**.

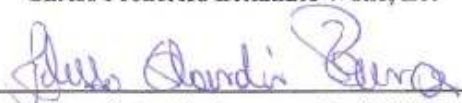
Aprovado em 23 de julho de 2016:



Carlos Alexandre Souza Bier, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Carlos Frederico Brillhante Wolle, Dr.



Melissa Orlandin Premack, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, Luis Paulo Mello e Maria Elisabeth Heckler Mello, que sempre me incentivaram e acreditaram no meu potencial, me apoiando em todas etapas da minha vida. Obrigada pelo amor incondicional e por me proporcionarem os melhores momentos da minha vida.

Amo vocês!

À minha irmã **Daniela Heckler Mello**, em quem sempre pude contar e que me acompanhou diariamente nessa jornada e mesmo nos momentos mais difíceis esteve sempre presente com palavras de conforto e amizade incondicional.

Dani, muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Carlos Alexandre Souza Bier, por me conceder a oportunidade de realizar o mestrado, contribuir para o meu crescimento pessoal e por me acompanhar em toda minha trajetória acadêmica. Obrigada Bier pela amizade, pelas boas risadas, pelas caronas a Porto Alegre, pelos churrascos na sua casa. Muito obrigada por tudo!

À amiga Mariana De Carlo Bello, por me ajudar no desenvolvimento e execução desse trabalho. Mari, obrigada por ser essa pessoa especial, sempre pronta a ajudar. Obrigada pelas longas conversas, por conceder sua casa como nosso QG de estudo e por contribuir com meu conhecimento.

Você é, e sempre será, uma grande amiga para mim.

À amiga Camilla dos Santos Tibúrcio Machado, por toda sua dedicação e empenho. Não há palavras que descrevam a minha gratidão por nos ajudar na realização de todo esse trabalho e pela amizade que construímos. Milla você é uma pessoa única, obrigada por alegrar meus dias, principalmente durante nossas longas semanas em Porto Alegre. Poder ter certeza que nunca esquecerei de você e sempre poderá contar comigo.

Muito obrigado, de coração!

À amiga Carina Michelon, pelas trocas de conhecimento, por fazer parte desse trabalho com dedicação e empenho. Obrigada pela amizade, por me acompanhar durante essa caminhada, por ser essa amiga sincera que tanto colaborou para o meu crescimento.

Ao professor Gustavo Dotto, por se disponibilizar a nos ajudar com as análises de imagens das nossas amostras, com muita dedicação e empenho, colaborando muito com
nosso trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas (PPGCO) da UFSM pela oportunidade de fazer parte deste programa e pelo apoio prestado durante todo o curso.

À Jéssica Dalcin da Silva, pelo apoio prestado junto à secretaria do PPGCO e por sempre estar disposta a nos ajudar e tirar nossas dúvidas.

À Professora Maria Martha Campos por todo seu tempo disponibilizado e por ter aberto as portas de seu laboratório, o que tornou possível a realização deste trabalho. Muito obrigada pela oportunidade!

Às amigas Kesiane Mayra da Costa e Pauline Mastella Lang por nos receberem em suas casas, nos acolhendo com muito carinho. A amizade e ajuda de vocês contribuíram muito para tornar nossos dias mais leves. Agradeço ter encontrado pessoas tão incríveis!

Ao amigo Gustavo Dalto Barroso Machado, nosso querido Gus, você é uma pessoa abençoada, com esse jeito humilde nos conquistou, alegrou nossos dias e sua ajuda foi fundamental para realização do nosso trabalho. Muito obrigada por tudo!

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, por permitir a realização da parte experimental deste trabalho em suas instalações.

EPÍGRAFE

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES PERIAPICAIS EM RATAS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA

AUTORA: Juliana Heckler Mello

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Alexandre Souza Bier

A osteoporose é uma condição sistêmica caracterizada pela redução da densidade mineral óssea (DMO) e pela deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, sendo sua forma mais comum aquela encontrada no período pós-menopausa. Entre os fatores que levam a uma diminuição da DMO nesse período, destaca-se a deficiência de estrogênio devido à atrofia dos ovários e ao aumento do estresse oxidativo gerado pela produção de espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo é responsável pela ocorrência de danos celulares e está intimamente relacionado com a perda na densidade óssea que ocorre na osteoporose. Estudos têm demonstrado que algumas condições sistêmicas, como a osteoporose, podem alterar a progressão e a severidade das lesões periapicais em virtude da menor densidade óssea e maior velocidade de reabsorção. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência da osteoporose sobre lesões periapicais induzidas em ratas. Para isso, foram utilizadas 20 ratas da linhagem *Wistar* divididas em 2 grupos experimentais (n=10): ovariectomia (OVX) e simulação da ovariectomia (SHAM). Após 21 dias, todos os animais foram submetidos aos procedimentos de indução da lesão periapical através da abertura endodôntica do primeiro molar inferior direito e exposição da câmara pulpar ao meio bucal até o final do período experimental. Após 35 dias da data da indução da lesão periapical, os animais foram eutanasiados. Foram realizadas análises do nível de estrogênio, de estresse oxidativo no fígado (óxido nítrico), além da mensuração da área das lesões periapicais através de radiografia digital e da DMO do fêmur e mandíbula por tomografia multislice. Os dados obtidos foram submetidos ao teste *t* não pareado com o nível de significância estabelecido em 5% ($P < 0.05$). Os resultados mostraram não haver diferença estatística no tamanho da lesão periapical entre os grupos OVX e SHAM. No entanto, os níveis de estrogênio e o peso do útero foram significativamente menores para o grupo OVX do que para o SHAM, comprovando o modelo de osteoporose. Adicionalmente, a análise de estresse oxidativo mostrou que a ovariectomia induziu a um aumento significativo de óxido nítrico no grupo OVX quando comparado ao grupo SHAM. Com relação aos parâmetros ósseos, a DMO no côndilo do fêmur foi significativamente menor no grupo OVX que no grupo SHAM, porém na mandíbula não foram encontradas diferenças significantes entre os dois grupos. Apesar de a osteoporose ter influenciado no nível de óxido nítrico e ter exercido um efeito sobre a DMO do fêmur nas ratas ovariectomizadas, os dados revelaram que a condição sistêmica não alterou o tamanho das lesões periapicais induzidas em ratas *Wistar*.

Palavras-Chave: Osteoporose. Periodontite Apical. Pós-menopausa.

ABSTRACT

ASSESSMENT OF THE DEVELOPMENT OF PERIAPICAL LESIONS IN RATS WITH INDUCED OSTEOPOROSIS

AUTHOR: Juliana Heckler Mello
ADVISOR: Prof. Dr. Carlos Alexandre Souza Bier

Osteoporosis is a systemic condition characterized by reduced bone mineral density (BMD) and microarchitectural deterioration of bone tissue. The most common kind of Osteoporosis is found in the postmenopausal period. Among the factors that lead to a decrease in BMD during this period, estrogen deficiency stands out due to atrophy of the ovaries and increased oxidative stress generated by the production of reactive oxygen species. Oxidative stress is responsible for the occurrence of cellular damage and is closely related to the loss in bone density which occurs in osteoporosis. Studies have shown that some systemic conditions, such as osteoporosis, can alter the progression and severity of periapical lesions, because of decreased bone density and increased speed of reabsorption. Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of osteoporosis on periapical lesions induced in rats. Twenty *Wistar* lineage rats were used on the study, divided into 2 experimental groups (n = 10): ovariectomized (OVX) and sham ovariectomized (sham). After 21 days, all animals were submitted to the periapical lesion induction procedures by endodontic opening of the mandibular first molar and exposure of the pulp to the oral environment by the end of the trial period. After 35 days from the date of induction of periapical lesions, the animals were euthanized. Estrogen level analyzes were performed, of oxidative stress in the liver (nitric oxide), and the measurement of the area of periapical lesions by digital radiography and femoral BMD and jaw tomography multislice. The data were submitted to the unpaired *t* test with significance level set at 5% ($P < 0.05$). The results showed no statistical difference in the size of the periapical lesion between the OVX and SHAM groups. However, the levels of estrogen and uterine weight was significantly lower for the OVX group than for the SHAM, showing the model of osteoporosis. In addition, oxidative stress analysis showed that ovariectomy induced a significant increase of nitric oxide in the OVX group compared to the SHAM group. Regarding bone parameters, BMD in the condyle of the femur was significantly lower in the OVX group than in the SHAM group, but the jaw significant differences were found between the two groups. Although osteoporosis have influenced the level of nitric oxide and have had an effect on BMD of the femur in ovariectomized rats, the data revealed that the systemic condition did not change the size of periapical lesions induced in *Wistar* rats.

Keywords: Menopause. Osteoporosis. Periapical Periodontitis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO

- figura 1– Mensurações realizadas no fêmur: a 2 mm (A), a 8,5 mm (B) e a 17 mm (C) da cartilagem de crescimento. 34
- figura 2 – Análise comparativa do tamanho da lesão periapical, mensurada em mm², entre os grupos OVX e SHAM (A); Imagem radiográfica representando a delimitação da lesão periapical (B). Os valores estão expressos em média e erro padrão da média (de 7 a 9 animais por grupo)..... 35
- figura 3 – Análise comparativa do peso do útero (em gramas) entre os grupos OVX e SHAM (A); Nível de estrogênio mensurado nos grupos OVX e SHAM (B). Os valores estão expressos em média e erro padrão da média (de 7 a 9 animais por grupo)..... 35
- figura 4 – Análise comparativa do níveis de NO entre os grupos OVX e SHAM. Os valores estão expressos em NO/g do fígado)..... 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Média e Desvio Padrão (DP) da Densidade Mineral Óssea em unidades de Hounsfield (HU)	34
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	O METABOLISMO ÓSSEO E A OSTEOPOROSE	15
1.2	DIAGNÓSTICO DA OSTEOPOROSE	18
1.3	OSTEOPOROSE E O ESTRESSE OXIDATIVO	19
1.4	MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOPOROSE EM RATAS	21
2	ARTIGO	23
3	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38
	ANEXO A - GUIDELINE PARA PUBLICAÇÃO DO ARTIGO NA REVISTA JOURNAL OF ENDODONTICS	43
	ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-PUCRS)	49

1 INTRODUÇÃO

A periodontite apical é um processo inflamatório causado por microrganismos presentes no sistema de canais radiculares, que afeta os tecidos periapicais (KAKEHASHI et al., 1965). É considerada uma reação imunopatológica do organismo frente ao estímulo oriundo dos microrganismos presentes no canal radicular resultando, frequentemente, em destruição dos tecidos periapicais. A lesão periapical, então, seria uma consequência da bem sucedida defesa imunológica do hospedeiro (TEN CATE, 1994; NAIR, 1997). O tratamento endodôntico visa eliminar ou reduzir a quantidade desses microrganismos e promover a cura dos tecidos perirradiculares (BYSTRÖM & SUNDQVIST, 1981). Apesar de a terapia endodôntica ter alto índice de sucesso, estudos têm demonstrado que algumas condições sistêmicas, como a osteoporose, podem alterar a progressão e a severidade das lesões periapicais, devido à menor densidade óssea e a maior velocidade de reabsorção (GILLES et al., 1997; JIANG et al., 2003; SOARES & GOLDBERG et al., 2001; IWAMA et al., 2003; ZHANG et al., 2007).

