



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

Luiz Guilherme Fiorin

***Influência do Tamoxifeno associado a
quimioterápicos nos tecidos periimplantares***

ARAÇATUBA – SP
2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

Luiz Guilherme Fiorin

***Influência do Tamoxifeno associado a
quimioterápicos nos tecidos periimplantares***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (Unesp), como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Odontologia – Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F521i Fiorin, Luiz Guilherme.
Influência do Tamoxifeno associado a quimioterápicos
nos tecidos periimplantares / Luiz Guilherme Fiorin. –
Araçatuba, 2023
120 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Juliano Milanezi de Almeida

1. Implantes dentários 2. Osseointegração 3. Tamoxifeno
I.T.

Black D6
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatória

A Deus

Ofereço esta conquista a Deus, por ser porto seguro em algumas partes dessa jornada, pelo apoio nos momentos difíceis e segurança nos momentos tranquilos.

Apesar da distância nos últimos anos, nunca me abandonou em momento nenhum.

Muito obrigado

À minha família

A minha mãe **Silvia** e meu Pai **Luciano**,

Por me proporcionar todo suporte necessário para a conclusão de mais uma etapa na minha vida.

Assim como a possibilidade de me dedicar a aprender e da realização de vários sonhos.

Muito obrigado por todo apoio.

Ao Meu Irmão **Juninho**,

Que apesar da distância esteve presente em todos os passos da minha vida adulta, desde o ingresso na faculdade até a defesa do meu doutorado.

Obrigado por fazer o que esteve ao seu alcance por mim.

Ao novo ingressante da família Fiorin, **Raul**

Espero que um dia você se orgulhe da pessoa que eu me tornei e que saiba sempre que é uma benção em nossas vidas

Amo vocês

Aos meus familiares

A todos meus familiares que estiveram presente na minha caminhada. Minha tia e madrinha Selma, meus tios Vitor e Lucio, aos meus primos João Vitor, Vinicius e Gustavo que são como meus irmãos, aos meus avós Maria Aparecida e Agenor, e aos que já se foram Izolina e Adirço e a minha cunhada Tatiane.

Agradeço todo carinho e força que me deram a todo momento, se não fosse vocês, seria tudo mais difícil.

Obrigado por caminharem ao meu lado!

Á todos, peço desculpas por minha ausência em momentos importantes.

Agradecimentos especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida**, quero expressar minha profunda gratidão por sua crença constante na evolução do seu aluno desde 2014. Agradeço sinceramente pela confiança depositada em mim, pela paciência incansável e por todo o esforço e investimento dedicados para que eu pudesse me tornar a melhor versão possível, não apenas no âmbito da pesquisa, mas também no clínico e ético. Suas orientações foram fundamentais para diversas realizações pessoais e profissionais ao longo desses anos. Cada passo, por menor que fosse, foi tomado com o objetivo de alcançar aqueles que considero modelos na vida e na odontologia, e este trabalho reflete, de muitas maneiras, o aprendizado contínuo proporcionado por sua dedicação exemplar à educação. Ao completar quase uma década sob sua orientação, sinto um imenso orgulho e continuarei a me orgulhar ao afirmar que o senhor foi meu orientador de pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Edilson Ervolino**, grande exemplo de ser-humano e de professor. O senhor exerceu contribuição significativa ao longo da minha trajetória acadêmica, desde os dias de graduação até a conclusão desta tese de doutorado. Suas aulas sempre foram fonte de inspiração, e sua habilidade em transmitir conceitos complexos de maneira acessível desempenhou um papel fundamental em minha formação. Agradeço sinceramente pela orientação perspicaz, pelos conselhos valiosos e pela paciência demonstrada ao longo dos anos. Mais uma vez, obrigado por ser um mentor exemplar e por acreditar em meu potencial.

Ao **Prof. Dr. Francisley Ávila Souza**, gostaria de expressar minha profunda gratidão pela oportunidade única que me viabilizou a realização de um sonho que sempre tive. Sua orientação e apoio foram essenciais para abrir portas para um ambiente acadêmico internacional que enriqueceu profundamente minha experiência de doutorado. Acreditar no meu potencial e investir na minha formação além-fronteiras não apenas ampliou meus horizontes acadêmicos, mas também representou a concretização de uma aspiração pessoal. Agradeço por amizade e confiança, que transformaram esse sonho em realidade e moldaram significativamente meu percurso acadêmico.

Ao prof. **Dr. Thiago Marchi Martins**, a amizade que compartilhamos, juntamente com os demais membros do grupo, tornou esta experiência ainda mais significativa e memorável. Valorizo imensamente a oportunidade de aprender com um professor tão respeitado e comprometido. Sua dedicação ao desenvolvimento acadêmico dos alunos, aliada à sua abertura para novas perspectivas,

me inspirou a buscar excelência em minha pesquisa e a aspirar a padrões mais elevados. Este momento representa não apenas a conclusão de um projeto de pesquisa, mas também o início de uma contínua jornada de aprendizado e descoberta. Agradeço sinceramente por sua influência positiva em minha trajetória acadêmica e pela amizade a devotada ao meu orientador e a mim.

À *prof. Dra. Diana Gabriela Soares dos Passos*, apesar do breve contato que tivemos na realização da defesa da minha tese de doutorado, sua influência positiva é evidente nas conquistas acadêmicas daqueles que tiveram a sorte de trabalhar sob sua orientação, a amizade e a parceria que tem estabelecido com nosso grupo são frequentemente mencionadas em nosso laboratório. Espero, sinceramente, ter a oportunidade de colaborar mais estreitamente em futuros projetos.

À *Prof. Claudia Dellavia*, a senhora é uma fonte inspiradora de determinação e amor pela pesquisa. Desde o momento em que fui acolhido como membro do laboratório de anatomia, sua paixão pelo conhecimento e dedicação ao desenvolvimento acadêmico têm sido um exemplo marcante. Sua orientação generosa e encorajadora foi fundamental para minha jornada na elaboração desta tese de doutorado. O LTS não é apenas um espaço de pesquisa, mas um ambiente impregnado com a energia positiva que você transmite diariamente. Sou imensamente grato por ter tido a oportunidade de aprender e crescer sob sua orientação, e levo consigo não apenas conhecimento, mas também a inspiração para perseguir a excelência na pesquisa.

As *Profs. Emanuela Galliera, Gaia Pellegrini e Daniela Carmagnola*, obrigado pelo apoio essencial que proporcionaram durante o desenvolvimento do meu doutorado sanduíche. Agradeço por compartilharem seus conhecimentos, guiando-me em um ambiente acadêmico internacional, e por dedicarem tempo e esforço para me auxiliar em cada etapa dessa jornada. Sou imensamente grato por ter contado com a orientação de professoras tão dedicadas e inspiradoras.

Às *amigas Dra. Vivian Novaes e Dra. Natalia Campos*, vocês foram faróis de inspiração, guiando-me com sabedoria e empatia. A amizade e o apoio que ofereceram tornaram essa jornada mais leve e significativa. Sou verdadeiramente grato por ter tido a oportunidade de ter mentoras como vocês, que não só contribuíram para o desenvolvimento da minha carreira, mas também enriqueceram minha vida de maneiras incontáveis.

Aos *meus amigos Ana Flávia Barbosa, Ana Clara Barbosa e Gabriel Secamilli*, não consigo imaginar um universo em que não trocamos mensagens todos os dias e não construímos laços de amizade tão genuínos como os nossos. Sou muito grato por tê-los em minha vida, agradeço especialmente pelos conselhos e compreensão que sempre me direcionam. Apesar de não termos tantos encontros como antes, sei que posso contar com a amizade de vocês pro resto da vida.

*Aos meus amigos **Giovani Sacilotto e Dolaji Henin**, sou muito grato por tê-los conhecido, durante um ano vocês foram meus irmãos em um país desconhecido aonde eu mal falava a língua quando cheguei. Obrigado pelo tempo dedicado a mim e por terem aberto a porta das suas casas e famílias a um estrangeiro desconhecido. Essa experiência foi enriquecida pela generosidade e acolhimento de vocês, algo que valorizarei para sempre. Independentemente de onde o futuro nos leve, saibam que serão sempre bem-vindos em qualquer lugar que eu esteja.*

*Aos meus amigos **Mateus, Thales, Otávio, Moacir, Caio, Luís, Lourenço, Gabriel, Edgard, Heitor e Leonardo**, vocês foram parte fundamental da minha jornada em Araçatuba e agradeço por todos os momentos compartilhados*

*Aos meus companheiros do departamento de periodontia **Elisa, Bianca, Otávio, Ruan, Ester, Giovana, Layra e Henrique**. Gostaria de expressar minha profunda gratidão ao inspirador grupo de pesquisa ao qual tive a honra de pertencer durante a minha pós-graduação, cada integrante contribuiu de maneira única para a construção deste trabalho, mesmo quando eu não estava presente. Ao meu Amigo **Henrique**, com qual tive o prazer de compartilhar grande parte das minhas conquistas e divido a periodontia desde a graduação, reforço que você sempre foi um modelo para mim e que sem você, a realização desse trabalho não seria possível.*

*Aos meus primeiros orientados de iniciação científica **Maria Eduarda, Bruno Urzedo e Gabriela Carrara**, quero expressar minha sincera gratidão pela paciência e pela valiosa contribuição que deram ao início da minha jornada como doutorando e professor. A parceria que construímos superou o âmbito acadêmico, transformando-se em uma amizade genuína. Torço sinceramente pelo sucesso de cada um de vocês, e suas conquistas são celebradas por mim como se fossem minhas próprias realizações. Obrigado por serem não apenas colaboradores, mas também amigos leais nesta jornada.*

*Aos meus amigos do departamento de Anatomia da universidade de Milão **Aurora, Alice, Claudia, Mariachiara, Massimiliano, Daniele, Elena, Edoardo**. Vocês alegraram meus dias e foram minha segunda família durante 2022. Agradeço sinceramente por todos os momentos que compartilhamos.*

*A todos os **professores da pós-graduação**, vocês foram importantes e contribuíram muito em todo meu aprendizado e caminhada durante estes anos.*

*A todos os **colegas da pós-graduação**, agradeço pela oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas e pela amizade criada neste período.*

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À Direção da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP. Em nome do Diretor, Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem, e Vice-Diretor, Prof. Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Odontologia na pessoa do Professor Dr. Associado Wirley Gonçalves Assunção, pela ajuda dada ao desenvolvimento do curso de Pós-graduação e lutar para termos o melhor curso de Pós-Graduação.

Aos Professores da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, pela dedicação e ensinamentos que me proporcionam no curso.

A todos os funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, Renato, Paulo e Marco, que sempre estiveram dispostos a dar o melhor. Os meus sinceros agradecimentos e admiração.

A todos os funcionários da Biblioteca da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Araçatuba, obrigado pela colaboração, ensinamentos e por fazer a “nossa” Biblioteca um lugar agradável e alegre.

A todos os funcionários da Seção de Pós-graduação, Valéria, Cristiane e Lilian, pela paciência, ajuda e estarem sempre disponíveis.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Odontologia Infantil e Social.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Ciências Básicas.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese.

Aos funcionários do Biotério, Camilo e João; aos funcionários da Seção de Materiais; aos funcionários da Seção de Divisão Técnica Acadêmica; aos funcionários da Seção de Divisão Técnica Administrativa; aos funcionários da Seção de Diretoria de Atividades Auxiliares; aos funcionários da Seção de Diretoria Técnica de Informática.

Aos funcionários da STAEPE, Mauricio, Patrick, Carlos e Samuel, os meus agradecimentos por toda ajuda no desenvolvimento das atividades da Graduação e Pós-graduação.

Aos Funcionários da Triagem, Esterilização, Distribuição de Materiais, Lavanderia e Limpeza, fundamentais no funcionamento das atividades clínicas.

Aos funcionários da Manutenção, que sempre estiveram a disposição nos atendendo prontamente. Os meus agradecimentos.

Aos Vigias por zelarem pela nossa Universidade e cuidarem dela.

Aos alunos do curso de graduação em odontologia pela UNESP – Campus de Araçatuba, os meus agradecimentos pelo convívio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo nº 2019/24825-5, pela colaboração nos financiamentos das minhas pesquisas.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por proporcionarem o funcionamento e conforto da Instituição.

Aos animais experimentais, meu profundo respeito e agradecimento.

Enfim, a todos que me ajudaram de forma direta ou indireta. Os meus sinceros agradecimentos.

OBRIGADO!

Epígrafe

*“Sempre la pratica dev'essere edificata sopra la buona
teorica.”*

*“A prática deve sempre ser construída sobre uma boa
teoria*

(Leonardo da Vinci - Tratado da pintura, 1651)

Resumo

FIORIN, L. G. **Influência do Tamoxifeno associado a quimioterápicos nos tecidos periimplantares.** 2023. 120 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

O propósito do presente estudo foi avaliar a influência da ação secundária do tamoxifeno in vitro, na vitalidade e no metabolismo de células de linhagem de osteossarcoma humano (SAOS-2) e in vivo, avaliar sua influência associada ou não aos quimioterápicos cisplatina (CIS) ou 5-Fluorouracil (5-FU) na remodelação óssea de implantes osseointegrados instalados em tíbias de ratos. Para a parte in vitro, células SAOS-2 foram incubadas com meio de crescimento meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram divididas em grupos que incluíram a presença/ausência de tamoxifeno e o uso/não uso de discos de titânio isoladamente e em combinação. Foram fabricados um total de 54 discos de Titânio (Ti). Os discos passaram por jateamento de CaMg(CO₃)₂, limpeza, descontaminação por plasma e posterior esterilização. O tamoxifeno foi utilizado na concentração de 2 µM. Foram avaliadas a vitalidade celular, o metabolismo, a mineralização e as taxas de colágeno. A taxa de síntese e mineralização de colágeno foi calculada em relação a um controle negativo. Para a parte in vivo, foram utilizadas 140 ratas, os animais receberam ovariectomia bilateral previamente (OVX), instalação dos implantes em tíbia bilateralmente e após 6 semanas foram divididos em dois grandes grupos (n=60), que receberam administração por gavagem de 0,5 ml de solução salina a 0.9% (SS) e 15mg/kg de citrato de tamoxifeno (TAM) por todo o período experimental e depois, em três subgrupos (n=10) de acordo com os agentes antineoplásicos. Foram administrados os agentes antineoplásicos CIS, 5-FU ou 0,5 ml de SS, via intraperitoneal, respeitando intervalo de 48 h entre as aplicações. Para CIS, 5 mg/kg e 2,5 mg/kg, e para 5- FU, 60 mg/kg e 40 mg/kg, respectivamente. Os animais também foram divididos em um grupo de controle negativo total que não receberam ovariectomia e receberam apenas SS via gavagem e intraperitoneal. Dez animais de cada grupo foram eutanasiados na 12ª, 20ª semana, as tíbias foram coletadas e fixadas em formaldeído tamponado 4% por 48h e destinadas randomicamente para processamento para análise do contato osso/implante (COI), ou processamento com desmineralização e inclusão em parafina para análises histométrica de porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTON), histológica e imunoistoquímica para os marcadores TRAP, OCN e RUNX2. Outros espécimes foram

fixados em glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato 0,1M para análise ultraestrutural de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e elementar por Dispersão por espectroscopia de raio-x (EDS). O tamoxifeno e o titânio sozinhos causaram uma diminuição na vitalidade, no metabolismo, na síntese e na taxa de colágeno da linha celular SAOS-2. Quando associados TAM e Ti causaram uma ligeira diminuição na vitalidade, mas não no metabolismo, na síntese de colágeno e nas taxas de mineralização. Os grupos que receberam administração de Tamoxifeno apresentaram maior COI, maior PTON, maior sinalização positiva de RUNX-2 e OCN, menor sinalização de células TRAP-positivas. Os grupos também apresentaram maior taxa de Ca/P em comparação com suas contrapartidas que não receberam a administração de tamoxifeno. Apesar da influência positiva do tamoxifeno, ele não foi suficiente pra reverter os efeitos deletérios nos tecidos periimplantares dos quimioterápicos.

Palavras-chave: Implantes. Osseointegração. Tamoxifeno.

FIORIN, L. G. **Influence of Tamoxifen associated with chemotherapy on peri-implant tissues.** 120 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the influence of the secondary action of tamoxifen in vitro, on the vitality and metabolism of cells of the human osteosarcoma lineage (OSAS-2) and in vivo, to evaluate its influence associated or not with cisplatin chemotherapy (CIS) or 5-Fluorouracil (5-FU) in bone remodeling of osseointegrated implants installed in rat tibias. For the in vitro part, SAOS-2 cells were incubated with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) growth medium at 37°C, in an atmosphere containing 5% CO₂. Samples were divided into groups that included the presence/absence of tamoxifen and the use/non-use of titanium discs alone and in combination. A total of 54 Titanium (Ti) discs were manufactured. The discs underwent sandblasting, cleaning, plasma decontamination and subsequent sterilization. Tamoxifen was used at a concentration of 2 µM. Cellular vitality, metabolism, mineralization and collagen levels were evaluated. The rate of collagen synthesis and mineralization was calculated relative to a negative control. For the in vivo part, 140 rats were used, the animals received previous bilateral ovariectomy (OVX), installation of implants in the tibia bilaterally and after 6 weeks they were divided into two large groups (n=60), which received gavage administration of 0.5 ml of 0.9% saline solution (SS) and 15mg/kg of tamoxifen citrate (TAM) for the entire experimental period and afterwards, in three subgroups (n=10) according to the antineoplastic agents. The antineoplastic agents CIS, 5-FU or 0.5 ml of SS were administered intraperitoneally, respecting an interval of 48 hours between applications. For CIS, 5 mg/kg and 2.5 mg/kg, and for 5-FU, 60 mg/kg and 40 mg/kg, respectively. Animals were also divided into a total negative control group that did not receive ovariectomy and received only SS via gavage and intraperitoneal. Ten animals from each group were euthanized in the 12th and 20th weeks, the tibias were collected and fixed in 4% buffered formaldehyde for 48h and randomly allocated for processing for analysis of bone/implant contact (IOC), or processing with demineralization and paraffin inclusion. for histometric analysis of the percentage of newly formed bone tissue (PTON), histological and immunohistochemical analysis for the markers TRAP, OCN and RUNX2. Other specimens were fixed in 2.5% glutaraldehyde and 0.1M cacodylate buffer for ultrastructural analysis by Scanning Electron Microscopy (MEV) and elemental analysis by Dispersion x-ray

spectroscopy (EDS). Tamoxifen and titanium alone caused a decrease in vitality, metabolism, synthesis and collagen rate of the OSAS-2 cell line. When combined with TAM and Ti, they caused a slight decrease in vitality, but not in metabolism, collagen synthesis and mineralization rates. The groups that received Tamoxifen administration showed higher COI, higher BIN, higher positive signaling of RUNX-2 and OCN, lower signaling of TRAP-positive cells. The groups also had a higher Ca/P ratio compared to their counterparts who did not receive tamoxifen administration. Despite the positive influence of tamoxifen, it was not enough to reverse the harmful effects of chemotherapy drugs on peri-implant tissues.

Keywords: Implants. Osseointegration. Tamoxifen.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS**Capítulo 1**

- FIGURA 1** Médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da vitalidade das células em 53
(A) cada período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey. Símbolos:
*Diferença estatisticamente significativa. ($p \leq 0,05$).
Fotomicrografias mostrando a morfologia das células da linhagem
SAOS-2 nos grupos B) MC+Disco e C) TAM+Disco às 72h.
Ampliação original: 4000x. Barras de escala: 200 μm .
- FIGURA 2** Médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da taxa de síntese de colágeno 54
das células em (A) cada período.(B) Imagens representativas da
coloração por Sirius Red dos poços de cultura por grupo e por
período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey. Símbolos:
*Diferença estatisticamente significativa. ($p \leq 0,05$).
- FIGURA 3** Médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da taxa de mineralização das 55
células em (A) cada período. (B) Imagens representativas da
coloração por Alizarin Red dos poços de cultura por grupo e por
período Testes estatísticos: ANOVA e Tukey. Símbolos:
*Diferença estatisticamente significativa. ($p \leq 0,05$).

Capítulo 2

- FIGURA 1** Design Experimental (A) e Procedimentos cirúrgicos realizados. 85
As imagens mostram o passo-a-passo da cirurgia de ovariectomia.
Tricotomia (B) e antisepsia com Iodo (C), incisão 1 cm abaixo da
costela (D), remoção dos ovários (E), suturas internas (F, G),
suturas externas (H) e aplicação de antibioticoterapia pós-
operatória (I). As imagens mostram o passo-a-passo da cirurgia de
instalação de implantes. Incisão na tibia tricotomizada (J),
divulsão do tecido muscular (K), exposição da janela óssea (L),
fresagem (M), instalação do implante (N) e implante já instalado
(O).

