



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

UNESP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

MÁRCIO LUIZ FERRO ALVES

Influência da quimioterapia com 5-Fluorouracil na osseointegração de implantes instalados em tíbias de ratos: avaliação biomecânica, microtomográfica, histomorfométrica, histoquímica e imunoistoquímica.

Araçatuba - São Paulo

2016

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

F395i FERRO-ALVES, Marcio Luiz.
Influência da quimioterapia com 5-Fluorouracil na osseointegração de implantes instalados em tíbias de ratos: avaliação biomecânica, microtomográfica, histomorfométrica, histoquímica e imunoistoquímica. Márcio Luiz Ferro-Alves. - Araçatuba, 2016 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Letícia Helena Theodoro

Orientador: Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia

1. Quimioterapia 2. Implantodontia 3. Osseointegração

Black D6

CDD 617.64



UNESP

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

MÁRCIO LUIZ FERRO ALVES

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de concentração em Periodontia).

Orientadora: Professora Dra. Letícia Helena Theodoro

Co-orientador: Professor Titular Dr. Valdir Gouveia Garcia

Araçatuba- São Paulo

2016

Dissertação de Mestrado

Dados curriculares

Márcio Luiz Ferro Alves

Nascimento: 25.03.1988 São Joaquim da Barra- SP

Filiação: Aparecido Alves
Silvia Rosa Ferro Alves

2008- 2013: **Graduação em Odontologia**
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba -
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP

2014-2016: **Pós-Graduação em Odontologia**
Nível de Mestrado - ÀREA DE PERIODONTIA - Faculdade de
Odontologia de Araçatuba – UNESP

Dissertação de Mestrado

EPÍGRAFE

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

Carl Sagan.

Dedicatória

A minha família, minha mãe, **SILVIA ROSA FERRO ALVES**, meu pai, **APARECIDO ALVES**, e meu irmão, **OTÁVIO LUIS FERRO ALVES**, pessoas sem as quais eu não teria obtido minha formação como profissional, e não teria tido forças para concluir minha pesquisa. Meus amáveis e eternos, que, no decorrer da minha vida, proporcionaram-me, além de extenso carinho e amor, os conhecimentos da integridade, da perseverança e de procurar sempre em Deus à força maior para o meu desenvolvimento como ser humano. Por essa razão, gostaria de dedicar e reconhecer à vocês, minha imensa gratidão e sempre amor.

A minha companheira, **FERNANDA CAVALARO PEREIRA**, que tem sido meu alicerce. Não seria possível concluir este trabalho sem estar ao seu lado. Minha amada, no decorrer de minha carreira tem sido minha maior incentivadora e para você é que realizo minha obra.

A minha orientadora, **LETICIA HELENA THEODORO**, que tem sido mãe quando necessário, amiga quando preciso, e a melhor professora com quem pude conviver, no seu empenho fiz meu espelho para me dedicar à docência e a pesquisa, esta obra é dedicada a senhora.

Dissertação de Mestrado

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais Aparecido e Silvia, que primeiramente me tornaram possível estar aqui, que inseriram em mim o anseio pelo saber, que me conduziram sempre para o melhor, que forneceram os alicerces para uma vida sólida e repleta de realizações

À meu irmão Otávio, meu melhor amigo, que sempre me apoiou em todos os momentos difíceis, que sempre esteve ao meu lado sem falhar, que dividiu comigo uma história, e constrói a cada dia mais ao meu lado algo que não poderia ser descrito com palavras.

À minha companheira Fernanda, pessoa fundamental em minha vida, que compartilhou comigo os momentos decisivos desta trajetória, sempre me apoiando e incentivando nos momentos mais difíceis, que ajuda a me tornar cada dia uma pessoa melhor.

A meus sogros, João e Rosângela, que me acolheram como a um filho em Araçatuba, e me forneceram suporte de verdadeiros pais na distância dos meus.

A todos os meus familiares que sempre me apoiaram e se fizeram presente na convivência mesmo que a distância.

A meus orientadores, Leticia e Valdir, pessoas com as quais eu redescobri o sentido da amizade, não teria concluído a pós-graduação se não fossem eles meus orientadores. Agradeço por reavivarem minha paixão pela ciência nos momentos mais difíceis, com vocês aprendi o valor do empenho e da perseverança em um objetivo. Vocês são pessoas que levarei para o resto da vida, mas não é uma despedida ainda teremos muitos trabalhos juntos!

Ao meu amigo e também orientador Prof. Edilson, sem o qual este trabalho não seria possível, obrigado pelo auxílio em todas as análises, pela amizade e suporte fornecido durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu amigo e professor, Juliano Milanezi, por ser sempre solícito quando requisitado, pelos ensinamentos ao longo deste curso e pela amizade que desenvolvemos. Tenho grande admiração pelo senhor, é um exemplo a ser seguido.

A meus companheiros cotidianos, Adriano, André, Alexandre, Bruno, Felipe, Gabriel, Gestter Jesse, João Rodolpho, Leonardo, Lucas, Luiz Henrique, Murilo, Paulo, Renato, Renatinho, Thiago e Willian, que além de dividirem contas formaram minha família em Araçatuba em algum momento desses quase 9 anos.

Ao Diretório Acadêmico Professor Carlos Aldrovandi – DACA, pelas amizades, e pelo aprendizado proporcionado ao longo dos últimos anos.

A Disciplina de Periodontia e meus colegas de pós graduação pela amizade e pela disponibilidade em me ajudar sempre que foi necessário.

A meus colegas de Periodontia Paula, Dani e Vitor por todo apoio no desenvolvimento experimental desta pesquisa.

Ao Prof. Rubens Spin Neto e o Dr. Guilherme Oliveira pelo apoio nas análises microtomográficas.

Ao Prof. Luciano Tavares e a doutoranda Fran Beneti pelo apoio na análise histoquímica.

Dissertação de Mestrado

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, nas pessoas do **Diretor Prof. Titular. Wilson Roberto Poi e Prof. Titular Joao Eduardo Gomes Filhos** por proporcionarem a realização desta pesquisa.

À atual coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa do **Prof. Adj Andre Luiz Fraga Briso**, por sua dedicação ao Curso e gosto pela docência.

À banca examinadora e suplente pela pronta disponibilidade em avaliar este trabalho, **Prof. Glauco, Prof Helio, Profª Eliane e Prof. Edilson.**

Aos colegas do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Aos Funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada - **Cleide, Renato, Marcos e Paulo** obrigado pela ajuda e disposição.

Aos Funcionários do Departamento de Ciências Básicas – **Arnaldo, André, Eliseide e Sandra** obrigada pela ajuda e disposição.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Cláudio, Celinha, Valéria, Cristiane, Lilian, Fatima, Graziela, Marie, Tania e tantos outros** pela atenção e eficiência com que sempre me atenderam.

A empresa **DENTFIX SISTEMA DE IMPLANTES** da cidade de Santa Rita do Passa Quatro (São Paulo) por ter disponibilizado todos os implantes utilizados na presente pesquisa.

À **FAPESP**, pela concessão da Bolsa de Mestrado (Processo nº 2014/11703-5) para realização deste trabalho.

Dissertação de Mestrado**RESUMO**

Ferro-Alves, ML. INFLUÊNCIA DA QUIMIOTERAPIA COM 5-FLUOROURACIL NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES INSTALADOS EM TÍBIAS DE RATOS: AVALIAÇÃO BIOMECÂNICA, MICROTOMOGRÁFICA, HISTOMORFOMÉTRICA, HISTOQUÍMICA E IMUNOISTOQUÍMICA. [Dissertação de Mestrado]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP; 2016.

O propósito do presente estudo foi avaliar a influência do tratamento quimioterápico com 5-Fluorouracil (5-FU) durante o processo inicial de osseointegração e na fase de maturação do tecido ósseo, em áreas de implantes osseointegrados, instalados em tíbias de ratos por meio das análises: biomecânica, microtomográfica, histomorfométrica, histoquímica e imunoistoquímica, pela detecção dos imunomarcadores TRAP e OCN. Foram utilizados 60 animais submetidos a um procedimento cirúrgico para instalação de um implante de titânio em suas tíbias. Os animais foram separados aleatoriamente nos seguintes grupos experimentais: **Grupo C15/30D** (n=10) – os animais receberam a primeira injeção com solução salina fisiológica(SSF) 15 dias após a instalação dos implantes; **Grupo 5FU15/30D** (n=10) – os animais receberam a primeira dose do 5-FU 15 dias após a instalação dos implantes, os animais dos grupos **30D** foram eutanasiados 45 dias após a instalação dos implantes; **Grupo C15/45D** (n=10) – os animais receberam a primeira injeção com SSF 15 dias após a instalação dos implantes; **Grupo 5FU15/45D** (n=10) – os animais receberam a primeira dose do 5-FU 15 dias após a instalação dos implantes; **Grupo C30/45D** (n=10) – os animais receberam a primeira injeção com SSF 30 dias após a instalação dos implantes; **Grupo 5FU30/45D** (n=10) – os animais receberam a primeira dose do 5-FU 30 dias após a instalação dos implantes, os animais dos grupos **45D** foram eutanasiados 45 dias após a instalação dos implantes. As tíbias direita e esquerda foram coletadas e fixadas em formol tamponado a 4% e álcool 70% respectivamente. As peças obtidas foram processadas para se efetuar as análises biomecânica, microtomográfica, histomorfométrica, histoquímica e imunoistoquímica (TRAP e OCN). Na Análise biomecânica e histométrica o grupo 5FU15/30D obteve resultados inferiores aos grupos 5FU15/45D($p<0.05$) e 5FU30/45D($p<0.05$), já na análise microtomográfica o grupo 5FU15/30D apresentou menor volume

Dissertação de Mestrado

ósseo quando comparado ao grupo 5FU15/45D($p<0.05$), e o grupo C15/30D também apresentou menor volume ósseo quando comparado ao grupo C30/45D($p<0.05$). Com relação a análise histoquímica o grupo 5FU15/30D apresentou menor quantidade de fibras colágenas maduras quando comparado aos grupos C15/30D($p<0.05$) e 5FU15/45D($p<0.05$). Na avaliação imunoistoquímica do marcador TRAP não foram encontradas diferenças entre os grupos, já para o marcador OCN o grupo 5FU15/30 apresentou um baixo padrão de imunomarcção quando comparado aos demais grupos. Concluiu-se que quando o tratamento quimioterápico com 5-FU é realizado durante a osseointegração ocorre um atraso desse processo, no entanto quando administrado após a osseointegração não exerce influencia negativa sobre os tecidos periimplantares.

Palavras- Chave: osseointegração, quimioterapia, implantes dentários.

Dissertação de Mestrado

ABSTRACT

Ferro-Alves, ML. INFLUENCE OF CHEMOTHERAPY WITH 5-FLUOROURACIL ON IMPLANTS OSSEOINTEGRATION INSTALLED AT THE RAT TIBIA. BIOMECHANICAL, MICROTOMOGRAPHY, HISTOMORPHOMETRY, HISTOCHEMISTRY AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY EVALUATION. [Dissertação de Mestrado]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP; 2016.