A osteoporose é considerada um distúrbio osteometabólico caracterizado pela redução da densidade óssea mineral e pela deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, levando a um aumento da fragilidade esquelética e do risco de fraturas (CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE ON OSTEOPOROSIS, 2014). A diminuição lenta e progressiva da massa óssea compromete a integridade do arcabouço ósseo e diminui sua resistência, propiciando fraturas dos ossos mesmo quando acometidos pelos mínimos esforços (BRAVO et al., 1996). Ela pode ser localizada em determinados ossos, como ocorre na osteoporose por desuso, ou pode envolver todo o esqueleto, sendo classificada como primária (fisiológica) ou secundária (causada por alguma doença, alteração sistêmica, deficiência alimentar ou medicação). Quando utilizado sozinho, o termo osteoporose, geralmente, refere-se às suas apresentações fisiológicas mais comuns: a osteoporose senil e a osteoporose pós-menopausa.

Tendo em vista que a perda óssea é a principal consequência da osteoporose e que o controle da infecção na terapia endodôntica em dentes com lesão periapical está vinculado à regressão da lesão mediante a deposição de tecido ósseo, a osteoporose e as periapicopatias apicais podem estar relacionadas, já que compartilham fatores que podem interferir ou modular ambas as doenças. Deste modo, torna-se relevante considerar os aspectos relacionados à influência da osteoporose na progressão lesão periapical.

1.1 O METABOLISMO ÓSSEO E A OSTEOPOROSE

O tecido ósseo é o principal componente do esqueleto humano. É um dos tecidos mais rígidos e resistentes do corpo e, embora com uma estrutura relativamente leve, a sua arquitetura permite suportar forças consideráveis, resultantes do peso do corpo e da tensão muscular (SZEJNFELD, 2000).

O tecido ósseo é constituído por uma matriz extracelular e por células. A Matriz Extracelular (MEC) ou matriz óssea é constituída por dois componentes, um inorgânico (65%) e outro orgânico (35%) (SEELEY et al., 1997). Na porção inorgânica predominam os íons cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (PO_4^{3-}), que se encontram na forma de cristais de fosfato de cálcio denominados hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (SEELEY et al., 1997; CLARKE et al., 2008). Já na parte orgânica da matriz predominam as fibras de colágeno tipo I (90 a 95%) e a parte restante é constituída por glicoproteínas não colágenas (por exemplo, a osteocalcina que é a proteína não colágena mais abundante da matriz óssea), substância fundamental e células (SZEJNFELD, 2000).

Os componentes celulares do osso são osteoclastos, osteócitos e as células osteogênicas, conhecidas como osteoblastos e as células de revestimento ósseo (SZEJNFELD, 2000).

Os osteoblastos são considerados as células chave do processo de formação óssea (GALLAGHER & SAI, 2010), pois sintetizam a parte orgânica da matriz óssea. A matriz recém-sintetizada deposita-se em torno do osteoblasto, envolvendo-o antes de sofrer o processo de mineralização, esta matriz denomina-se osteóide. Os osteóides são compostos, principalmente, por colágeno tipo I, e são rapidamente convertidos em matriz óssea pela deposição, sobre si, de cristais de fosfato de cálcio. A membrana plasmática do osteoblasto é rica em fosfatase alcalina, que aliada à osteocalcina, fornece o ambiente favorável para a mineralização da matriz. As células de revestimento ósseo se originam a partir daqueles osteoblastos que não foram envolvidos pela matriz óssea durante a fase de formação do tecido ósseo (SZEJNFELD, 2000).

Os osteócitos são as células mais abundantes do osso (GALLAGHER & SAI, 2010). Localizam-se nas lacunas da matriz óssea, e possuem prolongamentos citoplasmáticos longos e finos que os conectam aos osteócitos vizinhos e às demais células ósseas. Essa rede de células interconectadas permite o intercâmbio de diversas moléculas entre o tecido ósseo e o meio externo, contribuindo, assim, para a manutenção da homeostase óssea (SEELEY et al., 1997).

Os osteoclastos têm origem a partir de células da linhagem monocítica-macrofágica (precursores mononucleados) da medula óssea (ROODMAN, 1999). São células de grandes dimensões, multinucleadas, que desempenham um papel importante na remodelação óssea e na homeostasia (SZEJNFELD, 2000). Os osteoclastos apresentam pregas na membrana plasmática que se aderem à matriz óssea, criando um microambiente fechado, para onde segregam ácidos, colagenases e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP - do inglês, *tartrate-resistant acid phosphatase*) que degradam a parte orgânica da matriz e dissolvem os cristais de hidroxiapatita (ROODMAN, 1999). A solubilidade da parte inorgânica da matriz conduz à libertação de íons cálcio da matriz para a corrente sanguínea, intervindo, desta forma, na homeostasia de cálcio sanguíneo (SEELEY et al., 1997). Além disso, a membrana dos osteoclastos possui receptores para o estrogênio e para a calcitonina, os quais são poderosos inibidores hormonais da reabsorção óssea (BRAIDMAN et al., 2001).

A Densidade Mineral Óssea (DMO) aumenta progressivamente desde o nascimento e atinge seu pico ao redor da 3ª década de vida, quando se inicia um pequeno déficit na formação da massa óssea. A remodelação óssea é responsável pelo crescimento e modelação do tecido ósseo, esse processo deve-se às células ósseas responsáveis pela atividade de formação e de reabsorção do tecido ósseo (SZEJNFELD, 2000). A remodelação está presente durante toda vida, sendo um processo contínuo de destruição e renovação, intimamente relacionado com a homeostasia do cálcio e fósforo. Este processo se dá em unidades de remodelação óssea e caracteriza-se por acoplamento das funções dos osteoclastos e osteoblastos (CLARKE, 2008).

Resumidamente, o processo de remodelação é composto por quatro fases sequenciais. A 1ª fase consiste na ativação de células precursoras de osteoclastos e concentram-se sobre a superfície óssea que será absorvida. A 2ª fase é a reabsorção do osso pelos osteoclastos maduros, a 3ª fase consiste na reversão da reabsorção, ou seja, os osteoclastos desaparecem da unidade de reabsorção e, a 4ª fase caracteriza-se pela formação de um novo osso pela ação dos osteoblastos (GALLAGHER & SAI, 2010).

Em geral, há um excelente equilíbrio entre a reabsorção por osteoclastos e a subsequente restauração do osso pelos osteoblastos. Há evidências que na osteoporose, a perda do osso é resultado de um desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea, sendo que há uma atividade maioritária dos osteoclastos em relação aos osteoblastos (SEELEY et al., 1997; RAISZ, 2005; MANOLAGAS, 2000).

Inúmeros fatores sistêmicos e locais atuam sobre esse sistema, entre as alterações hormonais mais conhecidas relacionadas ao processo de remodelamento ósseo destaca-se a

ação de hormônios que agem sobre a formação óssea, como a calcitonina (CHAMBERS & MAGNUS, 1982) que age como um antagonista fisiológico do Paratormônio (PTH) em relação ao cálcio e o hormônio do crescimento, principalmente nos primeiros anos de vida (SØGAARD et al., 1997). Outros hormônios têm atuação sobre a estimulação da reabsorção óssea, como o PTH (SØGAARD et al., 1997), concentrações baixas de vitamina D3 (KASSTAD et al., 2001) e o declínio dos níveis de estrogênio, que leva à rápida perda óssea e é a principal causa da osteoporose pós-menopausa (LIU & HOWARD, 1991).

Os estrogênios são hormônios derivados do colesterol e sintetizados nos tecidos adrenais e gonadais. Representam um conjunto de hormônios denominados de estradiol, estrona e estriol, com o estradiol ocorrendo em maior concentração plasmática. Durante o período reprodutivo, o estrogênio predominante na circulação é o estradiol, hormônio produzido pelos folículos ovarianos em maturação (CLARK et al., 1992).

O estrogênio tem capacidade de diminuir a diferenciação das células progenitoras dos osteoclastos (SATO et al., 2001) e inibir a atividade de reabsorção óssea dos osteoclastos já diferenciados (RAISZ, 2005). Esse hormônio liga-se aos osteoblastos, induzindo ao aumento da produção de OPG responsável por impedir a maturação dos osteoclastos, controlando a perda óssea (BORD et al., 2004).

No início da puberdade, os estrogênios são secretados em grandes quantidades e promovem proliferação celular, crescimento dos órgãos sexuais femininos e desenvolvimento dos aparelhos reprodutivos. Além destes efeitos, o estrogênio aumenta a intensidade de crescimento dos ossos longos durante a puberdade e acelera a união das epífises às hastes destes ossos (CLARK et al., 1992).

Em torno de 45 anos de idade, devido à perda da função ovariana e o início da menopausa, há uma redução e paralisação da produção/secreção de estrogênio pela gônada feminina, e conseqüente redução dos níveis de estrogênio. A deficiência desse hormônio resulta em altas taxas de remodelação óssea, sendo que a reabsorção excede a formação, levando, dessa forma, a uma perda de massa óssea corporal (RIGGS et al., 1998). Estudos demonstram que o estrogênio desempenha um papel importante na manutenção da massa óssea, tanto indiretamente pela inibição da osteoclastogênese, quanto diretamente por inibição da função dos osteoclastos (WRONSKI et al., 1988; SRIVASTAVA et al., 2001). Assim, a deficiência de estrogênio causa perda óssea, podendo levar a um quadro de osteopenia e posteriormente a osteoporose (JEFFCOAT, 2005).

1.2 DIAGNÓSTICO DA OSTEOPOROSE

Várias técnicas não-invasivas estão disponíveis para estimar a massa ou densidade esquelética. Entre essas técnicas destacamos a absorciometria de raios X com energia dupla (DXA) e com energia única, tomografia computadorizada quantitativa (TC) e ultrassonografia. Todas essas técnicas para medição da DMO foram aprovadas pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) com base na capacidade de predizer o risco à fratura.

