



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE
ARAÇATUBA



HENRIQUE RINALDI MATHEUS

***Avaliação da influência da quimioterapia
com Cisplatina ou 5-fluorouracil sobre o
processo de reparo ósseo em implantes
osseointegrados instalados em tíbias de ratos
expostos ou não à nicotina***

ARAÇATUBA – SP
2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE
ARAÇATUBA



HENRIQUE RINALDI MATHEUS

***Avaliação da influência da quimioterapia
com Cisplatina ou 5-fluorouracil sobre o
processo de reparo ósseo em implantes
osseointegrados instalados em tíbias de ratos
expostos ou não à nicotina***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, do Campus de Araçatuba, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia – Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

ARAÇATUBA – SP
2019

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M427a Matheus, Henrique Rinaldi.
Avaliação da influência da quimioterapia com Cisplatina ou 5-fluorouracil sobre o processo de reparo ósseo em implantes osseointegrados instalados em tíbias de ratos expostos ou não à nicotina. – Araçatuba, 2019
109 f. : il.; tab.

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

1. Nicotina 2. Antineoplásicos 3. Implantes dentários
4. Osseointegração I.T.

Black D6
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Henrique Rinaldi Matheus

NASCIMENTO: 27 de fevereiro de 1994 – Auriflama – SP.

FILIAÇÃO: Marcelo Prado Matheus
Rosângela Aparecida Canova Rinaldi

2011/2016: Curso de Graduação em Odontologia na Universidade Estadual Paulista
Júlio de Mesquita Filho – UNESP – Araçatuba.

2017/2019: Curso de Pós-Graduação em Implantodontia, nível de Especialização, no
Instituto Opem – SOBREAS – Unidade Bauru.

2017/2019 Curso de Pós-Graduação em Odontologia - Área de Periodontia, nível de
Mestrado Acadêmico, na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Filho – UNESP – Araçatuba.

Dedicatória



*“A gratidão é uma forma singular de reconhecimento,
e o reconhecimento é uma forma sincera de gratidão”*

Alan Vaszatte

A Deus

Por estar sempre presente em minha vida,
guiar-me e colocar pessoas maravilhosas em meu caminho.
Obrigado por me conceder discernimento para aproveitar os bons momentos,
assim como força para atravessar os momentos difíceis.

“Deus é o nosso refúgio e a nossa fortaleza, auxílio sempre presente na adversidade”
Salmo 46:1

À minha Família

Aos meus pais, Marcelo e Rosângela,

Agradeço por todo suporte, carinho e dedicação com minha educação e formação como ser humano e profissional. O amor e incentivo de vocês são grandes forças que me mantêm em minha caminhada em busca dos meus sonhos. Obrigado por serem os maiores exemplos para mim.

Nada mais justo que dedicar essa conquista a vocês, afinal muitas vezes abriram mão das suas vontades para que as minhas fossem satisfeitas. Amo vocês.

Ao meu irmão Raul

Obrigado por todo carinho que tem comigo, e me perdoe por às vezes não poder estar presente da forma que você merece. Parabéns pela criança que está se tornando um grande homem. Não tenho dúvida que seu futuro será brilhante, assim como você é. O irmão te ama.

À minha Família

Aos meus avós, maternos e paternos,

Obrigado por todo carinho e excesso de cuidado que tem comigo. Vocês construíram verdadeiros lares para alicerçar meu futuro. Todo amor de vocês está comigo em cada momento da minha vida.

À minhas tias Elisângela e Luciana,

Obrigado por sempre estarem em minha vida. Por terem cuidado de mim e corrigido em cada momento que foi necessário. Obrigado por toda preocupação que tem comigo.

À minha Família

À tia Eliane e ao tio Homero,

Apesar de não compartilhar vínculo sanguíneo com os dois, não poderiam estar em outro lugar, senão “família”. O amor e o cuidado de vocês estiveram comigo durante minha formação como indivíduo e profissional, assim como estarão em todas as etapas que virão. Seus exemplos me guiam diariamente. A confiança que depositam em mim me move. Sou muito grato a vocês, por me aconselharem, ampararem ou simplesmente me ouvirem. Obrigado pela oportunidade de ter vocês comigo. Espero algum dia ser capaz de dispensar amor ao próximo como a senhora e me tornar parte do homem que o senhor é.

Amo vocês.

“Aprendi que de nada serve ser luz se não iluminar o caminho dos demais”
Walter Elías Disney

Agradecimentos Especiais



*A gratidão é um fruto de grande cultura;
não se encontra entre gente vulgar.*

Samuel Johnson

Ao Professor Dr. Juliano Milanezi de Almeida,

Meu querido orientador, quem acabou acumulando funções em relação a mim: de educador, cuidador, conselheiro, ouvinte, e, acima de tudo, um grande e verdadeiro amigo. Para mim é o maior orgulho ser orientado pelo senhor. Obrigado pela oportunidade e engajamento para eu encontrar meu caminho. Repito que sem a confiança e a crença que o senhor deposita em mim eu não chegaria a lugar algum. Nesses anos de convívio tive a certeza que suas qualidades como professor, pesquisador e clínico, são de extremo valor, guias de conduta para quem almeja seguir a carreira acadêmica. Mas em hipótese nenhuma ultrapassam seus valores e qualidades de ser humano. O cuidado, a paciência e a empatia do senhor pelo seu próximo são admiráveis. Há algum tempo o senhor é tão importante para minha formação profissional quanto para meu crescimento como ser humano.

O seu “ser professor” ultrapassa os limites da universidade. Obrigado por mais do que dar exemplos, o senhor ser exemplo. Espero algum dia me tornar parte do homem que o senhor é.

*“O professor medíocre conta. O bom professor explica.
O professor superior demonstra. O grande professor inspira.”
William Arthur Ward*

Ao Professor Dr. Edilson Ervolino

Um professor exemplar, um ótimo pesquisador, mas mais do que isso, um grande amigo. Além da gratidão pelo empenho, dedicação e cuidado com os trabalhos que o senhor auxilia na minha orientação, preciso expressar minha gratidão por todo aprendizado que ultrapassa a academia. Seu bom humor, humanidade e empatia fazem com que todos que estão ao seu redor o admirem muito e tenham um excelente exemplo a ser seguido. Comigo não é diferente. Espero que durante minha caminhada no mundo das pesquisas eu seja capaz de satisfazer as expectativas de tantas pessoas quanto o senhor consegue auxiliar. Sou extremamente grato pela oportunidade de trabalhar com o senhor e tê-lo como um grande amigo. Muito obrigado por tudo!

Ao Professor Dr. Álvaro Francisco Bosco

Um exemplo de professor, pesquisador, clínico e ser humano. É incrível a capacidade que o senhor possui em cativar os que estão ao seu redor. Tive a oportunidade de ver o senhor em aula uma única vez, no terceiro ano, a qual foi muito marcante para mim e contribuiu muito para que eu começasse a me espelhar em alguém. Depois de ingressar na periodontia, tive o prazer de aproximar-me do senhor, e, sem dúvida, posso afirmar que em cada conversa em todos esses anos eu tive algum ensinamento para extrair, nem sempre restrito à periodontia. Obrigado por fazer parte da minha formação.

À Professora Dr^a. Maria José Hitomi Nagata

Agradeço pela oportunidade de convívio com alguém tão competente e dedicada ao ensino e à pesquisa. As conversas com a senhora são sempre muito produtivas em todos os aspectos. Ter exemplos como a senhora são de extrema relevância para nosso caminho na pós-graduação e perspectivas de futuro. Obrigado por cada conversa, cada ensinamento, conselho ou exemplo que tenho o prazer da senhora compartilhar comigo.

À Professora Dr^a. Letícia Helena Theodoro

Obrigado por ter feito parte da minha formação tanto na graduação como no mestrado. Sempre muito atenciosa, educada e acessível, transmitindo todo o conhecimento que possui para nós, alunos.

Ao Professor Dr. Valdir Gouveia Garcia

Mesmo não tendo ingressado na graduação a tempo de participar das suas aulas, a pós-graduação me concedeu a oportunidade de conviver com o senhor. Obrigado por cada conversa, por mais breve que possa ter sido, e cada ensinamento que o senhor me passou durante esse período.

“Um professor só se torna de fato mestre quando ensina seu aluno a pensar”

Agnes Quintanilha

Ao meu amigo David Jonathan Rodrigues Gusman

Obrigado por cada momento que passamos juntos durante esses anos. Me sinto privilegiado em poder te chamar de irmão. Afinal, esses anos de parceria só me fizeram admirar você cada dia mais, seja como profissional ou pessoa incrível que é. Dividimos muitos momentos durante esse período, você sempre me amparou quando eu mais necessitava, bem como teve discernimento para vibrarmos em cada momento de alegria. Além disso, muito obrigado especificamente sobre este trabalho, sem você eu não teria conseguido executá-lo. Tenha certeza que minha vida já foi marcada por você, e que essas recordações seguirão comigo muito além do dia que nossos caminhos possam se distanciar. Obrigado por sempre estar comigo!

Ao meu amigo Breno Edson Sendão Alves

Um grande amigo que a pós-graduação me proporcionou. Suas características fazem com que a admiração por você seja inevitável. Tive o privilégio de cursarmos especialização juntos, e mais do que isso, de sermos dupla. As viagens para Bauru só evidenciaram sua inteligência, dedicação e seus valores. Dividimos momentos de adversidades, mas sem dúvida os de alegria e risadas somam números expressivamente maiores. Obrigado por ser outro irmão que a vida me apresentou.

À minha amiga Nathália Januario de Araujo

Uma pessoa excelente, que transborda cuidado e carinho pelos demais das formas mais expressivas possíveis. Obrigado por cada momento que estive comigo durante esse período,

dividindo problemas e somando experiências. Sua trajetória, assim como você, é admirável. Mesmo nos dias mais difíceis você foi capaz de arrancar boas risadas de mim, e sou muito grato por isso. Também, muito obrigado durante a execução deste trabalho, você foi uma das pessoas responsáveis por eu estar conseguindo apresentá-lo nessa forma.

À minha amiga Vivian Cristina Noronha Novaes

Uma pessoa incrível e ótima professora. Obrigado por fazer parte da minha trajetória desde o primeiro dia que frequentei o departamento. Desde então estive diretamente ligada com meu amadurecimento intelectual e pessoal. As preocupações e dedicação que tem comigo ultrapassam nossa convivência profissional, em outras palavras, sou grato por me tratar como um membro da sua família.

À minha amiga Paula Lazilha Faleiros

A inesquecível Paulinha! Desde a iniciação científica tenho o privilégio de denominar você como amiga, pela qual tenho muita admiração e apreço. Tive a oportunidade de ver você se tornar uma grande e querida professora. Mesmo às distâncias, suas manias e seus costumes estão marcados no meu trabalho e em mim. Sei que temos que seguir, mas tenho memórias muito boas e fortes da época que você me ajudava diretamente na execução do experimento. Obrigado por sempre contribuir comigo, seja profissionalmente ou simplesmente como amiga.

Ao meu amigo Luiz Guilherme Fiorin

Um colega de pós-graduação muito correto, inteligente, dedicado e bem-humorado, que se tornou um verdadeiro amigo durante essa fase. Ingressamos juntos no mestrado e compartilhamos muitas experiências, enfim, caminhamos juntos. Ver você trilhando um caminho brilhante me deixa muito feliz. Obrigado por, além de estar ativamente presente sempre que precisei de ajuda, trazer muita alegria para o dia-a-dia na periodontia. Espero que tenhamos muito a conviver nos anos que nos aguardam.