The purpose of the present study was to evaluate the influence of chemotherapy treatment with 5-fluorouracil(5-FU) during the initial process of osseointegration, and influence of chemotherapy treatment with 5-FU on osseous tissue maturation phase, on osseointegrated implants, installed at the rat tibia, through biomechanics, microtomography, histomorphometry, histochemistry and immunohistochemistry evaluation, through the detection of immunomarkers tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), osteocalcina (OCN). Sixty animals were submitted to a surgical procedure to install a titanium implant on their right and left tibia. The animals were randomly separated on the following experimental groups: Group C15/30D (control; n=10) – The animals received the first physiological saline (PS) 15 days after the implants installation; Group C15/45D (control; n=10) – The animals received the first OS 15 days after the implants installation and were euthanized 45 days after the implants installation; Group 5FU15/30D (n=10) – The animals received the first 5-FU chemotherapeutic shot 15 days after the implants installation and were euthanized 30 days after the implants installation. Group 5FU15/45D (n=10) – The animals received the first shot of 5-FU chemotherapeutic 15 days after the implants installation and were euthanized 45 days after the implants installation. Group C30/45D (control; n=10) received the first OS shot 30 days after the implants were installed and were euthanized 45 days after the implants installation. Group 5FU30/45D (n=10) – the animals received the first 5-FU chemoterapic shot 30 days after the installation of the implants and were euthanized 45 days after the implants installation. Both left and right tibias were collected and fixed in buffered formalin 4% and 70% ethanol respectively. The pieces were processed to do the biomechanical, microtomography, histomorphometry, histochemistry and immunohistochemistry evaluation. At the biomechanics and histomorphometry analyses the group 5FU15/30D got results

Dissertação de Mestrado

below the 5FU15/45D($p<0.05$) and 5FU30/45D($p<0.05$) groups, as in the analyses microtomography the group 5FU15/30D presented less osseous volume when compared to the 5FU15/45D($p<0.05$) group, and the C15/30D group presented less osseous volume when compared to C30/45D($p<0.05$) group. The histochemistry analyses of the 5FU15/30D group presented less quantity of mature collagen fibers when compared to C15/30D($p<0.05$) e 5FU15/45D($p<0.05$) groups. At the immunohistochemistry evaluation of the TRAP marker wasn't found any differences between the groups, but the OCN marker on 5FU15/30 group presented a low standard of immunostaining when compared to the other groups. It concludes that when the chemotherapy with 5-FU is accomplished during osseointegration it has no negative influence on peri-implant tissues.

Key-words: osseointegration, chemotherapy, dental implants.

Dissertação de Mestrado

LISTA DE ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS

N.cm- newton x centímetro

Kg- quilogramas

g- gramas

mg- miligramas

ml-mililitros

ANOVA- Análise de variância

AO – área de osso formado na espira

ROI - Region of interest – região de interesse

5-FU - 5 Fluorouracil

TRAP - fosfatase acida tartarato resistente

OCN - Osteocalcina

Dissertação de Mestrado**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Delineamento dos grupos experimentais. (A) Fluxuograma evidenciando o tratamento efetuado nos Grupos C15/30D, C15/45D, 5FU15/30D e 5FU15/45D. (B) Fluxuograma evidenciando o tratamento efetuado nos Grupos C30/45D e 5FU30/45D.

Figura 2. Resistência ao contratorque dos implantes. Gráfico evidenciando a força de resistência ao contratorque, em N.cm, nos diferentes grupos experimentais. Símbolos: ¶, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C15/30D; †, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU15/45D; ‡, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU30/45D.

Figura 3. Microtomografia computadorizada do tecido ósseo periimplantar. (A) Gráfico evidenciando o volume ósseo (%) periimplantar nos diferentes grupos experimentais. (B) Ilustração bidimensional da tíbia evidenciando o implante instalado reconstruída através do programa NRecon. (C) Ilustração bidimensional do implante e região periimplantar orientado através do programa Data Viewer. (D) Ilustrações tridimensionais da tíbia evidenciando o implante instalado reconstruídas através do programa CTvol-(2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT). Símbolos: ¶, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C30/45D; †, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU15/45D.

Figura 4: Análise histométrica do tecido ósseo periimplantar. (A) Gráfico evidenciando a média e o desvio padrão da área ocupada por tecido ósseo na região periimplantar nos diferentes grupos experimentais. (B-G) Fotomicrografias mostrando o tecido ósseo peri-implantar em C15/30D (B), C15/45D (C), C30/45D (D), 5FU15/30D (E), 5FU15/45D (F) e 5FU30/45D (G). Observar a pequena área ocupada por tecido ósseo na região peri-implantar em 5FU15/30D. Abreviações e símbolos: to, tecido ósseo peri-implantar. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E). Aumento original: 400x. Barras de escala: 50 µm. †, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU15/45D; ‡, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU30/45D.

Figura 5: Nível de maturação das fibras colágenas no tecido ósseo periimplantar. (A-B) Gráficos evidenciando a média e o desvio padrão da porcentagem de fibras colágenas imaturas (A) e fibras colágenas maduras (B) no tecido ósseo peri-implantar nos diferentes grupos experimentais. (C-H) Fotomicrografias mostrando o nível de maturação das fibras colágenas no tecido ósseo periimplantar em C15/30D (C), C15/45D (D), C30/45D (E), 5FU15/30D (F), 5FU15/45D (G) e 5FU30/45D (H). Observar a predominância de fibras colágenas imaturas (verde-amareladas) em 5FU15/30D. Símbolos: ¶, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C15/30D; †, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU15/45D. Coloração: Vermelho Picro Sirius observado em microscopia de luz polarizada. Aumento original: 400x. Barras de escala: 50 µm.

Figura 6: Padrão de imunomarcção para TRAP e OCN no tecido ósseo periimplantar. (A-F) Fotomicrografias evidenciando células multinucleadas TRAP-positivas (setas pretas) no tecido ósseo peri-implantar em C15/30D (A), C15/45D (B), C30/45D (C), 5FU15/30D (D), 5FU15/45D (E) e 5FU30/45D (F). (G-L) Fotomicrografias evidenciando células OCN-positivas (setas azuis) no tecido ósseo peri-implantar em C15/30D (G), C15/45D (H), C30/45D (I), 5FU15/30D (J), 5FU15/45D (K) e 5FU30/45D (L). Abreviações e símbolos: to, tecido ósseo peri-implantar; setas pretas, células TRAP-positivas; setas azuis, células OCN-positivas. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000X. Barras de escala: 20 µm.

Dissertação de Mestrado

SUMÁRIO

1. Introdução	14
2. Materiais e Métodos	19
3. Resultados.....	28
4. Discussão.....	36
5. Conclusão	44
6. Referências.....	46
Anexo I	51
Anexo II	52

*Artigo preparado para envio ao periódico
“Journal of Cranio-maxilo-facial Surgery”*

Introdução

Dissertação de Mestrado**INTRODUÇÃO**

Segundo estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2016) haverá 596.070 novos casos de Neoplasias malignas no território nacional, dentre esses 61200 serão tumores de próstata, 57.960 tumores de mama e 22.780 serão lesões de tecido sanguíneo (leucemias e linfomas). Os tumores da cabeça e do pescoço representam o quinto câncer mais frequente no mundo, sendo estimado que anualmente ocorram 500.000 novos casos (GRANSTRÖM, 2005), sendo que só no Brasil as estimativas para 2016 são de 15.490 novos casos (INCA, 2016). A radioterapia, quimioterapia e excisão cirúrgica são as três modalidades terapêuticas que combinadas ou usadas isoladamente constituem o tratamento de tumores malignos (BUDDULA et al, 2012).

A quimioterapia baseia-se na administração sistêmica de fármacos dirigidos contra certos grupos moleculares e o objetivo das drogas usadas em quimioterapia é destruir ou causar um atraso na divisão das células com proliferação acelerada (PETERSON et al., 2005). Os fármacos agem tanto nas células tumorais, como nas células com metabolismo acelerado como, por exemplo, as células do epitélio gastrointestinal, incluindo as da cavidade bucal (PETERSON et al., 2005).

Os agentes quimioterapêuticos atrasam a migração das células para o local danificado, diminuem a formação da matriz de reparo no dano tecidual, reduzem a produção de colágeno, comprometem a proliferação de fibroblastos e inibem a contração das feridas (GUO et al., 2010). Além disto, enfraquecem o sistema imunológico do paciente, impedindo a reposta imune-inflamatória das feridas aumentando assim a possibilidade de infecção (GUO et al., 2010). Alguns dos efeitos sistêmicos causados pela quimioterapia são: fadiga geral, astenia, náuseas, vômitos, diarreia, obstipação, anorexia, hipotireoidismo, hiperglicemia, toxicidade cardíaca e toxicidade dermatológica (BARTON, 2011). Estes fármacos induzem neutropenia, anemia e trombocitopenia, tornando a zona da ferida mais vulnerável e mais susceptível a hemorragia descontrolada (GARG e GUEZ, 2011). Como efeito secundário tardio, as alterações vasculares, causadas pelos agentes

Dissertação de Mestrado

quimioterapêuticos, conduzem à má-nutrição óssea, o que leva a um estado semelhante à osteoporose (KOVÁCS, 2001), tornando assim necessário a investigação sobre seus efeitos na osseointegração.

Os fármacos quimioterapêuticos mais frequentemente administrados são: 5-Fluororacil (5-FU), cisplatina, metotrexato, bleomicina e vincristina (GRANSTRÖM, 2005; GRANSTRÖM, 2007). O 5-FU é o fármaco mais associado à mucosite, durante a quimioterapia, pois é um análogo que interfere na síntese de DNA, provocando a destruição de células que se desenvolvem rapidamente como, por exemplo, células tumorais e também células da mucosa. Estas lesões ulcerativas podem ocorrer ao longo do trato gastrointestinal e, geralmente são tão dolorosas que podem fazer com que o paciente não consiga ingerir alimentos (GARG e GUEZ, 2011). Nas células da linhagem osteoclástica o efeito do 5-FU parece ser diferente de sua ação sobre as células da linhagem osteoblástica. O 5-FU provoca severa mielossupressão, o que pode afetar os precursores dos osteoclastos, no entanto, tais células possuem os denominados precursores quiescentes, os quais são altamente resistentes ao 5-FU e se mantem viáveis e capazes de se diferenciar após tratamento com esta droga (MIZOGUCHI et al., 2009). Além disto, o 5-FU pode induzir uma condição inflamatória no tecido ósseo por alterar os níveis de citocinas pró-inflamatórias capazes de recrutar osteoclastos, sugerindo que este quimioterápico pode aumentar a presença de osteoclastos no tecido ósseo (RAGHU NADHANAN et al., 2012), e pode ser citotóxico para osteoblastos e seus precursores (XIAN et al., 2006).

A osseointegração é essencial para o sucesso clínico dos implantes dentais em longo prazo, envolve a direta ancoragem do implante pela formação óssea sem o crescimento de um tecido fibroso na interface osso/implante, e representa um processo dinâmico tanto em seu estabelecimento quanto em sua manutenção (ALBREKTSSON et al., 2003; BLOCK et al., 2004; BERGLUNDH et al., 2003).

Dissertação de Mestrado

A neoformação óssea requer o recrutamento de células multipotentes do sistema mesenquimal, as quais são capazes de se proliferar e se diferenciar em uma variedade de tipos de células, incluindo os osteoblastos (WALKER et al., 2001). Estas células osteoblásticas, por sua vez, estão envolvidas na diferenciação e função osteoclástica via interação célula a célula (PEREIRA et al., 2010).