Atualmente, a densitometria óssea por DXA é considerada o método “padrão-ouro” para o diagnóstico da osteoporose, para avaliação do risco a fraturas e para o acompanhamento da doença, pois apresenta uma alta sensibilidade e precisão. Quando comparada com a radiografia, a DXA apresentou maior reprodutibilidade, menor dose de radiação e melhor resolução de imagens (WATTS, 2004).

No entanto, estudos recentes têm mostrado que a Tomografia Computadorizada (TC) também se mostra um método eficaz para avaliação da DMO, pois permite a aquisição volumétrica, ou seja, obter imagens tridimensionais, eliminando, desta maneira, a sobreposição de estruturas anatômicas. É capaz, ainda, de diferenciar tecidos moles e estruturas ósseas (SCARFE et al. 2006; FERREIRA, 2010).

A Tecnologia Multislice (TCM), também conhecida como multidetectores, por sua vez, permite o escaneamento rápido e reconstruções de imagens em alta definição, facilitando a interpretação radiográfica. Com isso é possível obter uma grande melhoria na qualidade de imagem nas reconstruções multiplanares (plano coronal e sagital), bem como na reconstrução em terceira dimensão (3D), além de reduzir sensivelmente o tempo de exame, quando comparado às gerações anteriores de tomógrafos (BAUM et al., 2000; BRINK et al., 1994; KALENDER et al., 1990).

A TCM mede o coeficiente de atenuação dos diferentes tecidos analisados e permite a caracterização do tipo de tecido em relação à sua densidade. Quanto menor a densidade do tecido, menor seu coeficiente de atenuação e quanto maior a densidade do tecido, maior será o coeficiente de atenuação (SILVA, 2011). O coeficiente de atenuação é representado de forma numérica na escala de valores de nominadas Unidades de Hounsfield (HU) (WEISHAUPT et al., 2001; TAY et al., 2012).

1.3 OSTEOPOROSE E O ESTRESSE OXIDATIVO

A geração de radicais livres é uma consequência natural da vida e ocorre continuamente nas células como subprodutos do metabolismo. Os radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativos que possuem um elétron desemparelhado no seu orbital mais externo. Apresentam poder oxidante podendo emparelhar seu elétron a moléculas importantes como lipídeos da membrana das células num processo denominado lipoperoxidação (LPO). Os radicais livres também são denominados espécies reativas de oxigênio, e este termo abrange os radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (OH^{\bullet}), peroxila (RO_2^{\bullet}), alcoxila (RO^{\bullet}) e os derivados não radicais potencialmente oxidantes como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HClO), o ozônio (O_3), entre outros. Além das espécies reativas de oxigênio, as espécies reativas de nitrogênio como o radical óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o peróxido nítrico ($ONOO^-$) também são potencialmente danosas. Depois de formados, esses compostos produzem uma reação de oxidação em cadeia onde um radical livre reage com um composto não radical, formando outro radical livre e assim sucessivamente, resultando na destruição, modificação ou inativação de inúmeras moléculas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000).

O estresse oxidativo é um importante evento que está relacionado com uma série de processos patológicos, como por exemplo, câncer, isquemia, arteriosclerose, diabetes, mal de Alzheimer e osteoporose. Diversos estudos observaram o papel das espécies reativas de oxigênio na patogênese da perda óssea (BASU et al., 2001; MAGGIO et al., 2003). Estudos *in vitro* ou em modelos animais mostraram que o estresse oxidativo tem um importante impacto na diferenciação e na função dos osteoclastos (GARRETT et al., 1990; BAX et al., 1992; LEAN et al., 2003) e osteoblastos (BAI et al., 2004).

A proteção contra o dano oxidativo é providenciada pelas defesas antioxidantes, incluindo enzimas como Catalase (CAT) que é responsável pela detoxificação do H_2O_2 e a Glutathione Peroxidase (GSH-Px) que quebra os peróxidos derivados da oxidação de fosfolipídeos de membranas e, por defesas não enzimáticas como as vitaminas A, C, E, B2 (riboflavina), isoflavinas e alguns compostos de baixo peso molecular como a glutathione, o ácido lipóico e o estrogênio (SALVADOR & HENRIQUES, 2004). O estrogênio apresenta atividade antioxidante por apresentar um grupamento hidrofénolico em sua molécula, o que lhe confere ação como “scavenger” de radicais livres, diminuindo a formação de espécies reativas de oxigênio (NIKI & NAKANO, 1990).

Em mulheres pós-menopausa ocorre queda do estrogênio e redução da massa óssea devido a um aumento da velocidade do remodelamento ósseo, favorecendo o processo de

osteoclastogênese em conjunto com diminuição da sobrevivência de osteoblastos (MANOLAGAS, 2000). A diminuição de massa óssea associada com o envelhecimento está ligada também ao estresse oxidativo. Modelos de ratas de envelhecimento precoce e sinais de danos oxidativos apresentam características osteoporóticas. Além disso, estudos clínicos em mulheres com osteoporose mostraram uma associação entre o aumento do estresse oxidativo, tanto com níveis plasmáticos mais baixos de antioxidantes quanto com a diminuição da DMO (BASU et al., 2001; MAGGIO et al., 2003).

O óxido nítrico é uma espécie reativa de nitrogênio produzido em quantidades significativas durante a resposta inflamatória por macrófagos e outras células do sistema imune. A produção do óxido nítrico ocorre através da ativação da NO sintase (iNOS), enzima precursora do NO, na cascata inflamatória. Nestas circunstâncias, esse radical livre gera danos às metalo-proteínas contendo cobre e ferro, liberando seus íons metálicos e ocasionando a formação de radicais hidroxila e oxigênio molecular, que possuem elevado potencial oxidante (HIBBS et al., 1987).

Estudos *in vivo* demonstraram o potencial efeito anti-inflamatório do estrogênio (CUZZOCREA, 2001). A deficiência desse hormônio resulta no aumento dos níveis de iNOS, ocasionando maior produção e acúmulo de NO no tecido ósseo. Portanto, podemos considerar o NO um importante marcador de atividade de estresse oxidativo na osteoporose (SALVATORE et al., 2013). Os altos níveis desse radical livre estão diretamente relacionados com a diminuição da DMO, uma vez que ele é considerado um marcador de supressão da proliferação e diferenciação de osteoblasto, além de induzir a diferenciação de osteoclastos (RIANCHO et al., 1995; SALVATORE et al., 2013).

A avaliação do estresse oxidativo pode ser feita diretamente, por meio da aferição da concentração de espécies reativas em fluidos biológicos e tecidos, ou indiretamente, mediante a avaliação dos danos que causam às células (MAYNE, 2003). A avaliação da atividade da iNOS é realizada através da análise da concentração dos produtos de espécies relacionadas ao NO, uma vez que sua curta meia-vida dificulta a avaliação quantitativa da produção *in vivo* nos tecidos. Entre as espécies citadas, as concentrações plasmáticas dos principais produtos da oxidação do NO mais comumente utilizadas são os nitratos e nitritos (YOON et al., 2000; TSUKADA et al., 1998; SALVATORE et al., 2013).

1.4 MODELO EXPERIMENTAL DE OSTEOPOROSE EM RATAS

O rato tem sido comumente utilizado para estudar os mecanismos reguladores do metabolismo do cálcio em processos patológicos como a osteoporose, pois constitui um bom modelo de estudo para verificar a incidência de perda de massa óssea (HODGKINSON, 1979) em virtude do tamanho, da facilidade de alimentação, manuseio e de execução dos procedimentos, além do custo operacional e da resistência à infecções e doenças (TURNER et al., 2001; PEARCE et al., 2007).

Segundo FROST & JEE (1992), os principais mecanismos biológicos responsáveis pelo ganho e perda da massa óssea durante o crescimento normal e na vida adulta, bem como na osteoporose, são os mesmos em humanos. Em relação ao reparo ósseo, o rato também provê um bom modelo para análise de agentes na regeneração desta estrutura corporal. Ademais, nas ratas ovariectomizadas, a prevenção da osteopenia com estrogênio parece ser semelhante ao da mulher.

Assim como no homem, o osso do rato não cresce continuamente durante sua vida. Em ratas, ocorre um rápido crescimento até os 6 meses de idade. Observa-se um aumento rápido do comprimento, peso, densidade e conteúdo de cálcio no fêmur de 1 a 3 meses de idade; depois deste período, a razão de crescimento se torna gradual. De 6 a 12 meses o crescimento é insignificante e cessa aos 18 meses. (KALU, 1991)

O modelo utilizando ratas idosas (12 meses de idade) possui características de perda óssea semelhantes às que ocorrem na pós-menopausa humana. Entretanto, ratas idosas são caras, sua disponibilidade é limitada e um longo período decorre antes que as manifestações ósseas ocorram. Por outro lado, ratas mais jovens (3 meses de idade) não são muito caras, são facilmente disponíveis e os efeitos ósseos da ovariectomia se manifestam dentro de um mês ou menos (KALU, 1991). Segundo CHAKRABORTY & GORE (2004), após uma semana da ovariectomia, os níveis de hormônios ovarianos já apresentam concentrações significativamente menores.

A técnica de ovariectomia consiste na remoção bilateral dos ovários, de forma a causar uma deficiência na produção de estrogênios, gerando assim efeitos clínicos semelhantes aos da menopausa (BACH & MILLER, 1994). É um método seguro para a indução de um modelo osteoporótico (PARK et al., 2010).

PENG et al. (1997), salientam que há muitas semelhanças entre a perda óssea induzida por ovariectomia em ratas e em mulheres após a menopausa, incluindo um metabolismo ósseo aumentado, uma desigualdade entre a reabsorção e a formação ósseas, uma maior perda de

osso trabecular em relação ao osso cortical, e uma fase inicial com rápida perda óssea, tornando-se lenta ao longo do tempo (WATANABE & HISHIYA, 2005; LELOVAS et al., 2008; PARK et al., 2010).

2 ARTIGO

Short period of osteoporosis induction does not influence the progression of apical periodontitis

Juliana Heckler Mello, DDS – Postgraduate Student, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

Mariana de Carlo Bello, MSc – Postgraduate Student, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

Carina Michelin, MSc – Postgraduate Student, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

Camilla dos Santos Tibúrcio Machado, MSc – Postgraduate Student, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

Carlos Frederico Brilhante Wolle, Dr.– Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, Brazil.

Maria Martha Campos, Dr. – Faculty of Dentistry / Institute of Toxicology and Pharmacology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brazil.

