

ANA CARULINA REZENDE DE MORAES FERREIRA

Araçatuba – São Paulo

2017

ANA CARULINA REZENDE DE MORAES FERREIRA

**RECONSTRUÇÃO ORBITÁRIA COM IMPLANTES MEDPOR®. ESTUDO
HISTOMORFOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO**

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 Implantodontia).

Orientador: Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Jr.

Araçatuba – São Paulo

2017

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F383r Ferreira, Ana Carolina Rezende de Moraes.
Reconstrução orbitária com implantes Medpore: estudo histomorfológico e imunohistoquímico / Ana Carolina Rezende de Moraes Ferreira. – Araçatuba, 2017.
45 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Jr

1. Órbita 2. Fraturas orbitárias 3. Polietileno I. T.

Black D7
CDD 617.6

DEDICATÓRIA

Eu dedico esta conquista as pessoas mais importantes da minha vida, os quais foram a base de tudo que me formei, aqueles que fundamentam a minha história: **a minha família.**

A meu pai e minha mãe (*Jeová Ferreira da Silva e Jueli Coelho de Rezende e Silva*) que desde o início da minha vida não mediram esforços para me amar, me educar e me darem bons conselhos. Com muita dor no coração me mandaram para longe de suas vistas com 14 anos, para garantirem meu futuro, e desde então recebi incentivos para me aperfeiçoar cada vez mais em minha profissão. Sem vocês jamais teria chegado tão longe, teria desistido várias vezes, mas graças a Deus tenho vocês comigo. Amo muito vocês.

A minha irmã ***Ana Bárbara Rezende de Moraes Ferreira***, que me emociono cada vez que digo seu nome, amor, fidelidade, lealdade, amizade e orgulho, essas palavras resume minha relação com minha querida irmã. Muito obrigada por ter me ajudado nas minhas conquistas e me dado força durante minhas angustias, nunca esquecerei todas as vezes que ergueu a mão para me ajudar, eu realmente não sei viver sem você.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, por sempre iluminar o meu caminho e conduzir minhas escolhas permitindo que em 2005 eu ingressasse nesta faculdade no curso de graduação em Odontologia e conhecesse pessoas que me inspiraram e encorajaram a ser cada dia melhor.

Ao meu querido orientador, **Prof. Adj. Idelmo Rangel Garcia Jr.**, que foi essencial no meu crescimento profissional e pessoal, durante o mestrado me orientou com todo carinho, interesse e responsabilidade, fazendo com que as coisas mais complexas parecessem simples. Agradeço a oportunidade de estar ao seu lado por todos esses 10 anos, e ter me deixado aprender com o senhor, me aceitando com todos os meus defeitos e sempre acreditando em meu potencial. Os seus ensinamentos foram muito além dos conteúdos curriculares, a sua missão vai muito além da missão de um professor, o senhor é um verdadeiro mestre, minha inspiração. Devo ao senhor esse título. Muito obrigada.

A **Prof^a Assistente Doutora Ana Paula Farnezzzi Bassi**, que com sua humildade e dedicação me ajudou durante os dois anos da minha pós graduação, sempre fazendo mais que suas obrigações sendo minha orientadora, amiga e exemplo de ser professora, muito obrigada por tudo.

Aos professores da Disciplina de **Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Prof. Dra. Alessandra Marcondes Aranega, Prof. Dra. Daniela Ponzoni e Prof. Dr. Francisley Ávila Campos.** Meu muito obrigado por todos os momentos de conhecimento que foram compartilhados no departamento. Vocês têm a minha admiração.

Ao **Professor Adjunto da Disciplina de Prótese Total Wirley Gonçalves Assunção** que do seu jeito ímpar sempre esteve disposto a me ouvir e me ensinar, esteve muito presente durante meu mestrado, quero que o senhor saiba da minha admiração e carinho e que está entre os melhores professores que já tive.

Ao **Professor Doutor Coordenador da residência de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Universidade de Cuiabá Alexandre Meirelles Borba**, que esteve na minha direção durante meus três anos de residência, fazendo com que esses anos fossem mais aconchegantes e me deu força para lutar mais esses dois anos de mestrado, muito obrigada por tudo Borba, tenho muito orgulho de ter você como chefe, professor e amigo.

Aos **colegas da pós-graduação de Odontologia**, da área de Prótese; Periodontia; Ortodontia; Periodontia; Clínica Integrada; Dentística; Estomatologia e Odontopediatria. Meu muito obrigado.

Aos **colegas da pós-graduação da área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial e Implantodontia: Sabrina Ferreira, André Luis Fabris, Rodrigo dos Santos Pereira, Juliana Zorzi, Igor Mariotto Beneti, Heldo Cesar, Julierme Ferreira, Eduardo Dias Ribeiro, Júlio Cesar Oliveira, Willian Moraes, Mônica Palacio, Carolina Danieletto, João Paulo Bonardi, Gustavo Momesso, Leonardo Freitas, Willian Ricardo, Ricardo Mureb, Gabriel Mulinari, Pedro Henrique Ferreira, Tarik Polo, Cristian Statkiewicz, Igor Putini, Valthierre Nunes e Maria del Pilar.** Todos vocês têm minha admiração, amizade e carinho. Muito obrigado por cada conhecimento compartilhado, ajuda e momentos incríveis que passamos. Um agradecimento especial aos meus queridos amigos **Willian Ricardo e Mônica Palacio** que estiveram comigo em tantos momentos especiais e levo vocês no meu coração por toda minha vida.

Ao meu namorado **Flávio Gonçalves Laranja** que no final do meu mestrado me incentivou e não mediu esforços para que eu pudesse concluir essa etapa da minha vida, te amo muito.

Ao **Diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Professor Wilson Roberto Poi**, pelo maior exemplo do “Ser Professor”. Muito obrigado por fazer parte da minha formação e me fazer descobrir o professor que está em mim.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da Bolsa de Mestrado durante meu curso. Meus

sinceros agradecimentos por promover o apoio financeiro e com isso, permitir que fosse possível a realização do mestrado.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, pela oportunidade de realização do curso de mestrado. A cada dia admiro mais esta universidade que há 10 anos é minha segunda casa e agradeço ainda as oportunidades que esta instituição me forneceu e continua fornecendo.

À **coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”** na pessoa do **Prof. Adj. André Luís FragaBriso**.

Aos **funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP** pela disponibilidade e paciência em todas as etapas do mestrado. Pelo trabalho honesto e sempre ágil, em especial a **Lilian**, que admiro pela dedicação à pós-graduação e aos alunos contidos nela, e muita gratidão pelas ajudas nos momentos difíceis.

Aos **funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP** pela prontidão em nos atender e carinho.

Aos **funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada (Paulo e Marco)**. Muito obrigado pelo carinho e respeito.

Aos **pacientes**, pela credibilidade e confiança depositadas a nós pós-graduandos, permitindo-nos aprimorar as habilidades cirúrgicas e, como sempre estaremos em nossas vidas, aprendendo constantemente.

Epígrafe

*“Absorva o que for útil, descarte o que não for, e adicione aquilo que for
unicamente seu.”*

Bruce Lee

RESUMO

Ferreira, ACRM. Reconstrução orbitária com implantes medpor®: Estudo histomorfológico e imunohistoquímico. [Dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP; 2017.

Entre os materiais aloplásticos, o Medpor® apresentou um aumento considerável no uso de 17% a 30%, portanto o objetivo desse trabalho foi avaliar a utilização do Medpor® na reconstrução do assoalho orbitário. Foram utilizados 18 ratos que sofreram trauma cirúrgico no assoalho orbitário, simulando uma fratura tipo "blow-out". O lado direito do animal recebeu implante de Medpor® e o lado esquerdo não recebeu qualquer tipo de material. Nos períodos de 15, 40 e 90 dias foram realizadas as eutanásias e obtenção das peças para processamento histológico e imunohistoquímico. Os cortes obtidos foram corados com hematoxilina e eosina, tricrômico de Masson e marcação imunohistoquímica nos períodos de 15, 40 e 90 dias com a osteocalcina e RUNX2. O processo de reparo no lado controle finalizou com neoformação óssea aos 40 dias e perda do contorno ósseo inicial, criando um defeito no assoalho de órbita. O grupo tratado mostrou prevalência de tecido conjuntivo em contato com o implante de Medpor®, tanto em sua periferia quanto no seu interior. Não houve processo inflamatório intenso e ou agudo junto ao material. A imunomarcação mostrou escores intensos de OC após 15 dias de pós-operatórios e manteve expressão moderada após 40 e 90 dias pós-operatório, a RUNX2 foi moderadamente expressa em todos os períodos avaliados. Concluímos que o polietileno poroso (Medpor®) é um biomaterial bionert seguro e eficaz, a sua presença levou ao reparo ósseo local e compensou a ausência de tecido ósseo na sustentação do globo ocular.

Palavras-chave: Órbita, Fraturas blow-out, Polietileno de Alta densidade

ABSTRACT

Ferreira, ACRM. Reconstruction of the orbital floor with Medpor®: Histomorphological and Immunohistochemical analysis in rats. [Dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP; 2017.

The aim of this research was to assess histological and immunohistochemical properties in the use of porous polyethylene (Medpor®) for orbital floor reconstruction. Under general anesthesia 18 male rats (*Rattus, norvegicus, albinus*, Wistar) underwent bilateral surgical defect, simulating blowout fracture and infraorbital rim. Groups were divided as follows: G1 control group and GII surgical defects were reconstructed with Medpor®. After 15, 40, and 90 days animals were euthanized with anesthetic overdose. Orbital specimens were processed, coronal slices were stained in Hematoxylin and Eosin and Masson trichrome. Immunohistochemical assessment of osteocalcin (OC) and Core-binding factor alpha1 (Cbfa1) were performed. Bone repair at the control group was achieved after 40 days with loss of the orbital rim and lack of ocular support. Immunolabeling showed intense scores of OC after 15 days post-operative and maintain moderate expression after 40 and 90 days postoperative, Cbfa1 was moderately expressed within all the periods evaluated. Medpor® group showed fibrous tissue in contact with the implant in the inner and outer surface, without new-bone formation and without intense inflammatory infiltrate nearby the biomaterial, the Medpor® gave enough support for the ocular globe.