- FIGURA 2 Médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da porcentagem de contato osso/implante em cada período (A). Teste estatístico: ANOVA e Tukey. Símbolo: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SHAM SS-SS no mesmo período. Símbolo: #, diferença estatisticamente significativa com o mesmo grupo sem TAM no mesmo período. Símbolo: §, diferença estatisticamente significativa no próprio grupo em períodos diferentes (≤ 0.05). Fotomicrografias (B-O) representativas mostrando o COI de cada grupo e período. Setas Brancas: Área sem contato osso/implante. Coloração: Fucsina Básica. Barras de escala 200 μ m. Fonte: Autor, 2023. 86
- FIGURA 3 (A) Médias e Desvio padrão ($M \pm DP$) da porcentagem de área de tecido ósseo neoformado. (B) Fotomicrografias representativas dos padrões histológicos por grupo e por período. Teste estatístico: ANOVA e Tukey. Símbolo: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SHAM SS-SS no mesmo período. Símbolo: #, diferença estatisticamente significativa com o mesmo grupo sem TAM no mesmo período. Símbolo: §, diferença estatisticamente significativa no próprio grupo em períodos diferentes (≤ 0.05). Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra de escala: 100 μ m. Fonte: Autor, 2023. 87
- FIGURA 4 (A) Médias e Desvio padrão ($M \pm DP$) da células TRAP-positivas. (B) Fotomicrografias representativas dos padrões imuno-histoquímicos por grupo e por período. Teste estatístico: ANOVA e Tukey. Símbolo: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SHAM SS-SS no mesmo período. Símbolo: #, diferença estatisticamente significativa com o mesmo grupo sem TAM no mesmo período. Símbolo: §, diferença estatisticamente significativa no próprio grupo em períodos diferentes (≤ 0.05). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barra de escala: 50 μ m. Fonte: Autor, 2023. 88
- FIGURA 5 (A) Médias e Desvio padrão ($M \pm DP$) da células RUNX2-positivas. (B-O) Fotomicrografias representativas dos padrões 89

imuno-histoquímicos por grupo e por período. Teste estatístico: ANOVA e Tukey. Símbolo: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SHAM SS-SS no mesmo período. Símbolo: #, diferença estatisticamente significativa com o mesmo grupo sem TAM no mesmo período. (≤ 0.05). Contra-coloração: Fast Green. Barra de escala: 50 μm . Fonte: Autor, 2023.

FIGURA 6 (A) Médias e Desvio padrão ($M \pm DP$) da células OCN-positivas. 90

(B-O) Fotomicrografias representativas dos padrões imuno-histoquímicos por grupo e por período. Teste estatístico: ANOVA e Tukey. Símbolo: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SHAM SS-SS no mesmo período. Símbolo: #, diferença estatisticamente significativa com o mesmo grupo sem TAM no mesmo período. (≤ 0.05). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barra de escala: 50 μm . Fonte: Autor, 2023.

FIGURA 7 Propriedades ultraestruturais e elementares do tecido 91

periimplantar. (A) Médias e Desvio padrão ($M \pm DP$) da taxa cálcio/fosfato na interface osso/implante. (B-O) Fotomicrografias representativas dos padrões ultraestruturais por grupo e por período. Teste estatístico: ANOVA e Tukey. Símbolo: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SHAM SS-SS no mesmo período. Símbolo: #, diferença estatisticamente significativa com o mesmo grupo sem TAM no mesmo período. (≤ 0.05). Barra de escala: 15 μm . Fonte: Autor, 2023.

]

Lista de Abreviaturas e Símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
≤	Menor ou igual
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
µm	Micrômetros
5-FU	5-fluorouracil
ABC	Absorbância Baixo Comprimento de onda
AAC	Absorbância Alto Comprimento de onda
ANOVA	Análise da Variância
AM	Amazonas, Brasil
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
Ca	Cálcio
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COI	Contato Osso/Implant
d	Dias
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
EDS	Espectroscopia de Dispersão de Raio X
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ER α	Receptores de Estrógeno Alfa
ER β	Receptores de Estrógeno Beta
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FBS	Soro Fetal Bovino
FOA-UNESP	Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
h	Horas
HE	Expressa a técnica de coloração das lâminas. Hematoxilina e Eosina
MC	Meio de Cultura
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligramas
mg/Kg	Miligramas por quilogramas

mm	Milímetros
NEPPI	Núcleo de Estudo e Pesquisa em Periodontia e Implantodontia
°	Graus
° C.	Graus Celcius
OCN	Osteocalcina
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Fosfato
PBS	Tampão fosfato-salino
PTON	Porcentagem de tecido ósseo neoformado
rpm	Rotações por minuto
RØ	Absorbância Relativa
ROI	Região de Interesse
SAOS-2	Linha celular derivada do osteossarcoma primário
SERMs	Moduladores seletivos do Receptores de Estrógeno
SS	Solução de cloreto de sódio 0,9%
TAM	Tamoxifeno
Ti	Titânio
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato

Lista de Anexos

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A	Normas de publicação do Periódico “Biochemical and Biophysical Research Communications”	93
ANEXO B	Normas de publicação do Periódico “Journal of Periodontal Research”	107
ANEXO C	Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal	120

Sumário

SUMÁRIO

Capítulo 1

PÁGINA DE TÍTULO	34
INTRODUÇÃO	36
MATERIAIS E MÉTODOS	38
RESULTADOS	41
DISCUSSÃO	723
CONCLUSÃO	756
REFERENCIAS	48
FIGURAS	53
ANEXO A	93

Capítulo 2

PÁGINA DE TÍTULO	57
INTRODUÇÃO	58
MATERIAIS E MÉTODOS	61
RESULTADOS	69
DISCUSSÃO	72
CONCLUSÃO	75
REFERENCIAS	77
FIGURAS	85
ANEXO B	107
ANEXO C	120

CAPÍTULO 1

Artigo Normalizado de acordo com as normas do Periódico “Biochemical and Biophysical Research Communications” (Anexo A)

**Título:**

Tamoxifeno quando na presença de titânio reduz a vitalidade, mas aumenta a síntese de colágeno e a taxa de mineralização nas células SAOS-2

Autores:

Luiz Guilherme Fiorin DDS, MSc^{1,2}, Emanuela Galliera, PhD^{3,4}, Henrique Rinaldi Matheus DDS, MSc^{1,2}, Dolaji Henin DDS⁵, Francisley Ávila Souza DDS, MSc, PhD^{1,6}, Juliano Milanezi de Almeida DDS, MSc, PhD^{1,2}, Claudia Dellavia DDS, PhD⁵

¹Departamento de Diagnóstico e Cirurgia - Divisão de Periodontia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Araçatuba, Brasil, UNESP

²Núcleo de Estudo e Pesquisa em Periodontia e Implantologia (NEPPI), Faculdade de Odontologia, São Paulo, Universidade Estadual (Unesp), Araçatuba, SP, Brasil

³Departamento de Ciências Biomédicas para a Saúde, Università degli Studi di Milano, Milão Itália

⁴IRCCS Instituto Ortopédico Galeazzi

⁵Ground Sections Laboratory, Departamento de Ciências Biomédicas, Cirúrgicas e Odontológicas, Università degli Studi di Milano Statale (UNIMI) - Milão, Itália

⁶Departamento de Diagnóstico e Cirurgia - Divisão de Cirurgia Oral, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Araçatuba, Brasil, UNESP

Running title: Influência do tamoxifêno no osso periimplantar.

***Corresponding author:**

Juliano Milanezi de Almeida

Address: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP:

Rua Jose Bonifácio 1193, Centro.

CEP: 16050-300 Araçatuba, SP, Brasil.

Tel/Fax 55- 1836363239

E-mail: jumilanezi@hotmail.com

Resumo: Objetivo. O estudo teve como objetivo observar a influência do tamoxifeno na presença de discos de titânio na viabilidade e no metabolismo de linhagens celulares de osteossarcoma humano (SAOS-2), bem como na sua produção de colágeno e capacidade de mineralização. **Materiais e Métodos.** As células SAOS-2 foram incubadas com meio de crescimento meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram divididas em grupos que incluíram a presença/ausência de tamoxifeno e o uso/não uso de discos de titânio isoladamente e em combinação. Foram fabricados um total de 54 discos de Titânio (Ti). Os discos passaram por jateamento de CaMg(CO₃)₂, limpeza, descontaminação por plasma e posterior esterilização. O tamoxifeno foi utilizado na concentração de 2 µM. Foram avaliadas a vitalidade celular, o metabolismo, a mineralização e as taxas de colágeno. A taxa de síntese e mineralização de colágeno foi calculada em relação a um controle negativo. **Resultados.** O tamoxifeno e o titânio sozinhos causaram uma diminuição na vitalidade, no metabolismo, na síntese e na taxa de colágeno da linha celular SAOS-2. Quando associados, TAM e Ti causaram uma ligeira diminuição na vitalidade, mas não na síntese de colágeno e nas taxas de mineralização. **Conclusão.** Com base em nossas descobertas, parece que a combinação de tamoxifeno e implantes de titânio pode ativar uma via que promove a homeostase do metabolismo, a síntese de colágeno e as taxas de mineralização.

Palavras-chave: Tamoxifeno, Moduladores Seletivos de Receptores de Estrógeno, cultura celular, viabilidade celular

Introdução

1.Introdução

A partir de um medicamento contraceptivo fracassado, o tamoxifeno foi desenvolvido a desde o final dos anos 70 e ao longo dos anos se tornou o primeiro modulador seletivo dos receptores de estrógeno (SERM)[1] e uma das mais antigas terapias coadjuvantes direcionadas no tratamento do câncer. Atualmente, com eficácia consolidada no tratamento de tumores ER+ e menores efeitos colaterais que outros SERMs[2-4], o tamoxifeno é amplamente utilizado como terapia coadjuvante no tratamento do câncer de mama[5-6]. Os receptores de estrógeno são subdivididos em alfa e beta, e atuam regulando a transcrição de genes no núcleo das células. Esses receptores são expressos em diversos tecidos [7]. Embora as drogas antiestrogênicas concorram com o estrógeno, bloqueando o receptor e exercendo efeito antagonista, estudos anteriores observaram que a ação do Tamoxifeno é tecido dependente, apresentando efeito agonista ou antagonista dependendo do tecido onde se liga ao receptor [8–10]. Além disso, o tamoxifeno não só é responsável pela ativação de ambos os subtipos de receptores de estrógeno [11], mas também possui diferentes alvos para sua ação, seja inibindo proteínas quinases ou ativando fatores apoptóticos.

A duração da terapia com tamoxifeno pode variar entre 5 e 10 anos [12–14], e seu efeito no osso ainda é controverso. Estudos anteriores observaram que o tamoxifeno reduz a remodelação óssea e mantém a massa óssea [15–17], enquanto isso, o uso prolongado de SERMS está associado ao comprometimento do crescimento ósseo e à perda óssea [17,18]. Isto pode representar um desafio quando se considera reabilitações dentárias. Os implantes dentários são dispositivos médicos comumente feitos de titânio, instalados no lugar da raiz perdida e sustentam uma prótese que substitui a coroa perdida. O sucesso dos implantes dentários está altamente relacionado com o crescimento ósseo dentro das espiras do implante, o chamado processo de osseointegração. Há uma clara necessidade de compreender os efeitos de uma droga altamente difundida associada a um procedimento padrão-ouro para substituição de dentes perdidos, uma vez que esta situação pode ser altamente prevalente no cenário clínico.

Pensando nisso, o objetivo deste estudo foi observar a influência do tamoxifeno associado a implantes de titânio na vitalidade e no metabolismo de uma linhagem de células SAOS-2, bem como na sua produção de colágeno e capacidade mineralizante. Além disso, o presente estudo teve como objetivo revisar as diferentes vias pelas quais o tamoxifeno influencia direta e indiretamente o metabolismo ósseo e o processo inflamatório.

Materiais e Métodos

2. Materiais e métodos

2.1 Grupos e períodos experimentais

Os grupos TAM consistiram em grupos onde 2µm de tamoxifeno foi associado ao meio de cultura enquanto o grupo MD consistiu apenas de meio de cultura. Os grupos +Disco consistiam em grupos onde o disco estava presente, enquanto -Disco consistiam em grupos onde o disco estava ausente. Os grupos foram divididos em TAM-Disco, TAM+Disco, MC-Disco, MC+Disco e avaliados 24h, 48h e 72h após o início do experimento.

2.2 Fabricação de Discos

Para a análise foram confeccionados discos de Titânio (Ti, grau 4) com diâmetro de 20mm (2r) e altura de 5mm. Em cada ponto de tempo, 18 discos foram usados, totalizando 54 discos por grupo. Os discos passaram por jateamento de $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$, limpeza, descontaminação por plasma e foram esterilizados por luz UV por 20 minutos de cada lado.

2.3 Cultura celular e subcultura

Células da linha celular de Sarcoma osteogênico primário humano (linha celular SAOS-2 humana, Sigma Aldrich, 89050205.) [19] foram incubadas com meio de crescimento (meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), 10.000 UI/ mL de penicilina G sódica, 100.000 µg/mL de sulfato de estreptomicina, 25 µg/mL de anfotericina B e 1% de L-glutamina) a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO_2 . Tamoxifeno (Enzo Life Sciences) foi utilizado na concentração de 2 µM. A dosagem escolhida de 2µm foi selecionada com base nos ensaios realizados por Darakhshan et al. 2015[20].

A subcultura de células aderentes foi iniciada. Uma vez determinado o número total de células (140.000 células/mL) e a porcentagem de viabilidade utilizando um hemocítômetro com contador de células em grades de Neubauer, a suspensão celular foi diluída até a densidade de semeadura recomendada para a linhagem celular, e o volume apropriado (o volume final foi 17mL, aproximadamente 1mL por amostra) foram pipetados para um novo poço de cultura celular. As amostras retornaram para a incubadora, onde foram mantidas por 2 dias até o dia 0 do experimento.

2.4 Vitalidade

O teste de vitalidade foi dividido em 24h, 48h, 72h, e tem como objetivo a obtenção de resultados quantitativos a partir da leitura da absorbância dos poços da microplaca contendo o reagente Alamar-Blue (Life-Technologies). Para obtenção da curva unitária de fluorescência versus concentração do fármaco, 100 µL do reagente Alamar-Blue foram adicionados aos 24 poços da microplaca e depois retornados à incubadora por 4 horas a 37°C. Após 4 horas, 6 discos por grupo foram avaliados em triplicata em microplacas de 96 poços e lidos nos comprimentos de onda de 560nm (ABC) e 600nm (AAC) para o cálculo de porcentagem pelo espectrofotômetro GloMax Plate Reader (Promega Corporation, Italia).

Cálculo da porcentagem da vitalidade

Redução relativa ($R\emptyset$) = ABC/AAC

% vitalidade = $\text{ABC} - (\text{AAC} \times R\emptyset) \times 100$

2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras foram analisadas em microscópio MEV (Jeol Neoscope Electron Microscope JCM-6000) para verificar a adesão e alterações morfológicas nas células. Após o período final da análise de vitalidade, o meio de cultura foi retirado e as amostras fixadas em solução de Glutaraldeído 2% e Cacodilato 0,1M por 2 horas a 4°C. As amostras foram então embebidas em tampão Cacodilato 0,1M por 2 horas, desidratadas em gradação seriada de etanol, desidratadas com hexametildisilano (HMDS) e armazenadas até a pulverização catódica de ouro.

2.6 Síntese de colágeno

As células foram semeadas nas amostras (6 discos por grupo + disco) e cultivadas em DMEM sem soro fetal bovino (FBS) durante 7 e 14 dias. As SAOS-2 cultivadas foram então fixadas com solução de Bouin por 1h e depois coradas com Sirius Red 0,1% (F3BA) dissolvido em ácido pícrico por 1h. As células coradas foram incubadas em NaOH 0,1 M durante 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e a absorbância lida, em triplicata, no comprimento de onda de 550 nm. A taxa de síntese de colágeno foi calculada com base nas médias do controle negativo.

2.7 Mineralização

As células foram semeadas nas amostras (6 discos por grupo + disco) e cultivadas em meio osteogênico por 7 e 14 dias. As amostras foram fixadas em etanol a 70% a 4 ° C durante 1 h, seguida de lavagem em PBS e coloração com solução 40 mM de Alizarin Red (Sigma-Aldrich) durante 20 min. As amostras foram submetidas a cinco lavagens em água deionizada sob agitação por 15 min, imersas em cloreto de cetilpiridínio a 10% e incubadas em temperatura ambiente por 20 min. O sobrenadante foi coletado e a absorbância lida, em triplicata, no comprimento de onda de 570 nm. A taxa de mineralização foi calculada com base nas médias do controle negativo.

2.8 Análise estatística

A análise estatística dos dados coletados foi realizada por meio do software BioEstat 5.0 (Instituto Mamirua). A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e os dados analisados pela ANOVA e teste de Tukey. O nível de significância adotado foi $p \leq 0,05$.

Resultados

3. Resultados

A análise dos efeitos principais mostrou que tanto o tratamento como a dependência do tempo por si só têm um efeito estatisticamente significativo na vitalidade das células. Em geral, não houve diferenças estatisticamente significativas entre grupos e momentos em relação ao metabolismo, síntese de colágeno e mineralização. ($p < 0,05$).

3.1 Vitalidade

Às 72h, os grupos sem a presença de tamoxifeno (MC, meio de crescimento), ou seja, MC-disco ($86,04\% \pm 7,77\%$; $96,40\% \pm 2,55\%$; $99,21\% \pm 0,23$) e MC+disco ($89,92\% \pm 4,51\%$; $97,63\% \pm 9,31\%$; $90,99\% \pm 0,36\%$) apresentaram percentual de vitalidade maior que os grupos onde o tamoxifeno estava presente, ou seja, disco TAM ($99,48\% \pm 6,93\%$; $108,22\% \pm 6,16\%$; $86,79\% \pm 1,92\%$) e TAM +disco ($93,23\% \pm 9,28\%$; $123,4\% \pm 3,62\%$; $86,16\% \pm 1,53\%$) ($p < 0,05$). Figura 1.

3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das células SAOS-2 foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Após 72h de cultivo in vitro, a observação por MEV mostrou evidente achatamento das células SAOS-2, aderidas ao disco de titânio e formando aglomerados de camadas homogêneas em ambos os grupos. Não foram visíveis diferenças morfológicas nas células viáveis entre os grupos. Porém, nos grupos onde o tamoxifeno foi administrado, foi observada uma diferença notável no número de células apoptóticas que apareceram caracterizadas por protuberâncias circulares, sugerindo o desprendimento das células da superfície do implante. A morfologia das células pode ser observada abaixo. Figura 1.

3.4 Síntese de colágeno

Todos os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa entre 0d e 7d, e 7d e 14d. A associação Tam e Ti (TAM+disco $0,057 \pm 0,021$; $0,223 \pm 0,005$; $0,086 \pm 0,001$) apresentou taxa de colágeno estatisticamente maior às 24h quando comparada ao MC-disco ($0,041 \pm 0,011$; $0,199 \pm 0,006$; $0,085 \pm 0,002$), embora, aos 14d, não tenha sido observada diferença estatística. Os grupos MC+disco ($0,041 \pm 0,011$; $0,213 \pm 0,006$; $0,067 \pm 0,009$) e TAM-disco, apresentaram menor taxa de síntese de colágeno aos 14d quando comparados aos grupos MC-disco e TAM+disco ($p < 0,05$). Figura 2.

3.5 Mineralização

Todos os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa ao comparar 0d com 7d e 14d. O grupo TAM-Disco apresentou menor taxa de mineralização a 48h e 72h ($1,187 \pm 0,083$; $1,638 \pm 0,009$; $1,615 \pm 0,051$) quando comparado a todos os grupos, ou seja, TAM+disco ($1,147 \pm 0,092$; $2,015 \pm 0,0387$; $1,942 \pm 0,092$; $2,015 \pm 0,0387$; $1,942 \pm 0,092$; MC+disco ($1,207 \pm 0,068$; $1,958 \pm 0,026$; $1,984 \pm 0,012$) e o controle negativo, ou seja, MC-disco ($1,143 \pm 0,044$; $1,911 \pm 0,084$; $1,847 \pm 0,072$). Não houve diferença estatisticamente significativa ao comparar disco TAM+ com disco MC em todos os momentos ($p < 0,05$). Figura 3.

Discussão

4. Discussão

Aproximadamente oitenta por cento dos tumores de mama são diagnosticados em mulheres na pós-menopausa, e a grande maioria apresenta receptores de estrógeno (RE) que, quando ativados pelo estrógeno, aumentam a taxa de proliferação de células tumorais [21], [22]. Esses tipos de tumores são denominados ER+ e respondem a terapias focadas na modulação do estrógeno. A natureza in vitro do presente estudo possibilitou avaliar o efeito isolado do tamoxifeno e a presença de titânio na linhagem celular de osteossarcoma humano, bem como sua associação, em situação livre de bactérias. Em nosso estudo, a associação de tamoxifeno e titânio diminuiu levemente a vitalidade, mas manteve a homeostase do setup aumentando o metabolismo das células SAOS-2, bem como as taxas de síntese e mineralização de colágeno.

Para enfatizar os resultados do nosso estudo, a dosagem do tamoxifeno foi escolhida com base no trabalho de Darakhshan et al., 2015[20] em que a concentração de 2 μ M apresentou não apenas um percentual aceitável de vitalidade após o tratamento, mas também apresentou menor porcentagem de toxicidade em múltiplas linhagens de células de câncer de mama quando comparada a dosagens mais altas de tamoxifeno. Em concentrações mais elevadas, a exposição crônica ao tamoxifeno cessa a replicação das células (5 μ M) e apresenta alta toxicidade (10 μ M e 20 μ M) conforme observado por Majundar et al., 2001[23]. Em humanos, a dosagem varia de 20mg a 40mg diariamente [24] em um protocolo de 2 a 10 anos [13], [25].