Embora alguns estudos tenham avaliado o prognóstico da reabilitação com implantes dentais em pacientes que haviam realizado quimioterapia (JAVED et al., 2010; BARROWMAN et al., 2011), a literatura ainda carece de respostas quando se pensa em indivíduos, que no curso de um tratamento odontológico invasivo, como a instalação de implantes, tenham a necessidade de realizar um tratamento quimioterápico ou quando com implantes já instalados há algum tempo, deverão serem submetidos a quimioterapia, ou ainda em casos de tumores de cabeça e pescoço onde há instalação de implantes junto a cirurgia de ressecção e/ou reconstrução da lesão.

Existem dois estudos clínicos que apontam em direções diferentes na discussão quanto à conduta com esses implantes, Kovacs (2001) mostrou que a quimioterapia, com cisplatina não teve nenhum efeito negativo na manutenção dos implantes ao longo de 10 anos, quando o implante foi colocado em média 10,5 meses após a quimioterapia, enquanto um estudo anterior que investigou implantes convencionais com superfície usinada e implantes tipo lamina (Karr et al., 1992) recomendou a remoção dos implantes antes da quimioterapia. Estes estudos apresentaram opiniões opostas sobre o efeito da quimioterapia na sobrevida dos implantes e revelam pouco sobre os efeitos da quimioterapia sobre o processo de osseointegração primária. Com relação a estudos em animais são escassas as pesquisas que avaliaram a osseointegração em animais submetidos a quimioterapia (AL-MAHALAWYL et al., 2016).

Diante do exposto constitui propósito do presente estudo avaliar a resposta biológica na fase inicial do processo de osseointegração e na fase de maturação do tecido ósseo periimplantar em tíbia

Dissertação de Mestrado

de ratos submetidos à quimioterapia com o 5-FU por meio de análises biomecânica, microtomográfica, histométrica, histoquímica, imunoistoquímica.

Materiais e Métodos

Dissertação de Mestrado

MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP – Campus de Araçatuba, dentro das normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Protocolo n^o. 003493 2/2).

1. Animais

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus, Wistar*) machos, de aproximadamente 250 a 300g e com 2 a 3 meses de idade, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, mantidos em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com água e ração *ad libitum*.

2. Protocolos experimentais

2.1. Protocolo de instalação dos implantes

Foi realizado o procedimento para instalação dos implantes de titânio na tíbia direita e esquerda de todos os animais. Para isso, os animais foram anestesiados pela associação de 70 mg/kg de cloridrato de quetamina (Vetaset, Fort Dodge Iowa, USA) e 6 mg/Kg de cloridrato de xilazina (Coopazine, Coopers São Paulo, Brasil), as tíbias foram tricotomizadas e foi realizada a antisepsia com iodopovidona a 10 %. A seguir os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada para acesso ao leito cirúrgico.

Para o acesso ao tecido ósseo foi realizada uma incisão pelo lado medial da tíbia de aproximadamente 30 mm, com auxílio de uma lâmina de bisturi n^o 15C (Swann-Morton, Sheffield, Inglaterra) e o tecido ósseo foi exposto com auxílio de um deslocador de perióstio. Um alvéolo cirúrgico bicortical foi preparado na metáfise proximal, usando uma fresa de 2,0 mm de diâmetro (Conexão Sistemas de Prótese, Arujá, São Paulo, Brasil) montada em motor cirúrgico (Dentscler Indústria de aparelhos Odontológicos Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) com torque de 45 N e velocidade

Dissertação de Mestrado

de 1200 rpm sob irrigação constante de solução salina fisiológica. Um implante com superfície tratada por meio de jateamento e ataque ácido com 4,0 mm de comprimento e 2,2 mm de diâmetro (Dentifix System, São Paulo, SP, Brasil) foi instalado no alvéolo cirúrgico de cada tíbia, com auxílio de uma chave digital de 1,2 mm de diâmetro (Conexão Sistemas de Prótese, Arujá, SP, Brasil) acoplada ao hexágono do implante até que a borda superior do implante ficasse posicionada no nível ósseo. Em seguida, o tecido muscular foi aproximado e suturado com fio 4.0 de poliglactina 910 (Johnson & Johnson do Brasil Ind. Com. Prod. Ltda, São Bernardo do Campo, SP, Brasil), e a pele aproximada e suturada com fio de seda 4.0 (Johnson & Johnson do Brasil Ind. Com. Prod Ltda, São Bernardo do Campo, Brasil). Imediatamente após a realização do procedimento cirúrgico, os animais receberam injeção intramuscular de penicilina e estreptomicina (Pentabiótico Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, Brasil) para prevenir infecções e Sulfato de morfina (0,2mg/ml) 2mg/kg (Dimorf®, Cristália, São Paulo, Brasil) para redução da dor.

2.2. Grupos experimentais

Os animais foram separados aleatoriamente por meio de uma tabela gerada em computador nos seguintes grupos experimentais: **Grupo C15/30D** (controle; n=10) – os animais receberam a primeira injeção com solução salina fisiológica 15 dias após a instalação dos implantes e foram eutanasiados 30 dias após a instalação dos implantes; **Grupo C15/45D** (controle; n=10) – os animais receberam a primeira injeção com solução salina 15 dias após a instalação dos implantes e foram eutanasiados 45 dias após a instalação dos implantes ; **Grupo 5FU15/30D** (n=10) – os animais receberam a primeira dose do quimioterápico 5-FU 15 dias após a instalação dos implantes e foram eutanasiados 30 dias após a instalação dos implantes; **Grupo 5FU15/45D** (n=10) – os animais receberam a primeira dose do quimioterápico 5-FU 15 dias após a instalação dos implantes e foram eutanasiados 45 dias após a instalação dos implantes; **Grupo C30/45D** (controle; n=10) – os animais receberam a primeira injeção com solução salina 30 dias após a instalação dos implantes e foram

Dissertação de Mestrado

eutanasiados 45 dias após a instalação dos implantes; **Grupo 5FU30/45D** (n=10) – os animais receberam a primeira dose do quimioterápico 5-FU 30 dias após a instalação dos implantes e foram eutanasiados 45 dias após a instalação dos implantes .

2.3. Protocolo para aplicação do quimioterápico 5-FU

Os animais dos grupos 5FU/15 e 5FU/30 receberam o quimioterápico 5-fluorouracil (Fluorouracil, 50 mg/ml – Eurofarma Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil) administrado por injeção intraperitoneal realizada em dois momentos: no Grupo 5FU/15 aos 15 dias após a instalação dos implantes e 48 horas após a primeira aplicação; e no Grupo 5FU/30 aos 30 dias após a instalação dos implantes e 48 horas após a primeira aplicação. Foi utilizado a dose de 60 mg/Kg (1º dose) e 40 mg/Kg (2º dose) de peso corporal do animal (Garcia et al., 2014). Simulando o mesmo grau de estresse dos grupos tratados os animais dos Grupo C15 receberam aplicação de solução salina de NaCl (0,9%) aos 15 dias após a instalação dos implantes e 48 horas após a primeira aplicação, e os animais do Grupo C30 receberam aplicação de solução salina de NaCl (0,9%) aos 30 dias após a instalação dos implantes e 48 horas após a primeira aplicação. Fluxograma

2.4. Períodos experimentais

Dez animais do grupo C15/30D e do grupo 5FU15/30D foram eutanasiados aos 30 dias após a instalação dos implantes. Nos grupos C15/45D, C30/45D, 5FU15/45D e 5FU30/45D os 10 animais foram eutanasiados 45 dias após a instalação dos implantes, por meio de superdosagem anestésica (150mg/kg de thiopental - Cristália, Itapira, São Paulo, Brazil). As tíbias direita e esquerda foram coletadas e fixadas em formol tamponado a 4% e álcool 70% respectivamente por um período mínimo de 48 horas (Figura 1).

Dissertação de Mestrado

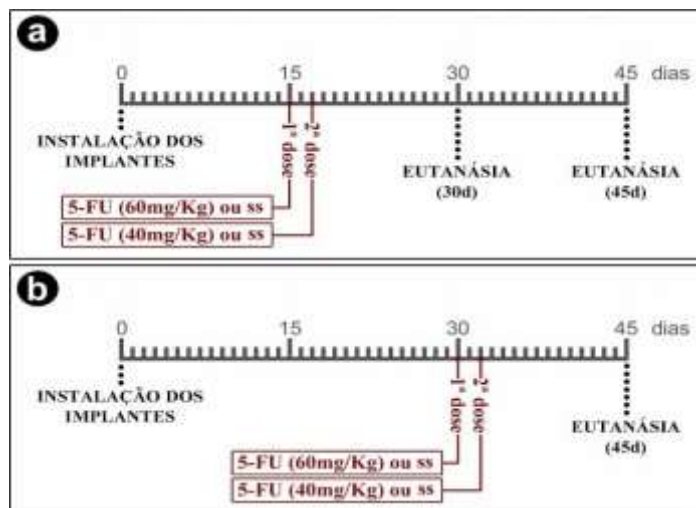


Figura 1. Fluxograma de Tratamento. a) Grupo C15/30D, C15/45D, 5FU15/30D e 5FU15/45D; b) C30/45D e 5FU30/45D.

3. Avaliação Microtomográfica e Biomecânica

As tíbias do lado esquerdo dos animais de todos os grupos foram removidas e mantidas em álcool 70%, elas foram primeiramente submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica) utilizando cortes de 9 μm de espessura (50Kv e 500 μ), passo de rotação de 0.3 mm e filtro de cobre e alumínio, que tem como função diminuir os artefatos gerados pelo metal do implante. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0). No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser –CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0) foi definida uma área de interesse ao redor do implante (ROI) delimitada por 0,5 mm em torno de todo o implante. Esta área ficou definida como Área Total (0,5mm de margem ao redor dos implantes- ROI 4,5mm x 3,2mm). O software CTAn analisou e mediu a imagem de acordo com a escalas de cinza (*threshold*). O *threshold* utilizado na análise foi de 25-90 tons de cinza, obtido por

Dissertação de Mestrado

meio de testes visando a similaridade com tecido ósseo, possibilitando obter o volume de osso formado ao redor dos implantes. Como os implantes osseointegrados colocados não receberam o Cover Screw (vedante) em alguns casos houve a formação óssea dentro da plataforma protética. Para que esta formação óssea não interferisse com a análise da osseointegração foi definido um segundo ROI que compreendeu a região da plataforma protética (Área da Plataforma). Com os resultados obtidos nos dois ROIs, foi possível definir a Área de formação óssea utilizando a fórmula: Área Total (AT) – Área Plataforma (AP) = Área de formação óssea.

O software CTAn, a partir da delimitação da região de interesse em 2D, promoveu a análise em 3D da mesma pela soma coletiva de todos os “ROI”s de um conjunto contíguo de fatias de imagens transversais. Deste modo foi obtido o percentual de volume do tecido ósseo presente nas áreas de interesse previamente delimitadas (ROIs). Os dados obtidos foram anotados em % de volume ao redor dos implantes.