Gustavo Dalto Barroso Machado – Postgraduate Student, Pontifícia Universidade Católica de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Carlos Alexandre Souza Bier, Doctor – Department of Stomatology, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

Universidade Federal de Santa Maria

Corresponding author

Juliana Heckler Mello – Post-Graduation Student, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Rua Marechal Floriano Peixoto, 1184

Sala 312 – Prédio da Antiga Reitoria

Abstract

Aim: To evaluate the influence of osteoporosis in the development of periapical lesions induced in rats.

Methodology: 20 *Wistar* rats were divided into two experimental groups (n = 10): ovariectomy (OVX) and sham ovariectomy (SHAM). 21 days after surgery all animals were submitted to the periapical lesion induction procedures in the right mandibular first molar. After 35 days from the date of periapical lesions induction, the animals were euthanized. Estrogen level analysis was performed, as well as oxidative stress (nitric oxide) analysis and measurements of the area of periapical lesions through digital radiography, and of Bone Mineral Density (BMD) of the femur and jaw by multislice computed tomography. The data were submitted to the unpaired *t* test with significance level set at 5% ($P < 0.05$).

Results: There was no statistically significant difference in the size of the periapical lesion between the OVX and SHAM groups ($P < 0.05$). However, estrogen levels and uterine weight were significantly lower for the OVX group ($P < 0.05$ and $P < 0.0001$, respectively). BMD in the condyle of the femur was significantly lower in OVX ($P = 0.001$) group, but there were no differences in the mandible between the two groups ($P > 0.05$). The oxidative stress analysis showed that ovariectomy induced a significant increase of nitric oxide in the OVX group ($P < 0.01$).

Conclusion: Even though the osteoporosis induction caused a decrease in the BMD in femur, it did not cause significant alteration the BMD of the mandible, as well as changes in the size of the periapical lesions.

Keywords: Menopause. Osteoporosis. Apical periodontitis.

Introduction

Apical periodontitis is an inflammatory process caused by microorganisms present in the root canal system, which affects the periapical tissues (1). Studies have shown that systemic factors such as osteoporosis can influence the development, progression and severity of periapical disease (2, 3).

Osteoporosis is a bone metabolic disorder characterized by decreased bone mineral density (BMD) and microarchitectural deterioration of bone tissues, leading to increased skeletal fragility and fracture risk (4). The most common type of the disease occurs in postmenopausal women due to loss of ovarian function and consequent reduction in estrogen levels. The deficiency of this hormone results in changes in the bone remodeling process, and the resorption exceeds the formation, leading to the loss of bone mass (5). Studies have shown that estrogen plays an important role in maintaining bone mass, both indirectly by inhibiting osteoclastogenesis, or directly by inhibiting the function of osteoclasts (6, 7).

Another contributing factor to the deterioration of BMD is the cell damage caused by excessive generation of reactive oxygen species, resulting in oxidative stress (8). Evidence has shown that oxidative stress is associated with bone loss in osteoporotic patients (9-12).

Osteoporosis is considered a risk factor for the development and progression of periodontal disease due to increased propensity for bone loss (13-15). In endodontics, little is known about the relation of this disorder to the development of periapical injuries. Xiong et al. (20) evaluated the influence of estrogen deficiency in the development of periapical lesions in models of ovariectomized rats. The variation of the plasma estrogen concentration guaranteed by the reproduction of a postmenopausal osteoporosis model produces changes in bone microarchitecture (17, 18), which influences the resorption of the alveolar bone (19) and may aggravate the course of apical periodontitis (20). Thus, the aim of this study is to evaluate, through radiographic analysis, the development of periapical lesions in ovariectomized rats.

Materials and Methods

Twenty *Wistar* female rats, weighing between 150 and 200 grams and aged approximately 70 days, from the Center for Biological and Experimental Models (CeMBE) were used. The animals were kept under controlled conditions in the number of four animals per microisolator (temperature: 22 ± 1 °C, 70% humidity, and cycle of 12h light and 12h dark)

and with free access to food and water. The weight of animals was measured weekly to allow calculation of the anesthetic and analgesic substances. The experimental procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use (*Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA*) of the Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS) (CEUA Registration No. 15/00436).

Ovariectomy

In order to simulate menopause, ten animals underwent bilateral removal of the ovaries (ovariectomy - OVX) (21-23). In the control animals (n = 10), simulation of ovariectomy (SHAM) was carried out. The animals were anesthetized intraperitoneally with xylazine (10mg/kg; Anasedan, Sespo Industry and LTD Trade, Paulinia, SP, Brazil) and ketamine (100 mg/kg; Dopalen, Sespo Industry and LTD Trade, Paulinia, Brazil). During the first 48 hours, acetaminophen (80 mg/kg) was administered by gavage to eliminate any discomfort caused by surgery.

Induction of Periapical Lesion

Twenty-one days after ovariectomy surgery, the animals were anesthetized with a xylazine (10mg / kg) and ketamine (100mg / kg) and coronal opening of the right mandibular first molar was performed with spherical diamond burs of high rotation 1011 HL (KG Soarsen Ind. Ltda, Barueri, SP, Brazil), under constant cooling. The pulp chamber was left exposed to the oral environment for 35 days to allow the development of the periapical lesion.

Euthanasia

Fifty-six days after the beginning of the experimental phase, the animals were euthanized by deep anesthesia with Sevoflurane (BIOCHIMICO Institute Ind. Farm. Ltda, Rio de Janeiro, Brazil). Blood samples were quickly taken from the hearts of rats by cardiac puncture with vacutainer device (BD Vacutainer® Eclipse™ BloodCollectionNeedle) to analyze the level of estrogen. The uterus of each rat was removed and weighed on precision and liver samples were collected to measure the oxidative stress indicators. The right

mandible was removed and dissected for further realization of periapical radiography. The left mandible and femur were removed for analysis of BMD by multislice computed tomography.

Radiographic analysis

The hemimandibles of the right side were x-rayed in a standardized manner using a digital sensor (Digora, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland) and an x-ray machine (DabiAtlante, Ribeirão Preto, SP, Brazil). The area of periapical lesions associated with the apex of the mesial root of the first molar were measured and quantified in square millimeters (mm^2) (24, 25). Using ImageJ software (National Institute of Health, Washington, DC), an endodontist blinded to the experimental groups, performed the measurement of periapical lesion area in duplicate. The intraclass correlation coefficient was calculated to determine the reproducibility (ICC = 0.94).

BMD Analysis by Multislice Computed Tomography

The femur and left hemimandible underwent multislice computed tomography (BrightSpeed, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) to determine the BMD of each sample. The images were analyzed by a trained endodontist and blinded to the comparison groups, with OsiriX software (Pixmeo SARL, Geneva, Switzerland) and bone density measurements were obtained in Hounsfield Units (HU). The measurement of BMD was based on a previous study (26), with minor adaptations. BMD of the mandible was observed in the condyle and periapical region of the mesial root of the left first mandibular molar. In the femur, three measurements were carried out: the first measurement was obtained in the condyle, 2 mm far from the growth plate; the second and third step were performed in the epiphysis, 8.5 mm and 17 mm far from the cartilage growth, respectively (Figure 1). In the apical region of the mesial root of the first molar and femur, measurements were performed in the cortical and cancellous bone.

Analysis of the estrogen level

Blood was collected and centrifuged for 12 min to separate the plasma, and the level of estrogen was verified by chemiluminescence (Estradiol IMMULITE®, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA)

Analysis of Oxidative Stress

The parameter used to evaluate the oxidative stress was by quantifying the levels of nitric oxide (NO_x) in the liver by the methodology used in a previous study (27).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 4 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). All data were submitted to the Shapiro-Wilk normality test and subsequently submitted to unpaired *t* test. The level of statistical significance was set at 5% ($P < 0.05$).

Results

Radiographic analysis

The results showed no statistically significant difference between the groups regarding the area of apical periodontitis ($P > 0.05$), as illustrated in Figure 2A. The mean and standard error values for OVX and SHAM groups were respectively $1.403 \pm 0.322 \text{ mm}^2$ and $1.653 \pm 0.356 \text{ mm}^2$. Figure 2B illustrates the area of periapical periodontitis associated with the mesial roots of the first molar.

BMD

The results of the femoral and mandibular BMD are described in Table 1. There was no statistically significant difference between the OVX and SHAM groups related to the BMD of the mandible ($P > 0.05$). However, in the femoral condyle, the average density in the OVX group was significantly lower than in the SHAM group, regarding both the cancellous bone and the cortical bone ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

Analysis of Estrogen Level and Uterus Weight

The OVX group showed estrogen levels significantly lower than the SHAM group ($P < 0.05$) as well as uterine weight ($P < 0.001$) (Figure 3A and 3B).

Analysis of Oxidative Stress

The OVX group had significantly higher NOx levels than the SHAM group ($P < 0.01$), as shown in Figure 4.

Discussion

After menopause, women experience a decline in estrogen production. This condition is associated with increased bone resorption resulting in osteopenia or osteoporosis (18). The supporting periodontal tissue is susceptible to changes in the estrogen levels (20, 28), thus the deficiency of this hormone can aggravate apical periodontitis. This study aimed to evaluate the development of periapical lesions induced in rats with osteoporosis.

The results showed no significant differences in the size of the periapical lesion between OVX and SHAM rats after 35 days of pulp exposure. Xiong et al. (20) showed a significant increase in the size of periapical lesions in ovariectomized Sprague-Dawley rats (SD) compared to the control group after 20 days of induction of apical periodontitis. This inconsistency in the results can be explained by the use of a different lineage of rat in that experimental model, whereas the present study used *Wistar* rats. Fang et al. (29) showed that after ovariectomy, SD rats had significantly greater bone loss in the lumbar area (L5 and L6) than *Wistar* rats, leading to the conclusion that the two lineages are not equivalent models for the study of post-menopausal osteoporosis.

Regarding BMD, statistically significant differences were observed between the groups in both cortical and in the medullary portion of the condyle of the femur. However, BMD in the jaw between the OVX and SHAM groups was similar, which may explain the similarity in the size of the periapical lesion between the groups. According to Kuroda et al. (26), femur is more susceptible to estrogen deficiency than jaw. These data suggest that the jaw may require a longer period of estrogen deficiency than the femur to develop changes in bone patterns. These assumptions are related to the findings of a recent study that used a

longer period between ovariectomy and euthanasia and have shown a statistically significant difference in the size of the periapical lesion between SHAM and OVX groups (30).