A viabilidade celular, um processo complexo que envolve muitas vias, é definida como o número de células saudáveis em uma amostra. O SAOS-2 foi escolhido para estudar os efeitos secundários do tamoxifeno em um cenário de instalação de implante de titânio no osso, por apresentar ambos os subtipos de receptores de estrógeno [26], [27]. O grupo sob efeito do tamoxifeno apresentou maior crescimento nos períodos iniciais seguido de rápida diminuição. Este fenômeno pode estar relacionado ao efeito protetor do tamoxifeno nas células osteoblásticas [10], mediado pelo envolvimento dos receptores de estrógeno ERA α e ERB β [9], [28–31] conforme descrito anteriormente por Kallio et al., 2008,[9]. Da mesma forma, a resposta à exposição aguda ao estradiol (ou, neste caso, a um agonista do estradiol) segue a linha observada por Gallea et al. 2013[32], em que sob alterações agudas, o ERA α promoveu proliferação osteoblástica

A diminuição da vitalidade após 72h foi confirmada por MEV, evidenciada pelo número considerável de células com morfologia arredondada, comumente observada em células apoptóticas. Foi descrito que o Ti tem um efeito prejudicial na vitalidade das células SAOS-2 [33], [34]. Além disso, observou-se que o tamoxifeno possui efeito apoptótico e antiproliferativo através de mecanismos não relacionados à ativação do receptor de estrógeno [35–37]. Estudos anteriores observaram que alguns metais exercem efeitos estrogênicos e podem influenciar as vias pelas quais o tamoxifeno induz a apoptose [36], [38]. Embora haja pouca ou nenhuma evidência sobre a espontaneidade desta interação in vitro.

A deposição de colágeno é uma etapa importante para a mineralização da matriz: à medida que o colágeno se mineraliza à medida que o número de fibras na matriz diminui, isso pode ser observado aos 7 dias, onde a quantidade de colágeno aumentou em todos os grupos, mas diminuiu com o tempo. Estudos mostraram que o tamoxifeno modula a organização e a remodelação da matriz [39]. Assim como observado em espécimes com administração isolada de tamoxifeno, que apresentaram menores valores de síntese de colágeno e conseqüentemente, menor taxa de mineralização.

Entretanto, a presença de titânio associado ao tamoxifeno pareceu reverter a diminuição da síntese de colágeno e da mineralização das células. Este achado pode ser explicado pela diferenciação osteogênica induzida pelo Ti [40] em associação com um efeito não mediado por ERE do tamoxifeno [41].

A experimentação *in vitro* é o primeiro passo para validar uma hipótese e representa um modelo confiável para isolar a causa e o efeito encontrados nos organismos vivos. *In vivo*, diferentes vias podem modular as respostas biológicas enquanto compensam o estresse sofrido pelas células. Portanto, investigações futuras sobre a possibilidade desse fenômeno ocorrer naturalmente e a interação com parâmetros observados *in vivo* são pertinentes, permitindo assim a transposição clínica dos resultados.

Conclusão

5. Conclusão

Com base nas limitações desta configuração específica, pode-se concluir que o tamoxifeno, na concentração de 2 μ M, quando associado ao titânio, reduz ligeiramente a vitalidade das células. Porém, o efeito negativo na vitalidade é compensado por um aumento do metabolismo celular, síntese de colágeno e mineralização da matriz.

Financiamento

Informações sobre financiamento: Luiz Guilherme Fiorin recebeu bolsas de mestrado e doutorado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (#2017/11688-4, 2019/24825-5). Além disso, este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Código Financeiro 001

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada – Divisão de Periodontia da Universidade Estadual Paulista (UNESP) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, São Paulo, Brasil e ao Laboratório de Seções Finas do Departamento de Ciências Biomédicas, Cirúrgicas e Odontológicas da Università degli Studi di Milano Statale (UNIMI), Milão, Itália. Luiz Guilherme Fiorin recebeu bolsas de mestrado e doutorado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (#2017/11688-4, 2019/24825-5). Além disso, este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) –Código Financeiro 001. Os autores agradecem a Camila Mocchi e ao departamento de ciências biomédicas da saúde.

Declaração de dados

Os dados que apoiam os resultados deste estudo estão disponíveis no autor correspondente, [LGF], mediante solicitação razoável.

Referências

Referências

- [1] V. C. Jordan, "Tamoxifen: Catalyst for the change to targeted therapy," *Eur J Cancer*, vol. 44, no. 1, 2008, doi: 10.1016/j.ejca.2007.11.002.
- [2] J. N. Ingle *et al.*, "Randomized Clinical Trial of Diethylstilbestrol versus Tamoxifen in Postmenopausal Women with Advanced Breast Cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 304, no. 1, 1981, doi: 10.1056/nejm198101013040104.
- [3] H. W. C. Ward, "Anti-oestrogen Therapy for Breast Cancer: A Trial of Tamoxifen at Two Dose Levels," *Br Med J*, vol. 1, no. 5844, 1973, doi: 10.1136/bmj.1.5844.13.
- [4] M. P. Cole, C. T. A. Jones, and I. D. H. Todd, "A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer an early clinical appraisal of ICI46474," *Br J Cancer*, vol. 25, no. 2, 1971, doi: 10.1038/bjc.1971.33.
- [5] O. Abe *et al.*, "Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: Patient-level meta-analysis of randomised trials," *The Lancet*, vol. 378, no. 9793, 2011, doi: 10.1016/S0140-6736(11)60993-8.
- [6] S. A. Nazarali and S. A. Narod, "Tamoxifen for women at high risk of breast cancer," *Breast Cancer: Targets and Therapy*, vol. 6, 2014. doi: 10.2147/BCTT.S43763.
- [7] I. Paterni, C. Granchi, J. A. Katzenellenbogen, and F. Minutolo, "Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): Subtype-selective ligands and clinical potential," *Steroids*, vol. 90, 2014. doi: 10.1016/j.steroids.2014.06.012.
- [8] M. A. Gallo and D. Kaufman, "Antagonistic and agonistic effects of tamoxifen: Significance in human cancer," *Seminars in Oncology*, vol. 24, no. SUPPL. 1, 1997.
- [9] A. Kallio *et al.*, "Estrogen and the selective estrogen receptor modulator (SERM) protection against cell death in estrogen receptor alpha and beta expressing U2OS cells," *Mol Cell Endocrinol*, vol. 289, no. 1–2, 2008, doi: 10.1016/j.mce.2008.03.005.
- [10] T. Watanabe *et al.*, "Agonistic effect of tamoxifen is dependent on cell type, ERE-Promoter context, and estrogen receptor subtype: Functional difference between estrogen receptors α and β ," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 236, no. 1, 1997, doi: 10.1006/bbrc.1997.6915.
- [11] M. Razandi, A. Pedram, V. C. Jordan, S. Fuqua, and E. R. Levin, "Tamoxifen regulates cell fate through mitochondrial estrogen receptor beta in breast cancer," *Oncogene*, vol. 32, no. 27, 2013, doi: 10.1038/onc.2012.335.
- [12] H. J. Burstein *et al.*, "Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline focused update," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 32, no. 21, 2014. doi: 10.1200/JCO.2013.54.2258.
- [13] D. Ribnikar, B. Sousa, T. Cufer, and F. Cardoso, "Extended adjuvant endocrine therapy – A standard to all or some?," *Breast*, vol. 32, 2017. doi: 10.1016/j.breast.2017.01.004.

- [14] D. Hinode, S. I. Tanabe, M. Yokoyama, K. Fujisawa, E. Yamauchi, and Y. Miyamoto, "Influence of smoking on osseointegrated implant failure: A meta-analysis," *Clin Oral Implants Res*, vol. 17, no. 4, 2006, doi: 10.1111/j.1600-0501.2005.01244.x.
- [15] R. L. Ward, G. Morgan, D. Dalley, and P. J. Kelly, "Tamoxifen reduces bone turnover and prevents lumbar spine and proximal femoral bone loss in early postmenopausal women," *Bone Miner*, vol. 22, no. 2, 1993, doi: 10.1016/S0169-6009(08)80220-6.
- [16] M. Kim *et al.*, "Changes in bone mineral density during 5 years of adjuvant treatment in premenopausal breast cancer patients," *Breast Cancer Res Treat*, vol. 180, no. 3, 2020, doi: 10.1007/s10549-020-05566-w.
- [17] L. Vehmanen, I. Elomaa, C. Blomqvist, and T. Saarto, "Tamoxifen treatment after adjuvant chemotherapy has opposite effects on bone mineral density in premenopausal patients depending on menstrual status," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 24, no. 4, 2006, doi: 10.1200/JCO.2005.02.3515.
- [18] E. Karimian *et al.*, "Tamoxifen impairs both longitudinal and cortical bone growth in young male rats," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 23, no. 8, 2008, doi: 10.1359/jbmr.080319.
- [19] H. J. Hausser and R. E. Brenner, "Phenotypic instability of Saos-2 cells in long-term culture," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 333, no. 1, 2005, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.05.097.
- [20] S. Darakhshan, A. Ghanbari, F. Gholami Rad, and A. Bidmeshki Pour, "Tamoxifen and tranilast show a synergistic effect against breast cancer in vitro," *Bratislava Medical Journal*, vol. 116, no. 1, 2015, doi: 10.4149/BLL_2015_013.
- [21] G. A. Clines, P. Choksi, and C. van Poznak, "Adjuvant Endocrine Therapy and Bone Health in Breast Cancer," *Current Osteoporosis Reports*, vol. 13, no. 5, 2015. doi: 10.1007/s11914-015-0277-9.
- [22] M. D. Planas-Silva, T. M. Rutherford, and M. C. Stone, "Prevention of age-related spontaneous mammary tumors in outbred rats by late ovariectomy," *Cancer Detect Prev*, vol. 32, no. 1, 2008, doi: 10.1016/j.cdp.2008.01.004.
- [23] S. K. Majumdar, J. A. Valdellon, and K. A. Brown, "In vitro investigations on the toxicity and cell death induced by tamoxifen on two non-breast cancer cell types," *J Biomed Biotechnol*, vol. 2001, no. 3, 2001, doi: 10.1155/S1110724301000316.
- [24] D. G. Bratherton *et al.*, "A comparison of two doses of tamoxifen (Nolvadex) in postmenopausal women with advanced breast cancer: 10 mg bd versus 20 mg bd," *Br J Cancer*, vol. 50, no. 2, 1984, doi: 10.1038/bjc.1984.163.
- [25] C. Davies *et al.*, "Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial," *The Lancet*, vol. 381, no. 9869, 2013, doi: 10.1016/S0140-6736(12)61963-1.
- [26] O. Vidal, L. G. Kindblom, and C. Ohlsson, "Expression and localization of estrogen receptor- β in murine and human bone," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 14, no. 6, 1999, doi: 10.1359/jbmr.1999.14.6.923.

- [27] M. K. Sutherland, D. U. Hui, L. G. Rao, J. N. Wylie, and T. M. Murray, "Immunohistochemical localization of the estrogen receptor in human osteoblastic SaOS-2 cells: Association of receptor levels with alkaline phosphatase activity," *Bone*, vol. 18, no. 4, 1996, doi: 10.1016/8756-3282(96)00016-6.
- [28] H. Michael, P. L. Härkönen, L. Kangas, H. K. Väänänen, and T. A. Hentunen, "Differential effects of selective oestrogen receptor modulators (SERMs) tamoxifen, ospemifene and raloxifene on human osteoclasts in vitro," *Br J Pharmacol*, vol. 151, no. 3, 2007, doi: 10.1038/sj.bjp.0707232.
- [29] V. Parikka *et al.*, "Estrogen responsiveness of bone formation in vitro and altered bone phenotype in aged estrogen receptor- α -deficient male and female mice," *Eur J Endocrinol*, vol. 152, no. 2, 2005, doi: 10.1530/eje.1.01832.
- [30] O. Vidal *et al.*, "Estrogen receptor specificity in the regulation of skeletal growth and maturation in male mice," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no. 10, 2000, doi: 10.1073/pnas.97.10.5474.
- [31] L. K. McCauley *et al.*, "Transgenic models of metabolic bone disease: Impact of estrogen receptor deficiency on skeletal metabolism," *Connective Tissue Research*, vol. 44, no. SUPPL. 1, 2003, doi: 10.1080/03008200390181744.
- [32] G. L. Galea *et al.*, "Estrogen receptor α mediates proliferation of osteoblastic cells stimulated by estrogen and mechanical strain, but their acute down-regulation of the Wnt antagonist Sost is mediated by estrogen receptor β ," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 13, 2013, doi: 10.1074/jbc.M112.405456.
- [33] M. G. Choi *et al.*, "Effects of titanium particle size on osteoblast functions in vitro and in vivo," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no. 12, 2005, doi: 10.1073/pnas.0500693102.
- [34] F. Schwarz, M. Langer, T. Hagena, B. Hartig, R. Sader, and J. Becker, "Cytotoxicity and proinflammatory effects of titanium and zirconia particles," *Int J Implant Dent*, vol. 5, no. 1, 2019, doi: 10.1186/s40729-019-0178-2.
- [35] C. J. Jennings, N. Zainal, I. M. M. Dahlan, E. W. Kay, B. J. Harvey, and W. Thomas, "Tamoxifen suppresses the growth of malignant pleural mesothelioma cells," *Anticancer Res*, vol. 36, no. 11, 2016, doi: 10.21873/anticancer.11177.
- [36] J. J. Hwang *et al.*, "Zinc(II) ion mediates tamoxifen-induced autophagy and cell death in MCF-7 breast cancer cell line," *BioMetals*, vol. 23, no. 6, 2010, doi: 10.1007/s10534-010-9346-9.
- [37] Z. Li, J. Chen, T. Lei, and H. Zhang, "Tamoxifen induces apoptosis of mouse microglia cell line BV-2 cells via both mitochondrial and death receptor pathways," *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science*, vol. 32, no. 2, 2012, doi: 10.1007/s11596-012-0039-1.
- [38] A. C. Famurewa, C. A. Ekeleme-Egedigwe, E. E. David, C. O. Eleazu, A. M. Folawiyo, and N. A. Obasi, "Zinc abrogates anticancer drug tamoxifen-induced hepatotoxicity by suppressing redox imbalance, NO/iNOS/NF- κ B signaling, and caspase-3-dependent apoptosis in female rats," *Toxicol Mech Methods*, vol. 30, no. 2, 2020, doi: 10.1080/15376516.2019.1669243.

- [39] E. Cortes *et al.*, "Tamoxifen mechanically reprograms the tumor microenvironment via HIF -1A and reduces cancer cell survival ," *EMBO Rep*, vol. 20, no. 1, 2019, doi: 10.15252/embr.201846557.
- [40] M. Vandrovcova *et al.*, "Interaction of human osteoblast-like Saos-2 and MG-63 cells with thermally oxidized surfaces of a titanium-niobium alloy," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0100475.
- [41] M. Takeuchi, M. Tokin, and K. Nagata, "Tamoxifen directly stimulates the mineralization of human osteoblast-like osteosarcoma cells through a pathway independent of estrogen response element," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 210, no. 2, 1995, doi: 10.1006/bbrc.1995.1660.

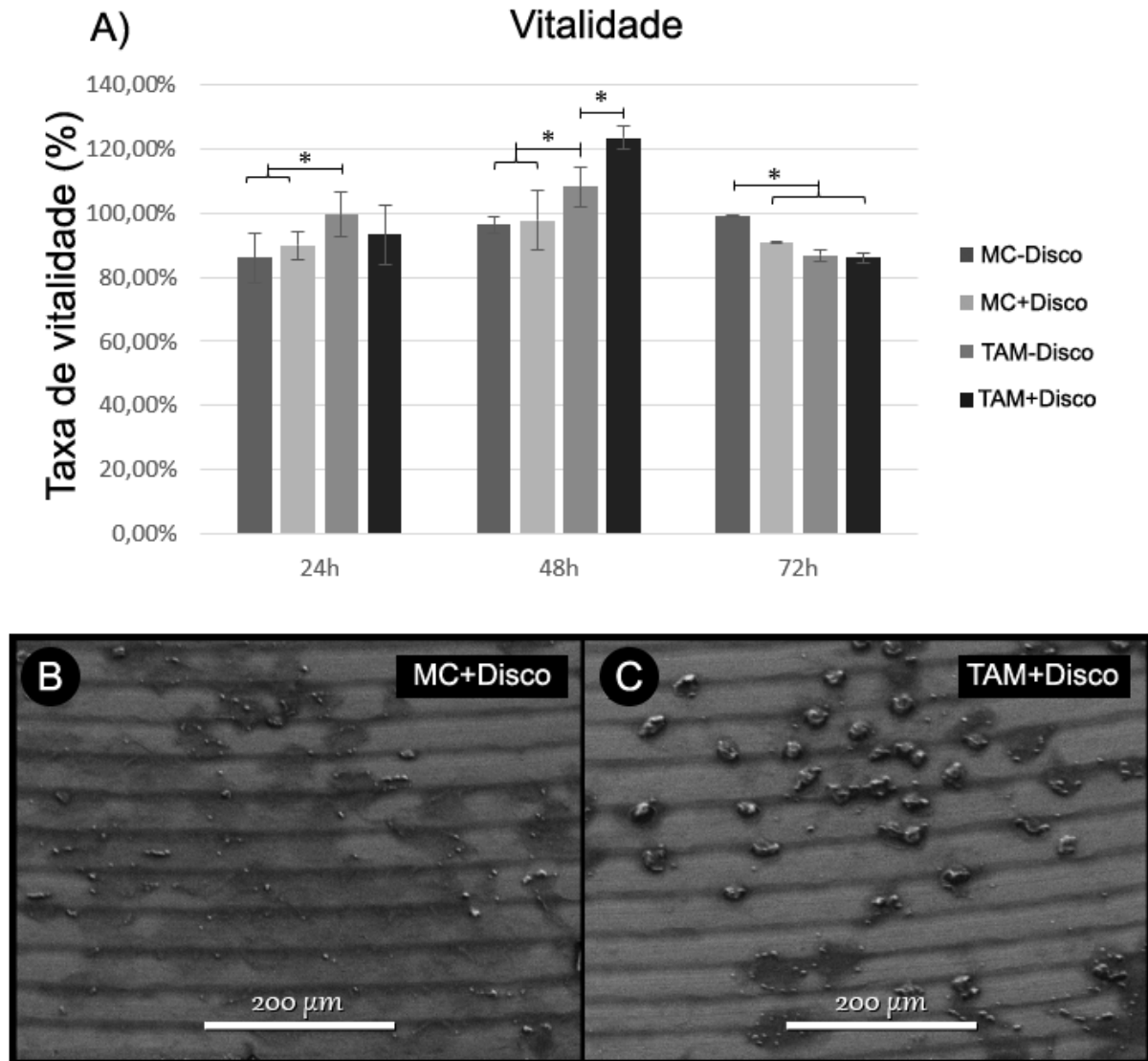


Figura 1. Médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da vitalidade das células em (B) cada período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey. Símbolos: *Diferença estatisticamente significativa. ($p \leq 0,05$). Fotomicrografias mostrando a morfologia das células da linhagem SAOS-2 nos grupos C) MC+Disco e D) TAM+Disco às 72h. Ampliação original: 4000x. Barras de escala: 200 μm . Fonte: Autor, 2023.