Após o escaneamento os implantes das tíbias do lado esquerdo foram submetidos ao teste de torque reverso. Para isso, as tíbias foram estabilizadas em uma morsa e, com auxílio de uma chave hexagonal (1,2 mm) conectada ao implante e a um torquímetro digital TQ-680 (Instrutherm Instrumentos de Medição Ltda, São Paulo, SP, Brasil), o implante foi removido por meio de movimento anti-horário. O torquímetro registrou a força (N.cm) necessária para romper a osseointegração (BOLDRINI et al., 2013) e os dados obtidos foram tabulados para obtenção de médias e desvio padrão em cada grupo e período de eutanásia.

4. Processamento das amostras

4.1. *Processamento histológico, histoquímico e imunoistoquímica das amostras.*

As tíbias direitas foram submetidas ao processamento laboratorial com descalcificação em EDTA a 10% por um período de 8 semanas, após esse período os implantes foram removidos e as tíbias foram incluídas em parafina. Cortes histológicos semi-seriados de 4 µm de espessura foram

Dissertação de Mestrado

realizados em direção longitudinal à loja do implante. Os cortes obtidos da porção central do alvéolo do implante foram selecionados e distribuídos por um examinador treinado e cego aos grupos experimentais para serem submetidos a um dos seguintes procedimentos: coloração pela hematoxilina e eosina, para análise histomorfométrica; reação histoquímica com vermelho picrossirius, para análise do nível de maturação do colágeno e reação imunoistoquímica.

O processamento imunoistoquímico foi realizado pela técnica da imunoperoxidase indireta. Para isso, os cortes histológicos selecionados foram desparafinizados em estufa e xilol e hidratados em série decrescente de etanol. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato, em câmara pressurizada (Decloaking Chamber, Biocare Medical, Concord, CA) por 10 min. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena em peróxido de hidrogênio 3% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) por 1 hora e bloqueio dos sítios inespecíficos em soro albumina bovina 2% (Sigma Aldrich, CA, USA) por 12 horas. As lâminas histológicas contendo amostras de todos os grupos experimentais foram divididas em dois lotes, e cada lote foi submetido à incubação durante 24 horas em câmara úmida com um dos seguintes anticorpos primários: anti-OCN do rato gerado em cabra (SC-18319, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) ou anti-TRAP do rato gerado em cabra (SC-30833, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Após lavagens, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado por 2 horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP por 1 hora (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

4.2. Análise Histomorfométrica

Dissertação de Mestrado

Para a avaliação do padrão de osseointegração foi observado a medida da área de osso formado na espira (AO) sobre a superfície do implante. As análises foram feitas entre a 2ª e 4ª rosca de cada implante, sendo considerada área de interesse a intersecção entre osso cortical e medular.

As mensurações foram realizadas utilizando-se um microscópio modelo AxioStar Plus – marca CARL ZEISS com sistema de captura e de análise de imagem AxioVision (Auxílio FAPESP – Processo 2008/06218-0), com objetiva para aumento de 10 vezes. A determinação dos valores foi feita utilizando um software analisador de imagens (ImageJ 1.50b, NIH, EUA). Os valores para a área óssea foram obtidos em mm². As avaliações foram realizadas por um examinador treinado, calibrado e cego para os grupos experimentais.

4.3. Análise Histoquímica

A análise histoquímica do nível de maturação das fibras colágenas foi realizada em microscópio de luz polarizada (100x; AxioLab A1, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), com o auxílio do programa de análise de imagens (ImageJ 1.50b, NIH, EUA) por um examinador treinado, calibrado e cego para os grupos experimentais. As análises foram feitas nas entre a 2ª e 4ª rosca de cada implante, sendo considerada área de interesse a intersecção entre osso cortical e medular. Com auxílio do programa de análise de imagens foram demarcadas as diferentes cores por meio da ferramenta limiar de cor. A área ocupada por verde-amarelo (fibras colágenas imaturas) e laranja-vermelho (fibras colágenas maduras) foi expressa em porcentagem.

4.4. Análise Imunoistoquímica

As secções histológicas foram analisadas sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (400x; AxioLab A1, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) por um histologista certificado que desconhecia os grupos experimentais que estavam sendo analisados. Para OCN a imunomarcção foi definida como coloração acastanhada confinada tanto ao citoplasma das células imunorreativas quanto matriz extracelular. Para TRAP a imunomarcção foi definida como coloração acastanhada

Dissertação de Mestrado

confinada exclusivamente ao citoplasma de células multinucleadas. Executou-se a análise imunohistoquímica empregando uma secção histológica de cada espécime na região entre a 2ª e 4ª rosca de cada implante, sendo considerada como área de interesse a intersecção entre osso cortical e medular. Foram atribuídos os seguintes padrões de imunomarcagem: nulo, baixo, moderado e alto. O grupo controle foi empregado como ponto de referência para se definir o padrão basal de imunorreatividade, a partir do qual os demais grupos experimentais foram comparados.

5. Análise estatística

Previamente a realização do estudo o tamanho da amostra foi determinado para um poder de estudo de 85%. Foram realizadas avaliações para testar a normalidade dos dados obtidos para cada análise através do teste de Shapiro-Wilk. Os testes estatísticos foram aplicados de acordo com a distribuição paramétrica, onde foi realizado o teste de ANOVA (Análises Biomecânica, Microtomográfica e Histométrica), ou não paramétrica, onde foi realizado o teste de Kruskal-Wallis (Análise Histoquímica), todos os testes foram realizados ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A calibração dos examinadores foi realizada com teste T-Student ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para análise dos dados foi utilizado o software Bioestat 5.3 (Instituto Mamirauá, Manaus, AM, Brasil).

Resultados

Dissertação de Mestrado**RESULTADOS****1. Análise Biomecânica**

Foi observada diferença estatisticamente significativa aos 30 dias com maior resistência ao contratorque do grupo C15/30D quando comparado ao grupo 5FU15/30D($p<0,001$), e quando comparados os animais do grupo 5FU15/30D com o grupo 5FU15/45D ($p<0,05$) houve maior contratorque no segundo, e quando comparado o grupo 5FU15/30D com o grupo 5FU30/45D($p<0,001$) houve maior contratorque também no segundo (Figura 2).

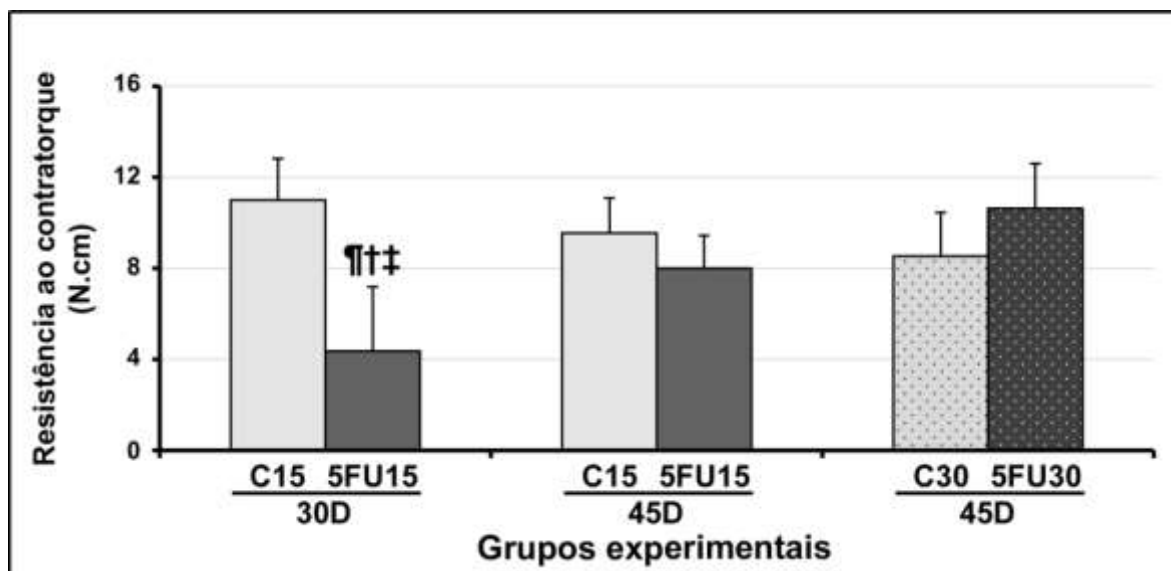


Figura 2. Medidas de resistência ao contratorque em N.cm agrupados por período. *Diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo 5FU15 30D

2. Análise Microtomográfica

Foi verificado maior percentual de volume ósseo na área de interesse no grupo 5FU15/45D quando comparado ao grupo 5FU15/30D($p<0,05$) e também foi observado um maior percentual de volume ósseo na área de interesse no grupo C30/45D quando comparado ao grupo C15/30D ($p<0,05$)(Figura 3).