Key words: Orbital floor, blow out fracture, Medpor®

LISTA DE FIGURAS

Figura A	Cirurgias experimentais para confecção das cavidades experimentais controle e tratado	35
Figura 1	Grupo controle – 15 dias. H.E. 10x	35
Figura 2	Grupo controle – 15 dias. H.E. 40x	36
Figura 3	Grupo controle – 15 dias. Tricrômico de Masson 40x	36
Figura 4	Grupo Medpor – 15 dias. H.E. 10x	37
Figura 5	Grupo Medpor – 15 dias. H.E. 100x	37
Figura 6	Grupo Medpor – 15 dias. Tricrômico de Masson 10x	38
Figura 7	Grupo Medpor – 15 dias. Tricrômico de Masson 100x	38
Figura 8	Grupo controle – 40 dias. H.E. 10x	39
Figura 9	Grupo controle – 40 dias. H.E. 100x	39
Figura 10	Grupo Medpor – 40 dias. H.E. 10x	40
Figura 11	Grupo Medpor – 40 dias. H.E. 40x	40
Figura 12	Grupo Medpor – 40 dias. Tricrômico de Masson. 10x	41
Figura 13	Grupo Controle - 90 dias. H.E. 40x	41
Figura 14	Grupo Controle - 90 dias. Tricrômico de Masson 100x	42
Figura 15	Grupo Medpor - 90 dias. H.E. 10x	42
Figura 16	Grupo Medpor - 90 dias. H.E. 40x	43
Figura 17	Grupo Medpor - 90 dias. H.E. 160x	43
Figura 18	Grupo Medpor - 90 dias. Tricrômico de Masson. 10x	44
Figura I	15 dias – Osteocalcina	44
Figura II	40 dias – Osteocalcina	45
Figura III	40 dias – Osteocalcina	45
Figura IV	40 dias – Osteocalcina	46
Figura V	Imunomarcações - Grupo Tratado: A - Expressão intensa de osteocalcina (15 dias); B - OC expressa de forma moderada (40 dias), C - OC expressa de forma moderada (90 dias), D - RUNX2 expressa moderadamente (15 dias), E - RUNX2 expressa moderadamente (40 dias), F - RUNX2 expressa moderadamente (90 dias).	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais	47
Tabela 2 – Grupos experimentais de acordo com o tratamento realizado para a fratura blow-out.	48
Tabela 3 – Tabela com escores obtidos das imuno marcações.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ml – Mililitro

kg – Kilograma

mg – Miligramas

ml/Kg – Mililitros por kilogramas

mg/Kg – Miligramas por kilogramas

nº - Número

EDTA – Etilenodiaminotetracético

mJ – Milijoules

µm – Micrometros

RUNX2 – Fator de Transcrição relacionado ao Fator Runt 2

OC – Osteocalcina

SUMÁRIO

1. Introdução	16
2. Proposição	19
3. Materiais e Métodos	20
4. Resultados	24
5. Discussão	27
6. Conclusão	30
Referências	32
Apêndices	35
Anexo A - Comitê de ética	49
Anexo B – Normas para publicação	51

1. INTRODUÇÃO

Fratura “blow-out” é o termo usado para descrever fraturas do assoalho orbitário e parede medial da órbita (1,2). A fisiopatologia dessas fraturas podem ser explicadas por duas teorias: a primeira chamada de teoria hidráulica, onde uma força é transmitida através do impacto no globo ocular, o qual sofre retropropulsão e eleva a pressão intra-orbital, esta pressão é transmitida à parede medial ou inferior, enquanto a borda orbitária permanece intacta; a segunda teoria é explicada pelo impacto direto da força na borda orbitária, onde a força é transmitida para a parede de menor espessura, causando a fratura (2, 3,4). Sinais clínicos como equimose periorbitária e subconjuntival, assimetria facial, limitação de movimentos oculares, enoftalmia, enfisema, sangramento nasal, diplopia, parestesia do nervo infra-orbitário e diminuição da acuidade visual são características deste tipo de fratura (5).

O tratamento cirúrgico da fratura blow-out tem como objetivo reposicionar o conteúdo orbitário e reconstruir anatomicamente o defeito ósseo do assoalho de órbita retomando a função orbital (6). Para reconstrução desses defeitos orbitários têm sido utilizado enxertos autógenos e aloplásticos. Reconstruções com enxerto ósseo autógeno geralmente apresentam bons resultados, sendo rara a presença de infecção no período pós-operatória e eficaz em casos de grandes defeitos ósseos, porém desvantagens como um tempo cirúrgico longo, morbidade ao obter o tamanho adequado do enxerto e risco de reabsorção óssea são encontradas (7,8,9). Como implante aloplástico, os implantes de polietileno poroso (Medpor®, Porex Surgical, Inc, College Park, Newnan, GA)

têm sido amplamente utilizados em reconstruções craniofacial (10, 11), assim como em reconstruções orbital (12).

Esse material, Medpor®, trata-se de um polietileno puro, com único processo de fabricação e tamanho padrão de poros (150 - 200 μm). Suas principais características são biocompatibilidade, rigidez, não reabsorvível, manipulação simples, fácil adaptação e confecção de contornos precisos (13-15). Através de seus poros ocorre proliferação de vasos sanguíneos e como consequência maior presença de células anti-inflamatórias, que diminui o risco de infecção e melhora a integração do implante com o tecido ósseo criando uma característica natural a região reconstruída (16). Entretanto apresenta desvantagens como radiolucência em exames de imagem, infecção, hematoma, seroma, palpação subcutânea e deformação do contorno (17). Há ainda a possibilidade de deslocamento do implante, que pode resultar em protrusão através da pele, compressão de nervos e outras estruturas importantes (18). Porém estudos afirmam que o Medpor não é diretamente responsável por essas complicações pois geralmente algumas dessas já são existentes no momento do pré-operatório e outras fazem parte dos sinais compatíveis com o processo cirúrgico independente da instalação ou não do implante de Medpor. Sendo que a única complicação ocasionada por esse biomaterial são quadros infecciosos com poucos casos na literatura (19).

Portanto o Medpor®, assim como a malha de titânio é o implante aloplástico mais utilizado (83%) para a reconstrução do assoalho orbital, enquanto o uso de enxerto autogeno foi inferior a 5% (20). Esta tendência de materiais aloplásticos é provavelmente o resultado de sua facilidade de uso (não

há necessidade de um sítio doador) e evidências científicas da sua segurança e eficácia. O enxerto ósseo autógeno foi predominantemente utilizado entre 1990 e 1999 (45% de osso autógeno contra 32% de tela de titânio), enquanto que as frequências mais recentes foram invertidas (46% de implantes aloplásticos contra 30% de osso autógeno). Entre os materiais aloplásticos, o Medpor® apresentou o maior aumento no uso de 17% a 30%, enquanto o uso de tela de titânio diminuiu de 15% para 11% (20).

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar os fenômenos que ocorrem ao redor do implante de Medpor quando implantado em região periorbitária em fraturas tipo blow-out por meio de avaliação histológica e imunohistoquímica e dar suporte à indicação clínica deste biomaterial para este tratamento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Após a aprovação do Comitê de ética em pesquisa no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (**Anexo A**), 18 ratos (*Rattus, norvegicus albinus* Wistar) machos, com peso variando entre 150 e 200 gramas foram mantidos em gaiolas individuais no Biotério da Faculdade de Odontologia do campus de Araçatuba– UNESP , alimentados com ração sólida (NUVILAB, Curitiba PR, Brasil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água "ad libitum", com exceção das 8 horas pré-operatórias e 3 horas pós-operatórias.

Para realização desta pesquisa, os animais foram divididos em 6 grupos (n = 6 por grupo), operados e submetidos à eutanásia em três momentos do experimento: 15, 40 e 90 dias pós-operatórios. Ambos os lados foram operados, sendo o lado esquerdo denominado controle e o direito tratado (Tabela 1e2).

Os animais foram operados sob anestesia geral utilizando cloridrato Ketamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) 0,7ml/kg associada a Xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil) 0,3mg/kg administrada via intramuscular. Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis. Após tricotomia e antissepsia com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico (PVPI 10% Riodeine, Rioquímica, São José do Rio Preto) e aposição de campos estéreis na região sub-ciliar bilateral, foi realizada uma incisão envolvendo a derme e o periósteo, contornando o rebordo

orbitário inferior, no sentido medial/lateral de aproximadamente 1,5 cm, com lâmina nº 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) e o descolamento total do retalho com descolador tipo Molt (Hu-Friedy, Alemanha) em ambos os lados. Através de dissecação cuidadosa e exposição do assoalho orbitário, foi realizada neste local osteotomia de 4mm de diâmetro, com broca carbide esférica nº 01 acoplada à alta rotação, sob irrigação contínua com solução fisiológica 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), simulando clinicamente a perda de substância óssea após fraturas cominutivas (blow-out) do assoalho e rebordo orbitário (Figura I).

Em seguida, após a realização da perda óssea cirúrgica bilateral das cavidades experimentais, o lado direito dos animais recebeu implantes de Medpor® (Medpor®, Porex Surgical, Inc, College Park, Newnan, GA) que foram esculpido com lâmina de bisturi n 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) para perfeita adaptação ultrapassando 1mm da borda do defeito e fixado através de sutura, empregando-se fio reabsorvível (ácido polilático – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) no periósteo, enquanto o lado esquerdo não recebeu qualquer tipo de enxerto ou implante. As estruturas foram cuidadosamente reposicionadas e ambos os lados tiveram o tecido mole suturado por planos, utilizando-se mais uma vez fio reabsorvível (ácido polilático – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo (Figura A). No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

Para obtenção das peças de análise laboratorial, os animais foram submetidos à eutanásia nos períodos de 15, 40 e 90 dias pós-operatórios por meio de dose excessiva de anestésico. Foi realizada a dissecação do local trabalhado de maneira criteriosa na busca de dados clínicos e obtenção das peças íntegras para a realização do exame histológico, incluindo toda cavidade orbitária e o globo ocular bilateral.

Processamento Tecidual

As estruturas orbitárias dos ratos foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por 5 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas. As peças foram incluídas em blocos de parafina, de maneira que na realização os corte foram iniciados a partir do centro do defeito e cortes seriados de 6µm de espessura, corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE Merck & Co.,Inc.). Para análise histológica foram avaliadas 3 lâminas por animal onde todo o defeito foi obtido. Um único examinador realizou as análises, sendo ele o orientador Professor Adjunto Doutor Idelmo Rangel Garcia Jr.