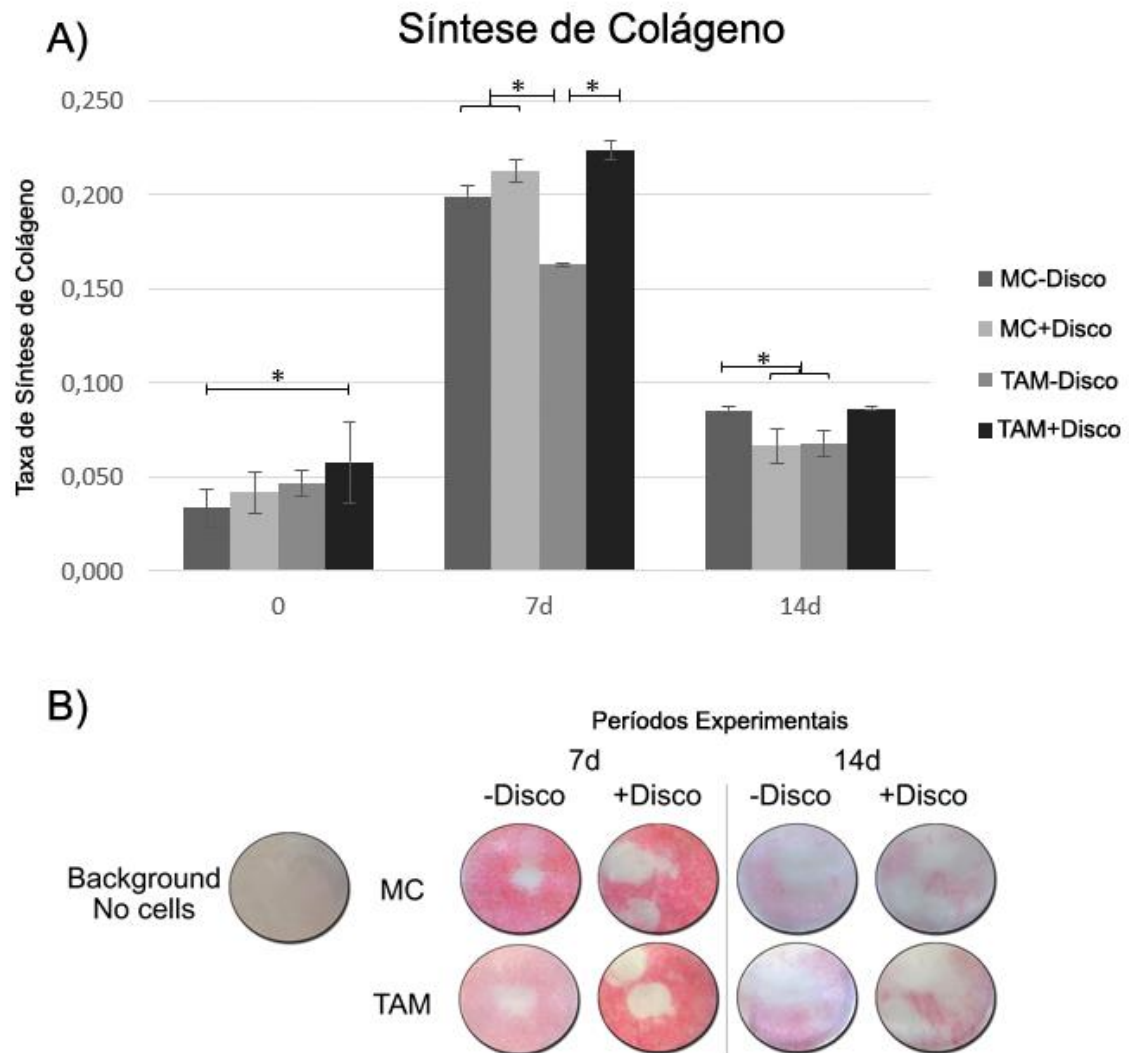


Figura 2. Médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da síntese de colágeno das células em (A) cada período. (B) Imagens representativas da coloração por Sirius Red dos poços de cultura por grupo e por período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey. Símbolos: *Diferença estatisticamente significativa. ($p \leq 0,05$). Fonte: Autor, 2023

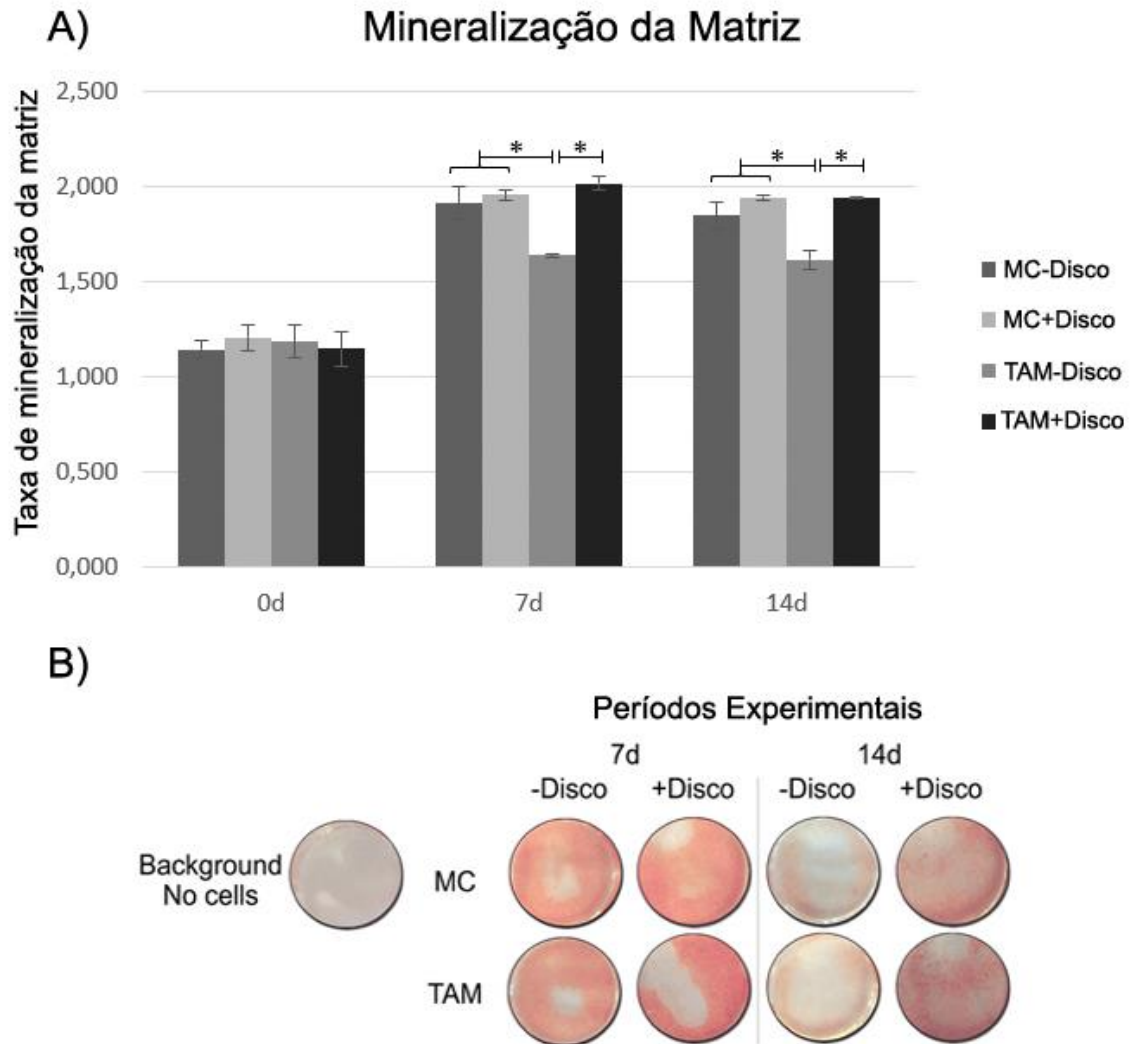


Figura 3. Médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da taxa de mineralização da matriz das células em (A) cada período. (B) Imagens representativas da coloração por Alizarin Red dos poços de cultura por grupo e por período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey. Símbolos: *Diferença estatisticamente significativa. ($p \leq 0,05$). Fonte: Autor, 2023

CAPÍTULO 2

Artigo Normalizado de acordo com as normas do Periódico “Journal of Periodontal Research” (Anexo B)

**Título:**

Influência do Tamoxifeno associado a quimioterápicos nos tecidos periimplantares

Autores:

Luiz Guilherme Fiorin¹, Juliano Milanezi de Almeida^{1*}.

¹São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

Running title: Influência do tamoxifeno no osso periimplantar.

***Corresponding author:**

Juliano Milanezi de Almeida

Address: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP:

Rua Jose Bonifácio 1193, Centro.

CEP: 16050-300 Araçatuba, SP, Brasil.

Tel/Fax 55- 1836363239

E-mail: jumilanezi@hotmail.com

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Desde a introdução dos implantes ósseointegráveis por Branemark no final dos anos 70, a implantodontia alcançou o status ouro entre a população como principal tratamento restaurador estético e funcional, sendo o principal foco populacional do tratamento adultos acima dos 60 anos. A ósseointegração, 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,¹⁻³ processo chamado de remodelação, composto por fases de deposição e reabsorção da matriz óssea. Embora a taxa de sucesso relatada para os implantes de titânio ósseointegrados seja elevada, falhas ainda ocorrem, e diferentes fatores locais e sistêmicos podem contribuir.⁴⁻⁶

Em ratos, o padrão anatômico e cinético da perda de massa óssea mimetiza o padrão em humanos⁷, vários investigadores tem usado ratos ovariectomizados para o estudo da perda óssea induzida por deficiência de estrógeno como um fator de risco em potencial na instalação e manutenção de implantes dentais.⁷⁻¹⁷ A literatura¹⁸ tem demonstrado resultados controversos com relação a ausência do estrógeno em estudos experimentais, demonstrando que a deficiência estrogênica não pode ser considerada como um fator de risco para falhas em implantes ósseointegrados em mandíbulas de ratas submetidas à ovariectomia. Por outro lado, estudos utilizando animais ovariectomizados como modelos de indução de osteoporose com implantes tem demonstrado que a deficiência do estrógeno resulta em uma menor taxa de renovação, menor taxa de contato direto entre o tecido ósseo e implante, competência biomecânica na interface do osso com o implante e redução na densidade em osso medular.¹⁰⁻²¹

Algumas terapias tem sido utilizadas para mimetizar os efeitos de supressão da reabsorção e estimulação da formação óssea do estrógeno²² e apesar de não ser uma terapia utilizada com foco para o tratamento de condições causadas pela ausência do estrógeno e sim como uma terapia hormonal unica ou adjuvante, o Tamoxifeno, um Modulador Seletivo do Receptor de Estrógeno (SERM) considerado o tratamento “gold standard” como terapia endócrina para o tratamento do câncer de mama,²³ possui ação agonista no osso.²³

Sendo administrado por um período de 5 a 10 anos,²⁴ o tamoxifeno é comumente utilizado em conjunto com drogas quimioterápicas²⁵⁻²⁷ no combate a células cancerígenas. A Cisplatina (CIS) e o 5-Fluorouracil (5-FU) são drogas amplamente utilizadas no tratamento quimioterápico.^{28,29} A CIS tem sua atividade antitumoral como resultado de interação de seu átomo central de platina com bases nitrogenadas,³⁰⁻³³ o que inibe replicação, transcrição, tradução e reparo do DNA.^{32,33} O 5-FU,

por sua vez, interfere com o metabolismo dos nucleosídeos e é incorporado a todas as classes de RNA por meio da RNA-polimerase. Adicionalmente, o fluorouracil forma o monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), que incorporado à timidilato sintase leva à inibição desta enzima, impedindo a síntese de timidilato, que é um precursor necessário do DNA.^{34,35}

Quando associado a esses fármacos, o tamoxifeno também apresenta influência sobre seus efeitos. Associado a cisplatina, sinergiza seu efeito antiproliferativo, aumentando a citotoxicidade e o efeito apoptótico nas células cancerígenas sem aumentar os efeitos adversos, além de retardar o desenvolvimento da resistência ao fármaco.³⁶⁻³⁹ Quando associado ao 5-fu, aumenta a incorporação do fármaco nas células tumorais potencializando a toxicidade mediada pelo RNA e retardando a resistência celular.⁴⁰⁻⁴² Quando associado aos quimioterápicos em ambos os casos a taxa de sobrevida dos pacientes aumentou.⁴²

A influência da CIS sobre o processo de reparo ósseo^{43,44} tem sido bem descrito na literatura. Por outro lado, em relação ao 5-FU relatos de sua influência sobre o tecido ósseo se limitam a progressão doença periodontal,⁴⁵ sua capacidade de alteração do reparo em regiões periimplantares permanece com uma resposta limitada na literatura.⁴⁶ Em particular o Tamoxifeno tem parcial efeito agonista nos receptores de estrógeno e reduz o turnover ósseo prevenindo assim a perda óssea em mulheres após a menopausa.⁴⁷ Relatos na literatura reportam que o Tamoxifeno mimetiza os efeitos do estrógeno no tecido ósseo, prevenindo a perda óssea em mulheres após a menopausa, por inibir diretamente a formação de osteoclastos e reabsorção óssea enquanto aumenta a apoptose de osteoclastos⁴⁷ exercendo uma influência positiva no processo de remodelação óssea, esse efeito foi verificado em nosso estudo anterior.

O Objetivo do Trabalho será avaliar a influência do Tamoxifeno associado a quimioterápicos no tecido ósseo periimplantar em implantes de Titânio osseointegrados. Sendo que nossa hipótese nula é que o Tamoxifeno associado aos quimioterápicos não possui influência positiva nos tecidos periimplantares de implantes osseointegrados.

Materiais e Métodos

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os protocolos descritos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, (protocolo nº 00196-2020) (Anexo C). A pesquisa foi realizada seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e segundo o guia The ARRIVE Guidelines: Animal Research: Reporting In Vivo Experiments.⁴⁸

Animais

Foram utilizados no presente estudo 140 ratas fêmeas (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), pesando aproximadamente 250 a 300 g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum*. Antes dos procedimentos cirúrgicos, todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), por todo o período experimental.

Cálculo Amostral

Para determinação do tamanho amostral, dois pontos foram considerados: 1 – Estudos prévios com metodologia semelhante realizados em nosso laboratório.⁴⁶ 2 – Foi realizado um estudo piloto e determinada a diferença mínima entre as médias obtidas de cada tratamento. Foi determinado o poder do teste de 80% com valor de α de 5%. Estes dados foram submetidos ao BioEstat 5.0 (BioEstat 5.0, Sociedade Civil de Mamirauá, Belém, PA, Brasil), que determinou um número mínimo de 8 repetições por tratamento em cada período. Considerando as perdas em animais modificados sistemicamente, o número de animais em cada período experimental foi estabelecido em 10 animais.

Grupos Experimentais e Tratamentos

Utilizando de um programa computacional, os 140 animais foram aleatoriamente distribuídos em sete grupos experimentais. Cada um composto por 10 animais que receberam os seguintes tratamentos:

Grupo SHAM + SS-SS: Chamado de Controle negativo total. Os animais pertencentes a este grupo receberam um procedimento que simulará a ovariectomia bilateral prévia e após 2 semanas do início receberam a instalação dos implantes, após 6 semanas da instalação dos implantes receberam administração de SS por gavagem por todo período experimental e 2 doses de solução salina intraperitoneal para simular a administração das soluções.

Grupo OVX + SS-SS: também chamado de grupo controle. Os animais pertencentes a este grupo receberam ovariectomia bilateral previamente e após 2 semanas do início receberam a instalação dos implantes, após 6 semanas da instalação dos implantes receberam administração por gavagem de 0,5 ml de solução salina a 0.9% por todo o período experimental.

Grupo OVX + SS-CIS: Os animais pertencentes a este grupo receberam ovariectomia bilateral previamente e após 2 semanas do início receberam a instalação dos implantes, após 6 semanas da instalação dos implantes receberam administração por gavagem de 0,5 ml de solução salina a 0.9% por todo o período experimental e 2 doses de cisplatina intraperitoneal.

Grupo OVX + SS-5fu: Os animais pertencentes a este grupo receberam ovariectomia bilateral previamente e após 2 semanas do início receberam a instalação dos implantes, após 6 semanas da instalação dos implantes receberam administração por gavagem de 0,5 ml de solução salina a 0.9% por todo o período experimental e 2 doses de 5-Fluorouracil intraperitoneal

Grupo OVX + TAM-SS: Os animais pertencentes a este grupo receberam a ovariectomia bilateral previamente, após 2 semanas do início receberam a instalação dos implantes, após 6 semanas da instalação dos implantes receberam administração por gavagem de tamoxifeno por todo o período experimental e 2 doses de SS via intraperitoneal.

Grupo OVX + TAM-CIS: Os animais pertencentes a este grupo receberam a ovariectomia bilateral previamente, após 2 semanas do início receberam a instalação dos implantes, após 6 semanas da instalação dos implantes receberam administração por gavagem de tamoxifeno por todo o período experimental e 2 doses de cisplatina intraperitoneal.

Grupo OVX + TAM-5fu: Os animais pertencentes a este grupo receberam a ovariectomia bilateral previamente, após 2 semanas do início receberam a instalação dos implantes, após 6 semanas da instalação dos implantes receberam administração por gavagem de tamoxifeno por todo o período experimental e 2 doses de 5-Fluorouracil intraperitoneal.

Períodos experimentais

Dez animais de cada grupo foram eutanasiados na 12ª semana, 20ª semana após o início do experimento 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%.

Protocolo experimental

A linha do tempo do design experimental e imagens representativas do passo-a-passo das cirurgias podem ser observadas na figura 1.

Protocolo para anestesia geral

Para todos os procedimentos cirúrgicos os animais receberam anestesia geral, obtida pela associação de 70mg/kg de Cloridrato de quetamina (Vetaset – ZoetisFlorham Park, NJ – USA) e 6mg/kg Cloridrato de xilazina (Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil), aplicados intramuscular no bíceps femoris da pata direita. Nos casos em que não foi obtido o efeito adequado do anestésico, a anestesia foi suplementada com a metade da dose inicial aplicada.

Protocolo para procedimento cirúrgico para ovariectomia

As ratas dos Grupos OVX foram submetidas a ovariectomia bilateral, foi realizada a tricotomia bilateral da região ventral e assepsia vigorosa com solução de digluconato de clorexidina a 0,2% (Farmácia de Manipulação Aphoticário, Araçatuba, SP, Brasil) em toda área.

Após preparo da área cirúrgica, com auxílio de lâmina de bisturi nº15, incisões bilaterais de aproximadamente 1cm de extensão, foram realizadas para se obter acesso aos ovários e, através das quais, realizados os procedimentos cirúrgicos que envolvem a remoção dos ovários. As suturas internas foram realizadas com fio absorvível Vicryl 4-0 (Vicryl 4-0, Ethicon Products, Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA.) e as suturas externas com fio de Seda 4-0 (Ethicon Products, Johnson & Johnson, Somerville, New Jersey, USA). Cada animal recebeu dose única de antibiótico (Pentabiótico Veterinário, Fontoura Wyeth S.A., São Bernardo do Campo, SP, Brasil) (administração intramuscular de 0,2 ml/animal) no pós-operatório imediato.

Verificação do Ciclo Estral

Todos os ratos foram submetidos a exame citológico para determinar a fase do ciclo nas 2 semanas anteriores à colocação dos implantes. Um cotonete embebido em solução salina (0,15 M) foi inserido na vagina. Uma lâmina de esfregaço foi produzida e imediatamente analisada sob microscopia óptica com aumento de 400x. As fases do ciclo estral foram determinadas de acordo com a quantificação de células epiteliais, células cornificadas e leucócitos no exame citológico.⁴⁹ O monitoramento das fases do ciclo foi realizado para confirmar o sucesso da ovariectomia.

Protocolo para administração do tamoxifeno e solução salina

Via Gavagem: A administração de 0,5 ml Solução Salina a 0,9% (Equiplex Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) e do Tamoxifeno (Citrato de Tamoxifeno, 15 mg/kg ml - Farmácia de Manipulação Aphoticário, Araçatuba, SP, Brasil.) ocorreu por gavagem uma vez ao

dia durante todo o período experimental. A dose do tamoxifeno foi calculada seguindo a proporcionalidade do cálculo da dose em humanos, a qual se baseia na superfície corpórea para determinação do volume da solução^{50,51} e em artigos anteriores que obtiveram resultados significantes com menor perda de animais.⁵²

Via Intraperitoneal: Tanto o cloreto de sódio 0,9% (Equiplax Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil), quanto a Cisplatina (Fauldcispla, 10 mg/10 ml, Libbs Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil) ou 5-Fluorouracil (Fluorouracila, 250 mg/10 ml, Eurofarma Laboratórios, São Paulo, SP, Brasil) foram administrados em duas doses, obedecendo intervalo de 48 horas entre elas, A dose total de 5- Fluorouracil e Cisplatina consiste em uma adaptação para o rato, do protocolo empregado para terapia oncológica em humanos, a qual considera a superfície corpórea para sua determinação.^{50,51} Para CIS, a primeira dose foi 5 mg/kg e a segunda 2,5 mg/kg,⁵³ enquanto 5-FU, 60 mg/kg e 40 mg/kg, respectivamente.⁵⁴ A injeção intraperitoneal de SS foi administrada nos animais que não receberam os agentes antineoplásicos para simular o estresse a que estiveram expostos.

Protocolo de instalação dos implantes e grupos experimentais

Após Anestesia geral, a porção medial das patas direita e esquerda de cada animal foi tricotomizada e realizou-se a antissepsia com auxílio de solução tópica de iodopovidona a 10%. Os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada, a qual permitiu a manutenção do animal em posição adequada para acesso às tíbias. Uma incisão de aproximadamente 30 mm foi realizada com lâmina de bisturi 15 C pelo lado medial nas tíbias. Após a dissecação com auxílio de um descolador de periósteo, o tecido ósseo foi exposto e perfurado um leito bicortical na metáfise tibial proximal usando uma fresa de 2,0 mm de diâmetro (Titanium Fix A.S Technology, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) montada em motor cirúrgico com 980 rpm (KaVo Konzept Surg, Filial KaVo São Paulo, São Paulo, Brasil), acompanhado por irrigação constante com solução salina fisiológica e aspiração com sugador de alta potência. Nos leitos preparados foram instalados um implante com superfície tratada por meio de jateamento e ataque ácido. Os implantes tem 4,0 mm de comprimento e 2,2 mm de diâmetro. A instalação foi realizada com auxílio de uma chave digital (1,2 mm) acoplada ao hexágono do implante até que o mesmo atinja o nível ósseo. Em seguida, o tecido muscular foi suturado internamente com fio 4.0 de poliglactina 910 (Vicryl – Johnson & Johnson do Brasil Ind. Com. Prod. Para saúde Ltda, São Bernardo do Campo, Brasil)

Processamento Laboratorial

Processamento histológico com desmineralização

Após fixação por 48 horas em solução de paraformaldeído tamponado 4%, as tíbias selecionadas foram submetidas à lavagem em água e imersas em solução desmineralizadora (constituída de PBS acrescida de 10% de ácido etileno diamino tetra-acético – EDTA, durante 60 dias). Após a desmineralização, o implante foi removido com o auxílio de uma chave digital (1,2 mm), as peças foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas, impregnadas, incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo com 4 µm de espessura. A microtomia foi executada seguindo um plano de corte longitudinal em relação à loja do implante e os cortes seriados que corresponderem à porção central da tal loja foram devidamente coletados. Seis secções equidistantes compreendendo a porção central do alvéolo do implante foram coradas com Hematoxilina & Eosina (HE) para análise histológica em cortes desmineralizados, da área de tecido ósseo neoformado. Oito outras secções equidistantes foram submetidas ao método da imunoperoxidase indireta. A seguir foram utilizados anticorpos primários (Santa Cruz Biotechnology®): cabra anti-TRAP, coelho anti-RUNX2 e cabra anti-OCN.