Dissertação de Mestrado

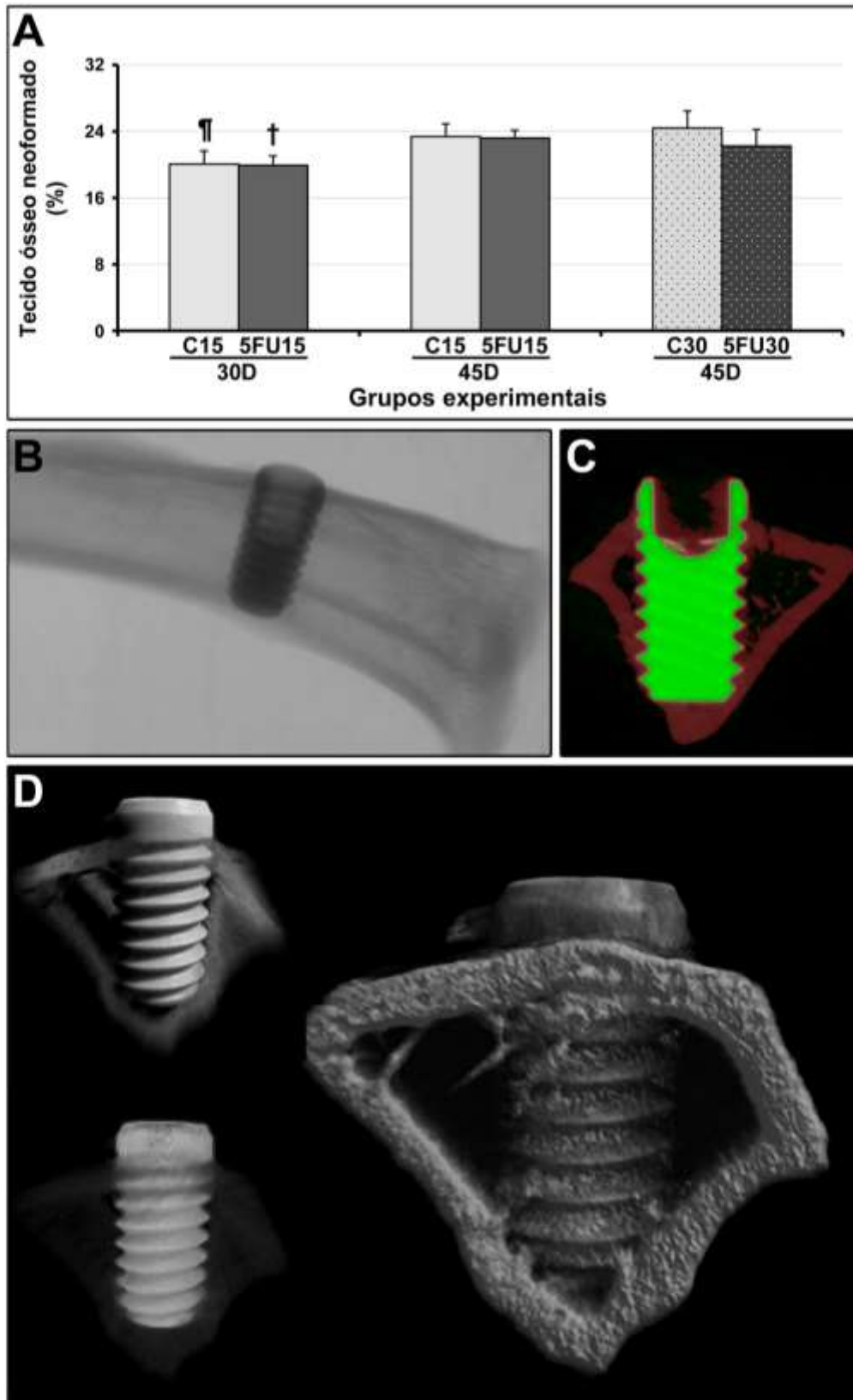


Figura 3. Microtomografia computadorizada do tecido ósseo periimplantar. **(A)** Gráfico evidenciando o volume ósseo (%) periimplantar nos diferentes grupos experimentais. **(B)** Ilustração bidimensional da tibia evidenciando o implante instalado reconstruído através do programa NRecon. **(C)** Ilustração bidimensional do implante e região periimplantar orientado através do programa Data Viewer. **(D)** Ilustrações tridimensionais da tibia evidenciando o implante instalado e reconstruído através do programa CTvol-(2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT). Símbolos: ¶, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C30/45D; †, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU15/45D.

Dissertação de Mestrado**3. Análise Histométrica**

Houve menor AO na interface osso implante 5FU15/30D quando comparado ao grupo 5FU15/45D ($p < 0,05$) e houve ainda menor AO na interface osso implante no grupo 5FU15/30D quando comparado ao grupo 5FU30/45D ($p < 0,05$) (Figura 4).

4. Análise Histoquímica

Houve maior marcação para coloração laranja-avermelhada (fibras maduras) para o grupo C15/30D quando comparado ao 5FU15/30D ($p < 0,05$). Observou-se também maior marcação para coloração laranja-avermelhada (fibras maduras) para o grupo 5FU15/45D quando comparado ao 5FU15/30D ($p < 0,05$) (Figura 5).

5. Análise Imunoistoquímica

A técnica imunoistoquímica empregada para a detecção de OCN e TRAP mostrou alta especificidade na detecção dessas proteínas, a qual foi comprovada pela ausência total de marcação nos controles negativos da reação imunoistoquímica. As células imunorreativas apresentaram uma coloração marrom escuro confinada ao citoplasma e matriz extracelular, no caso da OCN, e exclusivamente ao citoplasma, no caso da TRAP. Houve discreta marcação para TRAP em todos os grupos experimentais (menos de duas células multinucleadas TRAP-positivas por rosca). Esse padrão de imunomarcção foi similar em todos os grupos. O padrão de imunomarcção para OCN foi moderado em todos os grupos experimentais e períodos, exceto em 5FU15/30D que exibiu baixo padrão de imunomarcção (Figura 6).

Dissertação de Mestrado

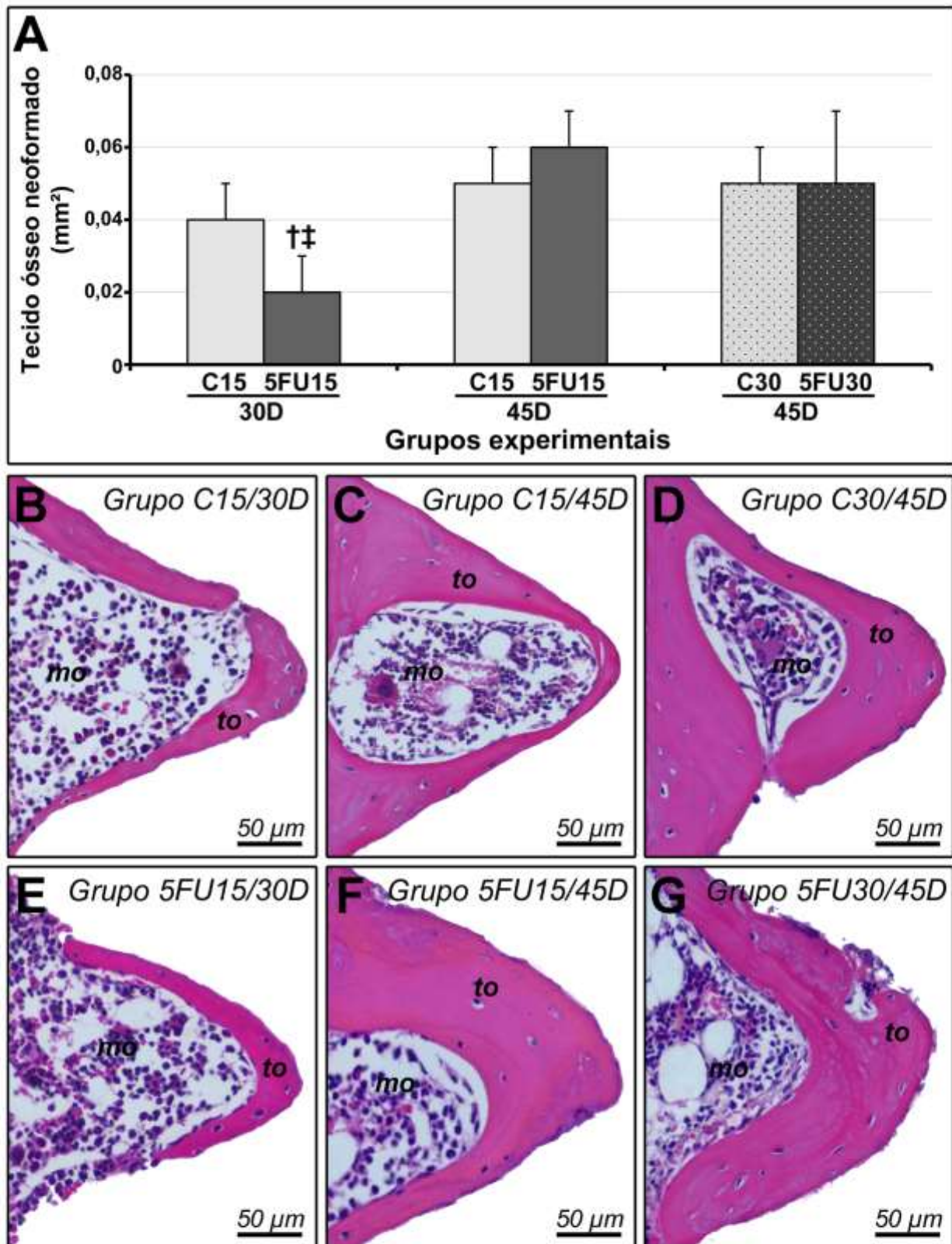


Figura 4: Análise histométrica do tecido ósseo periimplantar. **(A)** Gráfico evidenciando a média e o desvio padrão da área ocupada por tecido ósseo na região periimplantar nos diferentes grupos experimentais. **(B-G)** Fotomicrografias mostrando o tecido ósseo periimplantar em C15/30D **(B)**, C15/45D **(C)**, C30/45D **(D)**, 5FU15/30D **(E)**, 5FU15/45D **(F)** e 5FU30/45D **(G)**. Observar a pequena área ocupada por tecido ósseo na região periimplantar em 5FU15/30D. Abreviações e símbolos: to, tecido ósseo periimplantar; mo, medula óssea; †, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU15/45D; ‡, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU30/45D. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H&E). Aumento original: 400x. Barras de escala: 50 μm.

Dissertação de Mestrado

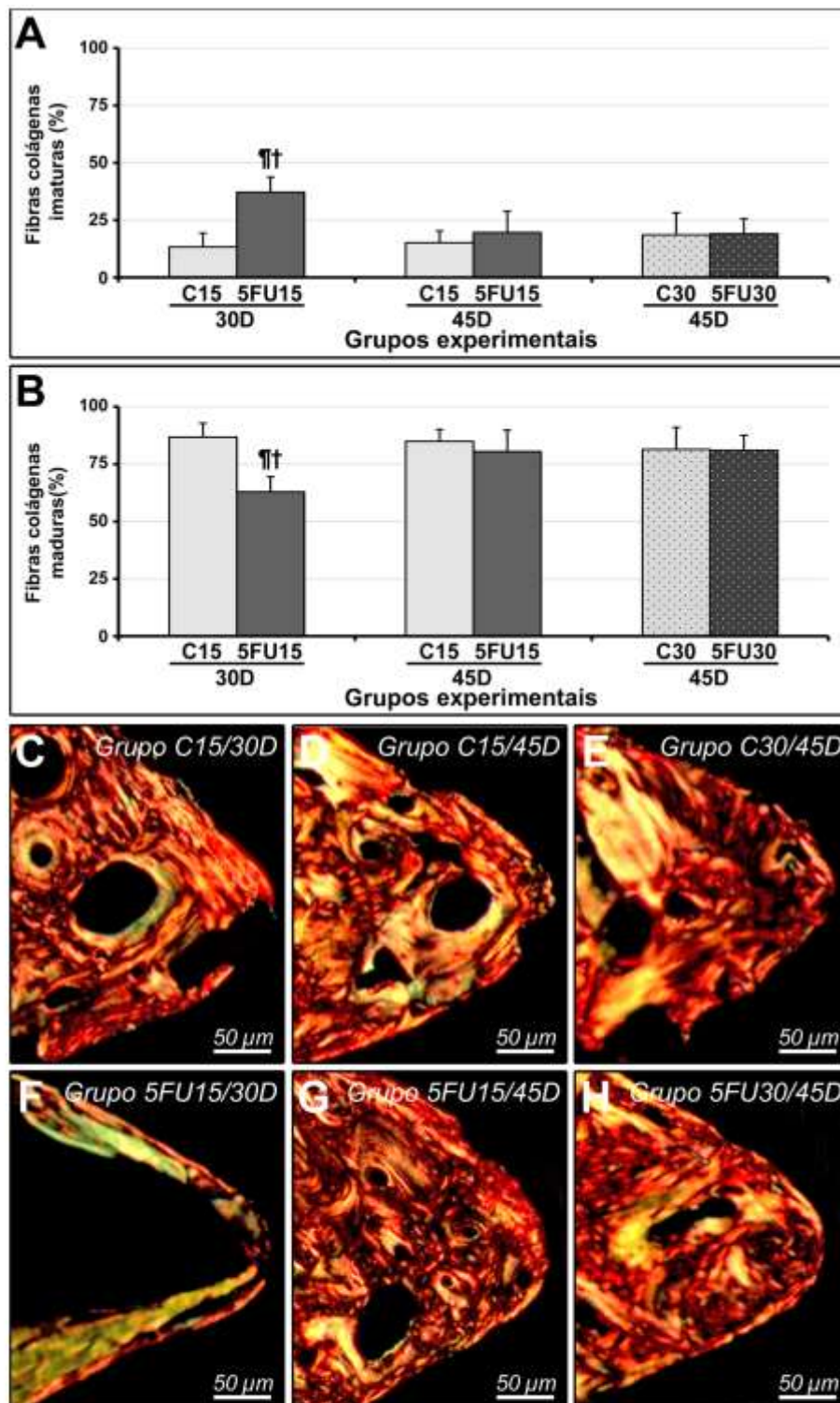


Figura 5: Nível de maturação das fibras colágenas no tecido ósseo periimplantar. **(A-B)** Gráficos evidenciando a média e o desvio padrão da porcentagem de fibras colágenas imaturas **(A)** e fibras colágenas maduras **(B)** no tecido ósseo periimplantar nos diferentes grupos experimentais. **(C-H)** Fotomicrografias mostrando o nível de maturação das fibras colágenas no tecido ósseo periimplantar em C15/30D **(C)**, C15/45D **(D)**, C30/45D **(E)**, 5FU15/30D **(F)**, 5FU15/45D **(G)** e 5FU30/45D **(H)**. Observar a predominância de fibras colágenas imaturas (verde-amareladas) em 5FU15/30D. Símbolos: ¶, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo C15/30D; †, Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 5FU15/45D. Coloração: Vermelho Picro Sirius observado em microscopia de luz polarizada. Aumento original: 400x. Barras de escala: 50 µm.