Análise histológica

Após as lâminas serem coradas com HE (Merck & Co. Inc.) as mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um

microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas ImageLab 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canada).

Análise Imunohistoquímica

Para o processamento imunohistoquímico, utilizou cortes incluídos em parafina dos mesmos animais que foram realizadas as colorações para análise histológica. Como anticorpos primários, foram utilizados o anticorpo para RUNX2 (Goat polyclonal anti-PEBP2a - Santa Cruz Biotechnology, SC8566), e anticorpo para OC (OC, Goat polyclonal 11anti-oc – Santa Cruz Biotechnology, SC18319). Como anticorpo secundário biotilado usou o anticabra (goat) produzido em coelhos (Pierce Biotechnology) e a Streptavidina Biotina como amplificador do sinal (Dako). O método de detecção foi imunoperoxidase e a 3,3 diaminobenzidina (Dako) foi utilizada como cromógeno, seguida da contra-coloração com hematoxilina (foram realizados procedimentos de controle por meio da omissão dos anticorpos primários controle negativo), para avaliar a especificidade e efetividade das reações.

Para realização da análise qualitativa da expressão das proteínas foi utilizado microscópio óptico com objetiva de aumento 20X Leica Aristoplan 47 Microsystems (Leitz, Benshein, Alemanha) acoplado a uma câmera de captura imagem (Leica DFC 300FX, Leica microsystems, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas (Leica Camera Software Box, Leica Imaging Manager - IM50 Demo Software).

Os escores foram atribuídos através de uma escala qualitativa de 4 graus, sendo 0 -ausente, 1 – leve, 2 – moderada e 3- intensa.

4. RESULTADOS

Não foram observadas complicações clínicas pós-operatórias e não houve sinal de deformidade periorbital em nenhum animal.

Análise histológica

Grupo Controle - 15 dias

Observou-se que o defeito cirúrgico foi preenchido com tecido conjuntivo e houve neoformação óssea próximo ao periósteo e ao centro do defeito; também foi observada área de osso necrótico adjacente às paredes do defeito (Figura II, III, IV).

Grupo Tratado - 15 dias

Neste período observa-se uma intensa proliferação do tecido conjuntivo fibroso, que envolve o Medpor, estando em íntimo contato com sua superfície e, sugerindo um processo de encapsulamento. Não há evidência de processo inflamatório intenso crônico e ou agudo (Figuras V e VI). É possível notar um bom padrão de disposição das células fibroblásticas e intensa secreção de colágeno com ordenação de fibras que penetram no interior do Medpor, ocupando áreas que proporcionam ancoragem ao implante no local (Figuras VII e VIII).

Grupo Controle - 40 dias

O defeito cirúrgico estava quase cheio de osso lamelar, trabéculas espessas e espaços medulares; contudo a área central foi invadida por tecido conjuntivo e muscular, sem reparo completo de todo o defeito (Figura IX e X).

Grupo Tratado - 40 dias

Aos 40 dias pós-operatórios do grupo Medpor, a cavidade experimental se encontra preenchida por tecido ósseo neoformado maduro com sistemas harvesianos completos e processo de remodelação óssea praticamente finalizada, similar ao grupo controle. (Figuras XI e XII). Todo o processo acontece sob a presença do implante, e junto à periferia prevalecem áreas de tecido conjuntivo fibroso que podem ser observadas em contato e preenchendo os espaços dos poros do material. Notamos em algumas áreas de interface do material e tecido conjuntivo, intensa proliferação celular, que pode sugerir processo inflamatório crônico (Figura XIII).

Grupo Controle - 90 dias

Observou-se um rebordo orbitário reparado em quase todos os espécimes, um tecido ósseo com trabéculas ósseas maduras, espessas e sistema Haversiano completo, com aparente diminuição da formação óssea no centro do defeito cirúrgico em alguns espécimes, de fato houve neoformação óssea em todos os defeitos cirúrgicos (Figura XIV e XV).

Grupo Tratado - 90 dias

Aos 90 dias pós-operatórios do grupo tratado, observamos a permanência do Medpor na área de reconstrução com tecido ósseo neoformado em sua porção inferior e tecido conjuntivo fibroso e muscular que sustentam o olho em sua porção superior (Figuras XVI e XIX). As áreas de osso remodelado na região da interface com o Medpor são minorias (Figura XVII), o que predomina em contato com o material e no interior de seus poros é tecido fibroso com raras áreas de infiltrado inflamatório crônico inespecífico (Figura XVIII).

Análise imunohistoquímica

As marcações de OC foram identificadas nos tempos de 15, 40 e 90 dias no grupo tratado com Medpor. Houve marcação discreta junto ao tecido de contato com o implante, mostrando apenas marcações no tecido conjuntivo periférico, sem evidenciar aumento no número ou diferenciação de células osteoblásticas nos períodos estudados, que não evidenciou processo de osteoindução ou mesmo osteocondução (Tabela 3). Amostra de marcações imunohistoquímicas para cada proteína usada neste estudo é mostrada nas figuras XX, XXI, XXII, XXIII e XIV.

5. DISCUSSÃO

O assoalho de órbita é considerado a parede mais fraca do complexo orbitário, por isso que constantemente é a área mais prejudicada após trauma nessa região. Estudos certificam que a energia média necessária para fratura de assoalho de órbita de um cadáver humano é de 78 mJ para a teoria hidráulica e para a teoria direta 68mJ. (21) Diante esses dados e o tipo de fratura simulada em nossa pesquisa, podemos classificar a nossa fratura na teoria direta.

A intervenção cirúrgica e a reconstrução óssea de uma fratura “blow-out” baseiam-se em critérios clínicos como a diplopia, o enoftalmo ou o aprisionamento de músculos extra-oculares (3). Reconstrução de grandes defeitos é um desafio real para os cirurgiões Bucomaxilofaciais, pois o enxerto ou o biomaterial tem que reparar a forma original (6) tão fielmente quanto possível e ainda a função do globo ocular, a posição inadequada do enxerto ou implante pode interferir no funcionamento dos músculos extraoculares ou alterar volume orbitário provocando diplopia e/ou enoftalmia ou exoftalmia (22). Dessa forma, esse estudo está avaliando apenas os tecidos adjacentes ao implante, analisando ainda a presença ou não de inflamação e infecção na região, pois não podemos observar essas análises clínicas por não terem as mesmas consequências no animal experimental utilizado.

Implantes autógenos e implantes aloplásticos têm sido usados com sucesso para a reconstrução orbitária, sendo que o polietileno de alta densidade poroso (Medpor®) e a malha de titânio são considerados biomateriais ideais para o reparo do assoalho de órbita (23). O Medpor® tem

vantagens conhecidas como sua porosidade que permite o crescimento fibrovascular no seu interior, é não absorvível, suporta estresse de alta tensão, biocompatibilidade e baixo risco de infecção (13,23). Na pesquisa descrita acima, o tecido conjuntivo fibroso e tecido fibrovascular cresceram progressivamente nos biomateriais porosos assim como ao redor do implante foi possível observar em todos os espécimes; e ainda achados semelhantes foram encontrados em outras pesquisas (24-27), não houve também nenhum sinal de infecção em todos os espécimes estudados. O crescimento fibrovascular nos poros ocorreu de forma centrípeta, na superfície que esteve em contacto com o leito vascular no implante (27). A grande porosidade permite um crescimento mais rápido do tecido conjuntivo no implante, além disso, a neovascularização permite a adesão do tecido e o risco reduzido de infecção devido à disseminação sistêmica de antibióticos no local do implante, mecanismo que favorece a resposta imune, diminuindo o risco de infecção e reação de corpo estranho (23).

Pequenas áreas de tecido de granulação foram observadas após 15 dias, formando uma cápsula ao redor do implante, que estava aumentando após 40 dias. Após 90 dias, o tecido de granulação foi mais organizado, com fibrose leve, confirmando a boa tolerabilidade do biomaterial como pesquisa prévia (27).

A avaliação por imunomarcção nos animais com o implante de Medpor® mostrou marcação fraca de osteocalcina, que é um peptido secretado por osteoblastos maduros, odontoblastos e condrócitos hipertróficos. Embora seja principalmente depositada na matriz óssea recém-formada, uma pequena fração desta proteína entra na circulação, caracterizando esta proteína como um marcador de atividade osteoblástica. A produção de osteocalcina é um marcado

de osteoblastos maduro. Portanto podemos conferir que o biomaterial utilizado não tem propriedade osteoindutiva ou osteocondutora.

Apesar da ausência de nova formação óssea, observou - se que a estrutura formada pelo Medpor® e tecido conjuntivo fibroso foi suficiente para prevenir alterações anatômicas da área afetada. Dentre as desvantagens relacionadas ao biomaterial como a falta de radiopacidade fazendo com que as imagens não sejam úteis para o seguimento pós-operatório (28).

Neste estudo, não foram observadas necrose tecidual, calcificações distróficas e ou seqüestro poroso de polietileno, reações agudas ou de corpo estranho. Infiltrado inflamatório crônico foi observado em algumas áreas. Ainda assim, foram observadas áreas de tecido ósseo em contato com o biomaterial, especialmente na interface com o rebordo orbital aos 90 dias de pós-operatório.

6. CONCLUSÃO

Concluimos que o polietileno poroso (Medpor®) é um biomaterial seguro e eficaz para a reconstrução do pavimento orbital, o que permite a reconstrução de defeitos ósseos e evita herniação ocular. A análise histológica mostrou uma prevalência de tecido conjuntivo fibroso encapsulando o implante e algumas áreas de infiltrado inflamatório crônico, sem que haja danos clínicos, já a marcação imunohistoquímica comprovou a falta de característica osteoindutora e osteocondutiva.