Processamento para análise sob microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia dispersiva de Raio - x

Depois da eutanásia e coleta das tíbias, foram fixadas em solução de paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2,5% em cacodilato tamponado 0.1M (pH 7,4) a temperatura ambiente por 4 horas, e transferidos para uma solução pura de cacodilato 0.1M.⁵⁵ foram desidratadas em soluções de concentração alcoólica crescente e incluídas em resina de alta viscosidade. Os blocos de resina foram recortados e lixados em direção longitudinal ao implante até atingirem a espessura de 30µm, seguindo o protocolo descrito para o processamento sem desmineralização. As secções foram polidas com suspensões de diamante com tamanhos de partículas de 6, 1 e 0,25µm. Cada secção polida terá sua superfície submetida a ataque ácido (ácido fosfórico 37%) por 1 minuto, e então lavadas em solução hipoclorito de sódio 5% por 5 minutos. Após secagem foram revestidos com ouro e paládio para análise em microscopia eletrônica de varredura.⁵⁶

Análise dos resultados

As análises foram realizadas por examinadores calibrados e cego em relação aos tratamentos. Duas regiões de interesse (ROI) foram determinadas por um histologista certificado (EE) com experiência em osteobiologia, com base na disposição e relevância dos eventos que ocorrem no tecido Peri-implantar pré e pós instalação do implante.

ROI 1

Determinado como o tecido entre as espiras dos implantes, estendendo-se desde o vale das espiras para 0,4 mm (a mesma profundidade do espira) em direção aos tecidos peri-implantar. Selecionado para análise histológica.

ROI 2

Do ápice do implante, a ROI 2 compreende a segunda espira localizada no tecido ósseo cortical e a primeira e segunda espiras localizadas no tecido ósseo medular. Selecionado para realizar o COI, ATON, imuno-histoquímica e microscopia de varredura. Para a espectroscopia dispersiva de raio-X, ROI 2 foi selecionado normalizando a Taxa de Ca/P dentro de um osso basal da mesma amostra. O ROI 2 foi determinado em ambos os lados da área anterior ocupada pelo implante.

Análise histométrica de contato direto osso/implante

A análise do contato direto osso/implante foi realizada utilizando-se um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Germany). A exigência determinada para a captura das imagens foi a de compreender o espaço entre uma rosca do implante localizada em tecido ósseo compacto e duas localizadas em tecido ósseo esponjoso.

Análise da área de tecido ósseo neoformado

A análise da área de tecido ósseo neoformado na região periimplantar foi realizada utilizando-se um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Germany). A exigência determinada para a captura das imagens foi a de compreender o espaço entre uma rosca do implante localizada em tecido ósseo compacto e duas localizadas em tecido ósseo esponjoso.

Análise histológica

A análise histológica foi realizada descritivamente nas secções coradas por hematoxilina e eosina, obtidas pelo processamento histológico com descalcificação, e foi efetuada em microscopia óptica avaliando-se os seguintes parâmetros: natureza e intensidade da resposta inflamatória local; extensão do processo inflamatório; padrão de celularidade e estruturação do tecido ósseo compacto neoformado e; padrão de celularidade e estruturação do tecido ósseo esponjoso neoformado.

Análise imuno-histoquímica

A análise imuno-histoquímica foi realizada sob microscopia óptica com uma ampliação original de 400x. Para RUNX2, OCN e TRAP, todas as células imuno-positivas em ROI2 foram consideradas.

Análise ultraestrutural

O foco da análise ultraestrutural foi a avaliação morfológica e dos elementos químicos presentes na interface entre o osso regenerado e a superfície do implante. Foi realizado por microscopia de Varredura com Sonda EDS (JEOL JSM 6610 MEV Jeol Nikon, Japan).

Análise Estatística

A análise estatística dos dados coletados foi realizada pelo programa BioEstat 5.0 (Mamirauá, Belém, PA, Brasil). Os dados da análise EDS foram submetidos à análise da normalidade pelo teste de Shapiro Wilk, em seguida foi empregado o teste de Análise de Variância (ANOVA) a um critério e o pós teste de Tukey. O nível de significância dos testes foi de $p \leq 0.05$.

Resultados

3 RESULTADOS

Análise do contato osso/implante

Os resultados para a análise de contato osso/implante (COI) estão representados na figura 2. Os grupo SS, apresentaram numericamente menor COI em todos os períodos experimentais quando comparado com os grupos TAM. Os Grupos com administração de CIS e 5FU apresentaram menor COI do que suas contrapartidas. Entretanto, nenhuma diferença estatística foi verificada. ($p>0,05$)

Análise de área de tecido ósseo neoformado (ATON)

Os resultados para a análise de área de tecido ósseo neoformado (ATON) estão representados na figura 3. O grupo OVX SS-SS, apresentou numericamente menor ATON em todos os períodos experimentais quando comparado aos outros grupos. Os grupos OVX SS-5FU e OVX SS-CIS apresentaram menor ATON quando comparado aos grupos aonde o TAM foi administrado.

Análise Histológica

No grupo SS-SS tanto aos 30 dias quanto aos 90 dias o espaço entre as espiras do implante se mostrava em sua totalidade preenchidas por tecido ósseo vital, bem vascularizado, com poucos espaços medulares.

Os grupos OVX-SS-SS, OVX-SS-CIS e OVX-SS-5FU aos 30 dias apresentavam pouco tecido ósseo preenchendo o espaço entre as espiras do implante. Os espaços medulares se mostravam bastante extensos nestes grupos e ocupados por medula óssea. Aos 90 dias o tecido ósseo situado entre as espiras passou a ocupar a maior parte da área, com espaços medulares menores. Neste período, nos grupos OVX-SS-CIS e OVX-SS-5FU observou-se em alguns espécimes áreas de tecido ósseo não vital e poucos focos inflamatórios.

Aos 30 dias nos grupos OVX-TAM-SS, OVX-TAM-5FU e OVX-TAM-CIS os espaços existentes entre as espiras do implante se mostraram ocupadas por quantidades equivalente de tecido ósseo vital e espaços medulares preenchidos por medula óssea. Aos 90 dias grande a quase totalidade dos espaços entre as espiras do implante eram ocupadas por tecido ósseo vital e bem vascularizado. Nestes grupos, raras foram as lacunas de osteócitos vazias observadas no tecido ósseo e não se observou focos inflamatórios.

Análise imuno-histoquímica

A técnica imunohistoquímica utilizada para detecção de RUNX2, OCN e TRAP apresentaram alta especificidade para esses biomarcadores, confirmado pela completa ausência de imunomarcagem negativa nos grupos controles. A imunomarcagem mostrou coloração marrom-escura

confinada ao núcleo em RUNX2, confinado ao citoplasma em TRAP e ao citoplasma e à matriz extracelular em OCN.

TRAP

Os padrões de imunomarcação das células TRAP-positivas podem ser observados na figura 4. O grupo OVX SS-SS apresentou maior padrão de imunomarcação quando comparado aos outros grupos aos 90 dias. A administração de TAM foi suficiente para diminuir numericamente a quantidade de células TRAP-positivas, porém não o suficiente para reverter os efeitos deletérios da ovariectomia e dos quimioterápicos nos grupos restantes.

RUNX2

Os padrões de imunomarcação das células RUNX2-positivas podem ser observados na figura 5. A administração de TAM foi suficiente para aumentar numericamente a quantidade de células TRAP-positivas, tendo maior importância nos períodos tardios dos grupos OVX TAM-SS e OVX TAM-CIS.

OCN

Os padrões de imunomarcação das células OCN-positivas podem ser observados na figura 6. Apenas nos grupos OVX TAM-SS e OVX TAM-CIS a quantidade numérica de células OCN-positivas apresentaram diferença estatística com suas contrapartidas sem TAM e no mesmo grupo em períodos diferentes.

Análise por Espectroscopia Multipla de Raio X

Os resultados para a análise por Espectroscopia Multipla de Raio X (EDS) estão representados na figura 7. Os grupos que receberam administração do TAM tiveram maiores taxas de mineralização quando comparado aos grupos que não receberam. Entretanto, o aumento não foi capaz de reverter totalmente a taxa de mineralização.

Análise Microscopia eletrônica de Varredura

O padrão ultraestrutural dos tecidos periimplantares estão reproduzidos na figura 7. O padrão ultraestrutural foi semelhante entre todos os grupos. Em todos os grupos, independente da administração de TAM ou dos quimioterápicos, um espessamento progressivo dos feixes de fibrilas de colágeno foi observado na matriz óssea

Discussão

4 DISCUSSÃO

Conforme evidenciado pelos resultados primários deste estudo, os grupos aonde houve administração de TAM, mesmo quando em associação aos quimioterápicos, apresentaram maior COI, ATON, imunomarcagem de células RUNX2 e OCN positivas e taxa de Ca/P, assim como menor marcação de células TRAP-positivas quando comparado aos grupos aonde a solução salina foi administrada. Nosso estudo avalia o efeito do TAM associado ou não aos quimioterápicos no osso periimplantar de ratos. Além disso, o desenho experimental desta pesquisa torna viável assumir que o tamoxifeno exerce influência positiva na manutenção da massa óssea e na calcificação do tecido ósseo periimplantar.

A utilização de modelos animais é o primeiro passo para validação de pesquisas *in vitro*³¹. Um modelo apropriado e confiável é essencial para correlacionar a causa com o efeito. Ratas ovariectomizadas são um modelo confiável para simular condições de pós-menopausa em humanos.⁵⁷⁻⁵⁹ Independentemente de quaisquer limitações, o padrão de perda óssea em ratos parece imitar o humano,^{7,9,18} o que permite a compreensão dos efeitos isolados do TAM em múltiplos cenários. Comumente utilizado como terapia adjuvante, o entendimento de seus efeitos no reparo ósseo é fundamental para estabelecer futuras investigações correlacionando o TAM com a quimioterapia.

O conceito primário de osseointegração como medida de sucesso de reabilitações implanto-suportadas foi apresentado por Albrektsson e Branemark.⁶⁰ Por outro lado, o conceito de taxa de sobrevivência dos implantes depende do processo de remodelação que ocorre no osso após a conclusão da osseointegração. Esses eventos complementares constituem o processo de cura. Após a conclusão da osseointegração, a remodelação é um processo dinâmico durante toda a vida, mas é mais evidente nos primeiros 6 meses após a cirurgia devido a microdanos no local periimplantar.⁶¹⁻⁶³

O TAM é o primeiro medicamento adjuvante introduzido e mais utilizado no tratamento do câncer de mama.⁶⁴⁻⁶⁵ Apesar do seu efeito agonista bem documentado no tecido ósseo, a literatura não avalia se estes efeitos também podem ser esperados localmente nos tecidos periimplantares. Em nosso estudo, os grupos aonde TAM foi administrado apresentaram maior COI quando comparado ao grupo controle em todos os períodos de análise, porém sem alterações significativas nas características estruturais e ultraestruturais.

Condições sistêmicas que afetam o metabolismo ósseo nem sempre refletem na diminuição do COI, mas podem afetar a área do tecido ósseo entre as espiras dos implantes, o que é relevante na avaliação da função e capacidade mecânica dos implantes.⁶⁶ Os animais tratados com TAM

apresentaram maior ATON quando comparados aos grupos SS em todos os períodos, incluindo os tratados com quimioterápicos. Esse resultado é corroborado pela análise histológica, na qual apesar das características celulares semelhantes entre os grupos, os grupos TAM apresentaram maior área de tecido ósseo em combinação com redução da área ocupada por tecido conjuntivo e hematopoiéticos, quando comparado aos grupos SS. Quando associado a CIS e ao 5FU, o tamoxifeno apresentou parcial efeito protetor contra a influência negativa dos quimioterápicos, porém não suficiente para se igualar ao grupo SHAM SS-SS.

A remodelação é um processo contínuo mantido durante toda vida útil de qualquer implante endósseo. O equilíbrio entre a formação óssea e a reabsorção são vitais para a manutenção da massa óssea e estrutura óssea ao redor do implante. Os grupos TAM apresentaram menor número de células TRAP-positivas ligadas à matriz óssea quando comparado aos grupos SS, sugerindo menor atividade osteoclástica. Além disso, os grupos TAM apresentaram expressão aumentada de biomarcadores relacionado à diferenciação osteoblástica como RUNX2 e OCN. Essas descobertas permitem a compreensão sobre como a atividade secundária do tamoxifeno influencia o equilíbrio do osso periimplantar.

O efeito mineralizante do TAM tem sido relatado desde a década de 1990, quando estudos in vitro demonstraram que células cultivadas sob a influência do TAM expressavam um aumento tempo-dependente na quantidade de cálcio acumulado na matriz extracelular.⁶⁷ Em sistemas não comprometidos, o aumento gradual nas taxas de Ca/P sugere o processo normal de mineralização, quando a deposição de minerais aumenta à medida que os componentes orgânicos são reduzidos.^{68,69} Conforme observado neste experimento avaliando a fase pós-osseointegração, houve aumento da taxa de Ca/P nos grupos aonde o TAM foi administrado quando comparado aos grupos SS em todos os períodos.

O ambiente livre de desafios bacterianos (tíbias de ratos) adotado pelo presente estudo permitiu avaliar conceitos de prova de princípio sobre o impacto do TAM na remodelação óssea periimplantar associado ou não as quimioterápicos. Com base nesses achados, pode-se extrapolar que os pacientes sob terapia adjuvante com TAM, sozinho ou em associação a CIS ou 5FU, poderiam ser reabilitados de forma segura e previsível com implantes de titânio. No entanto, encorajamos fortemente mais experiências que avaliem a complexidade da presença microbiana e funcionalidade (cargas oclusais) neste sistema.

Conclusão

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados deste experimento, nossa hipótese nula foi rejeitada. A administração de TAM não prejudicou a remodelação do osso periimplantar ao redor dos implantes de titânio osseointegrados. A terapia com TAM influenciou positivamente o COI e o BIN durante a fase de remodelação óssea, regulou negativamente os biomarcadores de atividade dos osteoclastos (TRAP) e regulou positivamente a expressão de RUNX2 e OCN. Além disso, a terapia com TAM aumentou a massa óssea e a mineralização ao redor dos implantes osseointegrados de titânio instalados nas tíbias de ratas ovariectomizadas, porém, não o suficiente para reverter totalmente os efeitos da depleção de estrógeno e da atividade deletéria dos quimioterápicos.

Referências

REFERENCIAS

1. Albrektsson T, Berglundh T, Lindhe J. Ósseointegration: Historic background and current concepts. In: Lindh J, Karring T, Niklaus PL, eds. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 4th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2003: 809-820.
2. Berglundh T, Abrahamsson I, Lang NP, Lindhe J. De novo alveolar bone formation adjacent to endósseous implants. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(3):251-262.
3. Block SM, Achong MR. Ósseointegration. In: Miloro M, Ghali GE, Larsen EP, Waite PD. *Peterson's principles of oral and maxillofacial surgery*. 2nd ed. London: BC Decker, 2004: 189-203.
4. Lambert PM, Morris HF, Ochi S. The influence of smoking on 3-year clinical success of ósseo-integrated dental implants. *Ann Periodontol*. 2000;5(1):79-89.
5. Ekfeldt A, Christiansson U, Eriksson T, et al. A retrospective analysis of factors associated with multiple implant failures in maxillae. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12(5):462-467.
6. Hinode D, Tanabe S, Yokoyama M, Fujisawa K, Yamauchi E, Miyamoto Y. Influence of smoking on ósseo-integrated implant failure: a meta-analysis. *Clin Oral Implants Res*. 2006;17(4):473-478.
7. Pan J, Shirota T, Ohno K, Michi K. Effect of ovariectomy on bone remodeling adjacent to hydroxyapatite-coated implants in the tibia of mature rats. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000;58(8):877-882.
8. Brufsky AM. Cancer treatment-induced bone loss: pathophysiology and clinical perspectives. *Oncologist*. 2008;13(2):187-195.
9. Qi MC, Zhou XQ, Hu J, et al. Oestrogen replacement therapy promotes bone healing around dental implants in osteoporotic rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004;33(3):279-285.
10. Yamazaki M, Shirota T, Tokugawa Y, et al. Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999;87(4):411-418.

11. Tokugawa Y, Shirota T, Ohno K, Yamaguchi A. Effects of bisphosphonate on bone reaction after placement of titanium implants in tibiae of ovariectomized rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18(1):66-74.
12. Cho P, Schneider GB, Krizan K, Keller JC. Examination of the bone-implant interface in experimentally induced osteoporotic bone. *Implant Dent*. 2004;13(1):79-87.
13. Giro G, Sakakura CE, Gonçalves D, Pereira RMR, Marcantonio E Jr, Orrico SRP. Effect of 17 β -estradiol and alendronate on the removal torque of osseointegrated titanium implants in ovariectomized rats. *J Periodontol*. 2007;78(7):1316-1321.
14. Viera-Negrón YE, Ruan WH, Winger JN, Hou X, Sharawy MM, Borke JL. Effect of ovariectomy and alendronate on implant osseointegration in rat maxillary bone. *J Oral Implantol*. 2008;34(2):76-82.
15. Motohashi M, Shirota T, Tokugawa Y, Ohno K, Michi K, Yamaguchi A. Bone reactions around hydroxyapatite-coated implants in ovariectomized rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999;87(2):145-152.
16. Frost HM, Jee WS. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner*. 1992;18(3):227-236.
17. Gnudi S, Giardino R, Mongiorgi R, et al. Evaluation of an experimental model of osteoporosis induced in the female rat through ovariectomy. *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1993;69(7-8):461-468.
18. Duarte PM, César Neto JB, Gonçalves PF, Sallum EA, Nociti JF. Estrogen deficiency affects bone healing around titanium implants: a histometric study in rats. *Implant Dent*. 2003;12(4):340-346.
19. Faverani LP, Polo TOB, Ramalho-Ferreira G, et al. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. *Clin Oral Investig*. 2018;22(1):255-265.
20. Giro G, Gonçalves D, Sakakura CE, Pereira RM, Marcantonio E Jr, Orrico SR. Influence of estrogen deficiency and its treatment with alendronate and estrogen on bone density around osseointegrated implants: radiographic study in female rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105(2):162-167.

21. Giro G, Coelho PG, Sales-Pessoa R, Pereira RM, Kawai T, Orrico SR. Influence of estrogen deficiency on bone around osseointegrated dental implants: an experimental study in the rat jaw model. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011;69(7):1911-1918.
22. Chow J, Tobias JH, Colston KW, Chambers TJ. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J Clin Invest*. 1992;89(1):74-78.
23. Clines GA, Choksi P, Van Poznak C. Adjuvant endocrine therapy and bone health in breast cancer. *Curr Osteoporos Rep*. 2015;13(5):263-273.
24. Burstein HJ, Temin S, Anderson H, et al. Adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline focused update. *J Clin Oncol*. 2014;32(21):2255-2269.
25. Gelber RD, Cole BF, Goldhirsch A, et al. Adjuvant chemotherapy plus tamoxifen compared with tamoxifen alone for postmenopausal breast cancer: meta-analysis of quality-adjusted survival. *Lancet*. 1996;347(9008):1066-1071.
26. Tormey DC, Gray R, Gilchrist K, et al. Adjuvant chemohormonal therapy with cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil, and prednisone (CMFP) or CMFP plus tamoxifen compared with cmf for premenopausal breast cancer patients. *Cancer*. 1990;65(2):200-206.
27. Rusthoven JJ. The evidence for tamoxifen and chemotherapy as treatment for metastatic melanoma. *Eur J Cancer*. 1998;34 Suppl 3:S31-S36.
28. Lorch JH, Goloubeva O, Haddad RI, et al. Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck: long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2011;12(2):153-159.
29. Vermorken JB, Peyrade F, Krauss J, et al. Cisplatin, 5-fluorouracil, and cetuximab (PFE) with or without cilengitide in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: results of the randomized phase I/II ADVANTAGE trial (phase II part). *Ann Oncol*. 2014;25(3):682-688.
30. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat Rev*. 2007;33(1):9-23.

31. Wozniak K, Czechowska A, Blasiak J. Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. *Chem Biol Interact.* 2004;147(3):309-318.
32. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(4):307-320.
33. Cho JM, Manandhar S, Lee HR, Park HM, Kwak MK. Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: implication to cancer cell resistance. *Cancer Lett.* 2008;260(1-2):96-108.
34. Noordhuis P, Holwerda U, Van der Wilt CL, et al. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Ann Oncol.* 2004;15(7):1025-1032.
35. Arias JL. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems. *Molecules.* 2008;13(10):2340-2369.
36. Tavassoli M, Soltaninia J, Rudnicka J, Mashanyare D, Johnson N, Gäken J. Tamoxifen inhibits the growth of head and neck cancer cells and sensitizes these cells to cisplatin induced-apoptosis: role of TGF-beta1. *Carcinogenesis.* 2002;23(10):1569-1575.
37. Ercoli A, Scambia G, De Vincenzo R, et al. Tamoxifen synergizes the antiproliferative effect of cisplatin in human ovarian cancer cells: enhancement of DNA platination as a possible mechanism. *Cancer Lett.* 1996;108(1):7-14.
38. Kim MJ, Lee JH, Kim YK, Myoung H, Yun PY. The role of tamoxifen in combination with cisplatin on oral squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Lett.* 2007;245(1-2):284-292.
39. Nakata B, Albright KD, Barton RM, Howell SB, Los G. Synergistic interaction between cisplatin and tamoxifen delays the emergence of cisplatin resistance in head and neck cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1995;35(6):511-518.
40. Benz C, Santos G, Cadman E. Tamoxifen and 5-fluorouracil in breast cancer: modulation of cellular RNA. *Cancer Res.* 1983;43(11):5304-5308.
41. Miyake T, Honma Y, Urano T, Kato N, Suzumiya J. Combined treatment with tamoxifen and a fusicoccin derivative (ISIR-042) to overcome resistance to therapy and to

enhance the antitumor activity of 5-fluorouracil and gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Int J Oncol.* 2015;47(1):315-324.