Ao meu amigo Luan Felipe Toro

Obrigado por estar comigo desde o primeiro ano da graduação. Ingressamos juntos, e a convivência diária só fez com que nossos laços de fortalecessem. Você é um ser humano incrível, um aluno brilhante, e um amigo/irmão mais surpreendente ainda. Tenho que agradecer diariamente por termos construído uma relação tão saudável e agregadora.

À Bianca, à Clara e ao Giovani

Meus queridos amigos e alunos exemplares de Iniciação Científica. Muito obrigado por terem contribuído significativamente para a execução desse trabalho, e por toda ajuda que me forneceram durante todo meu caminho na periodontia. Com vocês, Clara e Giovani, tive a felicidade de me tornar um grande amigo e poder apreciar a amizade de duas pessoas tão boas, dedicadas e bem-humoradas. Fico feliz que estejam seguindo seus caminhos, espero que sejam de muitas alegrias, mas os experimentos no departamento já não são mais os mesmos. Muito obrigado.

Ao João, à Marina, à Marta, à Natália, à Daniela, à Camila e à Ana

Meus queridos amigos da pós-graduação, obrigado pelo carinho e convívio agradável e de bastante aprendizado durante esses anos.

Ao Alex, Argilio, Bruno, Ivan, Guilherme, Rafael Castro, Rafael Jorge e Rafael Manzoli

Queridos irmãos que estão comigo há muito tempo, me incentivando, apoiando e me animando em todos os momentos. Mesmo hoje sendo difícil de nos reunirmos como antes, os laços construídos vão perdurar para sempre. Obrigado por serem uma verdadeira família para mim.

“Não há solidão mais triste do que a do homem sem amizades. A falta de amigos faz com que o mundo pareça um deserto”

Francis Bacon

Agradecimentos



O agradecimento é a memória do coração

Lao Tse

*À Direção da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP. Em nome do Diretor, Prof. Titular **Wilson Roberto Poi** e Vice-Diretor, Prof. Titular **João Eduardo Gomes Filho**.*

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de MESTRADO (CAPES-DS; 01/03/2017 – 31/09/2017), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), também pela concessão de bolsa de mestrado (processo 2017/11805-0; 01/10.2017 – 28/02/2018).

À empresa DSP Biomedical pelo fornecimento dos implantes de titânio que foram utilizados nessa pesquisa.

*À coordenação do curso de Pós-Graduação em Odontologia na pessoa do Professor Dr. **André Luiz Fraga Briso**, pela ajuda dada ao desenvolvimento do curso de Pós-graduação e lutar para termos o melhor curso de Pós-Graduação.*

Aos colegas do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nas Áreas de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Integrada, Estomatologia, Dentística e Prótese Dental.

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

*Aos Professores da disciplina de Periodontia, **Prof. Juliano**, **Profª Maria José**, e **Profª Letícia**, por transmitirem seus tão valiosos conhecimentos.*

*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.*

*Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz-USP, pela disponibilidade de uso do aparelho de microscopia eletrônica de varredura, e ao técnico **Renato** por toda ajuda no processamento das amostras.*

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, **Arnaldo, Camilo e João**.*

Aos funcionários da Seção de Recursos Humanos.

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 à disposição nos atendendo prontamente.

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.

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.

Epígrafe



O que a gente não pode mesmo, nunca, de jeito nenhum...

É amar mais ou menos, sonhar mais ou menos,

ser amigo mais ou menos, namorar mais ou menos,

ter fé mais ou menos, e acreditar mais ou menos.

Senão a gente corre o risco de se tornar uma pessoa mais ou menos.

Francisco Cândido Xavier

Resumo



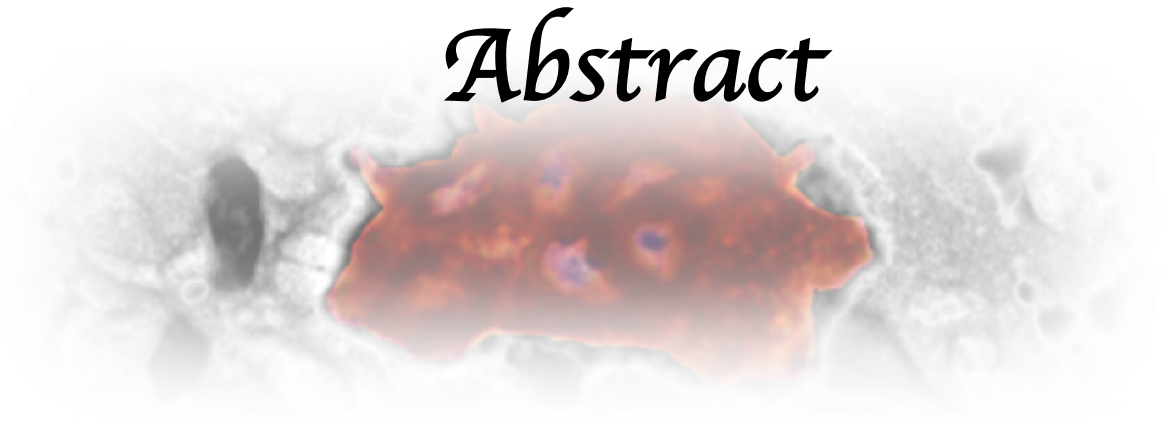
Matheus, HR. **Avaliação da influência da quimioterapia com Cisplatina ou 5-fluorouracil sobre o processo de reparo ósseo em implantes osseointegrados instalados em tíbias de ratos expostos ou não à nicotina.** 2019. 109 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

Objetivo: avaliar a influência da nicotina e dos agentes antineoplásicos Cisplatina (CIS) e 5-fluorouracil (5-FU) sobre os tecidos peri-implantares, bem como os efeitos desses agentes antineoplásicos sobre os tecidos peri-implantares em animais previamente expostos à nicotina. **Material e métodos:** 180 ratos machos (*Wistar*) foram randomizados para dois grandes grupos (n=90), NIC e SS, em seguida, para três subgrupos (n=30) de acordo com os agentes antineoplásicos. Receberam 0,5ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (SS) ou 3 mg/kg de hemissulfato de nicotina (NIC), de acordo com cada grupo, 30 dias antes e 30 dias após a cirurgia. No dia 0, todos os animais receberam os implantes de titânio (DSP Biomedical®, 4 mm x 2,2 mm) nas tíbias direita e esquerda. Aos 30 dias após a cirurgia, as aplicações de SS e NIC foram interrompidas por 5 dias e, aos 35 e 37 dias, 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. **SS-SS:** receberam SS via subcutânea e intraperitoneal. **SS-CIS:** receberam SS via subcutânea e CIS via intraperitoneal. **SS-5FU:** receberam SS via subcutânea e 5-FU via intraperitoneal. **NIC-SS:** receberam NIC via subcutânea e SS via intraperitoneal. **NIC-CIS:** receberam NIC via subcutânea e CIS via intraperitoneal. **NIC-5FU:** receberam NIC via subcutânea e 5-FU via intraperitoneal. Dez animais por grupo/período foram eutanasiados aos 50, 65 e 95 dias após instalação dos implantes de titânio. Os espécimes coletados foram fixados em formaldeído tamponado 4% por 48h e destinados para processamento sem desmineralização 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 detecção de BMP2/4, RUNX2, OCN e TRAP. Outros espécimes foram fixados em glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato 0,1M para análise ultraestrutural sob microscopia eletrônica de varredura (MEV). **Resultados:** SS-SS apresentou maior COI quando comparado aos demais grupos. SS-CIS e SS-5FU apresentaram maior COI quando comparados com NIC-CIS e NIC-5FU, respectivamente. NIC-SS apresentou maior COI quando comparado com NIC-CIS e NIC-5FU, sendo que NIC-5FU apresentou os piores resultados. SS-SS apresentou maior PTON quando comparado aos demais grupos. SS-CIS e SS-5FU apresentaram menor PTON aos 50 dias, e em todos os períodos, quando comparados com NIC-CIS e NIC-5FU, respectivamente. NIC-CIS apresentou maior PTON aos 65 dias quando comparado com NIC-5FU. A análise histológica dos tecidos peri-implantares mostrou que CIS e 5-FU comprometem sua estrutura geral. O tratamento com nicotina também compromete o padrão de celularidade e estruturação da matriz extracelular dos tecidos peri-implantares, o que é severamente agravado quando da associação com agentes antineoplásicos. SS-SS apresentou maior número de células BMP2/4, RUNX2 e OCN-positivas/mm² quando comparado aos demais grupos. SS-SS apresentou menor número de células TRAP-positivas/mm quando comparado com os demais grupos. A avaliação imunoistoquímica para cada biomarcador indicou que os piores resultados foram observados nos grupos NIC-CIS e NIC-5FU quando comparados com os demais grupos. A análise ultraestrutural da interface osso/implante mostrou estruturação tecidual e organização celular em SS-SS. *Gap* e desestruturação tecidual foram observados no demais grupos, sendo que os piores resultados foram observados nos grupos com nicotina. **Conclusão:** tanto nicotina quanto agentes antineoplásicos, isoladamente, são capazes de afetar negativamente os tecidos peri-implantares, sendo que a animais expostos a ambas substâncias apresentam comprometimento mais severo desses tecidos.

Palavras-chave: nicotina, antineoplásicos, implantes dentários, osseointegração.

Abstract



Matheus, HR. **Evaluation of the influence of Cisplatin or 5-fluorouracil over the bone repair process around osseointegrated implants installed in tibiae of rats exposed or not to nicotine.** 2019. 109 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

Objective: to evaluate the influence of nicotine and the antineoplastic agents Cisplatin (CIS) and 5-fluorouracil (5-FU) over the peri-implant tissues, as well as the effects of these agents over peri-implant tissues in animals previously exposed to nicotine. **Material and Methods:** 180 male rats (*Wistar*) were initially randomized to two groups (n=90), NIC and SS. Then, to three subgroups (n=30) according to the protocol of antineoplastic agents. Received 0.5 ml of sodium chloride 0.9% (SS) or 3 mg/kg of nicotine hemissulfate (NIC) according to each group, subcutaneously, 30 days before and after surgical procedure for implants placement. At day 0, all animals received the titanium implants (DSP Biomedical®, 4 mm x 2.2 mm) in both right and left tibiae. At 30 days after surgery SS and NIC was interrupted, and at 35 and 37 days were intraperitoneally administered the antineoplastic agents CIS, 5FU or 0.5 ml SS, with 48 h interval between applications. For CIS, 5 mg/kg and 2,5 mg/kg, and 5-FU, 60 mg/kg and 40 mg/kg, respectively. **SS-SS:** received SS subcutaneously and intraperitoneally. **SS-CIS:** received SS subcutaneously and CIS intraperitoneally. **SS-5FU:** received SS subcutaneously and 5-FU intraperitoneally. **NIC-SS:** received NIC subcutaneously and SS intraperitoneally. **NIC-CIS:** received NIC subcutaneously and CIS intraperitoneally. **NIC-5FU:** received NIC subcutaneously and 5-FU intraperitoneally. Ten animals per group and period were euthanized at 50, 65 and 95 days after implants placement. The collected specimens were fixed in buffered formaldehyde solution 4% for 48h and assigned to ground section processing for analysis of bone/implant contact (BIC), or conventional histologic processing with demineralization and paraffin embedding for histometric analysis of percentage of newly-formed bone (PNFB), histologic and