REFERÊNCIAS

1. Smith B, Regan Jr W. Blowout fracture of the orbit: mechanism and correction of internal orbital fracture. *Adv Ophthalmic Plast Reconstr Surg*. 1987;6:197-205.
2. Go JL, Vu VN, Lee KJ, Becker TS. Orbital trauma. *Neuroimaging Clin N Am*. 2002;12(2):311-24.
3. Bourguignon AM, Costa AT, Ibrahim D, Blaya DS, Viegas VN, Oliveira MG. Fraturas orbitárias blowout: tratamento com telas de titânio. *Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac*. 2005; 5(3):35 - 42.
4. Thaiparajan B, Ulaganathan V. Blow out fracture A Novel Management Modality. *Otolaryngology online journal*. 2013;3(1.5):34-9.
5. Burnstine MA. Clinical recommendations for repair of orbital facial fractures. *Curr Opin Ophthalmol*. 2003;14(5):236-40.
6. Wang S, Xiao J, Liu L, Lin Y, Li X, Tang W, et al. Orbital floor reconstruction: a retrospective study of 21 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106(3):324-30.
7. Kim Y, Kim I, Lim P. A clinical analysis of the pure blowout fracture. *J Korean Soc Plast Reconstr Surg*. 2004;(21):736y - 44.
8. Avashia YJ, Sastry A, Fan KL, Mir HS, Thaller SR. Materials used for reconstruction after orbital floor fracture. *J Craniofac Surg*. 2012;23(7 Suppl 1):1991-7.
9. Bains F. Biomaterials and implants for orbital floor repair. *Acta Biomater*. 2011;7(9):3248-66.
10. Kludt NA, Vu H. Auricular reconstruction with prolonged tissue expansion and porous polyethylene implants. *Ann Plast Surg*. 2014;72 Suppl 1:S14-7.
11. Atherton D, Haers P. Midfacial augmentation in teenage cleft patients using malar and paranasal Medpor implants. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014;43(7):824-6.
12. Huang D, Xu B, Yang Z, Lin X, Yang X, Zhao J. Fibrovascular Ingrowth Into Porous Polyethylene Orbital Implants (Medpor) After Modified Evisceration. *Ophthalm Plast Reconstr Surg*. 2014;(31)14.
13. Patel PJ, Rees HC, Olver JM. Clinicopathologic reports, case reports, and small case series: fibrovascularization of porous polyethylene orbital floor implants in humans. *Arch Ophthalmol*. 2003;121(3):400-3.

14. Romano JJ, Iliff NT, Manson PN. Use of Medpor porous polyethylene implants in 140 patients with facial fractures. *J Craniofac Surg*. 1993;4(3):142-7.
15. Gunarajah DR, Samman N. Biomaterials for repair of orbital floor blowout fractures: a systematic review. *J Oral Maxillofac Surg*. 2013;71(3):550-70.
16. Han DH, Chi M. Comparison of the outcomes of blowout fracture repair according to the orbital implant. *J Craniofac Surg*. 2011;22(4):1422-5.
17. Chambless LB, Mawn LA, Forbes JA, Thompson RC. Porous polyethylene implant reconstruction of the orbit after resection of sphenoid-orbital meningiomas: a novel technique. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012;40(1):e28-32.
18. Lin AY, Kinsella CR, Jr., Rottgers SA, Smith DM, Grunwaldt LJ, Cooper GM, Losee JE. Custom porous polyethylene implants for large-scale pediatric skull reconstruction: early outcomes. *J Craniofac Surg*. 2012;23(1):67-70.
19. Ferreira ACRM, Muñoz XM, Okamoto R, Pellizer EP, Garcia IR Jr. Postoperative Complications in Craniomaxillofacial Reconstruction With Medpor. *J Craniofac Surg*. 2016;27(2):425-8.
20. Aldekhayel S, Aljaaly H, Fouda-Neel O, Shararah AW, Zaid WS, Gilardino M. Evolving trends in the management of orbital floor fractures. *J Craniofac Surg*. 2014;25(1):258-61.
21. Warwar RE, Bullock JD, Ballal DR, Ballal RD. Mechanisms of orbital floor fractures: a clinical, experimental, and theoretical study. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 2000;16(3):188-200.
22. Nagasao T, Hikosaka M, Morotomi T, Nagasao M, Ogawa K, Nakajima T. Analysis of the orbital floor morphology. *J Craniomaxillofac Surg*. 2007;35(2):112-9.
23. Jung SK, Cho WK, Paik JS, Yang SW. Long-term surgical outcomes of porous polyethylene orbital implants: a review of 314 cases. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(4):494-8.
24. Kinoshita Y, Kuzuhara T, Kobayashi M, Ikada Y. Reduction in tumor formation on polyethylene by collagen immobilization. *J Long Term Eff Med Implants*. 1995;5(4):275-84.
25. Rubin PA, Popham JK, Bilyk JR, Shore JW. Comparison of fibrovascular ingrowth into hydroxyapatite and porous polyethylene orbital implants. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 1994;10(2):96-103.

26. Choi HY, Lee JE, Park HJ, Oum BS. Effect of synthetic bone glass particulate on the fibrovascularization of porous polyethylene orbital implants. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 2006;22(2):121-5.
27. Dougherty WR, Wellisz T. The natural history of alloplastic implants in orbital floor reconstruction: an animal model. *J Craniofac Surg*. 1994;5(1):26-32; discussion 3.
28. Kirby EJ, Turner JB, Davenport DL, Vasconez HC. Orbital floor fractures : outcomes of reconstruction. *Ann Plast Surg*. 2011;66(5):508-12.

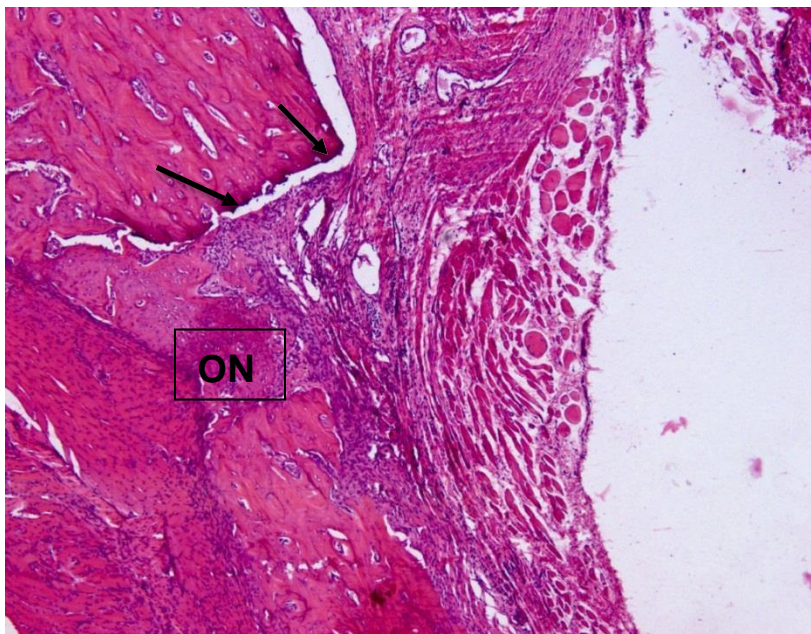
FIGURAS

Figura I

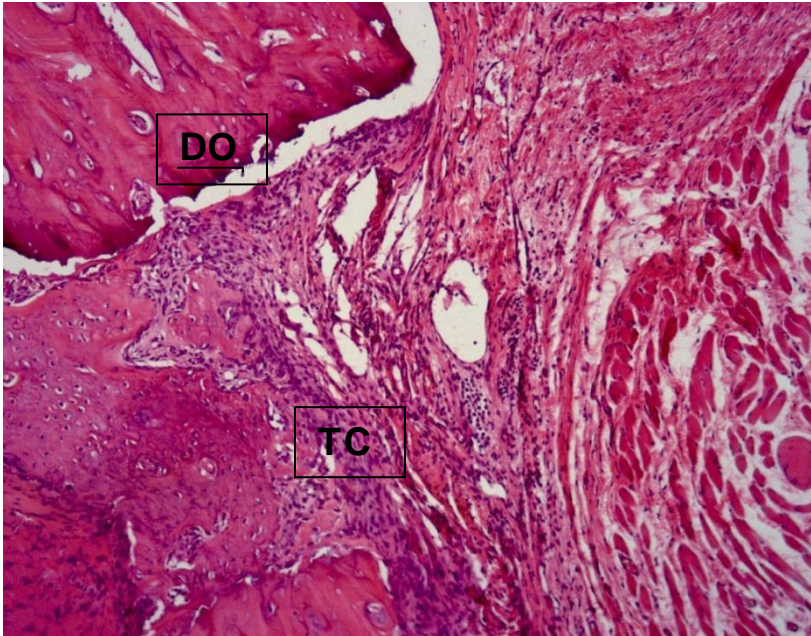


Cirurgias experimentais para confecção das cavidades experimentais controle e tratado.

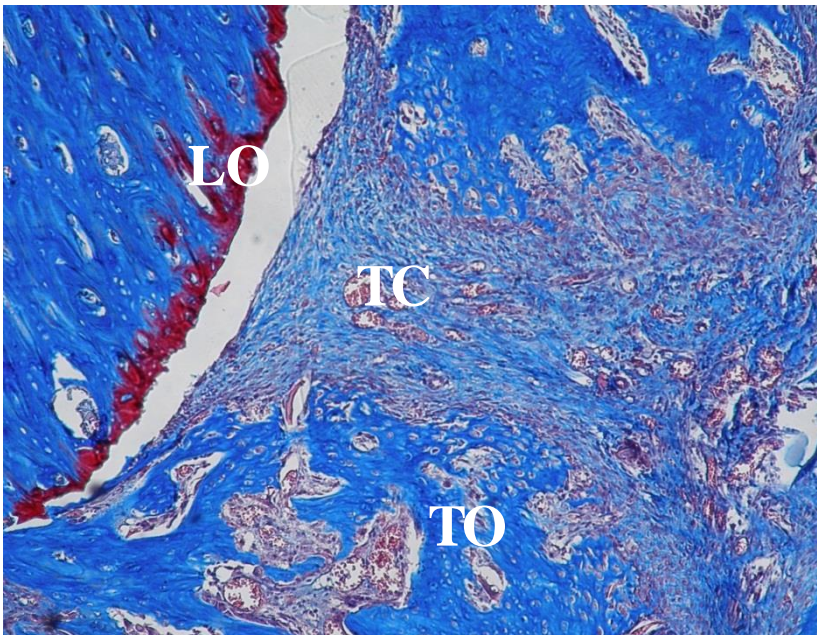
Figura II



Grupo controle – 15 dias. Rebordo ósseo orbitário exibindo a linha de osteotomia (Setas) e áreas iniciais de neoformação óssea (ON). H.E. 10x.