42. Liu JH, Yang MH, Fan FS, et al. Tamoxifen and colchicine-modulated vinblastine followed by 5-fluorouracil in advanced renal cell carcinoma: a phase II study. *Urology.* 2001;57(4):650-654.

43. Stine KC, Wahl EC, Liu L, et al. Nutlin-3 treatment spares cisplatin-induced inhibition of bone healing while maintaining osteosarcoma toxicity. *J Orthop Res.* 2016;34(10):1716-1724.

44. Stine KC, Wahl EC, Liu L, et al. Nutlin-3 treatment spares cisplatin-induced inhibition of bone healing while maintaining osteosarcoma toxicity. *J Orthop Res.* 2016;34(10):1716-1724.

45. Garcia VG, Novaes VC, Almeida JM, et al. Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. *Support Care Cancer.* 2015;23(7):2007-2017.

46. Almeida JM, Ervolino E, Gusman DJR, et al. Antineoplastic agents aggravate the damages caused by nicotine on the peri-implant bone: an in vivo histomorphometric and immunohistochemical study in rats. *Clin Oral Investig.* 2022;26(2):1477-1489.

47. Clines GA, Choksi P, Van Poznak C Adjuvant endocrine therapy and bone health in breast cancer. *Curr Osteoporos Rep.* 2015;13(5):263-273.

48. Kilkenney C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG; NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol.* 2010;160(7):1577-1579.

49. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002;62(4A):609-614.

50. Du Bois D, Du Bois EF. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. 1916. *Nutrition.* 1989;5(5):303-313.

51. Nakasato T, Izumisawa M, Akahane A, et al. Combined intra-arterial infusion and systemic chemoradiotherapy for stage IV squamous cell carcinoma of the mandibular gingiva. *Jpn J Radiol.* 2012;30(9):752-761.

52. Hilakivi-Clarke L, Wärrä A, Bouker KB, et al. Effects of in utero exposure to ethinyl estradiol on tamoxifen resistance and breast cancer recurrence in a preclinical model. *J Natl Cancer Inst.* 2016;109(1):djw188.
53. Havelka AM, Berndtsson M, Olofsson MH, Shoshan MC, Linder S. Mechanisms of action of DNA-damaging anticancer drugs in treatment of carcinomas: is acute apoptosis an "off-target" effect? *Mini Rev Med Chem.* 2007;7(10):1035-1039.
54. Medeiros CA, Leitão RF, Macedo RN, et al. Effect of atorvastatin on 5-fluorouracil-induced experimental oral mucositis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;67(5):1085-1100.
55. Ye L, Mishina Y, Chen D, et al. Dmp1-deficient mice display severe defects in cartilage formation responsible for a chondrodysplasia-like phenotype. *J Biol Chem.* 2005;280:6197-6203.
56. Du Z, Ivanovski S, Hamlet SM, Feng JQ, Xiao Y. The ultrastructural relationship between osteocytes and dental implants following osseointegration. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016;18(2):270-280.
57. Johnston BD, Ward WE. The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women. *Biomed Res Int.* 2015;2015:635023.
58. Koebele SV, Bimonte-Nelson HA. Modeling menopause: the utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas.* 2016;87:5-17.
59. Baloglu M, Gökalp Özkorkmaz E. Biochemical and immunohistochemical investigations on bone formation and remodelling in ovariectomised rats with tamoxifen citrate administration. *Folia Morphol.* 2019;78(4):789-797.
60. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, et al. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand.* 1981;52(2):155-170.
61. Roberts WE, Smith RK, Zilberman Y, et al. Osseous adaptation to continuous loading of rigid endosseous implants. *Am J Orthod.* 1984;86(2):95-111.
62. Sennerby L, Thomsen P, Ericson LE. Early tissue response to titanium implants inserted in rabbit cortical bone. *J Mater Sci Mater Med.* 1993;4:240-250.

63. Brunski JB. In vivo bone response to biomechanical loading at the bone/dental-implant interface. *Adv Dent Res*. 1999;13:99-119.
64. Jordan VC. Tamoxifen: catalyst for the change to targeted therapy. *Eur J Cancer*. 1990;44(1):30-38.
65. Quirke VM. Tamoxifen from failed contraceptive pill to best-selling breast cancer medicine: a case-study in pharmaceutical innovation. *Front Pharmacol*. 2017;8:620.
66. Brånemark PI, Adell R, Breine U, et al. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969;3(2):81-100.
67. Takeuchi M, Tokin M, Nagata K. Tamoxifen directly stimulates the mineralization of human osteoblast-like osteosarcoma cells through a pathway independent of estrogen response element. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995;210(2):295-301.
68. Tzaphlidou M, Zaichick V. Calcium, phosphorus, calcium-phosphorus ratio in rib bone of healthy humans. *Biol Trace Elem Res*. 2003;93(1-3):63-74.
69. Gandolfi MG, Zamparini F, Iezzi G, et al. Microchemical and micromorphologic esem-edx analysis of bone mineralization at the thread interface in human dental implants retrieved for mechanical complications after 2 months to 17 years. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2018;38(3):431-441.

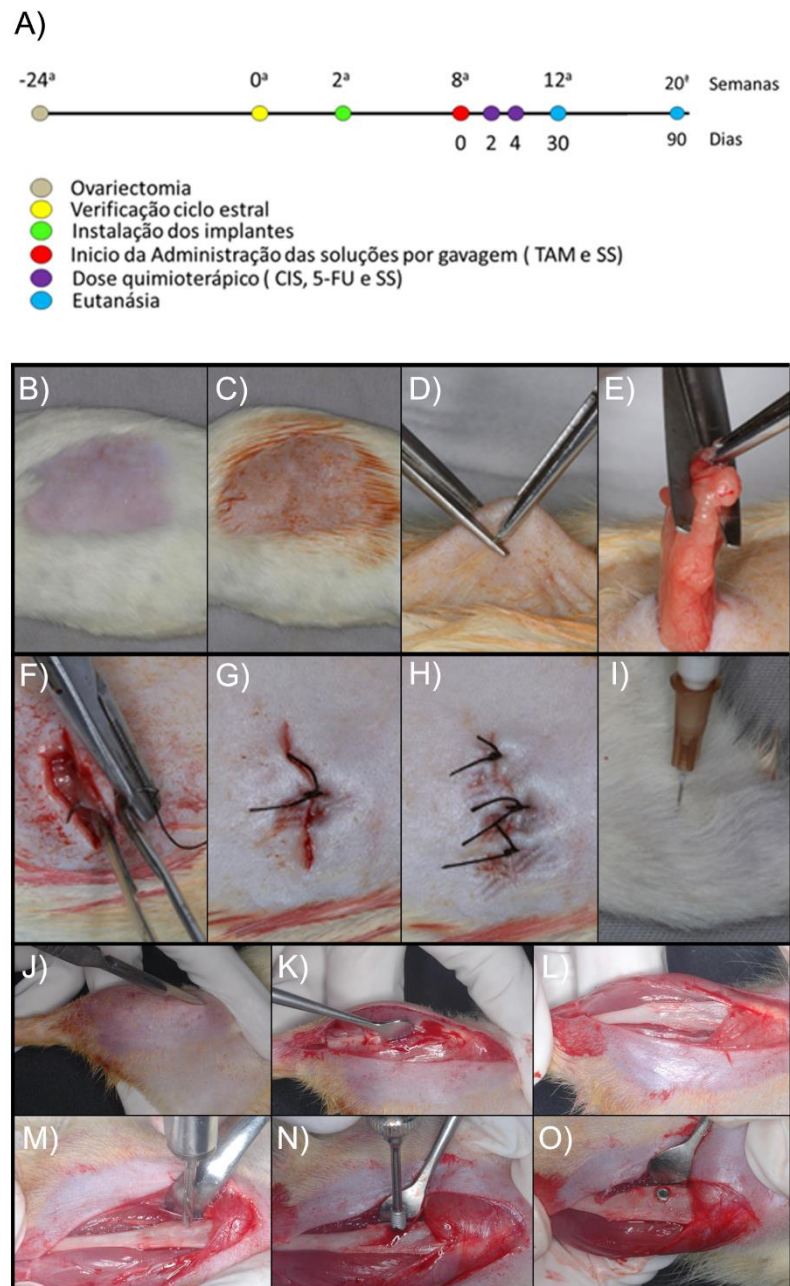


Figura 1. Design Experimental (A) e Procedimentos cirúrgicos realizados. As imagens mostram o passo-a-passo da cirurgia de ovariectomia. Tricotomia (B) e antisepsia com Iodo (C), incisão 1 cm abaixo da costela (D), remoção dos ovários (E), suturas internas (F,G), suturas externas (H) e aplicação de antibioticoterapia pós-operatória (I). As imagens mostram o passo-a-passo da cirurgia de instalação de implantes. Incisão na tibia tricotomizada (J), divulsão do tecido muscular (K), exposição da janela óssea (L), fresagem (M), instalação do implante (N) e implante já instalado (O). Fonte: Autor, 2023

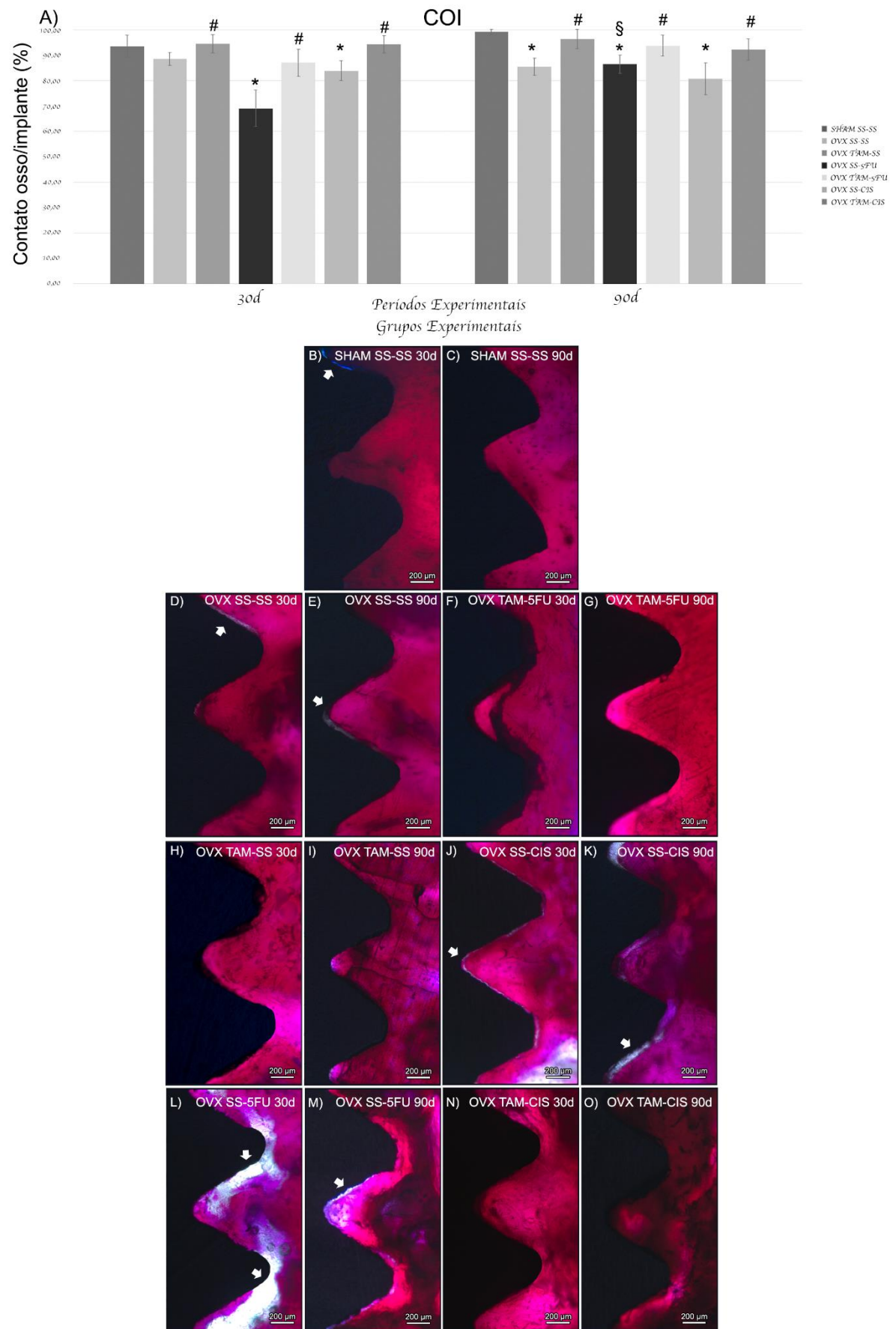


Figura 2. Médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da porcentagem de contato osso/implante em cada período (A). Teste estatístico: ANOVA e Tukey. Símbolo: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SHAM SS-SS no mesmo período. Símbolo: #, diferença estatisticamente significativa com o mesmo grupo sem TAM no mesmo período. Símbolo: §, diferença estatisticamente significativa no próprio grupo em períodos diferentes (≤ 0.05). Fotomicrografias (B-O) representativas mostrando o COI de cada grupo e período. Setas Brancas: Área sem contato osso/implante. Coloração: Fucsina Básica. Barras de escala 200 μ m. Fonte: Autor, 2023.

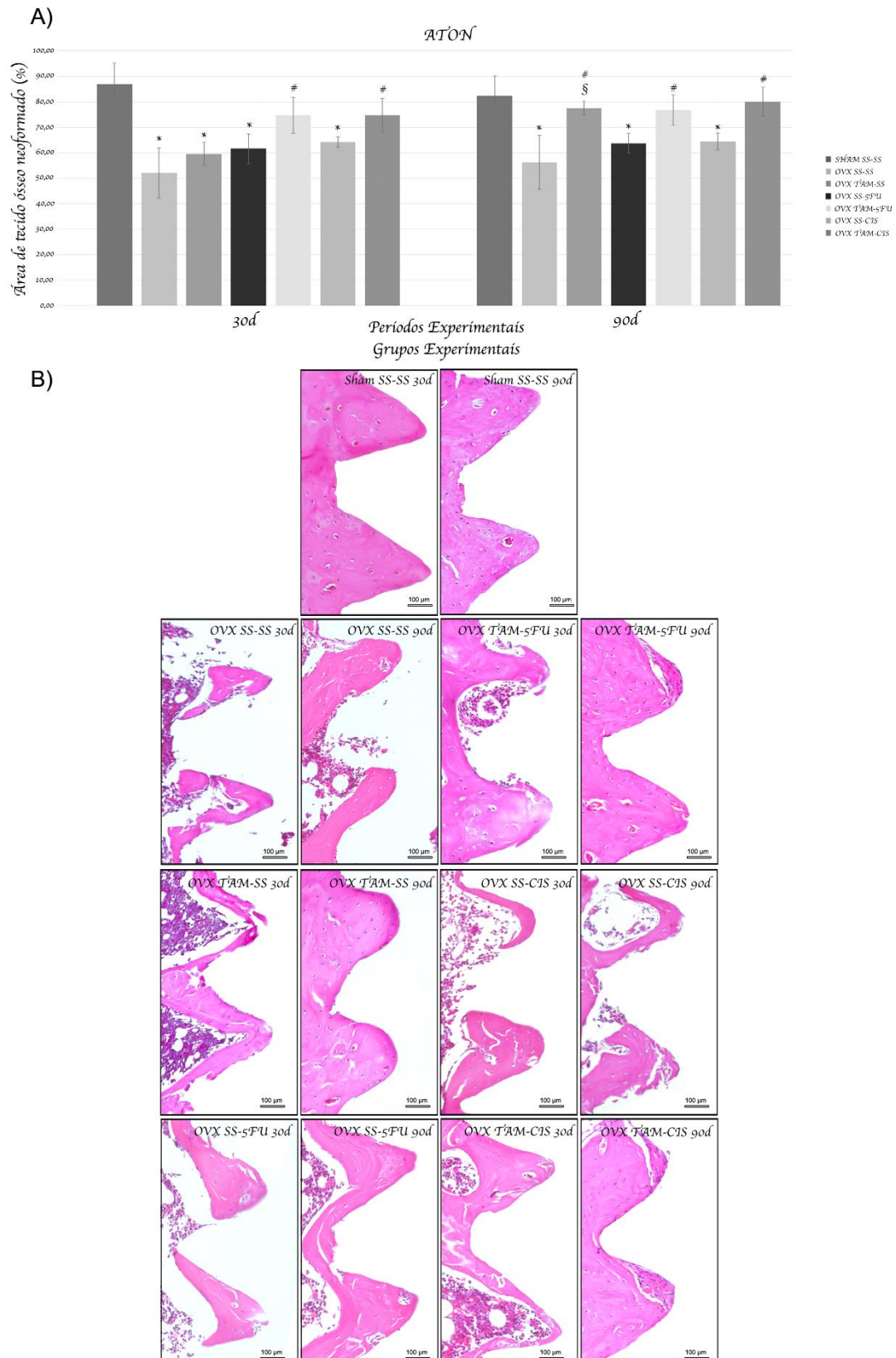
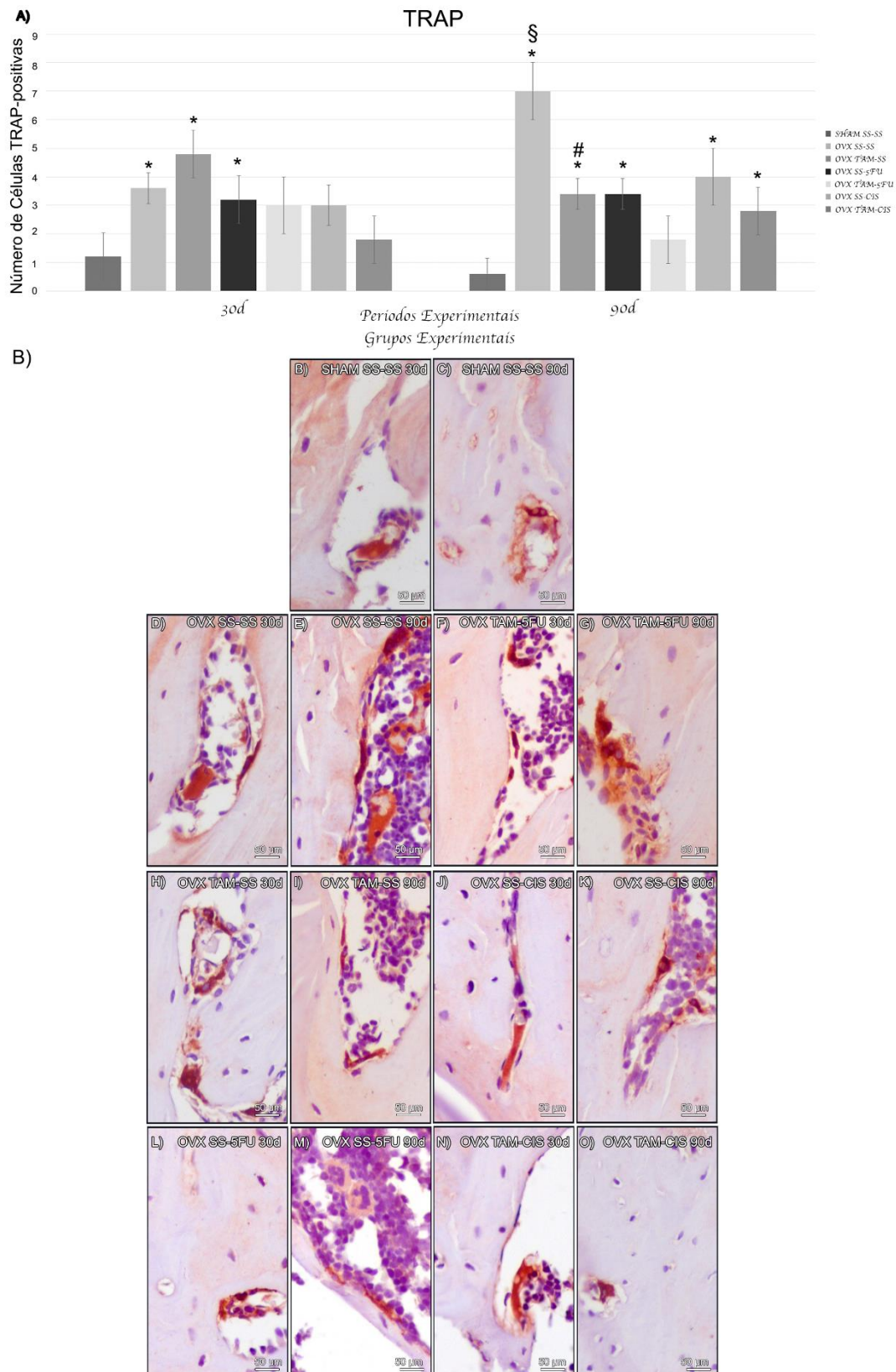


Figura 3. (A) Médias e Desvio padrão ($M \pm DP$) da porcentagem de área de tecido ósseo neoformado. (B) Fotomicrografias representativas dos padrões histológicos por grupo e por período. Teste estatístico: ANOVA e Tukey. Símbolo: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SHAM SS-SS no mesmo período. Símbolo: #, diferença estatisticamente significativa com o mesmo grupo sem TAM no mesmo período. Símbolo: §, diferença estatisticamente significativa no próprio grupo em períodos diferentes (≤ 0.05). Barra de escala: 100 μm . Fonte: Autor, 2023.