immunohistochemistry for detection of BMP2/4, RUNX2, OCN and TRAP. Other specimens were fixed in 2.5% glutaraldehyde and cacodilate buffer 0.1M for ultrastructural analysis under scanning electron microscopy (MEV). **Results:** SS-SS showed higher BIC when compared with the other groups. SS-CIS and SS-5FU showed higher BIC when compared with NIC-CIS and NIC-5FU respectively. NIC-SS showed higher BIC when compared with NIC-CIS and NIC-5FU, and NIC-5FU showed the worst results. SS-SS showed higher PNFB when compared with the other groups. SS-CIS and SS-5FU showed higher PNFB at 50 days and in all periods when compared with NIC-CIS and NIC-5FU respectively. NIC-CIS showed higher PNFB at 65 days when compared with NIC-5FU. The histologic analysis of the peri-implant tissues showed that CIS and 5-FU jeopardize its general structure. The treatment with nicotine also compromises the cellularity and structural patterns of the extracellular matrix of peri-implants tissues, and the association of both agents exacerbates tissues' disruption. SS-SS showed higher number of BMP2/4, RUNX2 and OCN-positive cells/mm² when compared with the other groups. SS-SS showed lower number of TRAP-positive cells/mm when compared with the other groups. The immunohistochemical analysis for each biomarker indicated that the worst results were observed in groups NIC-CIS and NIC-5FU when compared with the other groups. The ultrastructural analysis of the interface between bone/implant showed great tissue structuring and cell arrangement in SS-SS. *Gap* and tissues' disruption were observed in the other groups, with the worst results for the ones receiving nicotine. **Conclusion:** both nicotine and antineoplastic agents, even when isolated, are capable to negatively affect the peri-implant tissues, and animals exposed to both substances show the most compromising effects over these tissues.

Key words: nicotine, antineoplastics, dental implants, osseointegration.

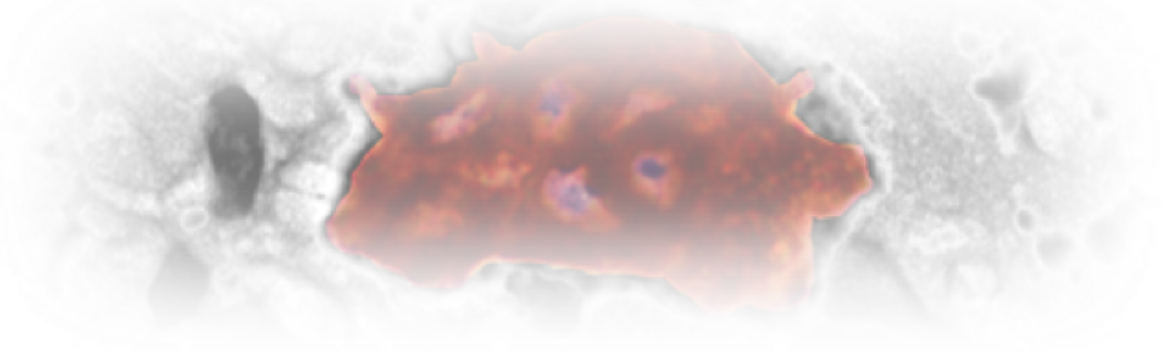
Lísta de Figuras



Lista de Figuras

Figura 1	Delineamento experimental e metodologia de instalação dos implantes de titânio em cada tíbia.	89
Figura 2	Contato osso/implante para cada grupo experimental.	90
Figura 3	Porcentagem de tecido ósseo neoformado e características histológicas dos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental.	91
Figura 4	Padrão de imunomarcção de BMP2/4 nos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental.	92
Figura 5	Padrão de imunomarcção de RUNX2 nos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental.	93
Figura 6	Padrão de imunomarcção de OCN nos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental.	94
Figura 7	Padrão de imunomarcção de TRAP nos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental.	95
Figura 8	Aspectos ultraestruturais da interface osso/implante para cada grupo experimental.	96

Lísta de Abreviaturas e Símbolos



Lista de Abreviaturas e Símbolos

%.....	Porcentagem
°C.....	Grau Celsius
®	Marca registrada
±	Mais ou menos
≤.....	Menor ou igual
5-FU.....	5-fluorouracil
AM.....	Amazonas, Brasil
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
AT.....	Área total
BIC.....	<i>Bone/implant contact</i>
BMP.....	Proteína morfogenética óssea
BMP2/4.....	Proteína morfogenética óssea 2/4, <i>bone morphogenetic protein 2/4</i>
CFO	Conselho Federal de Odontologia
CIS.....	Cisplatina
COBEA.....	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COI	Contato osso/implante
DAB.....	3,3' tetrahidrocloreto de diaminobenzidina
DNA.....	ácido desoxirribonucleico
EDTA.....	ácido etilenodiamino tetra-acético
ET	Extensão total
EUA	Estados Unidos da América
FdUMP	Monofosfato de fluorodesoxiuridina

FL.....	Flórida, Estados Unidos da América
FOA-UNESP	Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
e.g.	Por exemplo
g	Grama
GO	Goiás, Brasil
h	Hora
HE.....	Hematoxilina-eosina
i.e.	Em outras palavras
kg	Quilograma
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
mg/kg	Miligrama/kilograma
ml.....	Mililitro
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
MO.....	Missouri
NIC	Hemissulfato de nicotina
NJ.....	Nova Jersey
OCN.....	Osteocalcina, <i>osteocalcin</i>
PA	Pensilvânia
PNFB	<i>percentage of newly-formed bone</i>
PR	Paraná, Brasil
PTON.....	Porcentagem de tecido ósseo neoformado
RNA.....	Ácido ribonucleico
ROI	Região de interesse, <i>region of interest</i>

RUNX2..... Fator de transcrição relacionado à runt 2, *runt-related transcription factor*

2

SLA..... *Sandsblast and acid etching*

SS..... Cloreto de sódio 0,9%

TRAP..... Fosfatase ácida resistente ao tartarato, *tartrate-resistant acid phosphatase*

VEGF..... Fator de crescimento endotelial vascular

μm..... Micrômetro

Lísta de Anexos



Lista de Anexos

Anexo A	Normas para publicação no Periódico “ <i>Clinical Oral Implants Research</i> ”	98
Anexo B	Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal	109

Sumário



Sumário

Manuscrito para publicação	39
Página de título	40
Resumo	41
Abstract	43
Introdução	45
Materiais e Métodos	50
Resultados	64
Discussão	71
Conclusão	76
Referências Bibliográficas	78
Figuras	88
Anexos	97

Manuscrito
*para Publicação **

** Artigo elaborado Segundo a Normatização da Revista Clinical Oral Implants Research
(Anexo A)*

Título: Avaliação da influência da quimioterapia com Cisplatina ou 5-fluorouracil sobre o processo de reparo ósseo em implantes osseointegrados instalados em tíbias de ratos expostos ou não à nicotina.

Autores:

Henrique Rinaldi Matheus¹; Juliano Milanezi de Almeida^{1,*}

¹Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada – Disciplina de Periodontia, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, Brasil.

***Autor correspondente:** Juliano Milanezi de Almeida

Endereço: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

Rua José Bonifácio 1193, Vila Mendonça

CEP: 16050-050 Araçatuba, SP, Brasil

e-mail: jumilanezi@hotmail.com (autorizado para publicação)

Telefone: (005518) 36362860 (autorizado para publicação)

Conflito de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Short Running Title: Nicotina e quimioterapia prejudicam os tecidos peri-implantares.

Palavras-chaves: nicotina, antineoplásicos, implantes dentários, osseointegração.

Resumo

Objetivo: avaliar a influência da nicotina e dos agentes antineoplásicos Cisplatina (CIS) e 5-fluorouracil (5-FU) sobre os tecidos peri-implantares, bem como os efeitos desses agentes antineoplásicos sobre os tecidos peri-implantares em animais previamente expostos à nicotina. **Material e métodos:** 180 ratos machos (*Wistar*) foram randomizados para dois grandes grupos (n=90), NIC e SS, em seguida, para três subgrupos (n=30) de acordo com os agentes antineoplásicos. Receberam 0,5ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (SS) ou 3 mg/kg de hemissulfato de nicotina (NIC), de acordo com cada grupo, 30 dias antes e 30 dias após a cirurgia. No dia 0, todos os animais receberam os implantes de titânio (DSP Biomedical®, 4 mm x 2,2 mm) nas tíbias direita e esquerda. Aos 30 dias após a cirurgia, as aplicações de SS e NIC foram interrompidas por 5 dias e, aos 35 e 37 dias, 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. **SS-SS:** receberam SS via subcutânea e intraperitoneal. **SS-CIS:** receberam SS via subcutânea e CIS via intraperitoneal. **SS-5FU:** receberam SS via subcutânea e 5-FU via intraperitoneal. **NIC-SS:** receberam NIC via subcutânea e SS via intraperitoneal. **NIC-CIS:** receberam NIC via subcutânea e CIS via intraperitoneal. **NIC-5FU:** receberam NIC via subcutânea e 5-FU via intraperitoneal. Dez animais por grupo/período foram eutanasiados aos 50, 65 e 95 dias após instalação dos implantes de titânio. Os espécimes coletados foram fixados em formaldeído tamponado 4% por 48h e destinados para processamento sem desmineralização 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 detecção de BMP2/4, RUNX2, OCN e TRAP. Outros espécimes foram fixados em glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato 0,1M para análise ultraestrutural

sob microscopia eletrônica de varredura (MEV). **Resultados:** SS-SS apresentou maior COI quando comparado aos demais grupos. SS-CIS e SS-5FU apresentaram maior COI quando comparados com NIC-CIS e NIC-5FU, respectivamente. NIC-SS apresentou maior COI quando comparado com NIC-CIS e NIC-5FU, sendo que NIC-5FU apresentou os piores resultados. SS-SS apresentou maior PTON quando comparado aos demais grupos. SS-CIS e SS-5FU apresentaram menor PTON aos 50 dias, e em todos os períodos, quando comparados com NIC-CIS e NIC-5FU, respectivamente. NIC-CIS apresentou maior PTON aos 65 dias quando comparado com NIC-5FU. A análise histológica dos tecidos peri-implantares mostrou que CIS e 5-FU comprometem sua estrutura geral. O tratamento com nicotina também compromete o padrão de celularidade e estruturação da matriz extracelular dos tecidos peri-implantares, o que é severamente agravado quando da associação com agentes antineoplásicos. SS-SS apresentou maior número de células BMP2/4, RUNX2 e OCN-positivas/mm² quando comparado aos demais grupos. SS-SS apresentou menor número de células TRAP-positivas/mm quando comparado com os demais grupos. A avaliação imunoistoquímica para cada biomarcador indicou que os piores resultados foram observados nos grupos NIC-CIS e NIC-5FU quando comparados com os demais grupos. A análise ultraestrutural da interface osso/implante mostrou estruturação tecidual e organização celular em SS-SS. *Gap* e desestruturação tecidual foram observados no demais grupos, sendo que os piores resultados foram observados nos grupos com nicotina. **Conclusão:** tanto nicotina quanto agentes antineoplásicos, isoladamente, são capazes de afetar negativamente os tecidos peri-implantares, sendo que a animais expostos a ambas substâncias apresentam comprometimento mais severo desses tecidos.