Among the factors that lead to a reduction in BMD in the postmenopausal period, a highlight is the increase of oxidative stress generated by the production of reactive oxygen species. Oxidative stress is responsible for the occurrence of cellular damage and is closely related to the loss in bone density which occurs in osteoporosis (10). In the present study the evaluated parameter was NOx, which is considered as a regulatory molecule bone metabolism in humans and animals (31, 32). Excessive production of NOx increases cellular cytotoxicity, resulting in tissue damage (33). The high NOx levels are directly related to the decrease in BMD, since those levels are usually generated by iNOS, which is considered a marker of suppression of proliferation and differentiation of osteoblasts and induces the differentiation of osteoclasts (34, 35). This study found significantly higher levels of NOx in the OVX group. These results are in agreement with the study of Salvatore et al. (35), which suggests that iNOS and its NOx byproduct regulate bone resorption in estrogen deficient rats.

The use of mice as an animal model for experimenting systemic changes has been widely used because this model has many advantages such as low cost, easy handling and the possibility for standardization and control of many variables (6). In addition, mice have many similarities to humans in many respects, such as the presence of cortical and trabecular bone and bone changes similar to those observed at menopause, aging or resulting from ovariectomy (6). The osteoporosis model in rats is obtained by bilateral removal of ovaries, resulting in suppression of estrogen. Estrogen deficiency leads to reduction in weight of the uterus due to atrophy of the organ (36) and it has been proved to promote changes in the bone remodeling patterns (20, 37). This study found statistical difference in the weight of the uterus and estrogen levels between the groups, which proves the efficiency of the model. However, the time between ovariectomy and euthanasia and animal lineage are still conflict in the studies and can promote different metabolic responses depending on the methodology used (16,29,30,38).

Conclusion

The analyses demonstrate the efficiency of the reproduction of osteoporosis model. However, osteoporosis induction period was not sufficient to cause significant changes in the size of periapical lesions, since BMD was similar between the groups and a longer period of estrogen deficiency is required to cause changes in mandibular bone patterns.

References

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1965; 20:340-9.
2. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Provenzano JC, Guilherme BPS. Polymorphism of the FcγRIIIa gene and post-treatment apical periodontitis. *Journal of Endodontics* 2011; 37:1345–8.
3. Zhang X, Peng B, Fan M, Bian Z, Chen Z. The effect of estrogen deficiency on receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin synthesis in periapical lesions induced in rats. *Journal of Endodontics* 2007; 33(9):1053–6.
4. Consensus Development Conference: Prophylaxis and treatment of osteoporosis. *The American Journal of Medicine* 2014; 90.
5. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *Journal of Bone and Mineral Research* 1998; 13(5):763–73.
6. Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintron M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int.* 1989;45:360-6.
7. Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(12):8836-40.
8. Arias-Loza PA, Muehlfelder M, Pelzer T. Estrogen and estrogen receptors in cardiovascular oxidative stress. *Pflugers Arch* 2013; 465:739–746.
9. Manolagas SC. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis, *Endocr. Rev.* 2010; 31:266– 300.
10. Zhang JK, Yang L, Meng GL, Yuan Z, Fan J, Li D et al. Protection by salidroside against bone loss via inhibition of oxidative stress and bone-resorbing mediators. *PLoSOne* 8 [periódicoonline] 2013. Available on URL: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057251>
11. Sendur OF, Turan Y, Tastaban E, Serter M. Antioxidant status in patients with osteoporosis: a controlled study. *Joint Bone Spine* 2009; 76:514–518.
12. Baek KH, Oh KW, Lee WY, Lee SS, Kim MK, Kwon HS et al. Association of oxidative stress with postmenopausal osteoporosis and the effects of hydrogen peroxide on osteoclast formation in human bone marrow cell cultures. *Calcif. Tissue Int.* 2010; 87:226–235.
13. Zhang X, Peng B. Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. *Journal of Endodontics* 2005; 31:574–8.
14. Guiglia R, Di-Fede O, Lo-Russo L, Sprini D, Rini GB, Campisi G. Osteoporosis, jaw bone sand periodontal disease. *Medicina oral, Patología oral y CirugíaBucal* 2013; 18:93–9.
15. Geurs NC, Lewis CE, Jeffcoat MK. Osteoporosis and periodontal disease progression. *Periodontology* 2000; 32:105–10.
16. Gilles JA, Carnes DL, Dallas MR, Holt SC, Bonewald LF. Oral bone loss is increased in ovariectomized rats. *Journal of Endodontics* 1997; 23:419–22.
17. Amadei SU, Souza DM, Brandão AA, Rocha, RF. Influence of different durations of estrogen deficiency on alveolar bone loss in rats. *Brazilian Oral Research* 2011; 25(6):538–43
18. Anbinder AL, Prado MA, Spalding M, Balducci I, Carvalho YR, da Rocha RF. Estrogen deficiency and periodontal condition in rats: a radiographic and macroscopic study. *Brazilian Dental Journal* 2006; 17(3):201–7.

19. Zhang YB, Zhong ZM, Hou G, Jiang H, Chen JT. Involvement of oxidative stress in age-related bone loss. *J. Surg. Res* 2011; 169:37–42.
20. Xiong H, Peng B, Wei L, Zhang X, Wang L. Effect of an estrogen-deficient state and alendronate therapy on bone loss resulting from experimental periapical lesions in rats. *Journal of Endodontics* 2007; 33(11):1304–8.
21. Bach CM, Miller SC. Comparison of osteopenic changes in cancellous bone induced by ovariectomy and/or immobilization in adult rats. *The Anatomical Record* 1994; 239(3):243-54.
22. Peng ZQ, Väänänen HK, Zhang HX, Tuukkanen J. Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. *Bone* 1997; 20(3):207-12.
23. Park SB, Lee YJ, Chung CK. Bone mineral density changes after ovariectomy in rats as an osteopenic model: stepwise description of double dorso-lateral approach. *Journal of Korean Neurosurgical Society* 2010; 48(4):309-12.
24. Wolle CFB, Zollmann LA, Etges A, Vitalis GS, Leite CE, Campos MM. Effects of the antioxidant agent tempol on periapical lesions in rats with doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Journal of Endodontics* 2012; 38(2):191-5.
25. Wolle CFB, Zollmann LA, Bairros PO, Etges A, Leite CE, Morrone FB, Campos MM. Outcome of periapical lesions in a rat model of type 2 diabetes: refractoriness to systemic antioxidant therapy. *Journal of Endodontics* 2013; 39(5):643-7.
26. Kuroda S, Mukohyama H, Kondo h, Aoki K, Ohya K, Kasugai S. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and periapical quantitative computed tomography. *Oral Diseases* 2003; 9(1):24-28.
27. Bruning CA, Prigol M, Luchese C, Jesse CR, Duarte MMMF, Roman SS et al. Protective Effect of Diphenyl Diselenide on Ischemia and Reperfusion-Induced Cerebral Injury: Involvement of Oxidative Stress and Pro-Inflammatory Cytokines. *Neurochem Res* 2012; 37:2249–2258.
28. Duarte PM, 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. *Journal of Periodontology* 2004; 75(9):1196-202.
29. Fang J, Yang L, Zhang R, Zhu X, Wang P. Are there differences between Sprague-Dawley and Wistar rats in long-term effects of ovariectomy as a model for postmenopausal osteoporosis? *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(2):1491-1502.
30. Brasil SC, Santos RMM, Fernandes A, Alves FRF, Pires FR, Siqueira Jr & Armada L. Influence of estrogen deficiency on the development of apical periodontitis. *International Endodontic Journal* 2016 [online version]. Available on URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iej.12612/abstract>.
31. Van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology*. 2001; 103:255-61
32. Caballero-Alias AM, Loveridge N, Lyon A, Das-Gupta V, Pitsillides A, Reeve J. NOS isoforms in adult human osteocytes: multiple pathways of NO regulation? *Calcif Tissue Int*. 2004; 75:78-84.
33. Grabowski PS, Wright PK, Van't Hof RJ, Helfrich MH, Ohshima H, Ralston SH. Immuno localization of inducible nitric oxide synthase in synovium and cartilage in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Br J Rheumatol* 1997; 36:651–655.
34. Riancho JA, Salas E, Zarrabeitia MT, Olmos JM, Amado JA, Fernandez-Luna JL et al. Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. *J Bone MinerRes* 1995; 10:439–446.
35. Salvatore C, Emanuela M, Laura D, Tiziana G, Rosanna DP, ZairaR et al. Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. *Endocrinology* 2013; 144:1098–1107.

36. Lopez-Belmonte J, Nieto C, Estevez J, Delgado JL, del Prado JM. Comparative uterine effects on ovariectomized rats after repeated treatment with different vaginal estrogen formulations. *Maturitas* 2012; 72:353–8, 2012.
37. Kalu DN. The ovariectomized rat model of post-menopausal bone loss. *Bone Miner* 1991; 15:175-92.
38. Gomes-Filho JE, Wayama MT, Dornelles RCM, Ervolino E, Yamanari GH, Lodi CS et al. Raloxifene modulates regulators of osteoclastogenesis and angiogenesis in an oestrogen deficiency periapical lesion model. *International Endodontic Journal* 2015; 48:1059–1068.

Table 1 - Mean and Standard Deviation (SD) of Bone Mineral Density in Hounsfield Units (HU).

	Cortical (Mean \pm SD)		<i>P</i>	Cancellous (Mean \pm SD)		<i>P</i>
	OVX	SHAM		OVX	SHAM	
<i>Femur</i>						
2mm	1211,80 \pm 211,84	1476,39 \pm 166,95	0.017	498,50 \pm 157,18	875,67 \pm 251,50	0.002
8,5mm	1451,02 \pm 237,04	1448,96 \pm 210,57		0.986	666,55 \pm 268,86	
17mm	1690,13 \pm 164,23	1777,14 \pm 226,03	0.387	756,94 \pm 270,67	766,00 \pm 244,78	0.946
<i>Mandible</i>						
Periapical	1999,00 \pm 120,49	2022,00 \pm 213,61	0.853	1435,67 \pm 177,13	1701,41 \pm 169,36	0.114
Condyle*	1404,34 \pm 331,29	1526,46 \pm 254,46	0.490			

* For the condyle it was not possible to distinguish cortical and cancellous bone.

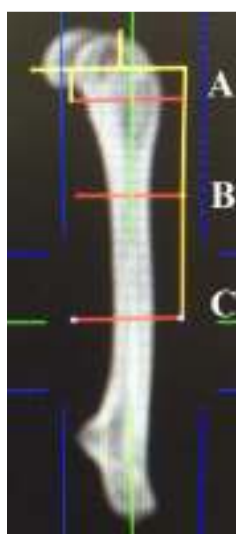


Figure 1 – Measurements performed on the femur: 2 mm (A), 8.5 mm (B) and 17 mm (C) of growth cartilage.