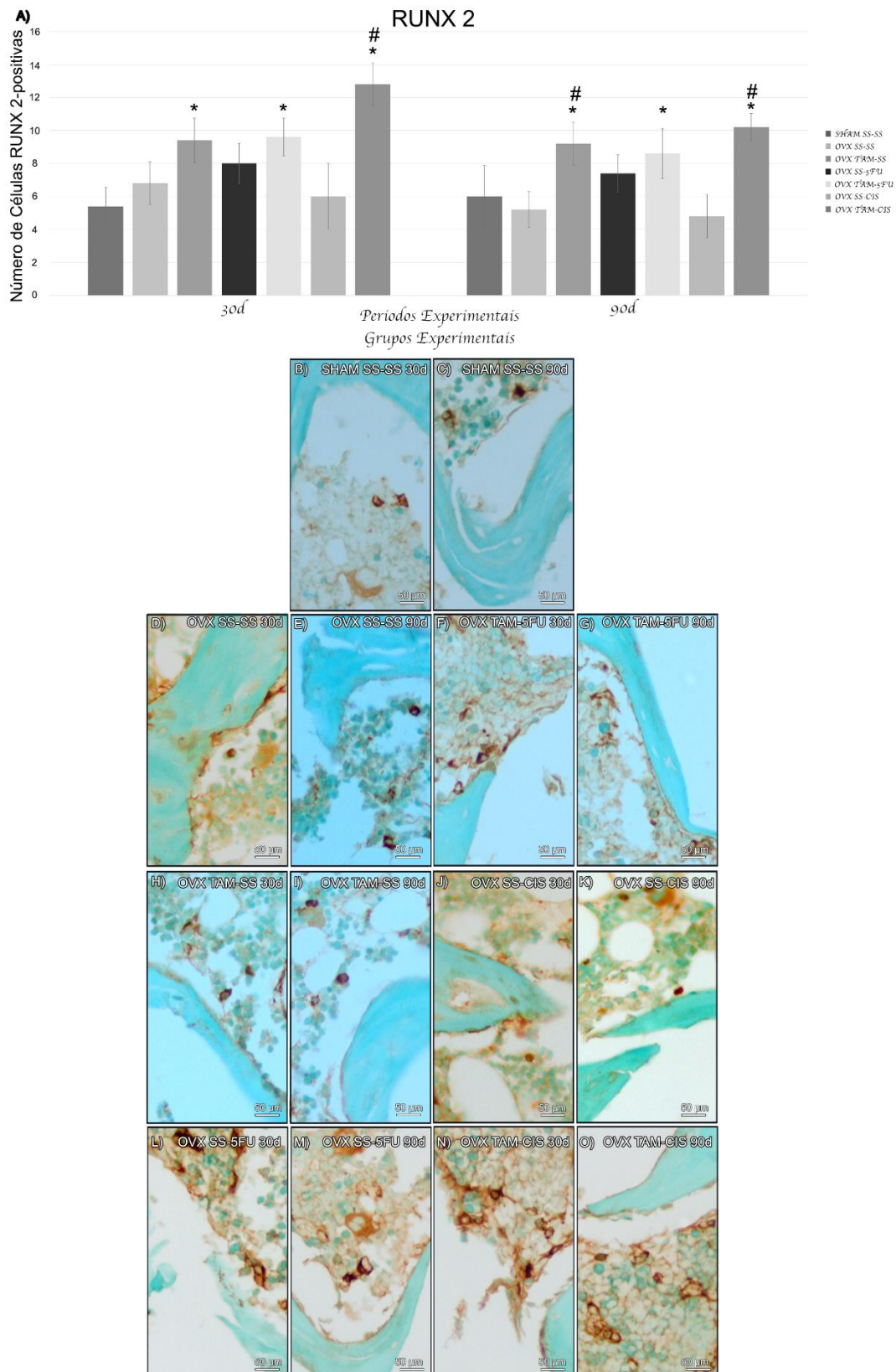


Figura 5. (A) Médias e Desvio padrão ($M \pm DP$) da células RUNX2-positivas. (B-O) Fotomicrografias representativas dos padrões imuno-histoquímicos por grupo e por período. Teste estatístico: ANOVA e Tukey. Símbolo: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SHAM SS-SS no mesmo período. Símbolo: #, diferença estatisticamente significativa com o mesmo grupo sem TAM no mesmo período. (≤ 0.05). Contra-coloração: Fast Green. Barra de escala: 50 µm. Fonte: Autor, 2023.

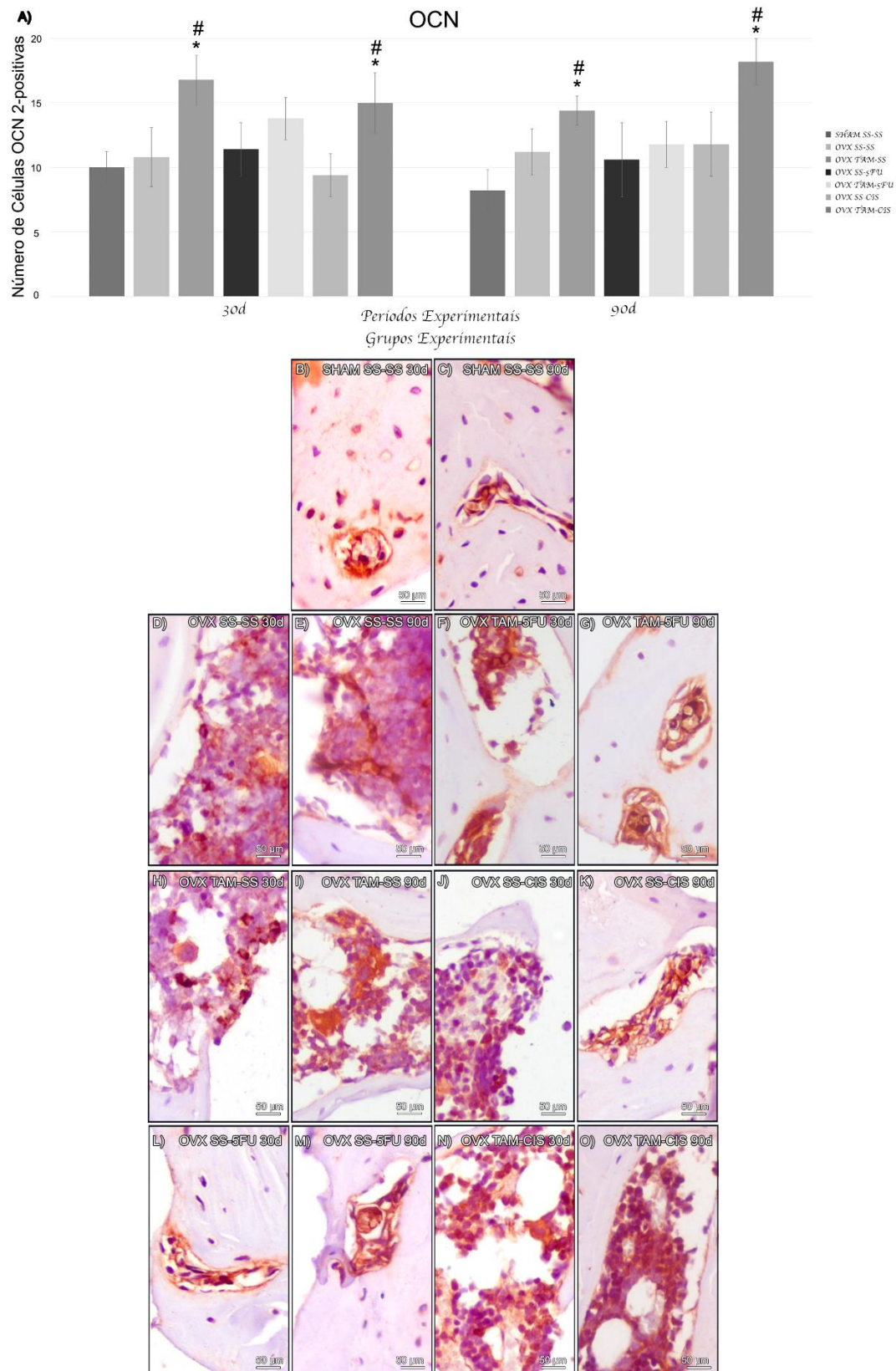


Figura 6. (A) Médias e Desvio padrão ($M \pm DP$) da células OCN-positivas. (B-O) Fotomicrografias representativas dos padrões imuno-histoquímicos por grupo e por período. Teste estatístico: ANOVA e Tukey. Símbolo: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SHAM SS-SS no mesmo período. Símbolo: #, diferença estatisticamente significativa com o mesmo grupo sem TAM no mesmo período. (≤ 0.05). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barra de escala: 50 µm. Fonte: Autor, 2023.

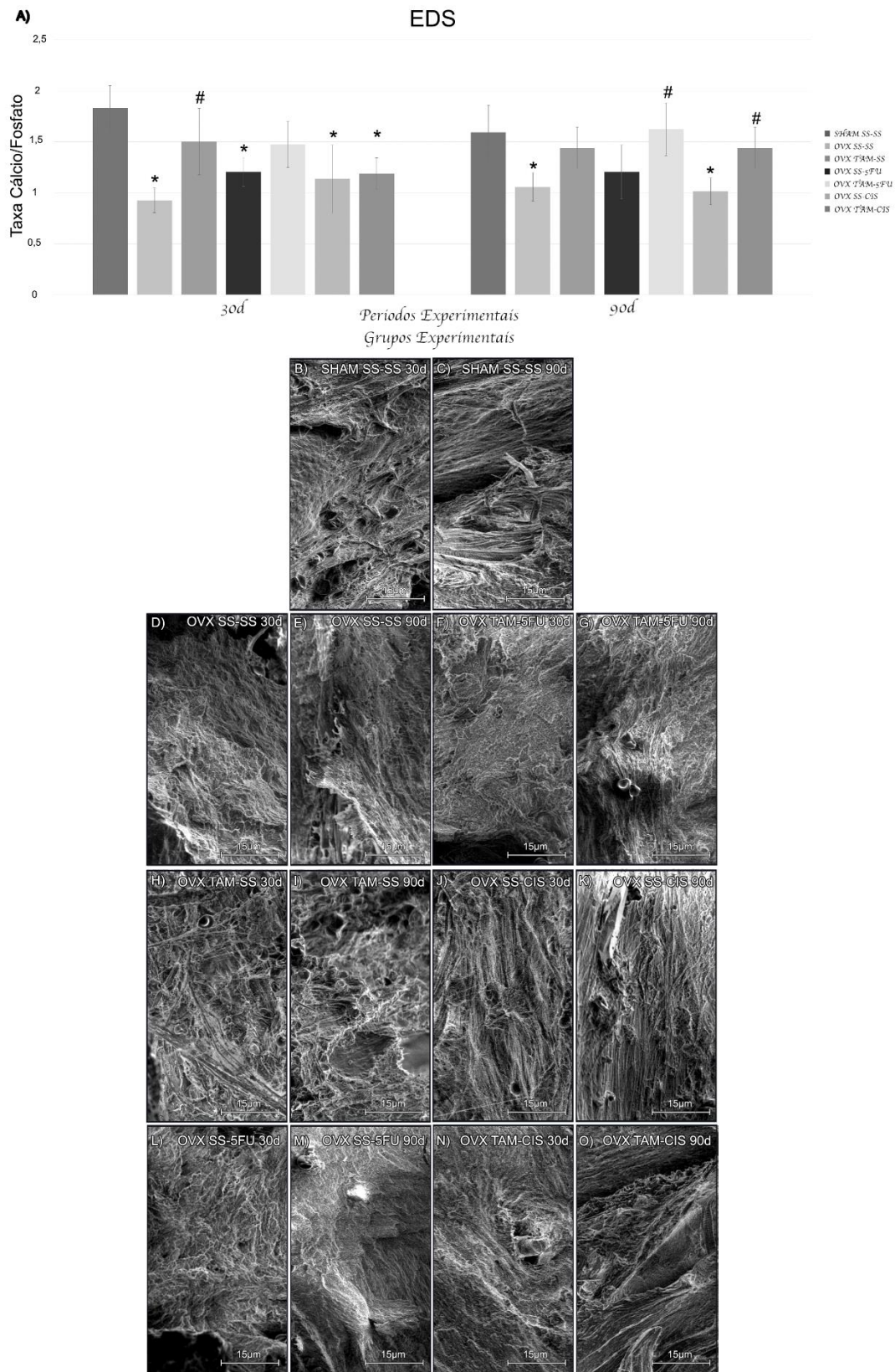


Figura 7. Propriedades ultraestruturais e elementares do tecido periimplantar. (A) Médias e Desvio padrão ($M \pm DP$) da taxa cálcio/fosfato na interface osso/implante. (B-O) Fotomicrografias representativas dos padrões ultraestruturais por grupo e por período. Teste estatístico: ANOVA e Tukey. Símbolo: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SHAM SS-SS no mesmo período. Símbolo: #, diferença estatisticamente significativa com o mesmo grupo sem TAM no mesmo período. (≤ 0.05). Barra de escala: 15 µm. Fonte: Autor, 2023.

ANEXOS

ANEXO A - Normas de publicação do Periódico “Biochemical and Biophysical Research Communications”)



Announcement:

BBRC has traditionally only published Short Communications of novel results. From 2023, the journal now publishes Short Communications, Full Length Research papers and Reviews.

What type of paper should I choose on submission?

For short communications, we will still aim to make an accept or reject decision within two weeks of submission. If you have novel results that you can consolidate into 4,600 words, with no more than four figures, then you may continue to choose the short communication route.

Short communications should be concise, no more than 4,600 words and up to four display items. They should offer novel insights and warrant a rapid peer review process. The 4,600 word count includes the title page, all sections of the manuscript (including the references), and the figure and table legends. Papers that exceed these limits will be reassigned within the submission system as a Full Length Research Paper.

If you submit a **full length research paper or a review paper**, we will continue to offer a fast turnaround (with a decision after review within 30 days of submission), and we'll also make sure that any revisions that we request of you will not require significant resource expenditure on your part.

Full Length Research papers should present a comprehensive account of original research. These papers are not restricted by length or number of figures.

Review Papers should be authoritative, state-of-the-art accounts of the selected research field, be of high interest, balanced and accurate. Beyond summaries of important scientific developments and ideas, authors are encouraged to identify and discuss how the field may be impacted or develop in the future, including insights that may be of significance to the scientific community. The number of co-authors of review articles is limited to five and each author is expected to make a substantial contribution to the writing of the manuscript.

There are no restrictions on length for review papers, and we welcome both comprehensive reviews and short reviews that offer an insight into more recent advances in a field.

Introduction

Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC) is the premier international journal focusing on the very rapid dissemination of timely and significant experimental results in diverse fields of biological research. The journal is broad scope, and is divided into the following sections, each with a team of dedicated expert editors:

- Biochemistry
- Biophysics

- Cell Biology
- Cellular Pathology and Cancer
- Computational Biology and Bioinformatics
- Genetics
- Immunology and Inflammation
- Microbiology and Virology
- Nanomedicine and Bionanomaterials
- Neuroscience
- Pharmacology
- Physiology
- Plant Biology
- Structural Biology

Please note that BBRC does not favorably review manuscripts identifying a miRNA-target pair without additional insights into the repression mechanism or significant advances in understanding regulatory pathways. In addition, the following elements should be an integral part of the study:

- In Silico prediction of miRNA targets must be experimentally verified using appropriate luciferase constructs and assays
- To exclude non-functional miRNA/mRNA interactions a reporter system including the whole 3'UTR of the target gene downstream of the "luciferase" or GFP should be considered
- To maximize physiological relevance any miRNA modulation should be validated by measuring the expression of the putative protein and should preferentially include miRNA inhibition rather than miRNA overexpression experiments

Types of paper

BBRC has traditionally only published Short Communications of novel results. From 2023, the journal now publishes Short Communications, Full Length Research papers and Reviews. Special content, such as thematic issues, are by invitation-only.

What type of paper should I choose on submissions?

If you have a novel result that needs to be published quickly and you can present it concisely (within the guidelines below), please submit as a short communication.

Short communications should be concise, no more than 4,600 words and up to four display items. They should offer novel insights and warrant a rapid peer review process. The 4,600 word count includes the title page, all sections of the manuscript (including the references), and the figure and table legends. Papers that exceed these limits will be reassigned within the submission system as a Full Length Research Paper.

Full Length Research papers should present a comprehensive account of original research. These papers are not restricted by length or number of figures.

Review Papers should be authoritative, state-of-the-art accounts of the selected research field, be of high interest, balanced and accurate. Beyond summaries of important scientific developments and ideas, authors are encouraged to identify and discuss how the field may be impacted or develop in the future, including insights that may be of significance to the scientific community. The number of co-authors of review articles is limited to five and each author is expected to make a substantial contribution to the writing of the manuscript.

There are no restrictions on length for review papers, and we welcome both comprehensive reviews and short reviews that offer an insight into more recent advances in a field.

Type of Peer Review

The practice of peer review is to ensure that good science is published. It is an objective process at the heart of good scholarly publishing and is carried out on all reputable scientific journals. Our

Editorial Board plays a vital role in maintaining the high standards of BBRC while ensuring that it retains the speed of publication necessary for a rapid communication journal.

Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups.

Type of Peer Review:

Short Communications - rapid review with decision in two weeks of submission:

Authors of manuscripts can expect an accept or reject decision normally within 2 weeks of receipt. Publication will then take place immediately unless the author has, upon submission, requested an embargo.

For short communication papers, the decision to publish a paper rests with the handling Editor. On submission, authors will choose the section most suitable for their work. The paper will be initially assessed by an in-house scientific editor to ensure the integrity of the science in the paper and that it falls within the scope of the journal. Suitable papers are then assigned to an Editor based on their expertise.

The Editor will then make a thorough assessment of the paper and may accept the paper as it is, send it to a colleague for review, or reject it. Requests for revisions are rare. Should the Editor request revisions, the paper will be treated as a new submission.

Full Length Research papers and Review Papers - painless and fast peer review

The journal operates a single anonymized review process for Full Length Research papers and Review Papers. On submission, authors will choose the section suitable for their work. The paper will be initially assessed by an in-house scientific editor to ensure the integrity of the science in the paper and that it falls within the scope of the journal. The scientific editor may then liaise with a suitable Editor to determine if the paper is suitable to be sent for review. For those papers deemed in scope and meeting the requirements for scientific integrity, two independent referees will be sought to review the paper. An Editor with suitable expertise will then make the final decision on the paper after review.

Timelines

We expect to provide a first decision on whether or not a paper is suitable for review within a week of submission, often sooner.

If a paper is sent to review, we aim to provide a decision of revise/reject/accept after review within 30 days of submission.

We endeavour to provide a painless peer review process, with only one round of revision for each paper (except in exceptional circumstances) and aim to render an editorial decision within a week of submission of the revised paper.

Contact details for submission

Papers should be submitted using the BBRC online submission system <https://www.editorialmanager.com/BBRC/default.aspx>. Authors who have questions regarding the electronic submission process could visit our [support center](#)

Before you begin

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Studies in humans and animals

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. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

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 Research Council's [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of competing interest

Corresponding authors, on behalf of all the authors of a submission, 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. All authors, including those *without* competing interests to declare, should provide the relevant information to the corresponding author (which, where relevant, may specify they have nothing to declare). Corresponding authors should then use [this tool](#) to create a shared statement and upload to the submission system at the Attach Files step. **Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.**

Declaration of generative AI in scientific writing

The below guidance only refers to the writing process, and not to the use of AI tools to analyse and draw insights from data as part of the research process.

Where authors use generative artificial intelligence (AI) and AI-assisted technologies in the writing process, authors should only use these technologies to improve readability and language. Applying the technology should be done with human oversight and control, and authors should carefully review and edit the result, as AI can generate authoritative-sounding output that can be incorrect, incomplete or biased. AI and AI-assisted technologies should not be listed as an author or co-author, or be cited as an author. Authorship implies responsibilities and tasks that can only be attributed to and performed by humans, as outlined in Elsevier's [AI policy for authors](#).

Authors should disclose in their manuscript the use of AI and AI-assisted technologies in the writing process by following the instructions below. A statement will appear in the published work. Please note that authors are ultimately responsible and accountable for the contents of the work.

Disclosure instructions

Authors must disclose the use of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process by adding a statement at the end of their manuscript in the core manuscript file, before the References list. The statement should be placed in a new section entitled 'Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process'.

Statement: During the preparation of this work the author(s) used [NAME TOOL / SERVICE] in order to [REASON]. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the publication.

This declaration does not apply to the use of basic tools for checking grammar, spelling, references etc. If there is nothing to disclose, there is no need to add a statement.

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, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), 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 in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify compliance, your article may be checked by [Crossref Similarity Check](#) and other originality or duplicate checking software.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Reporting sex- and gender-based analyses

Reporting guidance

For research involving or pertaining to humans, animals or eukaryotic cells, investigators should integrate sex and gender-based analyses (SGBA) into their research design according to funder/sponsor requirements and best practices within a field. Authors should address the sex and/or gender dimensions of their research in their article. In cases where they cannot, they should discuss this as a limitation to their research's generalizability. Importantly, authors should explicitly state what definitions of sex and/or gender they are applying to enhance the precision, rigor and reproducibility of their research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer (see Definitions section below). Authors can refer to the [Sex and Gender Equity in Research \(SAGER\) guidelines](#) and the [SAGER guidelines checklist](#). These offer systematic approaches to the use and editorial review of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation - however, please note there is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender.