Palavras-chave: nicotina, antineoplásicos, implantes dentários, osseointegração.

Abstract

Objective: to evaluate the influence of nicotine and the antineoplastic agents Cisplatin (CIS) and 5-fluorouracil (5-FU) over the peri-implant tissues, as well as the effects of these agents over peri-implant tissues in animals previously exposed to nicotine. **Material and Methods:** 180 male rats (*Wistar*) were initially randomized to two groups (n=90), NIC and SS. Then, randomly assigned to three subgroups (n=30) according to the protocol of administration of antineoplastic agents. Animals received 0.5 ml of sodium chloride 0.9% (SS) or 3 mg/kg of nicotine hemissulfate (NIC) according to each group, subcutaneously, 30 days before and after surgical procedure for implants placement. At day 0, all animals received the titanium implants (DSP Biomedical®, 4 mm x 2.2 mm) in both right and left tibiae. At 30 days after surgery SS and NIC was interrupted, and at 35 and 37 days were intraperitoneally administered the antineoplastic agents CIS, 5FU or 0.5 ml SS, with 48 h interval between applications. For CIS, 5 mg/kg and 2,5 mg/kg, and 5-FU, 60 mg/kg and 40 mg/kg, respectively. **SS-SS:** received SS subcutaneously and intraperitoneally. **SS-CIS:** received SS subcutaneously and CIS intraperitoneally. **SS-5FU:** received SS subcutaneously and 5-FU intraperitoneally. **NIC-SS:** received NIC subcutaneously and SS intraperitoneally. **NIC-CIS:** received NIC subcutaneously and CIS intraperitoneally. **NIC-5FU:** received NIC subcutaneously and 5-FU intraperitoneally. Ten animals per group and period were euthanized at 50, 65 and 95 days after implants placement. The collected specimens were fixed in buffered formaldehyde solution 4% for 48h and assigned to ground section processing for analysis of bone/implant contact (BIC), or conventional histologic processing with demineralization and paraffin embedding for histometric analysis of percentage of newly-formed bone (PNFB), histologic and immunohistochemistry for detection of BMP2/4, RUNX2, OCN and TRAP. Other specimens were fixed in 2.5% glutaraldehyde and cacodilate buffer 0.1M for ultrastructural analysis under scanning electron microscopy

(MEV). **Results:** SS-SS showed higher BIC when compared with the other groups. SS-CIS and SS-5FU showed higher BIC when compared with NIC-CIS and NIC-5FU respectively. NIC-SS showed higher BIC when compared with NIC-CIS and NIC-5FU, and NIC-5FU showed the worst results. SS-SS showed higher PNFB when compared with the other groups. SS-CIS and SS-5FU showed higher PNFB at 50 days and in all periods when compared with NIC-CIS and NIC-5FU respectively. NIC-CIS showed higher PNFB at 65 days when compared with NIC-5FU. The histologic analysis of the peri-implant tissues showed that CIS and 5-FU jeopardize its general structure. The treatment with nicotine also compromises the cellularity and structural patterns of the extracellular matrix of peri-implants tissues, and the association of both agents exacerbates tissues' disruption. SS-SS showed higher number of BMP2/4, RUNX2 and OCN-positive cells/mm² when compared with the other groups. SS-SS showed lower number of TRAP-positive cells/mm when compared with the other groups. The immunohistochemical analysis for each biomarker indicated that the worst results were observed in groups NIC-CIS and NIC-5FU when compared with the other groups. The ultrastructural analysis of the interface between bone/implant showed great tissue structuring and cell arrangement in SS-SS. *Gap* and tissues' disruption were observed in the other groups, with the worst results for the ones receiving nicotine. **Conclusion:** both nicotine and antineoplastic agents, even when isolated, are capable to negatively affect the peri-implant tissues, and animals exposed to both substances show the most compromising effects over these tissues.

Key words: nicotine, antineoplastics, dental implants, osseointegration.

Introdução



Introdução

No âmbito da reabilitação, muitas vezes o sucesso na recuperação estética e funcional não pode ser dissociado do planejamento envolvendo implantes de titânio, e, por isso, esses dispositivos se difundem em uma escala consideravelmente alta dentro na odontologia. Ao passo que, no último levantamento realizado pelo Conselho Federal de Odontologia, no ano de 2014, estimou-se que aproximadamente 800 mil implantes de titânio são instalados no Brasil por ano (*CFO 2014*) e, no entanto, hoje estes números podem ser expressivamente maiores. Mundialmente, esses dispositivos representam 20% de todas as reabilitações protéticas (Global Industry Analysts, 2012), com uma taxa de sucesso significativamente alta (Simonis, Dufour & Tenenbaum 2010).

Essa taxa de sucesso é determinada diretamente por osseointegração e longevidade, que podem ser prejudicadas por diversas condições sistêmicas, tais como o diabetes (Siqueira et al. 2003), osteoporose (Keller & Steiger 2004), imunossupressão com ciclosporina (Duarte et al. 2001; Sakakura et al. 2007), cigarro (Ma et al. 2011), e como reportado atualmente pela literatura, tratamento quimioterápico de lesões cancerígenas (Al-Mahalawy et al. 2016; Matheus et al. 2018).

O tabagismo prejudica diretamente o processo de reparo de qualquer tecido de origem conjuntiva, por comprometer a proliferação, migração e quimiotaxia de fibroblastos, e redução na produção de colágeno tipo I e III (Yin, Morita & Tsuji 2000; Wong & Martins-Green 2004), o que, conseqüentemente, traz prejuízos para a capacidade de reparo ósseo (César-Neto et al. 2003). Especificamente sobre esse tecido duro, é responsável por comprometer os principais processos que garantem sua homeostase: reabsorção e neoformação (Fang & Hall 1997, Ma et al. 2010; Ma et al. 2011). Ao reduzir a taxa de proliferação e maturação de osteoblastos (Suda et al. 1999; Walker et al. 2001), a nicotina

pode trazer um desequilíbrio para o sistema RANK/RANKL/OPG, uma das vias de ativação da reabsorção óssea. Diretamente sobre a neoformação, como um reflexo da redução de perfusão sanguínea (Ma et al. 2011), a nicotina diminui a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um potente mediador angiogênico que induz a proliferação e migração das células endoteliais (Ma et al. 2011), além de quimiotaxia (Mayr-Wohlfart et al. 2002) e diferenciação de osteoblastos (Gerber et al. 1999). Adicionalmente, o VEGF interage diretamente com proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), atuando sinergicamente sobre o desenvolvimento esquelético e reparo ósseo (Patel et al. 2008).

Além do prejuízo sobre esses processos, o tabagismo está vinculado a uma grande capacidade carcinogênica (Hecht 2003). Muitos questionamentos e dúvidas sobre os mecanismos pelos quais esse hábito aumentaria a chance de desenvolvimento da doença foram sanados por Alexandrov et al. (2016). Ao analisarem alterações somáticas e metilações de DNA em 5243 sequências genômicas de diferentes tipos de cânceres associados ao tabagismo, confirmaram maior número dessas mutações nos tecidos acometidos pela doença. Além do mais, o mesmo estudo (Alexandrov et al. 2016) observou que fumar está relacionado ao aumento na incidência de substituições, inserções/deleções e repetições de pares de bases em assinaturas mutacionais, e que a maneira que esses processos operam diferem entre si de acordo com o tipo de tecido acometido, o que pode consistir em um forte indício que o hábito de fumar pode ser um dos principais fatores de risco para o aparecimento do câncer.

A incidência dessa doença tende a dobrar nas próximas duas décadas (OMS 2014), e seu tratamento permanece baseado na tríade: quimioterapia e/ou radioterapia associadas ou não com procedimentos cirúrgicos (Shurin & Shurin 2009). A terapia com agentes antineoplásicos é baseada no princípio da dose máxima tolerável visando erradicação das células tumorais. No entanto, por agirem sobre moléculas comuns a todas as células do

organismo (i.e. DNA e RNA), são relacionados com toxicidade aguda sobre tecidos saudáveis (Guggenheimer et al. 1977; McGuire 2002).

A partir do diagnóstico da lesão, pacientes tabagistas são alertados a respeito da importância da cessação do hábito de fumar, uma vez que a nicotina (Shen et al. 2010; Dinicola et al. 2013; Banerjee, Al-Wadei & Schuller 2013), mesmo em baixas concentrações, diminui a atividade antiproliferativa e pró-apoptótica de diferentes quimioterápicos em várias linhagens de células malignas. Além disso, Warren et al. (2012) observaram que a nicotina produz recrescimento do tumor, sugerindo que exposição à nicotina especificamente durante o tratamento é determinante crítica do resultado terapêutico.

A Cisplatina (CIS) e o 5-Fluorouracil (5-FU) são drogas amplamente utilizadas no tratamento quimioterápico (Lorch et al. 2011; Vermorken et al. 2014). A CIS tem sua atividade antitumoral como resultado de interação de seu átomo central de platina com bases nitrogenadas (Rabik & Dolan 2007; Wozniak, Czechowska & Blasiak 2004; Wang & Lippard et al. 2005; Cho et al. 2008), o que inibe replicação, transcrição, tradução e reparo do DNA (Wang & Lippard et al. 2005; Cho et al. 2008). 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 (Noordhuis et al, 2004; Arias 2008).

Os danos da CIS sobre o processo de reparo ósseo (Stine et al. 2014; Stine et al, 2016), bem como especificamente sobre a osseointegração (Al-Mahalawy et al. 2016, Matheus et al. 2018), tem sido bem descritos na literatura. Por outro lado, apesar de haver informações disponíveis a respeito de efeitos prejudiciais do 5-FU sobre o tecido ósseo

durante a progressão doença periodontal (Garcia et al. 2015), sua capacidade de alteração do reparo em regiões peri-implantares permanece sem resposta na literatura.

Frente a essas informações, pode-se presumir que um número preocupantemente grande de indivíduos que receberam reabilitações implantossuportadas previamente ao diagnóstico do câncer está passível de se encontrar sob o efeito tanto da nicotina quanto de agentes antineoplásicos. Sendo assim, o propósito do presente estudo foi avaliar, através de análises histométrica, histológica, imunoistoquímica e ultraestrutural, a influência da nicotina e dos agentes antineoplásicos CIS e 5-FU sobre os tecidos peri-implantares, bem como os efeitos desses agentes antineoplásicos sobre os tecidos peri-implantares em animais previamente expostos à nicotina.

Material e Métodos



Material e Métodos

Animais

Cento e oitenta ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus*, Wistar) com três meses de idade, pesando entre 250-300 g, foram mantidos sob ciclos de claro/escuro de 12hr/12hr, temperatura ambiente de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 20 mudanças de ar por hora e umidade de $55 \pm 5\%$, alojados em gaiolas plásticas em grupos de 4 e monitorados diariamente, recebendo ração e água *ad libitum*. As gaiolas eram higienizadas duas vezes por semana. O experimento foi realizado no período que compreende outubro de 2017 e fevereiro de 2018. O protocolo experimental foi aprovado (#595-2017) (Anexo B) pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – Campus de Araçatuba, dentro das normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), bem como foi realizado em concordância com as *ARRIVE guidelines* (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) (Kilkenny et al. 2010).