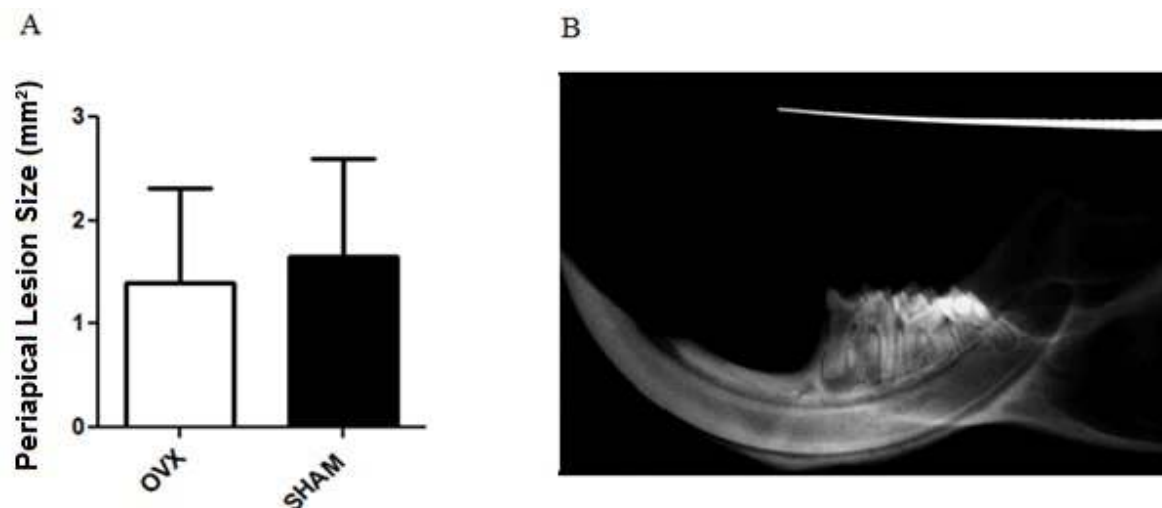


Figure 2 – Comparative analysis of the periapical lesion size, measured in mm², between OVX and sham groups (A); radiographic image representing the delimitation of apical periodontitis (B). Values are expressed as mean and standard error of the mean (7-9 animals per group).

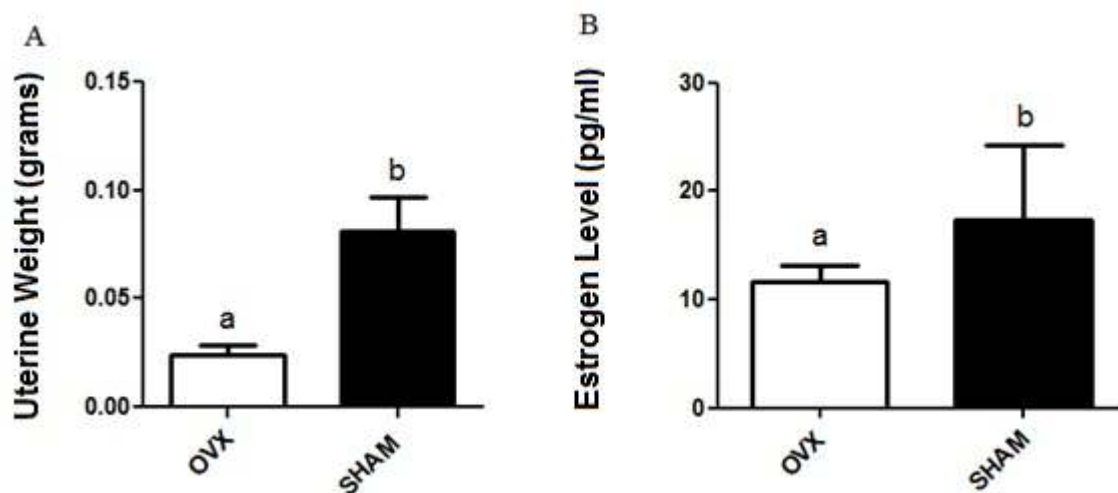


Figure 3 – Comparative Analysis of uterine weight (grams) between OVX and sham groups (A); estrogen level measured in OVX and SHAM groups (B). Values are expressed as mean and standard error of the mean (7-9 animals per group).

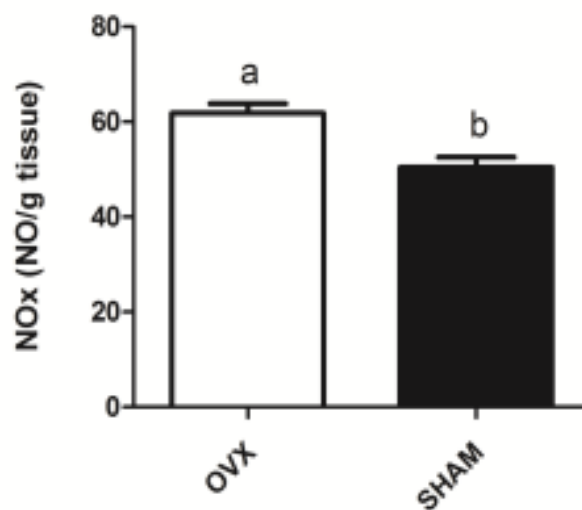


Figure 4 – Comparative analysis of NO levels between the OVX and SHAM groups. Values are expressed as mean and standard error of the mean (7-9 animals per group).

3 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo não mostraram diferença no tamanho da lesão periapical induzida entre ratas ovariectomizadas e ratas controle. Pressupõe-se que o tempo experimental adotado possa ter influenciado no resultado encontrado, pois não houve alteração na densidade mineral óssea da mandíbula nas ratas ovariectomizadas.

Mesmo que a densidade mineral óssea da mandíbula não tenha sofrido alteração significativa nas ratas ovariectomizadas, podemos afirmar a eficiência do modelo de reprodução da osteoporose, uma vez que os indicadores sistêmicos avaliados (peso de útero, nível de estrogênio, nível de óxido nítrico e alterações na densidade mineral óssea do fêmur) foram compatíveis com os modelos descritos pela literatura.

Adicionalmente, outras análises estão sendo realizadas a fim de complementar os resultados desse estudo. Estas compreendem a avaliação do infiltrado inflamatório dos tecidos periapicais por histologia e mensuração do volume da lesão periapical por microtomografia computadorizada. Portanto, somente após a finalização dessas avaliações é que será possível obter uma conclusão definitiva a respeito dos achados encontrados nesse estudo.

REFERÊNCIAS

- BACH, C.M.; MILLER, S. C. Comparison of osteopenic changes in cancellous bone induced by ovariectomy and/or immobilization in adult rats. **The Anatomical Record**, v. 239, n. 3, p. 243-54, 1994.
- BAI, X. C. et al. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF- κ B. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 314, n. 1, p. 197-207, 2004.
- BASU, S. et al. Association between oxidative stress and bone mineral density. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 288, n. 1, p. 275-9, 2001.
- BAUM, U. et al. Imaging of head and neck tumors-methods: CT, spiral-CT, multislice-spiral-CT. **Eur J Radiol**, v. 33, n. 3, p. 153-60, 2000.
- BAX, B. E. et al. Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 183, n. 3, p. 1153-8, 1992.
- BORD, S. et al. Estrogen stimulates differentiation of megakaryocytes and modulates their expression of estrogen receptors alpha and beta. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 92, n. 2, p. 249-57, 2004.
- BRAIDMAN, I. P. et al. Localization of Estrogen Receptor beta Protein Expression in Adult Human Bone. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 2, p. 214-20, 2001.
- BRAVO, G. et al. Impact of a 12-month exercise program on the physical and psychological health of osteopenic women. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 44, n.7, p. 756-62, 1996.
- BRINK, J.A. et al. Helical CT: principles and technical considerations. **Radiographics**, v. 14, n. 4, p. 887-93, 1994.
- BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 89, n. 4, p. 321-8, 1981.
- CHAKRABORTY, T. R.; GORE, A. C. Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. **Experimental Biology and Medicine**, v. 229, n.10, p. 977-87, 2004.
- CHAMBERS, T. J.; MAGNUS, C. J. Calcitonin alters behavior of isolated osteoclasts. **The Journal of Pathology**, v. 36, p. 27-39, 1982.
- CLARK, J. H. et al. Mechanisms of action of steroid hormones. In: WILSON, J. D.; FOSTER, W. D. **William textbook of endocrinology**. 8. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. cap. 3, p.35-90.

CLARKE, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, suppl 3, p. 131–9, 2008.

CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE: Prophylaxis and treatment of osteoporosis. **The American Journal of Medicine**, v. 90, 2014.

CUZZOCREA, S. et al. The protective role of endogenous estrogens in carrageen an induced lung injury in the rat. **Molecular Medicine**, v. 7, p.478–487, 2001.

FERREIRA, M. C. Avaliação da espessura das tábuas óssea alveolar, vestibular e lingual dos maxilares, por meio da tomografia computadorizada de feixe cônico (cone beam). **Dental Press J. Orthod**, v.15, n.1, 2010.

FROST, H. M.; JEE, W. S. S. On the rat model of human osteopenias and osteoporosis. **Bone and Mineral**, v. 18, n. 3, p. 227-36, 1992.

GALLAGHER, J. C.; SAI, A. J. Molecular biology of bone remodeling: Implications for new therapeutic targets for osteoporosis. **Maturitas**, v. 65, n. 4, p. 301-7, 2010.

GARRETT, I. R. et al. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. **Journal of Clinical Investigation**, v. 85, n. 3, p. 632–9, 1990.

GILLES, J. A. et al. Oral bone loss in increased in ovariectomized rats. **Journal of Endodontics**, v. 23, n. 7, p. 419-22, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. New York : Oxford, 3. Ed, 2000.

HODGKINSON, A. Effects of calcium deprivation and or chidectomy on bone composition in the rat. **Hormone and Metabolic Research**, v.11, n.9, p.516-9, 1979.

HIBBS, J.B.; VAVRIN, Z.; TAINTOR, R.R. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. **Res. Immunol**, v.138, p.550-565, 1987.

IWAMA, A. et al. The effect of high sugar intake on the development of periradicular lesions in rats with type 2 diabetes. **Journal of Dental Research**, v. 82, n. 4, p. 322-5, 2003.

JEFFCOAT, M. The association between osteoporosis and oral bone loss. **Journal of Periodontology Research**, v.76, suppl. 11, p.2125-32, 2005.

JIANG, G.; MATSUMOTO, H.; FUJII, A. Mandible bone loss in osteoporosis rats. **Journal of Bone Mineral Metabolism**, v. 21, n. 6, p. 388-95, 2003.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 20, p. 340-9, 1965.