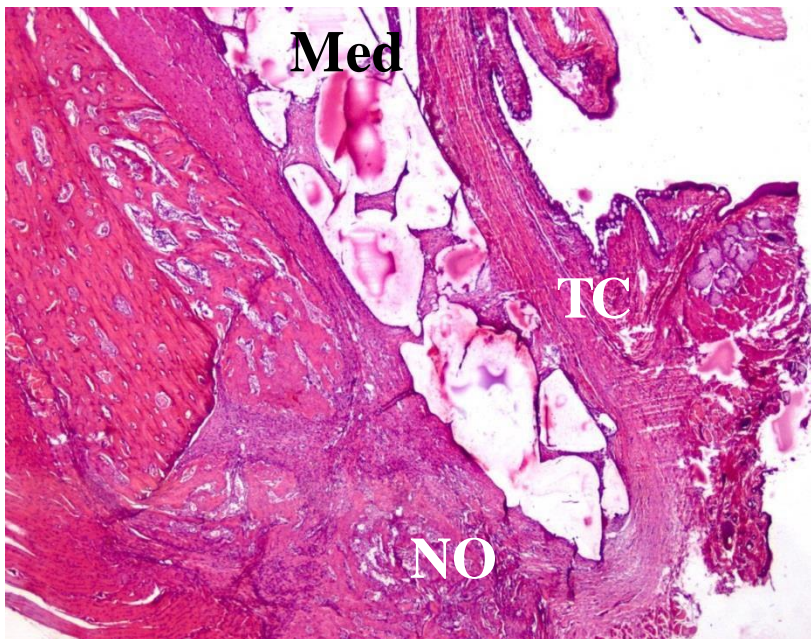
Figura III

Grupo controle – 15 dias. Rebordo ósseo orbitário apresentando a cavidade experiment al preenchida por proliferação do tecido conjuntivo (TC) e início de deposição óssea (DO) originárias do periósteo adjacente. H.E. 40x

FIGURA IV

Grupo controle – 15 dias. Cavidade cirúrgica demarcada pela linha de osteotomia (LO), preenchida pela proliferação do tecido conjuntivo (TC) e início de diferenciação óssea (TO). Tricrômico de Masson 40x.

FIGURA V



Grupo Medpor – 15 dias. Medpor (Med) envolto por tecido conjuntivo fibroso (TC), sobre o defeito experimental (DE) e início de neoformação óssea (NO) na periferia. H.E.10x.

FIGURA VI

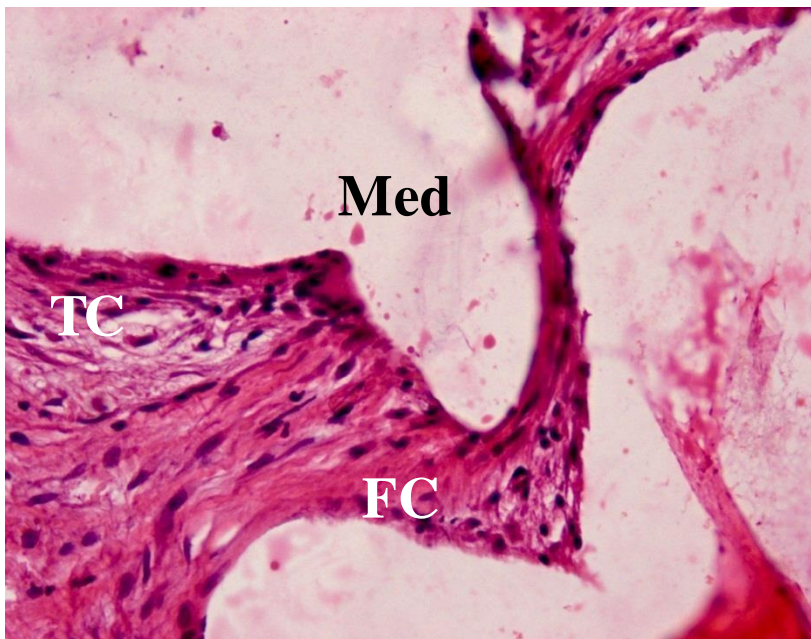
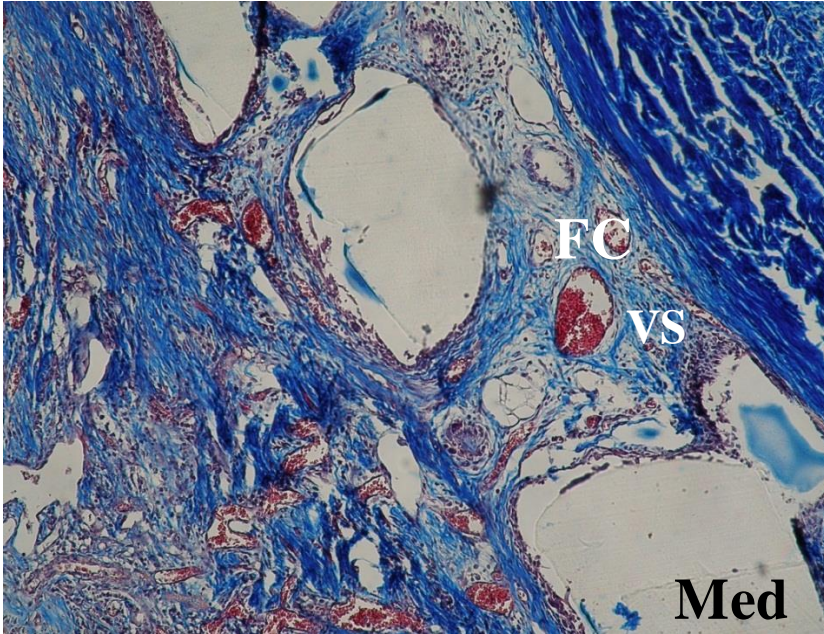


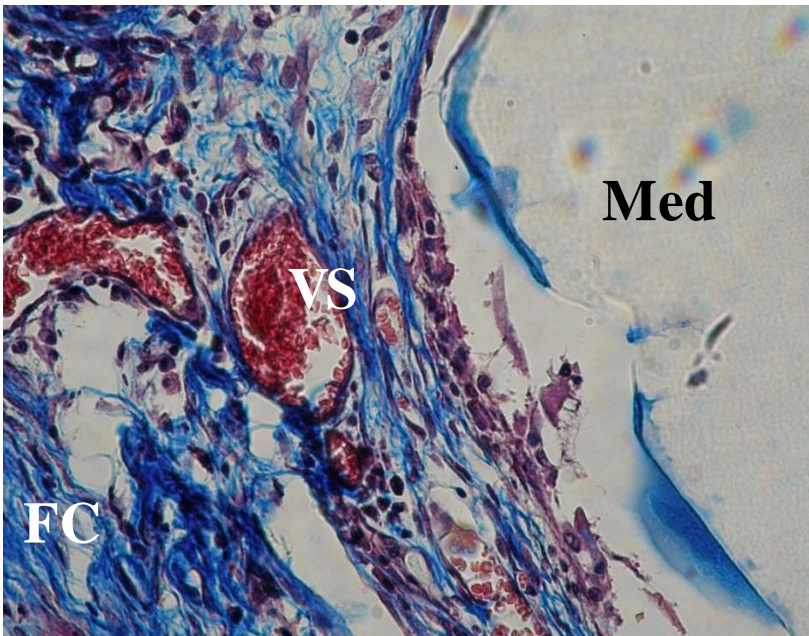
Figura 5: Grupo Medpor – 15 dias. Tecido conjuntivo fibroso (TC) em íntimo contato com o material (Med), penetrando nos poros do material. Há predomínio de fibras colágenas (FC) e ausência de células inflamatórias. H.E.100x.

FIGURA VII

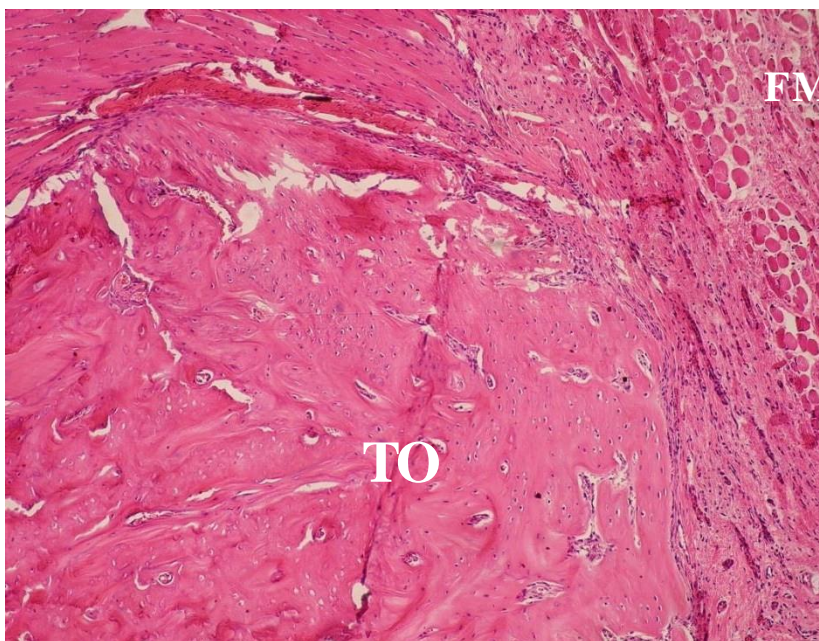


Grupo Medpor – 15 dias. Tecido conjuntivo rico em vasos sanguíneos (VS) e fibras colágenas (FC) envolvendo o implante de Medpor (Med). Tricrômico de Masson, 10x.