Cálculo amostral e randomização

O tamanho da amostra foi estimado de acordo com literatura prévia, experiência e execução de um estudo piloto. Foi adotado o protocolo estabelecido por Matheus et al. (2018), o qual mostrou que 4 amostras são suficientes para assegurar significância estatística na análise de contato osso/implante (COI). Baseado nisso e para compensar possíveis perdas, o tamanho amostral para este parâmetro foi estimado em $n=5$. Experiência prévia do nosso grupo de pesquisas utilizando o mesmo modelo animal determinou $n=10$ suficiente para rejeitar a hipótese nula para as análises histológica, histométrica e imunoistoquímica (Matheus et al. 2018). O estudo piloto estipulou que $n=5$ é suficiente para que a análise descritiva da relação

entre os osteócitos e seus prolongamentos com a superfície do titânio fosse realizada com precisão. A estimativa de cada medida de resultado foi realizada para alcançar poder de 0,8 e erro alpha de 0,05.

Este estudo seguiu um *design* controlado, randomizado e cego. Números de 1 a 180 foram marcados na região superior da cauda dos animais utilizando uma caneta tipo nankin. Essa sequência numérica foi inserida no software Minitab® 17 (Minitab Inc., State College, PA, EUA). Randomização simples dos animais para cada grupo e período, obedecendo taxa de alocação 1:1, foi realizada por meio de uma tabela numérica randômica, gerada em computador por um membro externo e cego ao estudo.

Grupos experimentais

Os 180 animais foram inicialmente divididos em dois grandes grupos, compostos por animais que receberam nicotina (NIC, n=90) ou solução de cloreto de sódio 0,9% (Equiplex Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) (SS) (SS, n=90) durante o período de osseointegração. Em seguida, subsequentemente destinados a outros 3 subgrupos (SS, CIS ou 5FU, n=30) de acordo com o protocolo de aplicação dos agentes antineoplásicos.

Grupo SS-SS (n=30): Os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções subcutâneas diárias de 0,5 ml de SS por um período de 30 dias, em seguida tiveram os implantes instalados em ambas tíbias, e nos 30 dias subsequentes à cirurgia foi continuado o protocolo de aplicação de SS. Após 5 dias de interrupção, duas injeções intraperitoneais, com intervalo de 48 horas entre elas, de 0,5 ml de SS, foram administradas.

Grupo SS-CIS (n=30): Os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções subcutâneas diárias de 0,5 ml de SS por um período de 30 dias, em seguida tiveram os implantes instalados em ambas tíbias, e nos 30 dias subsequentes à cirurgia foi continuado o protocolo de aplicação de SS. Após 5 dias de interrupção, duas injeções intraperitoneais de CIS, com intervalo de 48 horas entre elas, foram administradas.

Grupo SS-5FU (n=30): Os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções subcutâneas diárias de 0,5 ml de SS por um período de 30 dias, em seguida tiveram os implantes instalados em ambas tíbias, e nos 30 dias subsequentes à cirurgia foi continuado o protocolo de aplicação de SS. Após 5 dias de interrupção, duas injeções intraperitoneais de 5-FU, com intervalo de 48 horas entre elas, foram administradas.

Grupo NIC-SS (n=30): Os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções subcutâneas diárias com 3 mg/kg de hemissulfato de nicotina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) (NIC) por um período de 30 dias, em seguida tiveram os implantes instalados em ambas tíbias, e nos 30 dias subsequentes à cirurgia foi continuado o protocolo de aplicação de NIC. Após 5 dias de interrupção, duas injeções intraperitoneais, com intervalo de 48 horas entre elas, de 0,5 ml de SS, foram administradas.

Grupo NIC-CIS (n=20): Os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções subcutâneas diárias com 3 mg/kg de hemissulfato de nicotina (NIC) por um período de 30 dias, em seguida tiveram os implantes instalados em ambas tíbias, e nos 30 dias subsequentes à cirurgia foi continuado o protocolo de aplicação de NIC. Após 5 dias de interrupção, duas injeções intraperitoneais de CIS, com intervalo de 48 horas entre elas, foram administradas.

Grupo NIC-5FU (n=20): Os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções subcutâneas diárias com 3 mg/kg de hemissulfato de nicotina (NIC) por um período de 30

dias, em seguida tiveram os implantes instalados em ambas tíbias, e nos 30 dias subsequentes à cirurgia foi continuado o protocolo de aplicação de NIC. Após 5 dias de interrupção, duas injeções intraperitoneais de 5-FU, com intervalo de 48 horas entre elas, foram administradas.

Períodos experimentais e coleta das amostras

As eutanásias foram realizadas por superdosagem anestésica, aos 50, 65 e 95 dias após a instalação dos implantes. Para isso, 4 mg/kg de lidocaína foram combinados a 150 mg/kg de tiopental sódico, aplicados via intraperitoneal. Cada eutanásia consistiu em 10 animais de cada grupo para cada período. O delineamento experimental está demonstrado na figura 1A. No momento da coleta, ambas amostras de cada animal foram randomicamente selecionadas para cada protocolo de processamento (não desmineralizado, por desmineralização ou para microscopia eletrônica).

Protocolos experimentais

Protocolo de aplicação da nicotina ou solução salina

As soluções de hemissulfato de nicotina ou SS foram aplicadas via subcutânea no dorso de cada animal de acordo com cada grupo. O hemissulfato de nicotina foi diluído em cloreto de sódio 0,9% para obtenção de solução na de concentração de 5mg/ml. Para cada animal, o volume de solução correspondente a uma dose de 3 mg/kg foi administrado seguindo o protocolo descrito por Okamoto et al. (1994). A administração de 0,5 ml de cloreto de sódio 0,9% nos animais pertencentes aos grupos SS foi realizada com o objetivo de simular as mesmas condições de estresse diário proveniente das injeções de NIC.

Sedação e anestesia

Para o procedimento cirúrgico de instalação dos implantes, os animais foram profundamente anestesiados pela associação de 70 mg/kg de cloridrato de quetamina (Vetaset – ZoetisFlorham Park, NJ – EUA) e 6mg/kg cloridrato de xilazina (Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil.), aplicados intramuscularmente no bíceps *femoris* da pata direita. Nos casos em que o efeito anestésico adequado não foi obtido, a anestesia foi suplementada por metade da dose inicial.

Protocolo cirúrgico de instalação dos implantes

Após anestesia geral, tricotomia e antissepsia com solução tópica de iodopovidona 10% foram realizadas na porção medial das patas direita e esquerda de cada animal. Os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada para permitir posicionamento adequado para acesso às tíbias. A seguir, uma incisão de aproximadamente 30 mm foi feita com lâmina de bisturi 15C pelo lado medial nas tíbias. Após afastamento dos tecidos moles com descolador de periósteo e exposição do tecido ósseo, um alvéolo bicortical foi preparado na metáfise proximal das tíbias, perpendicular ao seu longo eixo, utilizando uma fresa de 2,0 mm de diâmetro (DSP Biomedical®, Campo Largo, Parana, Brasil) montada em motor cirúrgico com 980 rpm (Kavo Konzept Surg, Filial Kavo São Paulo, São Paulo, Brasil), acompanhado por irrigação constante com SS e aspiração com sugador de alta potência. Em cada leito preparado, os implantes de dimensões de 4 mm de comprimento x 2,2 mm de diâmetro (DSP Biomedical®, Campo Largo, Parana, Brasil), todos com superfície *SLA* (jateamento e ataque ácido), foram instalados com chave digital até que atingissem o nível ósseo. A ferida foi suturada em planos, sendo que para 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), e externamente com fio de seda 4.0 (Ethicon - Johnson & Johnson do Brasil Ind. Com. Prod. para Saúde Ltda, São Bernardo do Campo, Brasil). (Figura 1B, C, D e E).

Protocolo de aplicação dos agentes antineoplásicos ou solução salina

Tanto o cloreto de sódio 0,9% (Equiplex 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 por via intraperitoneal em duas doses, obedecendo intervalo de 48 horas entre elas, aos 35 e 37 dias após a instalação dos implantes. 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 (Dubois & Dubois 1916; Nakasato et al. 2012). Para CIS, a primeira dose foi 5 mg/kg e a segunda 2,5 mg/kg (Havelka et al. 2007), enquanto 5-FU, 60 mg/kg e 40 mg/kg, respectivamente (Medeiros et al. 2011). A injeção intraperitoneal de SS foi administrada nos animais que não receberam os agentes antineoplásicos para simular o estresse a que estiveram expostos.

Processamentos laboratoriais

Processamento histológico sem desmineralização

Para a análise histométrica do contato osso/implante (COI), após fixação por 48 horas em solução de formaldeído tamponado 4%, as tíbias selecionadas foram lavadas em água corrente e submetidas a desidratação gradual em soluções de concentrações crescentes de etanol com adição de fucsina (5×10^{-3}), seguida trocas de acetona a cada 5 dias por um período de 30 dias. Após, submetidas a banhos de resina cristal de alta viscosidade (Arazyn 1.0#00, Redelease, São Paulo, São Paulo, Brasil) e incluídas a vácuo, utilizando-se a mesma resina com a adição do catalisador. Após a presa do material, foram recortados os excessos de resina e as peças lixadas com lixas metalográficas de granulações crescentes (#100 - #400 - #600 - #1200, CarbiMet 2, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) até que atingissem a espessura de 50 μm . Para isso, ao obter espessura aproximada de 1 mm, as peças foram coladas com adesivo à base de epóxi (Araldite Hobby, Brascola, Joinville, SC, Brasil) em placas de vidro identificadas para aumentar sua resistência e continuar a serem lixadas até que a espessura desejada fosse atingida.

Processamento histológico com desmineralização

Após fixação por 48 horas em solução de formaldeído tamponado 4%, as tíbias selecionadas foram lavadas em água corrente e desmineralizadas em trocas semanais de solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) tamponado 10% por 60 dias. Após desmineralização, o implante foi removido com o auxílio de uma chave digital (1,2 mm), e os espécimes foram, então, lavados em água corrente, desidratados, diafanizados, impregnados e incluídos em

parafina. A microtomia foi executada para obtenção de cortes histológicos de 4 µm de espessura, seguindo um plano de corte longitudinal em relação à loja do implante, e selecionados os que correspondiam à porção central da loja do implante. Seis secções equidistantes compreendendo a porção central de cada alvéolo do implante foram coradas com Hematoxilina & Eosina (HE) para análise histométrica de porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTON) e histológica. Três outras secções, também equidistantes e compreendendo a porção central do alvéolo, foram submetidas ao processamento imunoistoquímico para detecção de proteína morfogenética óssea 2/4 (BMP 2/4), fator de transcrição relacionado ao Runt – 2 (RUNX2), osteocalcina (OCN) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).