Dissertação de Mestrado

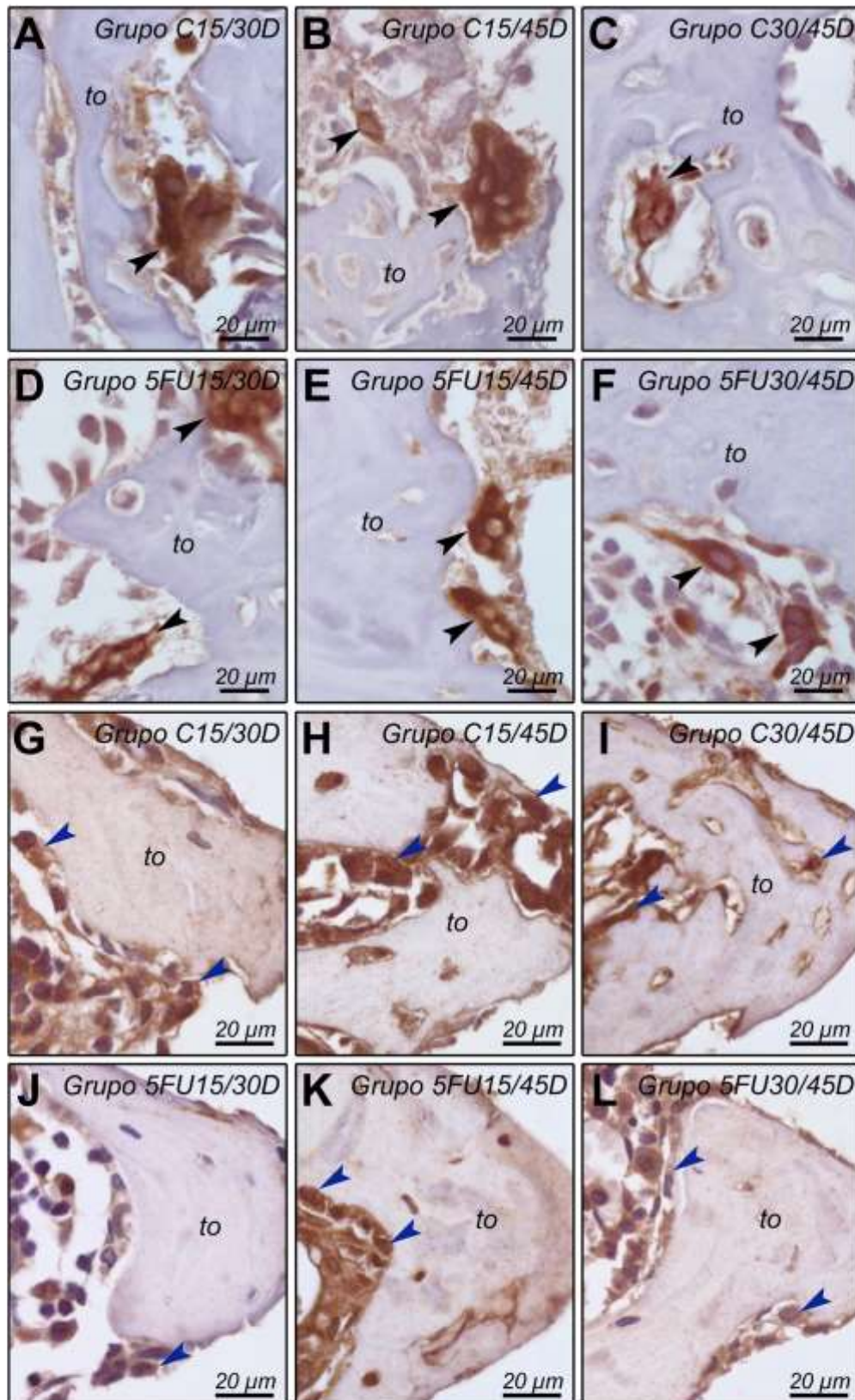


Figura 6: Padrão de imunomarcaco para TRAP e OCN no tecido ósseo periimplantar. (A-F) Fotomicrografias evidenciando células multinucleadas TRAP-positivas (setas pretas) no tecido ósseo periimplantar em C15/30D (A), C15/45D (B), C30/45D (C), 5FU15/30D (D), 5FU15/45D (E) e 5FU30/45D (F). (G-L) Fotomicrografias evidenciando células OCN-positivas (setas azuis) no tecido ósseo periimplantar em C15/30D (G), C15/45D (H), C30/45D (I), 5FU15/30D (J), 5FU15/45D (K) e 5FU30/45D (L). Abreviaes e simbolos: to, tecido ósseo periimplantar; setas pretas, células TRAP-positivas; setas azuis, células OCN-positivas. Contra-colorao: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000X. Barras de escala: 20 µm.

Dissertação de Mestrado

Discussão

Dissertação de Mestrado**DISCUSSÃO**

Devido ao aumento na incidência de casos de câncer no mundo e o papel que a quimioterapia representa no tratamento oncológico, há a necessidade de realização de estudos que avaliem a influência dos fármacos utilizados no tratamento quimioterápico das neoplasias sobre o processo de osseointegração. No entanto poucos são os estudos tanto em animais (AL-MAHALAWYL et al, 2016), quanto em humanos (KARR et al, 1992; McDONALD et al, 1998; KOVÁCS et al, 2001) que avaliaram o efeito dos quimioterápicos sobre o processo de osseointegração de implantes dentário.

No presente estudo objetivou-se avaliar a influência do tratamento quimioterápico com 5-FU durante o processo inicial de osseointegração de implantes e a influência deste mesmo tratamento na maturação do tecido ósseo em áreas de implantes já osseointegrados em tíbias de ratos.

Na análise dos resultados biomecânicos, que representam a força necessária para remover completamente os implantes do tecido ósseo, observou-se nos grupos C15/30D, 5FU15/45D e 5FU30/45D maiores valores no torque de remoção, quando comparados ao grupo 5FU15/30D. Estudos em animais tem demonstrado que as interferências no torque de remoção ocorrem quando comparados apenas os valores dos períodos iniciais com períodos tardios de avaliação (45 a 60 dias), independente dos tratamentos realizados (OGAWA et al, 2000; ELIAS et al, 2008; OMAR et al, 2011). Contudo neste estudo foi observada diferença significativa com menor valor no torque de remoção no período de avaliação de 30 dias no grupo 5FU15/30D quando comparado ao C15/30D. Mesmo que esta análise seja uma forma indireta de avaliação da osseointegração, estudos recentes tem confirmados que é um método válido de avaliação (KLOKKEVOLD et al, 2001; FAEDA et al, 2009; de MOLON et al 2013).

Estudos experimentais nos quais foram instalados implantes em tíbias de ratos demonstraram que o processo de osseointegração se completa próximo aos 30 dias, e aos 45 dias já ocorre a

Dissertação de Mestrado

maturação do osso ao redor do implante (FIORELLINI et al., 1999; BERLEY et al., 2010) razão pela qual optou-se neste estudo analisar os efeitos dos tratamentos nestes períodos.

Corroborando os dados da análise biomecânica, na análise microtomográfica observou-se menor volume ósseo nos animais do grupo 5FU15/30D, quando comparado com os do grupo 5FU15/45D, demonstrando que a osseointegração em animais que receberam o quimioterápico 15 dias após a instalação do implante, pode ser comprometida no início do processo de osseointegração, com um atraso significativo na formação óssea ao redor dos implantes. Recentemente muitos estudos tem utilizado o método de avaliação microtomográfica para mensurar a osseointegração, sendo que a análise da razão Volume de osso/Volume de tecido tem sido a mais utilizada (AL-MAHALAWYL et al, 2016; NAKAHARA et al, 2016), embora outros parâmetros tenham sido utilizados, como a densidade óssea (AL-MAHALAWYL et al, 2016) e superfície de contato osso implante (ARMENCEA et al, 2015).

Na avaliação histomorfométrica, os resultados demonstraram que houve menor área de osso formado nos animais do grupo 5FU15/30D, quando comparado aos animais dos grupos 5FU15/45D ($p < 0,05$) e 5FU30/45D ($p < 0,05$), corroborando os resultados obtidos nas outras análises deste estudo. Tais achados podem estar relacionados com a capacidade do 5-FU em reduzir significativamente o número de osteoblastos da superfície trabecular (XIAN et al, 2006). A coerência entre os resultados das análises biomecânicas e/ou histométricas ou por tomadas microtomográficas tem sido observada em outros estudos que utilizaram as mesmas análises (MARGONAR et al, 2003; LINDERBÄCK et al, 2012; AL-MAHALAWYL et al, 2016).

Entre os vários regimes terapêuticos, 5-FU é uma das drogas administradas no tratamento do câncer de laringe administrado em três ciclos por cinco dias consecutivos com 21 dias de intervalo entre eles (WOLF, 1991). O protocolo de tratamento com o quimioterápico utilizado no presente estudo (60mg/kg (0h) e 40mg/kg(48h), fundamentou-se em estudo prévio de nosso grupo que

Dissertação de Mestrado

observou maior perda óssea alveolar em áreas com doença periodontal induzida em ratos submetidos a este protocolo de quimioterapia (THEODORO et al, 2016).

Na análise histoquímica na qual pode verificar-se o nível de maturação das fibras colágenas presentes, onde as fibras colágenas tipo I maduras são observadas numa tonalidade que varia do vermelho ao laranja, enquanto que as fibras colágenas imaturas são observadas numa tonalidade que varia do amarelo ao verde (SILVA et al, 2011). Observou-se menor percentual de marcação de fibras colágenas maduras nos animais do grupo 5FU15/30D quando comparados aos animais dos grupos C15/30D e 5FU15/45D. Durante a osteogênese os osteoblastos secretam o colágeno, o qual se arranja sob a forma de fibras colágenas, as quais passam por um processo de maturação que precede a deposição da matriz inorgânica. Com relação a deposição de fibras imaturas foi observado maior quantidade nos animais do grupo 5FU15/30D, quando comparado aos animais do grupos C15/30D e 5FU15/45D, representando um atraso na maturação dessas fibras, o qual é essencial para que a osteogênese se concretize. Baseado nos resultados deste estudo salienta-se que houve apenas um atraso e não um comprometimento da maturação das fibras colágenas na osseointegração, tendo em vista que o grupo 5FU15/45D não diferiu do demais grupos experimentais.