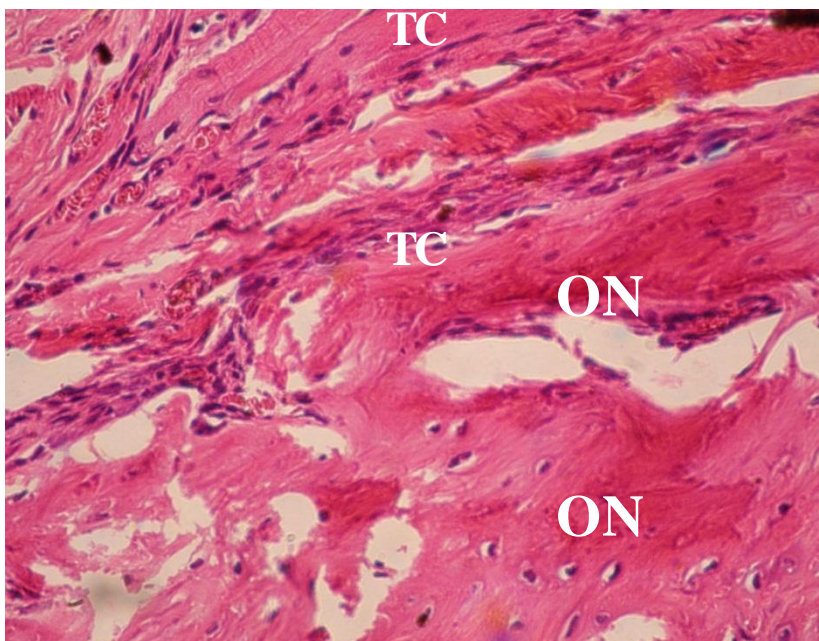
FIGURA VIII



Grupo Medpor – 15 dias. Tecido conjuntivo rico em vasos sanguíneos (VS) e fibras colágenas (FC), bem celularizado em íntimo contato com o implante de Medpor (Med). Tricrômico de Masson, 100x.

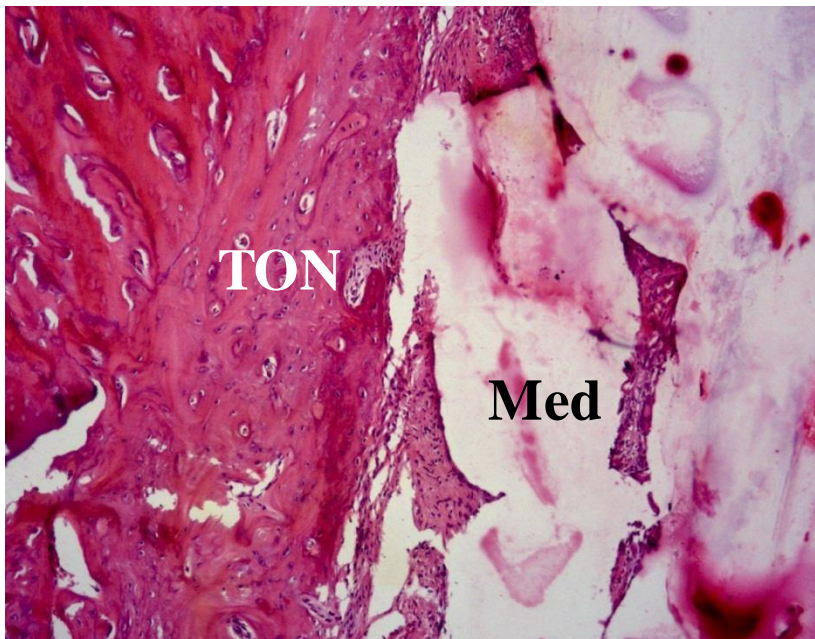
FIGURA IX

Grupo controle – 40 dias. Cavidade cirúrgica preenchida por tecido ósseo maduro (TO) e área de invaginação de fibras musculares (FM). H.E. 10x.

FIGURA X

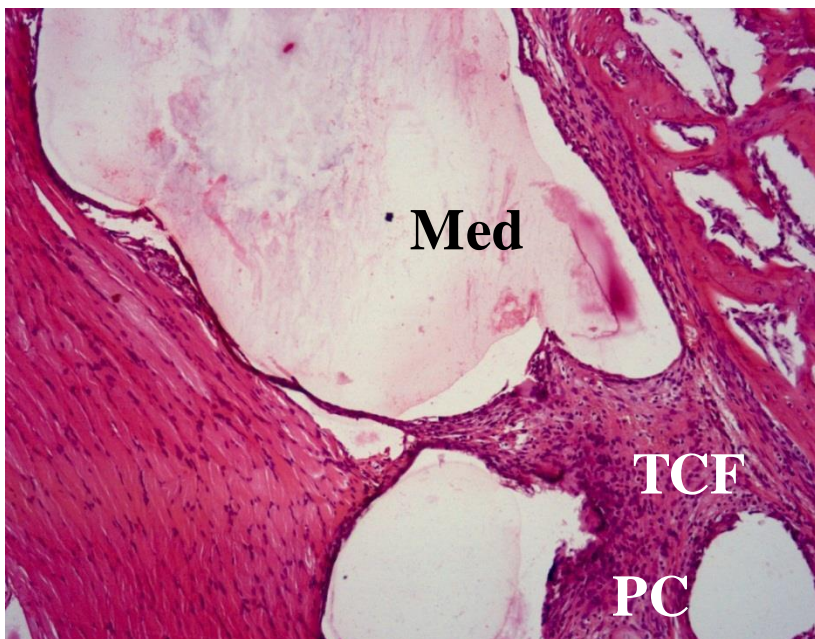
Grupo controle – 40 dias. Área de formação de tecido conjuntivo fibroso (TC) no interior do defeito em contato com tecido ósseo neoformado (ON). H.E. 100x.

FIGURA XI



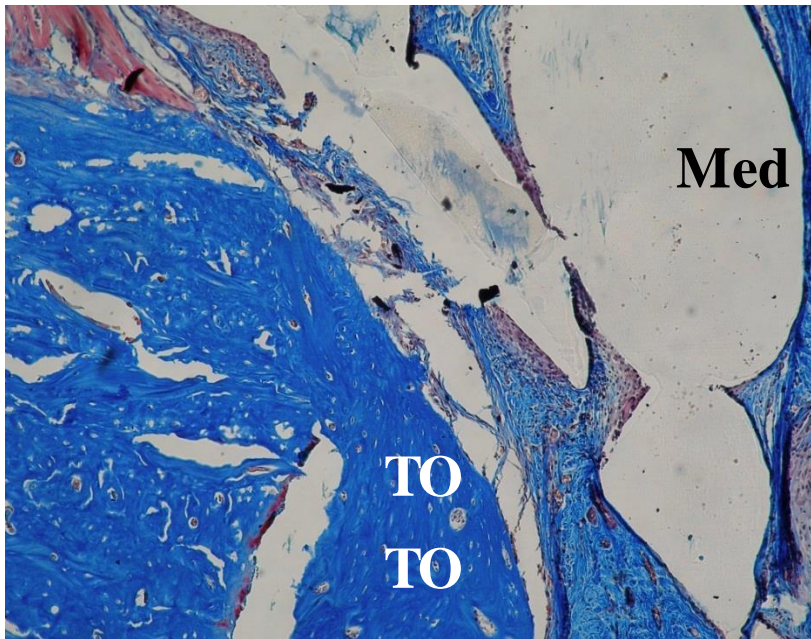
Grupo Medpor – 40 dias. Tecido ósseo neoformado (TON) apresentando trabéculas ósseas espessas e poucos espaços medulares em contato com o Medpor (Med). H.E. 10X.

FIGURA XII



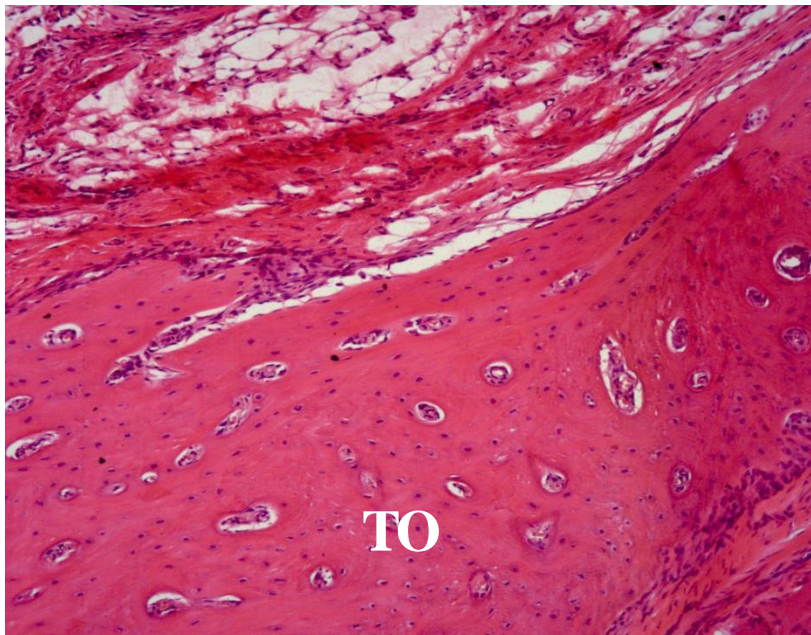
Grupo Medpor – 40 dias. Medpor (Med) envolto por tecido conjuntivo fibroso (TCF) e preenchendo a região dos poros do Medpor. Intensa proliferação celular (PC) em contato com o Medpor. H.E. 40x.

FIGURA XIII



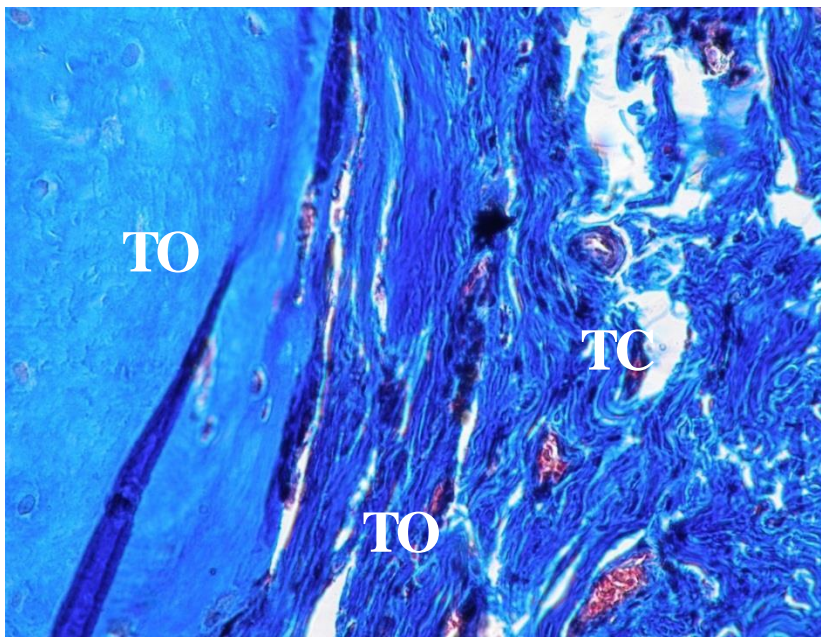
Grupo Medpor – 40 dias. Tecido ósseo neoformado (TO) sob o Medpor (Med) ocupando defeito o cirúrgico. Tricrômico de Masson, 10x.