Processamento imunoistoquímico

Foi adotada a técnica da imunoperoxidase indireta para detecção dos antígenos propostos. As secções dos espécimes de cada grupo experimental foram divididas em quatro lotes, sendo que cada lote foi incubado em cada um dos seguintes anticorpos primários: anti-BMP 2/4 do rato produzido em coelho (1:100, SC-9003; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); anti-RUNX2 do rato produzido em coelho (1:100, SC-10758; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); anti-OCN do rato produzido em cabra (1:100, SC-18319; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA); anti-TRAP do rato produzido em cabra (1:100, SC-30833; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Em seguida, os lotes destinados a detecção de BMP 2/4 e RUNX2 foram inicialmente incubados por 90 minutos em solução contendo anticorpo secundário biotinilado de coelho produzido em cabra (1:200; K0675; *BiotInylated Link*, Dako North Americ Inc.), e em seguida tratados

pela estreptavidina conjugada à peroxidase (1:200; K0675; *Streptavidin – HRP*; North America Inc.), também por 90 minutos. Os lotes destinados para detecção de OCN e TRAP foram inicialmente incubados em solução contendo anticorpo secundário biotilado de cabra produzido em coelho (1:200; ZB0923; *Biotinylated anti-goat IgG [H+L]*, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA) e em seguida tratadas pela estreptavidina conjugada à peroxidase (1:200; ZC0422; *R.T.U Streptavidin/Peroxidase Complex*, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA), também por 90 minutos. A reação foi revelada através do cromógeno 3,3' tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (DAB) (DAB chromogen Kit®; Dako Laboratories). Ao término das revelações, os lotes de BMP2/4, OCN e TRAP foram contra corados por Hematoxilina de Harris, e RUNX2, por Fast Green. Como controle negativo, outras secções foram submetidas ao mesmo processamento, contudo, suprimindo-se a incubação nos respectivos anticorpos primários.

Processamento para análise sob microscopia eletrônica de varredura

Após coleta das amostras, os espécimes foram fixados em solução de formaldeído 2% e glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0.1M (pH 7,4). Em seguida, desidratados em soluções de concentração alcoólica crescentes e incluídas em resina de alta viscosidade (Arazyn 1.0#00, Redelease, São Paulo, São Paulo, Brasil). Os blocos de resina foram recortados e lixados em direção longitudinal ao implante até atingirem a espessura de 50µm, seguindo o protocolo descrito para o processamento sem desmineralização. Após polimento, as superfícies receberam ataque ácido com ácido fosfórico 37% por 1 minuto e foram lavadas em solução de hipoclorito de sódio 5% por 5 minutos. Após secagem, foram preparadas por

revestimento com ouro e paládio para análise em microscópio eletrônico de varredura (JSM-IT300LV, Jeol, Ltd., Tóquio, Japão) (Du et al. 2016).

Análise dos resultados

As análises histométricas de COI e PTON, bem como a análise imunoistoquímica para cada um dos biomarcadores, foram realizadas por um examinador (HRM) calibrado e cego aos grupos e períodos experimentais. Um histologista certificado (EE) foi responsável por validar as análises anteriores, bem como realizar a análise histológica. A análise ultraestrutural em microscopia eletrônica de varredura foi realizada por outro examinador, treinado, calibrado e cego aos grupos experimentais (JMA).

Regiões de interesse

A delimitação das regiões de interesse para cada análise foi estabelecida pelo histologista certificado (EE), baseando-se na disposição e relevância dos eventos biológicos ocorrendo nos tecidos que circundam o implante.

ROI 1: determinada como sendo a região que compreende toda a extensão dos tecidos que circundam os implantes. Selecionada como região de interesse para realização da análise histológica.

ROI 2: determinada como a região que compreende o tecido ao redor de duas roscas localizadas exclusivamente em tecido ósseo medular. Para seleção da ROI 2 de uma maneira padronizada, a partir do ápice do implante foram selecionadas a primeira e segunda roscas

localizadas em tecido ósseo medular, para realização das análises de COI, PTON, imunoistoquímica e ultraestrutural.

Análise histométrica do contato osso/implante (COI)

Foram capturadas, em ROI 2, imagens das lâminas obtidas pelo processamento sem desmineralização, por meio de câmera digital (AxioCam®; Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) acoplada a microscópio óptico (AxioLab®; Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha). Utilizando o software ImageJ, foram realizadas medidas lineares da extensão total (ET) da superfície do titânio. Em seguida, no perímetro que compreende ET, foram realizadas medidas lineares das regiões com contato entre o tecido ósseo e o titânio. ET foi mensurada em mm e considerada como 100% do contato. COI foi, também, mensurado em mm e expresso como uma porcentagem da ET.

Análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTON)

Assim como para COI, o mesmo padrão de captura de imagens foi utilizado, no entanto, para o cálculo de área, realizado nas lâminas coradas pela técnica de HE. O software ImageJ foi utilizado para realizar as medidas da área total (AT) que compreende ROI 2. Em seguida, no interior da AT, foi mensurada a área de tecido ósseo neoformado (ATON). AT foi mensurada em mm² e considerada como 100% da área. ATON foi também mensurada em mm² e expressa como uma porcentagem de AT.

Análise histológica dos tecidos peri-implantares

Foi realizada em ROI 1, nas secções coradas por HE, sob microscopia óptica (AxioLab®; Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha). Para isso, foram avaliados os seguintes parâmetros: 1) padrão de celularidade e estruturação do tecido ósseo peri-implantar (quando presente); 2) padrão de celularidade e estruturação do tecido conjuntivo peri-implantar (quando presente); 3) padrão inflamatório peri-implantar, ou seja, natureza e intensidade do processo inflamatório local (quando presente).

Análise imunoistoquímica

Foi realizada sob microscopia óptica (AxioLab®; Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) em um aumento original de 400x. Para BMP2/4, RUNX2 e OCN foi realizada contagem do número de células imunorreativas para cada um dos biomarcadores em ROI 2. Foram capturadas imagens de ROI 2 e mensurada a área total de cada secção para que os resultados fossem expressos em células/mm².

Para TRAP, sob microscopia óptica e aumento original de 400x, foi realizada a contagem de células TRAP-positivas que se encontravam em contato com o tecido ósseo. Foram capturadas imagens de ROI 2 e medido o perímetro do tecido ósseo de cada secção, no interior da AT, para que os resultados fossem expressos em número de células TRAP-positivas/mm.

Análise ultraestrutural

O foco para a análise ultraestrutural foi a interface entre osso/implante, na qual foi avaliada a estruturação do tecido ósseo, bem como a relação dos osteócitos e seus prolongamentos com a superfície do titânio.

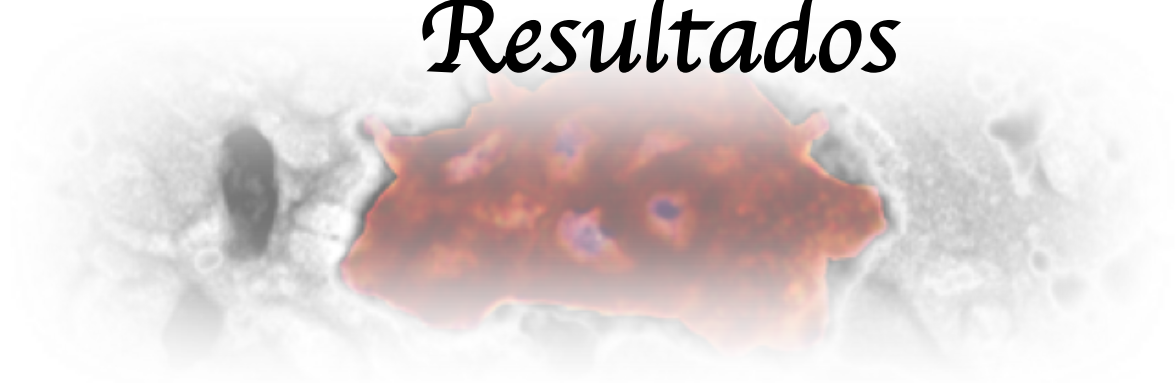
Desfechos primário e secundário

O desfecho primário foi definido como a formação óssea na região de interesse, sendo que COI e PTON foram determinadas como suas variáveis primárias. O desfecho secundário foi definido como os eventos celulares (análise histológica e imunoistoquímica) e a estruturação tecidual (análise ultraestrutural) relacionados com a remodelação óssea peri-implantar ao longo dos períodos.

Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados no software Bioestat 5.0 (Mamiruaá Institute, Manaus, AM, Brasil). A normalidade de distribuição dos dados foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk. As análises de COI, PTON, RUNX2, e TRAP, que apresentaram distribuição paramétrica dos dados, foram submetidas a análise de variância pelo teste ANOVA e pós teste de múltiplas comparações de Tukey ($p \leq 0,05$). As análises de BMP 2/4 e OCN, que apresentaram distribuição não paramétrica dos dados, foram submetidas a análise de variância pelo teste de Kruskal-Wallis e pós teste de múltiplas comparações de Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$).

Resultados



Resultados

Independentemente de grupo experimental, todos animais utilizados pela presente pesquisa se apresentaram saudáveis e não mostraram nenhuma complicação durante todo o período de execução do protocolo do experimento. Após coleta dos dados, o teste para verificação do poder do estudo indicou 94,56.

Análise histométrica do contato osso/implante (COI)

Os resultados da análise de contato osso/implante estão apresentados na Figura 2A. Os grupos SS-CIS, SS-5FU, NIC-SS, NIC-CIS e NIC-5FU apresentaram menor COI aos 50, 65 e 95 dias quando comparados com o grupo SS-SS ($100\% \pm 0$; $100\% \pm 0$; $100\% \pm 0$) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). Os grupos SS-5FU e NIC-CIS apresentaram menor COI aos 50, 65 e 95 dias quando comparados com o grupo SS-CIS ($86,40\% \pm 0,82$; $85,73\% \pm 0,54$; $86,33\% \pm 1,22$) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). O grupo NIC-5FU apresentou menor COI aos 50, 65 e 95 dias quando comparado com o grupo SS-5FU ($83,40\% \pm 1,05$; $84,09\% \pm 0,26$; $83,29\% \pm 1,57$) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). O grupo NIC-CIS aos 50 dias, e o grupo NIC-5FU aos 50, 65 e 95 dias, apresentaram menor COI quando comparados com o grupo NIC-SS ($70,58\% \pm 2,3$; $73,16\% \pm 2,7$; $72,23\% \pm 3,29$) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). O grupo NIC-5FU apresentou menor COI aos 50, 65 e 95 dias ($53,25\% \pm 4,39$; $56,78\% \pm 3,07$; $57,44\% \pm 1,84$) quando comparado com o grupo NIC-CIS ($66,39\% \pm 0,5$; $69,24\% \pm 2,7$; $66,19\% \pm 5,11$) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$).

Análise histométrica da porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTON)

Os resultados da análise de porcentagem de tecido ósseo neoformado estão apresentados na Figura 3A. Os grupos SS-CIS, SS-5FU, NIC-SS, NIC-CIS e NIC-5FU apresentaram menor PTON aos 50, 65 e 95 dias quando comparados com o grupo SS-SS ($33,88\% \pm 8,64$; $32,4\% \pm 7,13$; $35,05\% \pm 11,89$) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). O grupo NIC-CIS apresentou menor PTON aos 50 dias ($5,27\% \pm 1,13$) quando comparado com o grupo SS-CIS ($12,44\% \pm 5,95$) no mesmo período ($p \leq 0,05$). O grupo NIC-5FU apresentou menor PTON aos 50, 65 e 95 dias ($7,66\% \pm 3,1$; $6,95\% \pm 1,41$; $8,59\% \pm 4,56$) quando comparado com o grupo SS-5FU ($13,66\% \pm 3,22$; $10,37\% \pm 2,87$; $14,17\% \pm 1,43$) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). O grupo NIC-5FU apresentou menor PTON aos 65 dias ($6,95\% \pm 1,41$) quando comparado com o grupo NIC-CIS ($13,03\% \pm 3,79$) no mesmo período ($p \leq 0,05$).

Análise histológica dos tecidos peri-implantares

No grupo SS-SS, a totalidade dos espécimes apresentou trabéculas de tecido ósseo vital ao redor dos implantes, as quais se mostraram mais espessas ao longo dos períodos experimentais. Neste grupo não se observou presença de tecido conjuntivo interposto entre o tecido ósseo e os implantes. Em nenhum espécime deste grupo se constatou a presença de inflamação peri-implantar (Figura 3B, C).