A reabsorção óssea consiste na dissolução mineral óssea e catabolismo dos componentes da matriz óssea, e é realizada pelos osteoclastos, que são células multinucleadas, ricas em mitocôndrias e vacúolos e contem fosfatase acida tartarato resistente – TRAP (NAIDU et al, 2008). Na avaliação da imunomarcção de células TRAP-positivas neste estudo observou-se que todos os grupos experimentais apresentaram baixo padrão de imunomarcção para TRAP, evidenciando processo de neoformação óssea continuou sendo predominante mesmo na avaliação de 30 dias nos animais que receberam o quimioterápico 15 dias após a instalação do implante (5FU15/30D), considerado grupo crítico devido aos resultados das demais avaliações. Por outro lado Raghu Nandana et al.(2012) observaram que o 5-FU induz uma condição inflamatória no tecido ósseo que aumenta os níveis de

Dissertação de Mestrado

citocinas pró-inflamatórias, capazes de recrutar osteoclastos, sugerindo assim que o 5-FU aumenta a presença de osteoclastos em tecido ósseo.

Na análise da imunomarcagem de OCN, que é considerada uma das principais proteínas que favorecem a formação óssea, e sua detecção costuma ser abundante nos períodos iniciais do processo de osseointegração (PRATI et al, 2013), foi observado padrão de imunomarcagem moderado em todos os animais dos grupos experimentais, exceto nos animais que foram eutanasiados aos 30 dias e receberam o quimioterápico 15 dias após a instalação do implante (5FU15/30D), e que exibiram baixo padrão de imunomarcagem.

Dentro das limitações do estudo, deve ser considerado que o estudo foi realizado em roedores e os implantes foram instalados em tíbias, não sofrendo ação dos microorganismos bucais e nem as forças da mastigação, que poderiam influenciar no processo de osseointegração. Traçando uma relação dos achados neste estudo com a prática clínica, podemos inferir que há necessidade de um cuidado maior na reabilitação com implantes osseointegráveis em pacientes que receberão tratamento quimioterápico, pois quando a quimioterapia é realizada durante o período de osseointegração este estudo demonstrou que há um prejuízo tanto na formação óssea quanto na qualidade do osso formado. Entretanto também foi possível observar que cessado o efeito imunodepressor do tratamento quimioterápico a osseointegração segue seu curso sem prejuízo. Diante destes fatos acreditamos que seja de grande relevância a proposição de novos estudos em que se avalie o tratamento com sessões prolongadas de quimioterapia, e que avaliem a longevidade dos implantes em pacientes submetidos a quimioterapia.

Conclusão

Dissertação de Mestrado

CONCLUSÃO

Baseado na metodologia utilizada e dentro dos limites deste estudo conclui-se que quando o tratamento quimioterápico com 5-FU é realizado durante a osseointegração ocorre um atraso desse processo, no entanto quando administrado após a osseointegração não exerce influencia negativa sobre os tecidos periimplantares.

Agradecimentos

Ao Departamento de Cirurgia e Clinica Integrada, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”– UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil. À Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pela concessão de bolsa (Processo FAPESP 2014/ 11703-5)

Conflito de Interesse

Não há conflitos de interesse relacionados com este estudo.

Referências

Dissertação de Mestrado

REFERÊNCIAS

1. Albrektsson T, Berglundh T, Lindhe J. Osseointegration: Historic background and current concepts. In: Lindh J, Karring T, Niklaus PL, editors. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 4th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2003. p 809–820.
2. Al-Mahalawyl H, Mareiemail HF, Abuohashishemail H, Alhawajemail H, Alrefaeemail M, Al-Jandanemail B. Effects of cisplatin chemotherapy on the osseointegration of titanium implants. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery*. 2016
3. Armencea G, Berce C, Rotaru H, Bran S, Leordean D, Coadă C, Todea M, Jula CA, Gheban D, Baciut G, Baciut M, Campian RS. Micro-CT and histological analysis of Ti6Al7Nb custom made implants with hydroxyapatite and SiO₂-TiO₂ coatings in a rabbit model. *Clujul Med*. 2015;88(3):408-14. doi: 10.15386/cjmed-479. Epub 2015 Jul 1. PubMed PMID: 26609278; PubMed Central
4. Barrowman, R. ; Wilson, P.; Wiesenfeld, D. Oral rehabilitation with dental implants after cancer treatment, *Australian Dental Journal*, 2011; 56 :160-165
5. Barton D. Oral agents in cancer treatment: the context for adherence. *Semin Oncol Nurs*. 2011 May;27(2):104-15. doi: 10.1016/j.soncn.2011.02.002. Review. PubMed PMID: 21514480.
6. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(3):251-62.
7. Berley J, Yamano S, Sukotho C. The effect of systemic nicotine on osseointegration of titanium implants in the rat femur. *J Oral Implantol* 2010;36(3):185–193.

Dissertação de Mestrado

8. Block SM, Achong MR. Osseointegration. In: Miloro M, Ghali GE, Larsen EP, Waite PD, editors. Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery, 2nd ed. London: BC Decker; 2004. p 189–203.
9. Boldrini C, de Almeida JM, Fernandes LA, Ribeiro FS, Garcia VG, Theodoro LH, et al. Biomechanical effect of one session of low-level laser on the bone-titanium implant interface. *Lasers Med Sci.* 2013;28(1):349-52.
10. Buddula A, Assad DA, Salinas TJ, Garces YI, Volz JE, Weaver AL. Survival of dental implants in irradiated head and neck cancer patients: a retrospective analysis. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012 Oct;14(5):716-22.
11. de Molon RS, Morais-Camilo JA, Verzola MH, Faeda RS, Pepato MT, Marcantonio E Jr. Impact of diabetes mellitus and metabolic control on bone healing around osseointegrated implants: removal torque and histomorphometric analysis in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2013 Jul;24(7):831-7. doi: 10.1111/j.1600-0501.2012.02467.x. Epub 2012 Apr 18. PubMed PMID: 22509797.
12. Elias CN, Oshida Y, Lima JH, Muller CA. Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2008 Jul;1(3):234-42. doi: 10.1016/j.jmbbm.2007.12.002. Epub 2007 Dec 31. PubMed PMID: 19627788.
13. Estimativa 2016. Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2016.
14. Faeda RS, Tavares HS, Sartori R, Guastaldi AC, Marcantonio E Jr. Biological performance of chemical hydroxyapatite coating associated with implant surface modification by laser beam: biomechanical study in rabbit tibias. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Aug;67(8):1706-15. doi: 10.1016/j.joms.2009.03.046. PubMed PMID: 19615586.

Dissertação de Mestrado

15. Fiorellini JP, Nevins ML, Norkin A, Weber HP, Karimbux NY. The effect of insulin therapy on osseointegration in a diabetic rat model. *Clin Oral Impl Res* 1999;10:362–368.
16. Garcia VG, Novaes VC, de Almeida JM, Longo M, Ervolino E, Bomfim SR, Theodoro LH. Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. *Support Care Cancer*. 2015 Jul;23(7):2007-17. doi: 10.1007/s00520-014-2563-y. Epub 2014 Dec 18. PubMed PMID: 25519757. MCID: PMC4632904.
17. Garg A, Guez G. Head and neck cancer, dental implants, and dental oncology. *Dent Implantol Update*. 2011 Jan;22(1):1-8. PubMed PMID: 21323003.
18. Granström G. Craniofacial osseointegration. *Oral Dis*. 2007 May;13(3):261-9.
19. Granström G. Osseointegration in irradiated cancer patients: an analysis with respect to implant failures. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005 May;63(5):579-85.
20. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res*. 2010 Mar;89(3):219-29. doi: 10.1177/0022034509359125. Epub 2010 Feb 5. Review. PubMed PMID: 20139336; PubMed Central PMCID: PMC2903966.
21. Javed F, Al-Hezaimi K, Al-Rasheed A, Almas K, Romanos GE. Implant survival rate after oral cancer therapy: a review. *Oral Oncol*. 2010 Dec;46(12):854-9
22. Karr RA, Kramer DC, Toth BB. Dental implants and chemotherapy complications. *J Prosthet Dent*. 1992 May;67(5):683-7. Review. PubMed PMID: 1527756.
23. Klokkevold PR, Johnson P, Dadgostari S, Caputo A, Davies JE, Nishimura RD. Early endosseous integration enhanced by dual acid etching of titanium: a torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res*. 2001 Aug;12(4):350-7. English, French, German. PubMed PMID: 11488864.

Dissertação de Mestrado

24. Kovács AF. Influence of chemotherapy on endosteal implant survival and success in oral cancer patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001 Apr;30(2):144-7. PubMed PMID: 11405450. .
25. Kovács AF. Influence of chemotherapy on endosteal implant survival and success in oral cancer patients. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001 Apr;30(2):144-7. PubMed PMID: 11405450.
26. Linderbäck P, Agholme F, Wermelin K, Närhi T, Tengvall P, Aspenberg P. Weakeffect of strontium on early implant fixation in rat tibia. *Bone.* 2012 Jan;50(1):350-6. doi: 10.1016/j.bone.2011.10.034. Epub 2011 Nov 12. PubMed PMID: 22108138.
27. Margonar R, Sakakura CE, Holzhausen M, Pepato MT, Alba jR, Marcantonio jE. The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits. *Implant Dent.* 2003;12(4):333-9. PubMed PMID: 14752970.
28. McDonald AR, Pogrel MA, Sharma A. Effects of chemotherapy on osseointegration of implants: a case report. *J Oral Implantol.* 1998;24(1):11-3. PubMed PMID: 9759035.
29. Medeiros CACX, Leitão RFC, Macedo RN, Barbosa DRMM, Gomes AS, Nogueira NAP, Alencar NMN, Ribeiro RA, Brito GAC. Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 67, p. 1085- 1100, 2010.
30. Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, Arai A, Yamashita T, Hosoya A, Ninomiya T, Nakamura H, Yamamoto Y, Kinugawa S, Nakamura M, Nakamichi Y, Kobayashi Y, Nagasawa S, Oda K, Tanaka H, Tagaya M, Penninger JM, Ito M, Takahashi N. Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *The Journal of Cell Biology.* 2009 184, 541-554.