FIGURA XIV



Grupo Controle - 90 dias. Rebordo ósseo orbitário exibindo trabeculado ósseo (TO) bem definido, espesso, isento de espaços medulares amplos e áreas de reabsorção. HE. 40x.

FIGURA XV



Grupo Controle - 90 dias. Centro do defeito cirúrgico orbitário exibindo trabeculado ósseo (TO) bem definido, espesso, isento de espaços medulares amplos em contato com tecido conjuntivo (TC) neoformado no centro do defeito criado. Tricrômico de Masson 100x.

FIGURA XVI

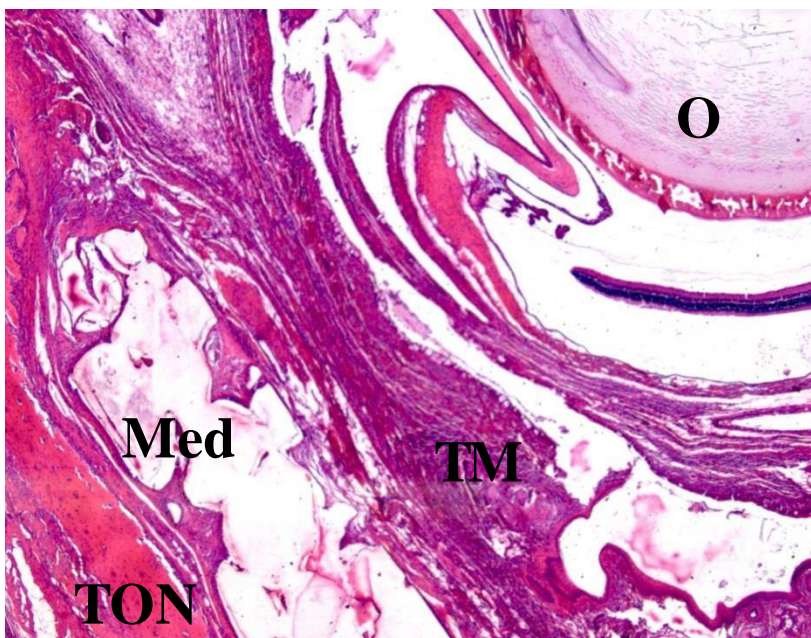


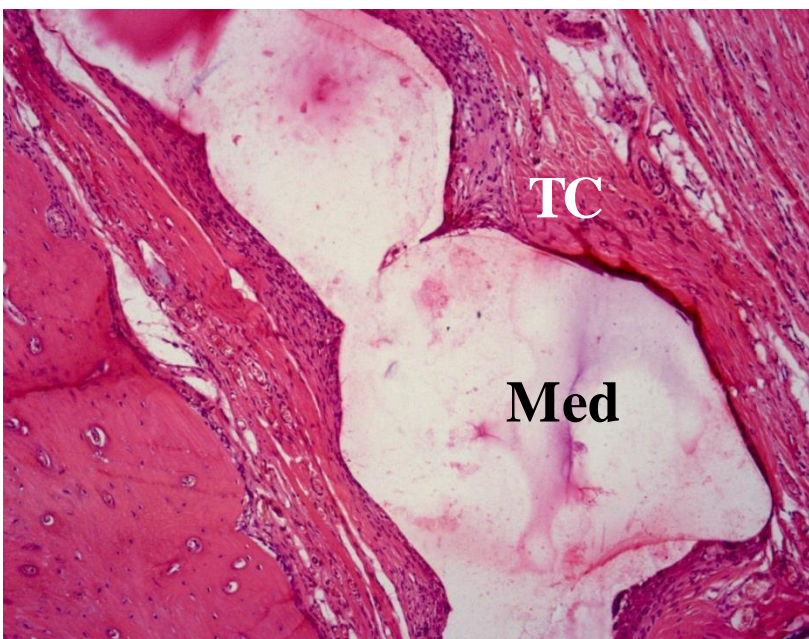
Figura 15: Grupo Tratado - 90 dias. Medpor (Med) permanece entre o tecido ósseo (TON) neoformado em sua porção inferior e tecido fibroso e muscular (TM) que sustentam o olho (O) em sua porção superior. H.E. 10x.

FIGURA XVII

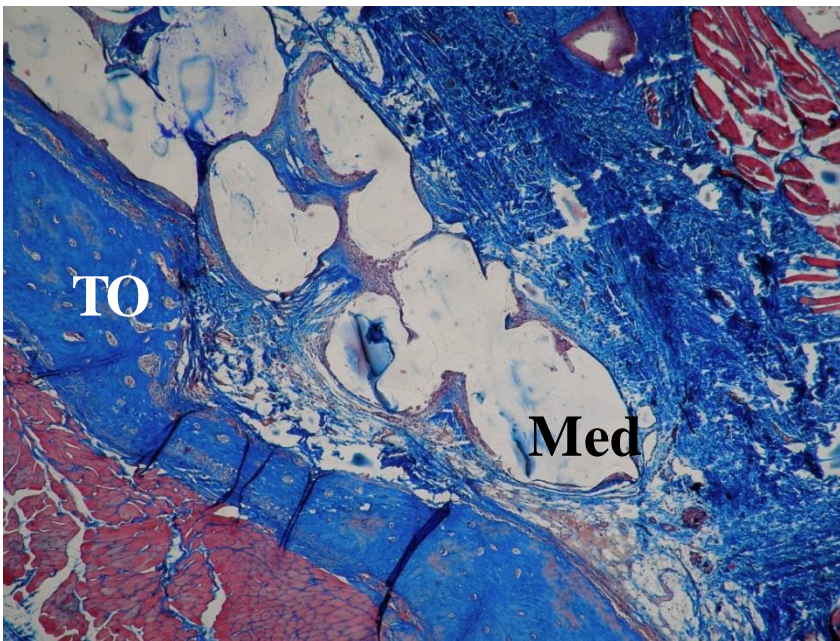


Grupo Tratado – 90 dias. Área de osso remodelado na região da interface (OI) com o Medpor (Med). H.E. 40x

FIGURA XVIII



Grupo Tratado – 90 dias. Observa-se tecido conjuntivo fibroso (TC) no interior e na interface com o Medpor (Med). H.E.40x

FIGURA XIX

Grupo Controle - 90 dias. Rebordo ósseo orbitário exibindo trabeculado ósseo (TO) bem definido com perda de contorno em altura na área do defeito experimental e a presença do Medpor (Med) ocupando esta área. Tricrômico de Masson. 10x.

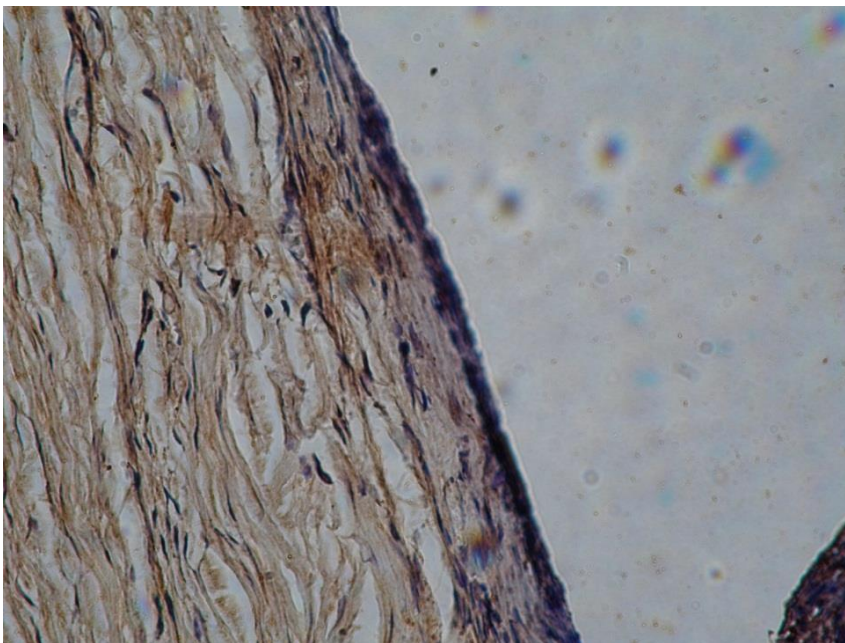
FIGURA XX

Figura I – Imunomarcção - 15 dias – Osteocalcina. 100x.

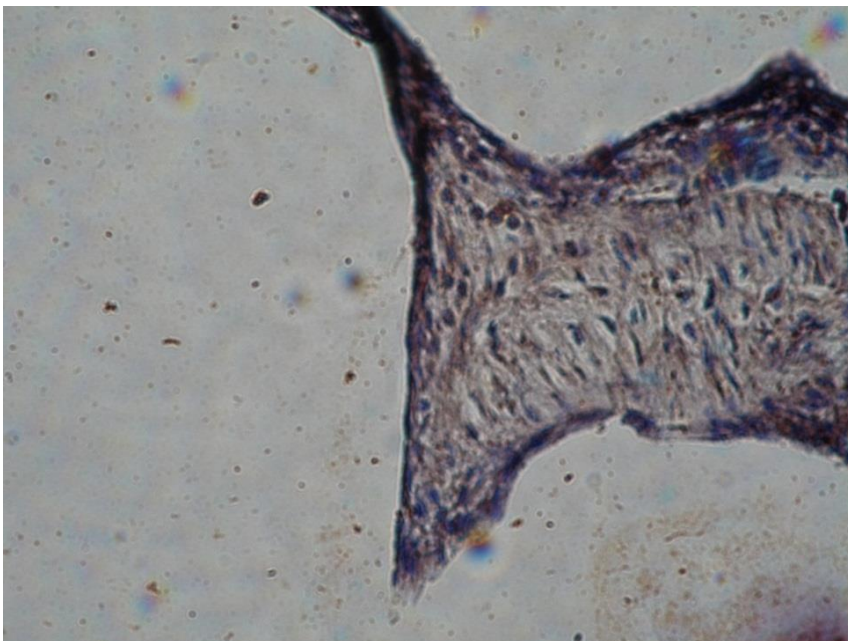
FIGURA XXI

Figura II - 15 dias – Osteocalcina. 100x.