Os grupos SS-CIS e SS-FU apresentaram características histológicas similares. Nestes grupos, em todos os períodos experimentais, na maior parte das espiras do implante se observou delgadas trabéculas de tecido ósseo sustentadas por um tecido conjuntivo com pequenos focos de inflamação. Em uma parcela considerável de espécimes destes grupos havia interposição de tecido conjuntivo na interface osso/implante (Figura 3D, E, F e G).

No grupo NIC-SS, os espécimes apresentavam finas trabéculas de tecido ósseo ao redor dos implantes, cuja quantidade e espessura pouco variou ao longo dos períodos experimentais. Em alguns destes espécimes havia interposição de tecido conjuntivo na interface osso/implante. Este tecido conjuntivo se apresentava com focos de infiltrado inflamatório na maioria dos espécimes, especialmente aos 50 e 65 dias. Alguns espécimes deste grupo apresentaram severa desestruturação tecidual peri-implantar (Figura 3H e I).

Nos grupos NIC-CIS e NIC-5FU, os arredores da maioria dos espécimes apresentou trabéculas extremamente delgadas de tecido ósseo entremeadas com um tecido conjuntivo com diferentes níveis de desestruturação. Esta desestruturação tecidual foi se agravando ao longo dos períodos experimentais em ambos os grupos. Algumas espiras do implante se mostravam ocupadas exclusivamente por tecido conjuntivo que em algumas regiões se mostrava severamente desestruturado e em outras regiões com intensa inflamação. O comprometimento tecidual foi nitidamente maior em NIC-5FU (Figura 3J, K, L e M).

Análise imunoistoquímica

A reação imunoistoquímica utilizada para detecção de BMP2/4, RUNX2, OCN e TRAP mostrou alta especificidade por esses biomarcadores, confirmada pela completa ausência de marcação no controle negativo. A imunomarcação apresentou coloração acastanhada, confinada ao núcleo para RUNX2, confinada ao citoplasma para TRAP e confinada ao citoplasma e fracamente à matriz extracelular para BMP2/4 e OCN.

BMP2/4

Os resultados da análise de contagem de células imunorreativas a BMP2/4 estão apresentados na Figura 4A. Os grupos SS-CIS, SS-5FU, NIC-SS, NIC-CIS e NIC-5FU apresentaram menor número de células BMP2/4-positivas/mm² aos 50, 65 e 95 dias quando comparados com o grupo SS-SS (45,33±2,98; 49,33±11,16; 51,11±6,89) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). O grupo NIC-5FU apresentou menor número de células BMP2/4-positivas/mm² aos 50, 65 e 95 dias (5,93±6,6; 7,78±6,55; 13,33±7,7) quando comparado com o grupo SS-5FU (29,17±11,23; 24,76±9,97; 33,33±10,08) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). O grupo NIC-5FU apresentou menor número de células BMP2/4-positivas/mm² aos 95 dias (13,33±7,7) quando comparado com o grupo NIC-SS (26,67±4,22) no mesmo período ($p \leq 0,05$).

RUNX2

Os resultados da análise de contagem de células imunorreativas a RUNX2 estão apresentados na Figura 5A. Os grupos SS-CIS, SS-5FU, NIC-SS, NIC-CIS e NIC-5FU apresentaram menor número de células RUNX2-positivas/mm² aos 50, 65 e 95 dias quando comparados com SS-SS (44±11,16; 94,67±31,76; 118,89±13,61) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). O grupo NIC-CIS apresentou menor número de células RUNX2-positivas/mm² aos 95 dias (25,33±5,58) quando comparado com o grupo SS-CIS (69,17±43,20) no mesmo período ($p \leq 0,05$). O grupo NIC-5FU apresentou menor número de células RUNX2-positivas/mm² aos 50, 65 e 95 dias (12,38±8,97; 22,22±12,4; 29,52±19,57) quando comparado com o grupo SS-5FU (28,33±9,92; 38,1±9,20; 65±29,55) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$).

OCN

Os resultados da análise de contagem de células imunorreativas a OCN estão apresentados na Figura 6A. Os grupos SS-CIS, SS-5FU, NIC-SS, NIC-CIS e NIC-5FU apresentaram menor número de células OCN-positivas/mm² aos 50, 65 e 95 dias quando comparados com SS-SS (64±17,38; 97,33±5,96; 83,33±32,04) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). O grupo NIC-CIS apresentou menor número de células OCN-positivas/mm² aos 65 e 95 dias (12±7,3; 2,33±6,99) quando comparados com o grupo SS-CIS (42,67±10,11; 57,5±6,11) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). O grupo NIC-5FU apresentou menor número de células OCN-positivas/mm² aos 50, 65 e 95 dias (11,67±7,77; 16,67±9,19; 23,81±7,56) quando comparado com o grupo SS-5FU (33,33±9,43; 40±18,46; 53,33±8,73) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). Os grupos NIC-CIS e NIC-5FU apresentaram menor número de células OCN-positivas/mm² aos 65 e 95 dias quando comparados com o grupo NIC-SS (35,56±12,41; 34,44±5,02) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$).

TRAP

Os resultados da análise de contagem de células imunorreativas a TRAP estão apresentados na Figura 7A. Os grupos SS-CIS, SS-5FU, NIC-SS, NIC-CIS e NIC-5FU apresentaram maior número de células TRAP-positivas/mm aos 50, 65 e 95 dias quando comparados com o grupo SS-SS (1,27±0,59; 2,41±0,81; 6,11±1,21) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). Os grupos SS-5FU e NIC-CIS apresentaram maior número de células TRAP-positivas/mm aos 50, 65 e 95 dias quando comparados com o grupo SS-CIS (5,4±2,1; 5,54±0,38; 7,45±0,8) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). O grupo NIC-5FU apresentou maior número de células TRAP-

positivas/mm aos 50, 65 e 95 dias quando comparado com o grupo SS-5FU ($10,39 \pm 1,18$; $9,48 \pm 3,22$; $8,44 \pm 0,8$) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). O grupo NIC-CIS aos 65 dias ($13,41 \pm 2,15$), e o grupo NIC-5FU aos 50, 65 e 95 ($13,34 \pm 2,07$; $13,04 \pm 1,67$; $13,15 \pm 1,56$) apresentaram maior número de células TRAP-positivas/mm quando comparados com o grupo NIC-SS ($9,5 \pm 2,06$; $9,03 \pm 0,85$; $10,81 \pm 1,58$) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). O grupo NIC-5FU apresentou maior número de células TRAP-positivas/mm aos 50 e 95 dias quando comparado com o grupo NIC-CIS ($10,5 \pm 1,38$; $13,62 \pm 1,37$) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$).

Análise ultraestrutural

A análise dos espécimes não desmineralizados sob microscopia eletrônica de varredura, para o grupo SS-SS, mostrou melhor estruturação do tecido ósseo peri-implantar, bem como áreas de melhor organização célula-a-célula e contato entre os prolongamentos dos osteócitos com a superfície do titânio. Por outro lado, nos espécimes dos grupos SS-CIS e SS-5FU, apesar de serem observados osteócitos, os mesmos se encontravam raros e isolados. Além do mais, nesses espécimes foi observado *gap* entre o tecido peri-implantar e o titânio. Já para NIC-SS, NIC-CIS e NIC-5FU, foi observada a maior desestruturação dos tecidos peri-implantares, nos quais não foram observados osteócitos organizados entre si ou com a superfície do titânio. Para esses grupos, foi também observado *gap* entre o tecido peri-implantar e o titânio.

Díscussão

Não há saber mais ou saber menos: há saberes diferentes.

Paulo Freire

Discussão

O advento da utilização de implantes de titânio osseointegráveis na odontologia tornou completamente palpável e bastante previsível a recuperação de função em condições reabilitadoras desafiadoras. Por outro lado, condições sistêmicas debilitantes comprometem estruturalmente o sucesso dessas reabilitações. A nicotina altera severamente o metabolismo de diversos tecidos vivos, além de constituir um dos principais fatores de risco para o aparecimento do câncer. A quimioterapia, utilizada no tratamento dessas lesões, apresenta efeitos adversos sobre células saudáveis, inclusive comprometendo o reparo ósseo. Fundamentado na perspectiva de que cada vez mais a população estará exposta a essas substâncias, e na escassez de informações a respeito dos efeitos do seu uso isolado ou combinado, o presente estudo objetivou avaliar seus efeitos sobre os tecidos ao redor de implantes de titânio.

Apesar de testes *in vitro* serem a primeira linha de experimentos quando uma questão é levantada, a abrangência e complexidade dos eventos biológicos relacionados àquele questionamento conduzem à experimentação animal (Hollinger & Kleinschmidt, 1990). Como em qualquer modelo animal, algumas limitações podem ser levantadas. No caso de instalação de implantes em tíbias de ratos, estão principalmente relacionadas à origem embriológica divergente ao cenário clínico e à atividade metabólica, que é inúmeras vezes maior no rato quando comparado ao humano. Por outro lado, avaliações pré-clínicas *in vivo* podem balancear essas limitações pela possibilidade de obtenção de tamanho adequado da amostra e, especificamente no modelo no presente estudo, redução de viés (e.g. supressão da influência de microrganismos bucais durante o reparo), e também similaridades anatômicas entre a tíbia do rato e a mandíbula humana (e.g. presença de cortical espessa e

amplo tecido medular).

A conceituação de sucesso em implantodontia foi dada através do termo histológico de osseointegração, situação na qual o tecido ósseo apresenta íntimo contato com a superfície do titânio (Albrektson et al. 1981; Carlsson et al. 1986). Por outro lado, em condições de função, a área de tecido ósseo que estará ao redor do metal é responsável por desempenhar um importante papel sobre o suporte e dissipação das forças provenientes da mastigação e, por isso, ambos parâmetros (BIC e PTON) foram definidos como primários para o presente estudo. A influência negativa da nicotina sobre o contato osso/implante já havia sido confirmada (Yamano et al. 2010), no entanto, além do resultado de COI ter mostrado menor extensão de contato no grupo NIC-SS quando comparado com SS-SS em todos os períodos, o presente estudo mostrou que a área de tecido ósseo na região peri-implantar também é comprometida nos animais que receberam nicotina em todos os períodos experimentais.

A nicotina exerce efeito deletério sobre diversos mecanismos relacionados com o metabolismo corpóreo (Wong & Martins-Green 2004; Ma et al. 2010; Ma et al. 2011). A avaliação dos eventos celulares relacionados com os processos de reparo ou remodelação óssea mostrou que essa substância foi capaz de interferir em diversas fases desses processos, uma vez que a imunoistoquímica foi capaz de confirmar esse comprometimento, desde indução de diferenciação até sobre células diretamente relacionadas com a formação de matriz óssea, o que também corrobora com estudos prévios (Yamano et al. 2010; Ma et al. 2010). Além disso, o maior número de células TRAP-positivas no grupo NIC-SS, quando comparado com SS-SS, mostra maior atividade osteoclástica e confirma um possível desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea. A combinação desses achados pode justificar a desestruturação estrutural e ultraestrutural da interface osso/implantes.