KALENDER, W.A. et al. Spiral volumetric CT with single-breath-hold technique, continuous transport, and continuous scanner rotation. **Radiology**, v.76, n. 1, p. 181-3, 1990.

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone and Mineral**, v. 15, n. 3, p. 175-192, 1991.

KASSTAD, T. S. et al. Vitamin D deficiency and ovariectomy reduced the strength of the femoral neck in rats. **Calcified Tissue International**, v. 69, n. 2, p. 102-8, 2001.

LEAN, J. M. et al. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. **Journal Clinical Investigation**, v. 112, n. 6, p. 915–23, 2003.

LELOVAS, P. P. et al. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. **Comparative Medicine**, v. 58, n. 5, p. 424-30, 2008.

LIU, C. C, HOWARD, G. A. Bone-cell changes in estrogen-induced bone-mass, increase in mice: dissociation of osteoclasts from bone surfaces. **The Anatomic Record**, n. 229, n. 2, p. 240-50, 1991.

MAGGIO, D. et al. Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of across-sectional study. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 4, p. 1523–7, 2003.

MANOLAGAS, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 2, p. 115-37, 2000.

MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 933S-940S, Supplement 3, 2003.

NAIR, P. N. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. **Periodontol 2000**, v. 13, n. 1, p. 121-48, 1997.

NIKI, E.; NAKANO, M. Estrogens as antioxidants. **Methods in Enzymology**, v.186, p.330-3, 1990.

PARK, S. B.; LEE, Y. J.; CHUNG, C. K. Bone mineral density changes after ovariectomy in rats as an osteopenic model: stepwise description of double dorso-lateral approach. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 48, n. 4, p. 309-12, 2010.

PEARCE, A. et al. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. **European Cells and Materials**, v. 13, n.1, p. 1-10, 2007.

PENG, Z. Q. et al. Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. **Bone**, v. 20, n. 3, p. 207-12, 1997.

RAISZ, L. G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 12, p. 3318-25, 2005.

RIANCHO, J. A. et al. Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. **J Bone Miner Res**, v. 10, p. 439–446, 1995.

RIGGS, B. L.; KHOSLA, S.; MELTON, L. J. A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 13, n. 5, p. 763–73, 1998.

ROODMAN, G. D. Cell biology of the osteoclast. **Experimental Hematology**, v. 27, n. 8, p. 1229-41, 1999.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. P. In: **Radicais livres e a reposta celular ao estresse oxidativo**. 1. ed. Canoas: Editora Ulbra, 2004.

SALVATORE, C. et al. Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. **Endocrinology**, v. 144, p.1098–1107, 2013

SATO, T. et al. Generation of bone-resorbing osteoclasts from B220 + cells: its role in accelerated osteoclastogenesis due to estrogen deficiency. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 12, p. 2215-21, 2001.

SEELEY, R. R.; STEPHENS, T. D.; TATE, P. **Anatomia & Fisiologia**. 3.ed. Lisboa: Lusodidacta, 1997.

SILVA, I.M. et al. Bone density: comparative evaluation of Hounsfield units in multislice and cone beam computed tomography. **Bras Oral Res**, v. 26, n. 6, p. 550-56, 2012.

SOARES, I. J.; GOLDBERG, F. Reparo após o tratamento de canais radiculares In: **ENDODONTIA - Técnica e Fundamentos**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2001. p. 282-4.

SØGAARD, L. H. et al. Comparison of the effects of two anabolic agents (fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in a osteopenic rat model. **Bone**, v. 20, p. 439-49, 1997.

SCARFE, W. C.; FARMAM, A.G., SUKOVIC, P. Clinical applications of cone-beam computed tomography in dental practice. **J Cant Dent Assoc**, v. 72, n. 1, p. 75-80, 2006

SRIVASTAVA, S. et al. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 12, p. 8836-40, 2001.

SZEJNFELD, Vera Lúcia. **Osteoporose: Diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Sarvier, 2000

TAY, W.L. et al. Osteoporosis screening using a real bone mineral density estimation from diagnostics CT images. **Acad Radiol**, v. 19, n.10, p.1273-82, 2012.

TEN CATE, A. R. Repair and regeneration of dental tissue. In: **Oral histology: development, structure and function**. 4 ed. St Louis: Mosby, 1994. cap. 20, p. 456 – 68.

TSUKADA, T. et al. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. **Biochem Biophys Res Commun**, v.245, n.1, p.190-3, 1998.

TURNER, A. S. Animal models of osteoporosis- Necessity and Limitations. **European Cells and Materials**, v. 1, n. 1, p. 66-81, 2001.

WATANABE, K.; HISHIYA, A. Mouse models of senile osteoporosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 3, p. 221-31, 2005.

WATTS, N. B. Fundamentals and pitfalls of bone densitometry using dual-energy x-ray absorptiometry (DXA). **Osteoporosis International**, v. 15, n. 11, p. 847-54, 2004.

WEISHAUPT, D. et al. Relationship of cervical, thoracic, and lumbar bone density by quantitative CT. **J Computer Assisted Tomography**, v. 25, n. 1, p. 146-50, 2001.

WRONSKI, T. J. et al. Skeletal alterations in ovariectomized rats. **Calcified Tissue International**. v. 37, n. 3, p. 324-8, 1985.

YOON, Y. et al. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease. **Clin Chem**, v. 46, n. 10, p. 1626-30, 2000.

ZHANG, X. et al. The effect of estrogen deficiency on receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin synthesis in periapical lesions induced in rats. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 9, p. 1053-6, 2007.

ANEXOS

ANEXO A – Guidelines for Publishing Papers in the *Journal of Endodontics*

Guidelines for Publishing Papers in the JOE

Writing an effective article is a challenging assignment. The following guidelines are provided to assist authors in submitting manuscripts.

The *JOE* publishes original and review articles related to the scientific and applied aspects of endodontics. Moreover, the *JOE* has a diverse readership that includes full-time clinicians, full-time academicians, residents, students and scientists. Effective communication with this diverse readership requires careful attention to writing style.

1. General Points on Composition

a. Authors are strongly encouraged to analyze their final draft with both software (*e.g.*, spelling and grammar programs) and colleagues who have expertise in English grammar. References listed at the end of this section provide a more extensive review of rules of English grammar and guidelines for writing a scientific article. Always remember that clarity is the most important feature of scientific writing. Scientific articles must be clear and precise in their content and concise in their delivery since their purpose is to inform the reader. The Editor reserves the right to edit all manuscripts or to reject those manuscripts that lack clarity or precision, or have unacceptable grammar or syntax. The following list represents common errors in manuscripts submitted to the *JOE*:

b. The paragraph is the ideal unit of organization. Paragraphs typically start with an introductory sentence that is followed by sentences that describe additional detail or examples. The last sentence of the paragraph provides conclusions and forms a transition to the next paragraph. Common problems include one-sentence paragraphs, sentences that do not develop the theme of the paragraph (see also section “c” below), or sentences with little to no transition within a paragraph.

c. Keep to the point. The subject of the sentence should support the subject of the paragraph. For example, the introduction of authors’ names in a sentence changes the subject and lengthens the text. In a paragraph on sodium hypochlorite, the sentence, “In 1983, Langeland et al., reported that sodium hypochlorite acts as a lubricating factor during instrumentation and helps to flush debris from the root canals” can be edited to: “Sodium hypochlorite acts as a lubricant during instrumentation and as a vehicle for flushing the generated debris (Langeland et al., 1983)”. In this example, the paragraph’s subject is sodium hypochlorite and sentences should focus on this subject.

d. Sentences are stronger when written in the active voice, *i.e.*, the subject performs the action. Passive sentences are identified by the use of passive verbs such as “was”, “were”, “could”, etc. For example: “Dexamethasone was found in this study to be a factor that was associated with reduced inflammation”, can be edited to: “Our results demonstrated that dexamethasone reduced inflammation”. Sentences written in a direct and active voice are generally more powerful and shorter than sentences written in the passive voice.

e. Reduce verbiage. Short sentences are easier to understand. The inclusion of unnecessary words is often associated with the use of a passive voice, a lack of focus or run-on sentences. This is not to imply that all sentences need be short or even the same length. Indeed, variation

in sentence structure and length often helps to maintain reader interest. However, make all words count. A more formal way of stating this point is that the use of subordinate clauses adds variety and information when constructing a paragraph. (This section was written deliberately with sentences of varying length to illustrate this point.)

f. Use parallel construction to express related ideas. For example, the sentence, “Formerly, endodontics was taught by hand instrumentation, while now rotary instrumentation is the common method,” can be edited to “Formerly, endodontics was taught using hand instrumentation; now it is commonly taught using rotary instrumentation.” The use of parallel construction in sentences simply means that similar ideas are expressed in similar ways, and this helps the reader recognize that the ideas are related.

g. Keep modifying phrases close to the word that they modify. This is a common problem in complex sentences that may confuse the reader. For example, the statement, “Accordingly, when conclusions are drawn from the results of this study, caution must be used,” can be edited to “Caution must be used when conclusions are drawn from the results of this study.”

h. To summarize these points, effective sentences are clear and precise, and often are short, simple and focused on one key point that supports the paragraph’s theme.

i. Authors should be aware that the *JOE* uses iThenticate, plagiarism detection software, to assure originality and integrity of material published in the *Journal*. The use of copied sentences, even when present within quotation marks, is highly discouraged. Instead, the information of the original research should be expressed by new manuscript author’s own words, and a proper citation given at the end of the sentence. Plagiarism will not be tolerated and manuscripts will be rejected, or papers withdrawn after publication based on unethical actions by the authors. In addition, authors may be sanctioned for future publication.