Definitions

Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features (e.g., chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy). A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth"), most often based solely on the visible external anatomy of a newborn. Gender generally refers to socially constructed

roles, behaviors, and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society. Sex and gender are often incorrectly portrayed as binary (female/male or woman/man) and unchanging whereas these constructs actually exist along a spectrum and include additional sex categorizations and gender identities such as people who are intersex/have differences of sex development (DSD) or identify as non-binary. Moreover, the terms "sex" and "gender" can be ambiguous—thus it is important for authors to define the manner in which they are used. In addition to this definition guidance and the SAGER guidelines, the [resources on this page](#) offer further insight around sex and gender in research studies.

Author contributions

For transparency, we require corresponding authors to provide co-author contributions to the manuscript using the relevant CRediT roles. The [CRediT taxonomy](#) includes 14 different roles describing each contributor's specific contribution to the scholarly output. The roles are: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; and Writing - review & editing. Note that not all roles may apply to every manuscript, and authors may have contributed through multiple roles. [More details and an example](#).

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 in 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. The Editor will not consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. If you wish to make changes after the manuscript has been submitted (but before it's been accepted), publication of the manuscript will be suspended while the Editor considers the request.

Article transfer service

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated [Scientific Managing Editor](#), a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed 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 gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold 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, it is recommended to state this.

Elsevier journals comply with current NIH public access policy.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information about open access publishing in this journal.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

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 [Language Editing service](#) available from Elsevier's Language Services.

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.

Preparation

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

Use of word processing software

Please submit your paper in Word Document format. Include a cover letter with your submission to appear before the manuscript. It should be in letter format and address the submission to BBRC, including a brief outline of the manuscript and why you think it is important to the readers of BBRC. The text of the manuscript should be in single-column format and include page numbers. Keep the layout of the text as simple as possible. Please do not include any line numbers or running headers or footers such as the manuscript title or corresponding author name. Please remove any "hidden edits" from your paper prior to submission by using track changes then accept changes. 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. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the word processor's facility. 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: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

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

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described. Any Methods exclusively used for supplemental figures may be described in the supplemental material, however Methods pertaining to figures in the main text should be presented in the main text.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

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. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. 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. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **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.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, 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.

Western blots images

Papers that include Western Blot images in their figures will often be asked to provide the whole uncropped images of the original western blots in triplicate that contributed to the quantitative analysis, from which the figures have been derived.

In order to ensure the rapid assessment of your paper, please provide this data when submitting your paper.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

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, it is recommended to include the following sentence:

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

Standards for Reporting Enzymology Data (STRENDa)

This journal follows the recommendations of the STRENDa (Standards for Reporting Enzymology Data) Commission of the Beilstein-Institut for the reporting of kinetic and equilibrium binding data. Detailed guidelines can be found at (<http://www.strenda.org/documents.html>) or in this [pdf](#) file.

All reports of kinetic and binding data must include a description of the identity of the catalytic or binding entity (enzyme, protein, nucleic acid or other molecule). This information should include the origin or source of the molecule, its purity, composition, and other characteristics such as post-translational modifications, mutations, and any modifications made to facilitate expression or purification. The assay methods and exact experimental conditions of the assay must be fully described if it is a new assay or provided as a reference to previously published work, with or without modifications. The temperature, pH and pressure (if other than atmospheric) of the assay **must** always be included, even if previously published. In instances where catalytic activity or binding cannot be detected, an estimate of the limit of detection based on the sensitivity and error analysis of the assay should be provided. Ambiguous terms such as "not detectable" should be avoided. A description of the software used for data analysis should be included along with calculated errors for all parameters. First-order and second-order rate constants: see [pdf](#) for full instructions.

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

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

The journal has started a pilot to screen for any image irregularities, during which images may be sent to a third-party service. If there is a question about an image, the editor may ask for original data or images. Ultimately, if these are not satisfactory, we may decide not to accept the manuscript. As the final step before submission, we encourage you to check all images once more and connect all of the data in the figures to the original, unprocessed data. Advice on avoiding common mistakes is available [here](#).

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.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

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.

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.](#)

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.

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.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, J. Sci. Commun. 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. Heliyon. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015.
<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

[7] E. Coon, M. Berndt, A. Jan, D. Svyatsky, A. Atchley, E. Kikinzon, D. Harp, G. Manzini, E. Shelef, K. Lipnikov, R. Garimella, C. Xu, D. Moulton, S. Karra, S. Painter, E. Jafarov, S. Molins, Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88), Zenodo, March 25, 2020.
<https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

You must also list a minimum of 3 authors associated with a cited work before using "et al." in each of your references.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

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 file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. 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.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings, which may also include software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to

the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in a [Research Elements journal](#).

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a manuscript to one of the Research Elements journals.

More information can be found on the [Research Elements page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full institutional address

All necessary files have been uploaded

- Research Highlights

Keywords

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

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" 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 Web)

For any further information please visit our customer support site at <https://service.elsevier.com>.

After acceptance

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. 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. 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.

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.

ANEXO B - Normas de publicação do Periódico “Journal of Periodontal Research”)



Author Guidelines

Call for Associate Editors and Editorial Board members

The *Journal of Periodontal Research (JRE)* is welcoming applications from top-class researchers/clinicians interested in collaborating as **Associate Editors** with our new Editor-in-Chief, Mario Romandini. To read more about the Associate Editor vacancies, please [click here](#).

We are also welcoming expressions of interest from scholars interested in joining our expanding "**Editorial Board**" and our newly established "**Junior Editorial Board**", who are keen to support JRE through its next phase of growth. To read more about this opportunity, please [click here](#).

This is a great opportunity to become a part of the editorial team of one of the most historical and prestigious journals in periodontology and implant dentistry.

Journal of Periodontal Research now offers [Free Format submission](#) for a simplified and streamlined submission process. [More details here](#)

Content of Author Guidelines: [1. General](#), [2. Ethical Guidelines](#), [3. Manuscript Submission Procedure](#), [4. Manuscript Types Accepted](#), [5. Manuscript Format and Structure](#), [6. After Acceptance](#), [7. Data Protection](#), [8. Offprints](#)

Journal of Periodontal Research guarantees an effective review and publication process.
Rapid review processing: on average 32 days from submission to first decision
Rapid publication: on average 55 days from acceptance to online availability and Medline indexing

Important notice for authors considering submitting their work to *Journal of Periodontal Research*

We have been informed that some third-party websites are falsely claiming to act on behalf of *Journal of Periodontal Research* and its Editors.

Wiley wishes to confirm that it has no connection to any third-party submission site and that **submissions to our journal can only be made via the publisher's own website**

at <https://wiley.atyponrex.com/journal/JRE> and not through any third-party site. **Wiley does not charge for article submission.**

This is a practice known within the industry as “predatory publishing.” These predatory publishers are using the name of established journals to solicit content from authors. Publishers are working together to try to find a solution to this problem. However, in the meantime, anyone seeking to submit work to established journals should take great care. Some helpful advice on how to check this can be found at [Think Check Submit](#).

Useful Websites: [Submission Site](#), [Author Services](#), [Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

1. GENERAL

The *Journal of Periodontal Research* is an international research periodical the purpose of which is to publish original clinical and basic investigations and review articles concerned with every aspect of periodontology and related sciences. Reports of scientific meetings in periodontology and related fields are also published.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in the *Journal of Periodontal Research*. Authors are encouraged to visit Wiley's [Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

Free Format submission

The *Journal of Periodontal Research* now offers [Free Format submission](#) for a simplified and streamlined submission process.

Before you submit, you will need:

- Your manuscript: this should be an editable file including text, figures, and tables, or separate files—whichever you prefer. All required sections should be contained in your manuscript, including abstract, introduction, methods, results, and conclusions. Figures and tables should have legends. Figures should be uploaded in the highest resolution possible. If the figures are not of sufficiently high quality your manuscript may be delayed. References may be submitted in any style or format, as long as it is consistent throughout the manuscript. Supporting information should be submitted in separate files. If the manuscript, figures or tables are difficult for you to read, they will also be difficult for the editors and reviewers, and the editorial office will send it back to you for

revision. Your manuscript may also be sent back to you for revision if the quality of English language is poor.

- An ORCID ID, freely available at <https://orcid.org>. *(Why is this important? Your article, if accepted and published, will be attached to your ORCID profile. Institutions and funders are increasingly requiring authors to have ORCID IDs.)*
- The title page of the manuscript, including:
 - Your co-author details, including affiliation and email address. *(Why is this important? We need to keep all co-authors informed of the outcome of the peer review process.)*
 - Statements relating to our ethics and integrity policies, which may include any of the following *(Why are these important? We need to uphold rigorous ethical standards for the research we consider for publication):*
 - data availability statement
 - funding statement
 - conflict of interest disclosure
 - ethics approval statement
 - patient consent statement
 - permission to reproduce material from other sources
 - clinical trial registration

Data Sharing and Data Accessibility

Journal of Periodontal Research expects that data supporting the results in the paper will be archived in an appropriate public repository. Authors are required to provide a data availability statement to describe the availability or the absence of shared data. When data have been shared, authors are required to include in their data availability statement a link to the repository they have used, and to cite the data they have shared. Whenever possible the scripts and other artefacts used to generate the analyses presented in the paper should also be publicly archived. If sharing data compromises ethical standards or legal requirements then authors are not expected to share it.

See the [Standard Templates for Author Use](#) to select an appropriate data availability statement for your dataset.

2. ETHICAL GUIDELINES

The *Journal of Periodontal Research* adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

The *Journal of Periodontal Research* adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

2.2. Ethical Approvals

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

2.3 Photographs of People

The *Journal of Periodontal Research* follows current HIPAA guidelines for the protection of patients/subject privacy. Patient anonymity should be preserved. Photographs need to be cropped sufficiently to prevent human subjects being recognized (or an eye bar should be used). Images and information from individual participants will only be published where the authors have obtained the individual's free prior informed consent. Authors do not need to provide a copy of the consent form to the publisher; however, in signing the author license to publish, authors are required to confirm that consent has been obtained. Wiley has a [standard patient consent form available](#) for use.

2.4 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material.

The *Journal of Periodontal Research* encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.5 Conflict of Interest and Source of Funding

Please disclose information concerning sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest under Acknowledgements

2.6 Appeal of Decision

The decision on a paper is final and cannot be appealed.

2.7. Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.8. Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login to Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS), they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the Open Access option is not selected, the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing Open Access

If the Open Access option is selected, the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Agreements (OAA):

Creative Commons License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial - NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements, please visit the Copyright FAQ hosted on Wiley Author Services <http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-301.html> and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the Open Access option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF)], you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy, please visit <http://www.wiley.com/go/funderstatement>

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

New submissions should be made via the Research Exchange submission portal <https://wiley.atyponrex.com/journal/JRE>. Should your manuscript proceed to the revision

stage, you will be directed to make your revisions via the same submission portal. You may check the status of your submission at anytime by logging on to submission.wiley.com and clicking the "My Submissions" button. For technical help with the submission system, please review our FAQs or contact submissionhelp@wiley.com.

Journal of Periodontol Research now offers [Free Format submission](#) for a simplified and streamlined submission process.

Manuscripts can be uploaded either as a single document (containing the main text, tables and figures), or with figures and tables provided as separate files. Should your manuscript reach revision stage, figures and tables must be provided as separate files. The main manuscript file can be submitted in Microsoft Word (.doc or .docx) format.

Before you submit, you will need:

Your main document file should include:

- A short informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations
- The full names of the authors with institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;
- Acknowledgments;
- Abstract structured (intro/methods/results/conclusion) or unstructured
- Up to seven keywords;
- Practitioner Points (optional) Authors will need to provide no more than 3 'key points', written with the practitioner in mind, that summarize the key messages of their paper to be published with their article.
- Main body: formatted as introduction, materials & methods, results, discussion, conclusion
- References;
- Tables (each table complete with title and footnotes);
- Figures: Figure legends must be added beneath each individual image during upload AND as a complete list in the text.

Blinded Review

All manuscripts submitted to the Journal of Periodontal Research will be reviewed by two experts in the field. The Journal of Periodontal Research uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

Suggest a Reviewer

The Journal of Periodontal Research attempts to keep the review process as short as possible to

enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of 2 potential international reviewers whom you consider capable of reviewing your manuscript.

Article Preparation Support

[Wiley Editing Services](#) offers expert help with English Language Editing, as well as translation, manuscript formatting, figure illustration, figure formatting, and graphical abstract design – so you can submit your manuscript with confidence.

Also, check out our resources for [Preparing Your Article](#) for general guidance about writing and preparing your manuscript.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Articles: must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles must conform to the highest international standards in the field.

Review Articles: are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged.

Mini Reviews are covering a smaller area and may be written in a more free format.

Short Communications: Short communications, limited to 1-3 pages, including illustrations and references, will be considered for rapid publication. Such papers must be based on work that is of special importance or having the potential for great impact, or a body of work that is complete but of insufficient scope to warrant a full-length paper. Short communications need not follow the usual divisions.

Meeting Reports: Reports of scientific meetings in periodontology and related fields are also published.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 7 published pages (including figures and tables) are subject to a charge of GBP70.00 per additional page. For guidance purposes, one published page amounts approximately to 5,500 characters; text should be reduced if figures/tables are included within the 7 pages. If authors are unable to pay additional page fees they will need to reduce the length of their articles.

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and

arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

Abbreviations and symbols: Abbreviations should be in accordance with Guidelines laid down by the American Society of Microbiology. Unless they are in common usage (e.g. DNA), all terms must be displayed in full in the key words, and the first time that they appear in the abstract, the main text, tables and figures, followed by the abbreviation in parentheses. If an abbreviation is used in the body of figure or table only it must be defined in the figure legend or table footnotes. The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro* and *in vivo* are to be italicized. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of *Webster's Third New International Dictionary* will be adhered to.

Scientific Names: Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined in the typescript. The full proper name (e. g. *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e. g. *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e. g. streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalized and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e. g. *Ps.* for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names.

It is strongly recommended that all abbreviations be introduced in the first paragraph in Materials and Methods. Alternatively, define each abbreviation and introduce it in parentheses the first time it is used; e.g., "Cultures were grown in Eagle minimal essential medium (MEM)." Generally, eliminate abbreviations that are not used at least three times in the text (including tables and figure legends).

5.3. Structure

All manuscripts submitted to the Journal of Periodontal Research should include: Title page, abstract, main text, references and tables, figures and figure legends were appropriate.

Title Page: should contain the title of the article, name(s) of the author(s), initials, and institutional affiliation(s), and the name and complete mailing address, including email address, of the author responsible for correspondence. We accept only one corresponding author per manuscript and in case of co-correspondence a foot note will be added indicating 'Both the authors have contributed equally to the work'. The author must list 4 keywords for indexing purposes.

Abstract: The abstract should consist of 1) the objective 2) the background data discussing the present status of the field 3) methods 4) results 5) conclusion.

Main Text of Original Research Articles

Introduction: Summarize the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively.

Material and methods: Materials and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made.

Results: Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all of the data in the tables and illustrations. Important observations should be emphasized.

Discussion: Summarize the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

Main Text of Reviews, Short Communications and Meeting Reports

These need not follow the usual divisions.

Acknowledgements: Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support must be acknowledged.

5.4. References

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text, and should be kept to a pertinent minimum. References should include the beginning and ending page numbers. Identify references in the text, tables, and figure legends by arabic numerals in superscript format. References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first notation of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which is based on *Index Medicus*. Manuscripts accepted but not published may be cited in the reference list by placing "in press" after the abbreviated title of the journal. Abstracts and manuscripts not yet accepted may be cited in full in the text but not in the reference list. References must be verified by the author(s) against the original documents.

We recommend the use of a tool such as [Reference Manager](http://refman.com/downloads/styles) for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://refman.com/downloads/styles>

Examples:

(1) *Standard journal article*

(List all authors up to 6; for 7 or more list the first 3 and add "et al.") Dockrell H, Greenspan JS. Histochemical identification of T- cells in oral lichen planus. *Oral Surg* 1979; 48: 42-49. Thomas Y, Sosman J, Yrigoyen O, et al. Functional analysis of human T- cell subsets defined by monoclonal antibodies. I. Collaborative T-T interactions in the immunoregulation of B-cell differentiation. *J Immunol* 1980; 125: 2402-2405.

(2) *Corporate author*

The Royal Marsden Hospital Bone- Marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone-marrow graft without preconditioning in post- hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977; 2: 628-630.

(3) *No author given*

Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas [Editorial]. *Br Med J* 1981; 283: 628-635.

(4) *Journal supplement*

Mastri AR. Neuropathology of diabetic neurogenic bladder. *Ann Intern Med* 1980; 92 (2 pt 2): 316-324.

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979; 54 (suppl 1): 26- 28.

(5) *Journal paginated by issue*

Seaman WB. The case of the pancreatic pseudocyst. *Hosp Pract* 1981; 16 (Sep): 24-29.

(6) *Personal author(s)*

Eisen HN. *Immunology: an introduction to molecular and cellular principles of the immune response* , 5th edn. New York: Harper Row, 1984:406-420.

(7) *Editor, compiler, chairman as author*

Dausset J, Colombani J, eds. *Histocompatibility testing* 1972. Copenhagen: Munksgaard, 1973: 12-18.

(8) *Chapter in a book*

Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. *Pathologic physiology: mechanisms of disease* . Philadelphia: WB Saunders, 1974: 457-480.

(9) *Published proceedings paper*

DePont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. *Proceedings of 3rd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology*. Houston: International Society for Experimental Hematology, 1974: 44-50.

(10) *Agency publication*

Ranofsky AL. Surgical operations in short-stay hospitals: United States - 1975. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics, 1978; DHEW publication no. (PHS) 78-1785. (Vital and health statistics; series 13; no. 34.)

(11) *Dissertation or thesis*

Cairns RB. Infrared spectroscopic studies of solid oxygen. Berkeley, CA: University of California, 1965. 156pp. Dissertation.

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be numbered consecutively with arabic numerals. Use titles which are self explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Figures: All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single column width (54 mm) after reduction, although in some cases 113 mm (double column) and 171 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be

reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed.

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible).

For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>.

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

5.6. Supporting Material

Supporting Material, such as data sets or additional figures or tables, that will not be published in the print edition of the journal, but which will be viewable via the online edition, can be submitted.

It should be clearly stated at the time of submission that the Supporting Material is intended to be made available through the online edition. If the size or format of the Supporting Material is such that it cannot be accommodated on the journal's Web site, the author agrees to make the Supporting Material available free of charge on a permanent Web site, to which links will be set up from the journal's website. The author must advise Wiley Blackwell if the URL of the website where the Supporting Material is located changes. The content of the Supporting Material must not be altered after the paper has been accepted for publication.

The availability of Supporting Material should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supporting Material' and providing titles of figures, tables, etc. In order to protect reviewer anonymity, material posted on the authors Web site cannot be reviewed. The Supporting Material is an integral part of the article and will be reviewed accordingly.

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1 Proof Corrections

Authors will receive an e-mail notification with a link and instructions for accessing HTML page proofs online. Page proofs should be carefully proofread for any copyediting or typesetting errors. Online guidelines are provided within the system. No special software is required, most common browsers are supported. Authors should also make sure that any renumbered tables, figures, or references match text citations and that figure legends correspond with text citations and actual figures. Proofs must be returned within 48 hours of receipt of the email. Return of proofs via e-mail is possible in the event that the online system cannot be used or accessed.

6.2. Early Online Publication Prior to Print

The Journal of Periodontal Research is covered by Wiley Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3. Production Tracking

Online production tracking is available for your article through Wiley's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production.

6.4. Wiley's Author Name Change Policy

In cases where authors wish to change their name following publication, Wiley will update and republish the paper and redeliver the updated metadata to indexing services. Our editorial and production teams will use discretion in recognizing that name changes may be of a sensitive and private nature for various reasons including (but not limited to) alignment with gender identity, or as a result of marriage, divorce, or religious conversion. Accordingly, to protect the author's privacy, we will not publish a correction notice to the paper, and we will not notify co-authors of the change. Authors should contact the journal's Editorial Office with their name change request.

6.5. Cover Image Submissions

This journal accepts artwork submissions for Cover Images. This is an optional service you can use to help increase article exposure and showcase your research. For more information, including artwork guidelines, pricing, and submission details, please visit the [Journal Cover Image](#) page.

6.6. Article Promotion Support

[Wiley Editing Services](#) offers professional video, design, and writing services to create shareable video abstracts, infographics, conference posters, lay summaries, and research news stories for your research – so you can help your research get the attention it deserves.

6.7. Offprints

If you wish to purchase additional printed copies of your article, please click on the link and follow the instructions provided: www.sheridan.com/wiley/eoc

7. DATA PROTECTION

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

ANEXO C – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CCEA)



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 do Tamoxifeno associado a quimioterápicos nos tecidos periimplantares**", Processo FOA nº 00196-2020, sob responsabilidade de Juliano Milanezi de Almeida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 02 de Outubro de 2020.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 03 de Agosto de 2025.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 03 de Setembro de 2025.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Influence of Tamoxifen associated with Chemotherapy on periimplant tissue**", Protocol FOA nº 00196-2020, under the supervision of Juliano Milanezi de Almeida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 02, 2020.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 03, 2020,

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 03, 2025.

Prof, Associado Guilherme de Paula Nogueira
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