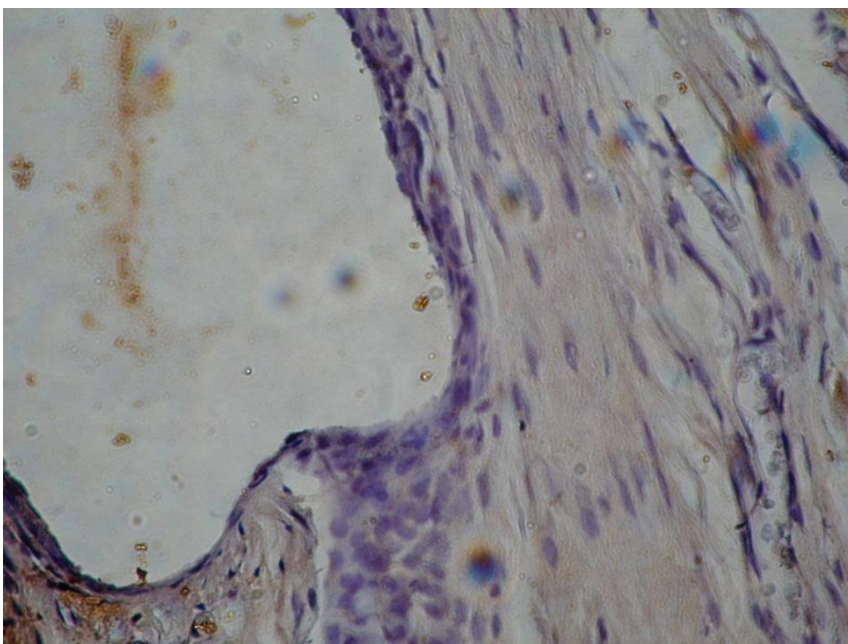
FIGURA XXIII

Figura III - 40 dias – Osteocalcina. 100x.

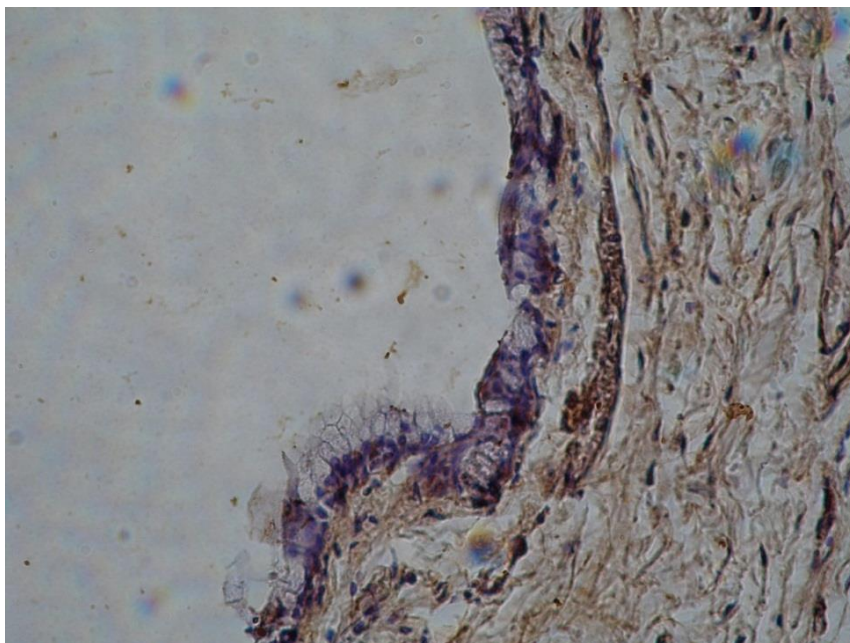
FIGURA XXIV

Figura IV - 40 dias – Osteocalcina. 100x.

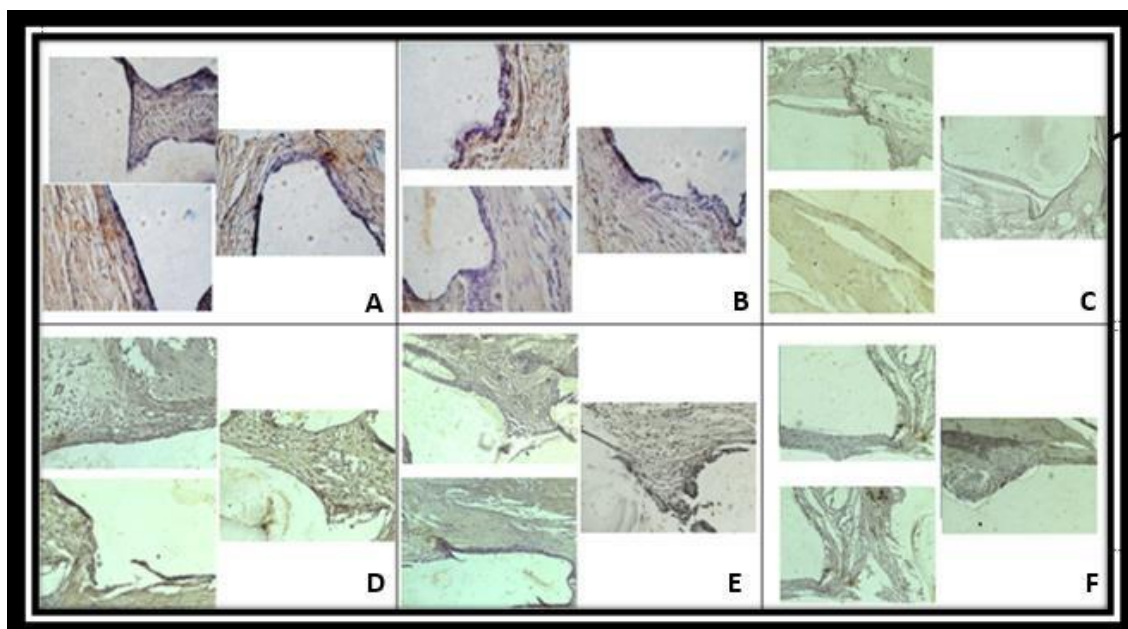
FIGURA XXV

Figura 1. Lâminas com Imunomarcações no Grupo Tratado exibindo: **A** - Expressão intensa de osteocalcina após 15 dias, **B** - OC expressa de forma moderada após 40 dias, **C** - OC expressa de forma moderada após 90 dias, **D** - RUNX2 expressa moderadamente no período de 15 dias, **E** - RUNX2 expressa moderadamente no período de 40 dias, **F** - RUNX2 expressa moderadamente no período de 90 dias.

TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais

AMOSTRA DE 36 RATOS - Adultos e Machos	
Grupo controle: 16 ratos	15 Dias - 6 ratos
	40 Dias - 6 ratos
	90 Dias - 6 ratos
Grupo Tratado -16 ratos	15 Dias - 6 ratos
	40 Dias - 6 ratos
	90 Dias - 6 ratos

Tabela 2 – Grupos experimentais de acordo com o tratamento da fratura “blow-out”

Grupo Controle 15 dias (n=6) , ratos submetidos à fratura “blow-out” e não receberam tratamento para reparo ósseo, sacrificados em 15 dias pós fratura;
Grupo Controle 40 dias (n=6) , ratos submetidos à fratura “blow-out” e não receberam tratamento para reparo ósseo, sacrificados em 40 dias pós fratura;
Grupo Controle 90 dias (n=6) , ratos submetidos à fratura “blow-out” e não receberam tratamento para reparo ósseo, sacrificados em 90 dias pós fratura;
Grupo Tratado 15 dias (n=6) , ratos submetidos à fratura “blow-out” e receberam tratamento com implantes Medpor® para reparo ósseo, sacrificados em 15 dias pós fratura;
Grupo Tratado 40 dias (n=6) , ratos submetidos à fratura “blow-out” e receberam tratamento com implantes Medpor® para reparo ósseo, sacrificados em 40 dias pós fratura;;
Grupo Tratado 90 dias (n=6) , ratos submetidos à fratura “blow-out” e receberam tratamento com implante Medpor® para reparo ósseo, sacrificados em 90 dias pós fratura;

Tabela 3**Tabela de escores da Imunomarcção**

	15 dias	40 dias	90 dias
Osteocalcina	3	2	2
RUNX2	2	2	2

ANEXO

Anexo A - Comitê de Ética



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



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "**RECONSTRUÇÃO DO ASSOALHO ORBITÁRIO COM MEDPOR®, ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA EM RATOS**" sob responsabilidade do **Prof. Dr Idelmo Rangel Garcia Júnior** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 05/12/2008 de acordo com o protocolo 2008-009057

Araçatuba, 05 de Dezembro de 2008

Prof.ª Adjunto Tereza Cristina Cardoso da Silva

Presidente da CEEA- FOA/UNESP



Edited By: J. Wiltfang, Klinik für Mund, Kiefer-, und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Arnold-Hellerstr. 16, 24105, Kiel, Germany

Impact Factor: 1.252

Online ISSN: 1010-5182

AUTHOR INFORMATION PACK

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

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:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files where applicable)Supplemental files where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- 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)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

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; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. 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 comply with the ARRIVE guidelines and 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.

Declaration 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'. More information.

Submission declaration and verification

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 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and acitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

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 are available online.

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 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 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.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). 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. 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.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

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 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 funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online. 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.

- 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 3300 , excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

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. 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.

Find out more.

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.

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 . 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 Please submit your article via

<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). 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 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.

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.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy];

the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

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.
- 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.

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 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. Further information on the preparation of electronic artwork.

Illustration services

Elsevier's WebShop 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 and shading in table cells.

References

Citation in text

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.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation

details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

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.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

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: 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

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. 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 . 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.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

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.

Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

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/about/open-science/open-access/agr%C3%A9ments> for full details of the agreements that are in place for these bodies):

- Arthritis Research Campaign (UK)
- 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 visit our Support Center

. 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.

AFTER ACCEPTANCE

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 the free Adobe Reader , version 9 (or higher). Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online).

The exact system requirements are given at the Adobe site.

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 will, at no cost, receive 25 free paper offprints, or alternatively a customized

Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect.

The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, 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

. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also

check the status of your submitted article

or find out

when your accepted article will

be published

.