Dissertação de Mestrado

31. Naidu A, Dechow PC, Spears R, Wright JM, Kessler HP, Opperman LA. The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008 Jul;106(1):5-13. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.03.036. Epub 2008 May 27. PubMed PMID: 18504149.
32. Nakahara K, Haga-Tsujimura M, Sawada K, Kobayashi E, Mottini M, Schaller B, Saulacic N. Single-staged vs. two-staged implant placement using bone ring technique in vertically deficient alveolar ridges - Part 1: histomorphometric and micro-CT analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2016 Feb 1. doi: 10.1111/clr.12751. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26833804.
33. Ogawa T, Ozawa S, Shih JH, Ryu KH, Sukotjo C, Yang JM, Nishimura I. Biomechanical evaluation of osseous implants having different surface topographies in rats. *J Dent Res.* 2000 Nov;79(11):1857-63. Erratum in: *J Dent Res* 2001 Jan;80(1):396. PubMed PMID: 11145355.
34. Omar OM, Lennerås ME, Suska F, Emanuelsson L, Hall JM, Palmquist A, Thomsen P. The correlation between gene expression of proinflammatory markers and bone formation during osseointegration with titanium implants. *Biomaterials.* 2011 Jan;32(2):374-86. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.09.011. Epub 2010 Oct 8. PubMed PMID: 20933278.
35. Pereira ML, Carvalho JC, Peres F, Fernandes MH. Simultaneous effects of nicotine, acrolein, and acetaldehyde on osteogenic-induced bone marrow cells cultured on plasma-sprayed titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2010;25(1):112-22.
36. Peterson, LJ, Ellis III, E, Hupp Jr., Tucker, MR. *Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea.* 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2005. 880p.

Dissertação de Mestrado

37. Prati AJ, Casati MZ, Ribeiro FV, Cirano FR, Pastore GP, Pimentel SP, Casarin RC. Release of bone markers in immediately loaded and nonloaded dental implants: a randomized clinical trial. *J Dent Res*. 2013 Dec;92(12 Suppl):161S-7S. doi: 10.1177/0022034513504951. Epub 2013 Oct 24.
38. Raghu Nadhanan R, Abimosleh SM, Su YW, Scherer MA, Howarth GS, Xian CJ. Dietary emu oil supplementation suppresses 5-fluorouracil chemotherapy-induced inflammation, osteoclast formation, and bone loss. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolismo*. 2012 302, 1440-1449.
39. Raghu Nadhanan R, Abimosleh SM, Su YW, Scherer MA, Howarth GS, Xian CJ. Dietary emu oil supplementation suppresses 5-fluorouracil chemotherapy-induced inflammation, osteoclast formation, and bone loss. *Am J Physiol Endocrinol Metab*2012, 302(11):E1440–E1449
40. Silva AN, Oliveira JA, Jamur MC, Junqueira JA, Correa VM, Lima WT. Bone defect. repair on the alveolar wall of the maxillary sinus using collagen membranes and temporal fascia: an experimental study in monkeys. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2011 Jul-Aug;77(4):439-46. English, Portuguese. PubMed PMID: 21860969.
41. Takahashi N, Sasaki T, Tsouderos Y, Suda T. S12911-2 inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. *J Bone Miner Res*. 2003; 18(6): 1082–7.
42. Theodoro LH, Caiado R C, Longo M, Novaes VCN, Zanini NA, Ervolino E, Almeida JM, Garcia VG. Effectiveness of the diode laser in the treatment of induced periodontitis in rats: a histopathological, histometric and immunohistochemical study. *Lasers in Medical Science*, 2014

Dissertação de Mestrado

43. Theodoro LH, Longo M, Ervolino E, Duque C, Ferro-Alves ML, Assem NZ, Louzada LM, Garcia VG. Effect of low-level laser therapy as an adjuvant in the treatment of periodontitis induced in rats subjected to 5-fluorouracil chemotherapy. *J Periodontal Res.* 2016 Jan 10. doi: 10.1111/jre.12347. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26750739.
44. Walker LM, Preston MR, Magnay JL, Thomas PB, El Haj AJ Nicotinic regulation of c-fos and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. *Bone.* 2001;28(6):603-8.
45. Wolf GT. Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. *N Engl J Med.* 1991 Jun 13;324(24):1685-90. PubMed PMID: 2034244.
46. Xian, C.J., Cool, J.C., Pyragius, T. & Foster, B.K. (2006) Damage and recovery of the bone growth mechanism in young rats following 5-fluorouracil acute chemotherapy. *Journal of Cellular Biochemistry* 99, 1688-1704.

Dissertação de Mestrado

Anexo I



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Influência da quimioterapia com 5-fluorouracil na osseointegração de implantes instalados em tíbias de ratos: avaliação biomecânica, histomorfométrica, imunoistoquímica e microtomográfica", Processo FOA nº 2014-00786, sob responsabilidade de Leticia Helena Theodoro apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 26 de junho de 2014.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 21 de Fevereiro de 2016.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 21 de Março de 2016.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Influence of chemotherapy with 5-fluorouracil of the osseointegration installed implants in the rat tibia: biomechanical, histomorphometry, immunohistochemistry and microtomography analysis", Protocol FOA nº 2014-00786, under the supervision of Leticia Helena Theodoro presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 26, 2014.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 21, 2016.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 21, 2016.

Prof. Dr. Edilson Ervolino
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

Dissertação de Mestrado

Anexo II

GUIDELINES for Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see External link <https://www.elsevier.com/publishingethics> and External link <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, External link <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals, External link <http://www.icmje.org>. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. All animal studies need to ensure they comply with the ARRIVE guidelines. More information can be found at External link <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. See also External link <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: External link http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/suporthub/publishing.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see External link <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Dissertação de Mestrado

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Reporting clinical trials

Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including recruitment, enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the randomization procedure. The CONSORT checklist and template flow diagram can be found on External link <http://www.consort-statement.org>.

Registration of clinical trials

Registration in a public trials registry is a condition for publication of clinical trials in this journal in accordance with International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE, External link <http://www.icmje.org>) recommendations. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. A clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to

Dissertação de Mestrado

modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: External link <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see External link <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult External link <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult External link <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see External link <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see External link <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see External link <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of

Dissertação de Mestrado

the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit External link <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (External link <https://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is USD 3000, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: External link <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Dissertação de Mestrado

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (External link <http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (External link <http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (External link <http://support.elsevier.com>) for more information.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals, External link <https://www.elsevier.com/patient-consent-policy>. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Dissertação de Mestrado

Please submit your article via External link <http://ees.elsevier.com/jcms/>.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: External link <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Papers should be set out as follows, with each section beginning on a separate page:

- Title page
- Summary and keywords
- Text
- Acknowledgements and conflict of interest statement
- List of references
- Tables
- Captions to illustrations.

Headings within the text should be appropriate to the nature of the paper. In general those for experimental papers should follow the usual conventions (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusion). Other papers can be subdivided as the

Dissertação de Mestrado

author desires: the use of headings enhances readability. Normally only two categories of headings should be used: major ones should be typed in capital letters in the centre of the page and underlined; minor ones should be typed in lower case (with an initial capital letter) at the left hand margin and underlined.

Papers should be submitted in journal style. Failure to do so may lead to significant delays in publication. Spelling may follow British or American usage, but not a mixture of the two.

Do not use he, his etc where the sex of the person is unknown; say 'the patient', etc. Avoid inelegant alternatives such as he/she. Patients should not be automatically designated as she, and doctors as he. Proprietary names of drugs, instruments, etc should be indicated by the use of initial capital letters and should include the town and country of their manufacture. Papers should be typed in double spacing with a margin of at least 3 cm all round.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Please also include any sources of support in the form of grants.

Summary

This should consist of not more than 200 words and summarize the contents of the article.

Dissertação de Mestrado

Keywords

Immediately after the summary, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes. Terms from the medical subject headings (MeSH) list of Index Medicus should be used (see <http://www.nih.nlm.gov>).

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Temperatures should be given in degrees Celsius and blood pressure in mmHg. Define abbreviations that are not standard in the field at their first occurrence in the article, in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the text.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.

Dissertação de Mestrado

- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

External link <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Photographs and radiographs should be submitted as clear, lightly contrasting black and white images. Photomicrographs should have a magnification and details of staining techniques shown. The final size of photographs will be: (a) single column width (80 mm), (b) double column width (167 mm), (c) somewhere between these sizes and centred on the page. Photographs should ideally be submitted

Dissertação de Mestrado

at the final reproduction size based on the above figures. Where illustrations include recognisable individuals, living or dead, great care must be taken to ensure that consent for publication has been given. In cases where consent has not been obtained and recognisable features may appear, it will be necessary to mask the eyes or otherwise render the individual officially unrecognisable.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see External link <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Illustration services

Elsevier's WebShop (External link <http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Dissertação de Mestrado

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference style

The accuracy of references is the responsibility of the author. The journal follows the `author-date system of citation. Give the author s name (in italics), followed by the year of the publication, e.g. (Gundlach, 2006). If two authors, name both (e.g. Muller and Schulze, 1960); if more than two authors, give the name of the first author followed by `et al. (Shaw et al., 2001) If the same author(s) is referred to in text with more than one publication in same year, a lower case letter should be added to the year (e.g. Meier 1970a, 1970b.). The same letter must be added to the year in the corresponding entry in the reference list. When several publications are cited one after the other, begin with the oldest and end with the most recent (not in alphabetical order).

List all references alphabetically at the end of the paper, on a separate page. All authors or groups of authors cited in the article must appear in the list of references and vice versa. For each reference, list all authors, full title of paper, journal name (abbreviated according to Index Medicus, see <http://www.nih.nlm.gov>), volume, first and last page numbers, year of publication. For example:

Shaw WC, Semb G, Nelson P, Brattstrom V, Molsted K, Prah-Andersen B, Gundlach KK: The Eurocleft project 1996-2000: overview. *J Craniomaxillofac Surg* 29:131-142, 2001.

When citing a book chapter, give the author(s), title, editor, title of book, place of publication, publisher, first and last page numbers, year of publication. For example:

Dissertação de Mestrado

Heslop IH, Cawood JI, Stoelinga PJW: Mandibular fractures: treatment by closed reduction and direct skeletal fixation. In: Williams JL (ed.), Rowe and Williams Maxillofacial Injuries, 2nd edition. Edinburgh: Churchill Livingstone, 341 386, 1994.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: External link <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at External link <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at External link <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at External link <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

Dissertação de Mestrado

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site at External link <http://support.elsevier.com>.

Special subject repositories

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with manuscript archiving requirements of the following funding bodies, as specified as conditions of researcher grant awards (please see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/fundingbodyagreements> for full details of the agreements that are in place for these bodies):

- Arthritis Research Campaign (UK)

Dissertação de Mestrado

- British Heart Foundation (UK)
- Cancer Research UK
- Howard Hughes Medical Institute (US)
- Medical Research Council (UK)
- National Institutes of Health (US)
- Wellcome Trust (UK)

These agreements and policies enable authors to comply with their funding body's archiving policy without having to violate their publishing agreements with Elsevier. The agreements and policies are intended to support the needs of Elsevier authors, editors, and publishing partners, and protect the quality and integrity of the peer review process. They are examples of Elsevier's ongoing engagement with scientific and academic communities to explore ways to deliver demonstrable and sustainable benefits for the research communities we serve.

Authors who report research by funding bodies not listed above, and who are concerned that their author agreement may be incompatible with archiving requirements specified by a funding body that supports an author's research are strongly encouraged to contact Elsevier's author support team (authorsupport@elsevier.com). Elsevier has a track-record of working on behalf of our authors to ensure authors can always publish in Elsevier journals and still comply with archiving conditions defined in research grant awards.

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

External link <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 9 (or higher) available free from External link <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs

Dissertação de Mestrado

(also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: External link <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and scan the pages and return via e-mail. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication; please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with 25 free paper offprints, or, alternatively, a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, more paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (External link <http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (External link <http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).