2. Organization of Original Research Manuscripts

Please Note: All abstracts should be organized into sections that start with a one-word title (in bold), i.e., *Introduction, Methods, Results, Conclusions, etc.*, and should not exceed more than 250 words in length.

a. **Title Page:** The title should describe the major emphasis of the paper. It should be as short as possible without loss of clarity. Remember that the title is your advertising billboard—it represents your major opportunity to solicit readers to spend the time to read your paper. It is best not to use abbreviations in the title since this may lead to imprecise coding by electronic citation programs such as PubMed (e.g., use “sodium hypochlorite” rather than NaOCl). The author list must conform to published standards on authorship (see authorship criteria in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at www.icmje.org). The manuscript title, name and address (including email) of one author designated as the corresponding author. This author will be responsible for editing proofs and ordering reprints when applicable. The contribution of each author should also be highlighted in the cover letter.

b. **Abstract:** The abstract should concisely describe the purpose of the study, the hypothesis, methods, major findings and conclusions. The abstract should describe the new contributions made by this study. The word limitations (250 words) and the wide distribution of the abstract (e.g., PubMed) make this section challenging to write clearly. This section often is written last by many authors since they can draw on the rest of the manuscript. Write the abstract in past tense since the study has been completed. Three to ten keywords should be listed below the abstract.

c. **Introduction:** The introduction should briefly review the pertinent literature in order to identify the gap in knowledge that the study is intended to address and the limitations of previous studies in the area. The purpose of the study, the tested hypothesis and its scope should be clearly described. Authors should realize that this section of the paper is their primary opportunity to establish communication with the diverse readership of the *JOE*. Readers who are not expert in the topic of the manuscript are likely to skip the paper if the introduction fails to succinctly summarize the gap in knowledge that the study addresses. It is important to note that many successful manuscripts require no more than a few paragraphs to accomplish these goals. Therefore, authors should refrain from performing extensive review of the literature, and discussing the results of the study in this section.

d. **Materials and Methods:** The objective of the materials and methods section is to permit other investigators to repeat your experiments. The four components to this section are the detailed description of the materials used and their components, the experimental design, the procedures employed, and the statistical tests used to analyze the results. The vast majority of manuscripts should cite prior studies using similar methods and succinctly describe the essential aspects used in the present study. Thus, the reader should still be able to understand the method used in the experimental approach and concentration of the main reagents (*e.g.*, antibodies, drugs, etc.) even when citing a previously published method. The inclusion of a “methods figure” will be rejected unless the procedure is novel and requires an illustration for comprehension. If the method is novel, then the authors should carefully describe the method and include validation experiments. If the study utilized a **commercial product**, the manuscript must state that they either followed manufacturer’s protocol *or* specify any changes made to the protocol. If the study used an *in vitro* model to simulate a clinical outcome, the authors must describe experiments made to validate the model, or previous literature that proved the clinical relevance of the model. Studies on **humans** must conform to the Helsinki Declaration of 1975 and state that the institutional IRB/equivalent committee(s) approved the protocol and that informed consent was obtained after the risks and benefits of participation were described to the subjects or patients recruited. Studies involving **animals** must state that the institutional animal care and use committee approved the protocol. The statistical analysis section should describe which tests were used to analyze which dependent measures; p-values should be specified. Additional details may include randomization scheme, stratification (if any), power analysis as a basis for sample size computation, drop-outs from clinical trials, the effects of important confounding variables, and bivariate versus multivariate analysis.

e. **Results:** Only experimental results are appropriate in this section (*i.e.*, neither methods, discussion, nor conclusions should be in this section). Include only those data that are critical for the study, as defined by the aim(s). Do not include all available data without justification; any repetitive findings will be rejected from publication. All Figures, Charts and Tables should be described in their order of numbering with a brief description of the major findings. Author may consider the use of supplemental figures, tables or video clips that will be published online. Supplemental material is often used to provide additional information or control experiments that support the results section (*e.g.*, microarray data).

f. **Figures:** There are two general types of figures. The first type of figures includes photographs, radiographs or micrographs. Include only essential figures, and even if essential, the use of composite figures containing several panels of photographs is encouraged. For example, most photo-, radio- or micrographs take up one column-width, or about 185 mm wide X 185 mm tall. If instead, you construct a two columns-width figure (*i.e.*, about 175 mm wide X 125 mm high when published in the *JOE*), you would be able to place about 12 panels of photomicrographs (or radiographs, etc.) as an array of four columns across and three rows down (with each panel about 40 X 40 mm). This will require some editing to emphasize the

most important feature of each photomicrograph, but it greatly increases the total number of illustrations that you can present in your paper. Remember that each panel must be clearly identified with a letter (*e.g.*, “A”, “B”, etc.), in order for the reader to understand each individual panel. Several nice examples of composite figures are seen in recent articles by Jeger et al (J Endod 2012;38:884–888); Olivieri et al., (J Endod 2012;38:1007–1011); Tsai et al (J Endod 2012;38:965–970). Please note that color figures may be published at no cost to the authors and authors are encouraged to use color to enhance the value of the illustration. Please note that a multipanel, composite figure only counts as one figure when considering the total number of figures in a manuscript (see section 3, below, for maximum number of allowable figures).

The second type of figures are graphs (*i.e.*, line drawings including bar graphs) that plot a dependent measure (on the Y axis) as a function of an independent measure (usually plotted on the X axis). Examples include a graph depicting pain scores over time, etc. Graphs should be used when the overall trend of the results are more important than the exact numerical values of the results. For example, a graph is a convenient way of reporting that an ibuprofen-treated group reported less pain than a placebo group over the first 24 hours, but was the same as the placebo group for the next 96 hours. In this case, the trend of the results is the primary finding; the actual pain scores are not as critical as the relative differences between the NSAID and placebo groups.

g. **Tables:** Tables are appropriate when it is critical to present exact numerical values. However, not all results need be placed in either a table or figure. For example, the following table may not be necessary:

% NaOCl	N/Group	% Inhibition of Growth
0.001	5	0
0.003	5	0
0.01	5	0
0.03	5	0
0.1	5	100
0.3	5	100
1	5	100
3	5	100

h. Instead, the results could simply state that there was no inhibition of growth from 0.001–0.03% NaOCl, and a 100% inhibition of growth from 0.03–3% NaOCl (N=5/group). Similarly, if the results are not significant, then it is probably not necessary to include the results in either a table or as a figure. These and many other suggestions on figure and table construction are described in additional detail in Day (1998).

i. **Discussion:** This section should be used to interpret and explain the results. Both the strengths and weaknesses of the observations should be discussed. How do these findings compare to the published literature? What are the clinical implications? Although this last section might be tentative given the nature of a particular study, the authors should realize that even preliminary clinical implications might have value for the clinical readership. Ideally, a review of the potential clinical significance is the last section of the discussion. What are the major conclusions of the study? How does the data support these conclusions?

j. **Acknowledgments:** All authors must affirm that they have no financial affiliation (*e.g.*, employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing

arrangements or honoraria), or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past three years. Any other potential conflict of interest should be disclosed. Any author for whom this statement is not true must append a paragraph to the manuscript that fully discloses any financial or other interest that poses a conflict. Likewise the sources and correct attributions of all other grants, contracts or donations that funded the study must be disclosed

k. **References:** The reference style follows Index Medicus and can be easily learned from reading past issues of the *JOE*. The *JOE* uses the Vancouver reference style, which can be found in most citation management software products. Citations are placed in parentheses at the end of a sentence or at the end of a clause that requires a literature citation. Do not use superscript for references. Original reports are limited to 35 references. There are no limits in the number of references for review articles.

3. Manuscripts Category Classifications and Requirements

Manuscripts submitted to the *JOE* must fall into one of the following categories. The abstracts for all these categories would have a maximum word count of 250 words:

A. CONSORT Randomized Clinical Trial-Manuscripts in this category must strictly adhere to the Consolidated Standards of Reporting Trials-CONSORT- minimum guidelines for the publication of randomized clinical trials. These guidelines can be found at www.consort-statement.org/. These manuscripts have a limit of 3,500 words, [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.

B. Review Article-Manuscripts in this category are either narrative articles, or systematic reviews/meta-analyses. Case report/Clinical Technique articles even when followed by extensive review of the literature will should be categorized as “Case Report/Clinical Technique”. These manuscripts have a limit of 3,500 words, [including abstract, introduction, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.

C. Clinical Research (*e.g.*, prospective or retrospective studies on patients or patient records, or research on biopsies, excluding the use of human teeth for technique studies). These manuscripts have a limit of 3,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures and 4 tables*.

D. Basic Research Biology (animal or culture studies on biological research on physiology, development, stem cell differentiation, inflammation or pathology). Manuscripts that have a primary focus on biology should be submitted in this category while manuscripts that have a primary focus on materials should be submitted in the Basic Research Technology category. For example, a study on cytotoxicity of a material should be submitted in the Basic Research Technology category, even if it was performed in animals with histological analyses. These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures or 4 tables*.

E. Basic Research Technology (Manuscripts submitted in this category focus primarily on research related to techniques and materials used, or with potential clinical use, in endodontics). These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 3 figures and tables*.

F. Case Report/Clinical Technique (*e.g.*, report of an unusual clinical case or the use of cutting-edge technology in a clinical case). These manuscripts have a limit of 2,500 words [including abstract, introduction, materials and methods, results, discussion and acknowledgments; excluding figure legends and references]. In addition, there is a limit of a total of 4 figures or tables*.

* Figures, if submitted as multipanel figures must not exceed 1 page length. Manuscripts submitted with more than the allowed number of figures or tables will require approval of the *JOE* Editor or associate editors. If you are not sure whether your manuscript falls within one of the categories above, or would like to request preapproval for submission of additional figures please contact the Editor by email at jendodontics@uthscsa.edu.

Importantly, adhering to the general writing methods described in these guidelines (and in the resources listed below) will help to reduce the size of the manuscript while maintaining its focus and significance. Authors are encouraged to focus on only the essential aspects of the study and to avoid inclusion of extraneous text and figures. The Editor may reject manuscripts that exceed these limitations.

Available Resources: Strunk W, White EB. *The Elements of Style*. Allyn & Bacon, 4th ed, 2000, ISBN 020530902X. Day R. *How to Write and Publish a Scientific Paper*. Oryx Press, 5th ed. 1998. ISBN 1-57356-164-9. Woods G. *English Grammar for Dummies*. Hungry Minds:NY, 2001 (an entertaining review of grammar). Alley M. *The Craft of Scientific Writing*. Springer, 3rd edition 1996 SBN 0-387-94766-3. Alley M. *The Craft of Editing*. Springer, 2000 SBN 0-387-98964-1

ANEXO B – Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-PUCRS)



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, INOVAÇÃO E DESENVOLVIMENTO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício 31/2015 - CEUA

Porto Alegre, 28 de maio de 2015.

Prezado Sr(a). Pesquisador(a),


A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou seu Protocolo de Pesquisa, registro CEUA 15/00436, intitulado **“Efeito da medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio e da reposição com estrogênio sobre lesões periapicais em ratas com osteoporose induzida”**.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está **autorizada** a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Nº de Animais	Espécie	Duração do Projeto
80 animais	Rattus norvegicus	02/2015 – 12/2016

Atenciosamente,


Prof. Dr. João Batista Blessmann Webber
Coordenador da CEUA/PUCRS

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Maria Martha Campos

INTOX

Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 – P. 99 – Portal Tecnopuc – sala 1512

CEP: 90619-900 – Porto Alegre/RS

Fone: (51) 3353-6365

E-mail: ceua@pucrs.br