O efeito de medicações sistêmicas sobre a osseointegração tem sido bem descrito na literatura (Apostu et al. 2016). A quimioterapia, por exercer influência sobre praticamente

todos os tecidos do organismo (Half & Arber, 2009; Kim et al., 2012), pode afetar a osseointegração. Os piores resultados de BIC e PTON no grupo SS-CIS quando comparado com SS-SS corrobora com estudos prévios que encontraram efeitos prejudiciais de CIS sobre o reparo ósseo peri-implantar (Al-Mahalawy et al. 2016; Matheus et al. 2018). Por outro lado, apesar de se presumir comprometimento também nos animais tratados com 5FU, o presente estudo, no melhor de nosso conhecimento, foi o primeiro a confirmar seus efeitos prejudiciais sobre os tecidos peri-implantares, ao observar menor BIC e PTON no grupo SS-5FU quando comparado com SS-SS.

O comprometimento da CIS sobre o reparo ósseo (Ehrhart et al, 2002; Stine et al. 2014; Stine et al. 2016; Matheus et al. 2018) está bastante sedimentado. Por outro lado, as análises, histológica, imunoistoquímica para detecção de BMP/24, RUNX2, OCN e TRAP, e ultraestrutural, do presente estudo, mostraram que esse agente antineoplásico compromete os tecidos peri-implantares, mesmo que administrado em longos períodos após a instalação dos implantes de titânio. A capacidade de causar esses prejuízos também foi confirmada para o agente 5-FU, uma vez que piores resultados foram observados no grupo SS-5FU quando comparado com SS-SS, além de maior número de células TRAP-positivas ter sido observado em SS-5FU quando comparado com SS-CIS. Este aumento na atividade reabsortiva associado ao 5-FU foi observada por Garcia et al. (2015), sobre o tecido ósseo alveolar em animais com periodontite experimental.

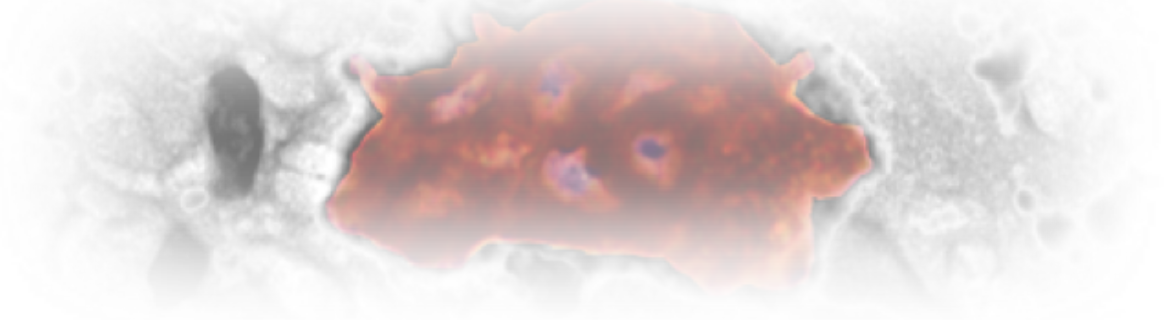
Além da nicotina ter efeito comprometedor sobre o tratamento do câncer em decorrência da capacidade induzir resistência à quimioterapia por modular a sinalização mitocondrial (Zhang et al. 2009), seus efeitos prejudiciais combinados aos de agentes neoplásicos sobre os tecidos podem exercer forte influência sobre os processos de reparo e remodelação ao redor de implantes de titânio. Esse questionamento foi abordado pelo presente estudo, e observou-se que os animais dos grupos NIC-CIS e NIC-5FU, que

receberam tanto o protocolo de aplicação de nicotina e agentes antineoplásicos, apresentaram o mais severo comprometimento dos tecidos peri-implantares quando comparado com os grupos SS-CIS, SS-5FU e NIC-SS, em praticamente todos os parâmetros avaliados.

Pacientes fumantes que serão submetidos ao tratamento quimioterápico são instruídos a cessar o hábito em decorrência dos seus efeitos adversos complementares (Warren et al. 2012). Mesmo que este seja um protocolo, e tenha sido mimetizado pelo presente estudo, os danos causados pela nicotina são observados sobre o tecido ósseo em até dois meses após cessação (Hapidin et al. 2011). Esse fato, associado à presença de níveis circulantes de agentes antineoplásicos por até 20 anos, que podem ainda estar agindo sobre os tecidos (Gietema et al., 2000; Orchard et al., 2014), tornam bastante remotas as possibilidades de melhora no quadro dos tecidos peri-implantares, mesmo no decorrer do tempo.

Os métodos utilizados para mimetização das situações propostas, assim como as ferramentas utilizadas para avaliação dos efeitos das substâncias sobre os tecidos peri-implantares, foram eficientes para confirmação de tal proposta. No entanto, em um cenário clínico no qual o paciente é submetido a mais de um ciclo de quimioterapia e seu implante instalado na cavidade bucal permanece sobre influência diária de cargas mastigatórias, o comprometimento dos tecidos peri-implantares e a incidência de falhas nas reabilitações podem ser mais severas e mais significativas que o quadro reportado pela presente avaliação pré-clínica.

Conclusão



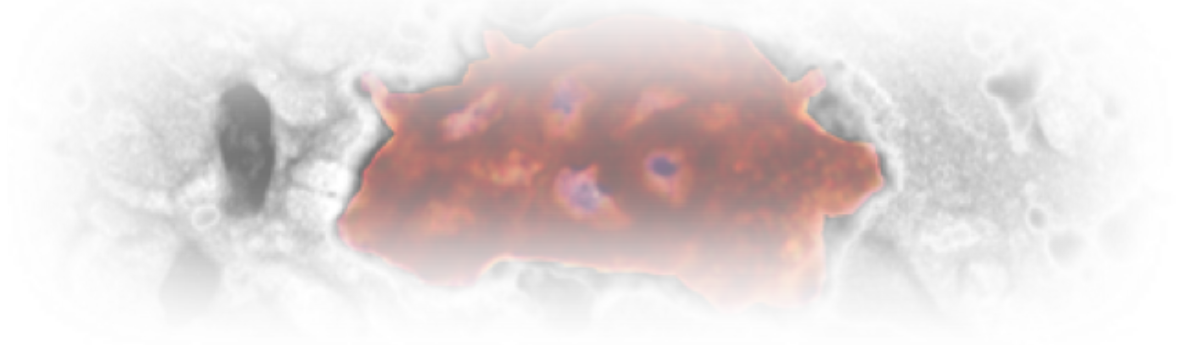
“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”

George Bernard Shaw

Conclusão

Pode-se concluir, dentro dos limites do presente estudo, que tanto a nicotina quanto os agentes antineoplásicos Cisplatina e 5-fluorouracil, ainda que isoladamente, são capazes de prejudicar os tecidos peri-implantares, mesmo em fases avançadas do processo de reparo ou remodelação óssea. Também, os animais que receberam ambos nicotina e agentes antineoplásicos apresentam comprometimento mais severo desses tecidos quando comparado com os animais expostos a apenas uma dessas substâncias isoladamente.

Referências Bibliográficas



Referências Bibliográficas

- Aging demographics and awareness levels drives the global dental implants volumes, according to new report by Global Industry Analysts, Inc. (press release). San Jose, Calif.: PRWeb; July 13, 2012. www.prweb.com/releases/dental_implants/dentures/prweb9693638.htm. Acessado 13 de dezembro de 2018.
- Al-Mahalawy, H.; Marei, H.F.; Abuohashish, H.; Alhawaj, H.; Alrefae, M.; Al-Jandan, B. (2016) Effects of cisplatin chemotherapy on the osseointegration of titanium implants. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery*, 44(4), 337-346. doi: 10.1016/j.jcms.2016.01.012.
- Albrektsson, T.; Brånemark, P.I.; Hansson, H.A.; Lindström, J. (1981) Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 52(2), 155-170. doi: 10.3109/17453678108991776.
- Alexandrov, L.B.; Ju, Y.S.; Haase, K.; Van Loo, P.; Martincorena, I.; Nik-Zainal, S.; Totoki, Y.; Fujimoto, A.; Nakagawa, H.; Shibata, T.; Campbell, P.J.; Vineis, P.; Phillips, D.H.; Stratton, M.R. (2016) Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science*, 354(6312), 618-622. doi: 10.1126/science.aag0299.
- Apostu, D.; Lucaciu, O.; Lucaciu, G.D.; Crisan, B.; Crisan, L.; Baciut, M.;... Bran, S. (2017) Systemic drugs that influence titanium implant osseointegration. *Drug Metabolism Reviews*, 49(1):92-104. doi: 10.1080/03602532.2016.1277737.
- Arias, J.L. (2008) Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery system. *Molecules*, 13(10), 2340-2369. doi: 10.3390/molecules13102340.

- Banerjee, J.; Al-Wadei, H.A, Schuller, H.M. (2013) Chronic nicotine inhibits the therapeutic effects of gemcitabine on pancreatic cancer in vitro and in mouse xenografts. *European Journal of Cancer*, 49:1152–8. doi:10.1016/j.ejca.2012.10.015.
- Carlsson, L.; Röstlund, T.; Albrektsson, B.; Albrektsson, T.; Brånemark, P.I. Osseointegration of titanium implants. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 57(4):285-289. doi: 10.3109/17453678608994393.
- César-Neto, J.B.; Duarte, P.M.; Sallum, E.A.; Barbieri, D.; Moreno, H Jr.; Nociti, F.H Jr. (2003) A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *Journal of Periodontology*, 74(10), 1454-1459. doi: 10.1902/jop.2003.74.10.1454.
- Cho, J. M., Manandhar, S., Lee, H. R., Park, H. M., & Kwak, M. K. (2008) Role of the Nrf2-antioxidant system in cytotoxicity mediated by anticancer cisplatin: Implication to cancer cell resistance. *Cancer Letters*, 260(1-2), 96–108. doi: 10.1016/j.canlet.2007.10.022.
- Dinicola, S.; Morini, V.; Coluccia, P.; Proietti, S.; D’Anselmi, F.; Pasqualato, A, et al. (2013) Nicotine increases survival in human colon cancer cells treated with chemotherapeutic drugs. *Toxicology in Vitro*, 27 (8), 2256–2263. doi: 10.1016/j.tiv.2013.09.020.
- Du, Z.; Ivanovski, S.; Hamlet, S.M.; Feng, J.Q.; Xiao, Y. (2016) The Ultrastructural Relationship Between Osteocytes and Dental Implants Following Osseointegration. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 18(2), 270-280. doi: 10.1111/cid.12257.
- Duarte, P.M.; Nogueira Filho, G.R.; Sallum, E.A.; De Toledo, S.; Sallum, A.W.; Nociti, F.H Jr. (2001) The effect of an immunopressive therapy and its withdrawal on bone healing around titanium implants. A histometric study in rabbits. *Journal of Periodontology*, 72(10), 1391-1397. doi: 10.1902/jop.2001.72.10.1391.

- Dubois, D.; Dubois, E.F. (1989) A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. 1916. *Archives of Internal Medicine*, 5(5), 303-311.
- Ehrhart, N., Eurell, J. A., Tommasini, M., Constable, P. D., Johnson, A. L., & Feretti, A. (2002) Effect of cisplatin on bone transport osteogenesis in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 63(5), 703–711. 10.2460/ajvr.2002.63.703.
- Fang, J.; Hall, B.K. (1997) Chondrogenic cell differentiation from membrane bone periosteum. *Anatomy and embryology*, 196(5), 349-362. doi: 10.1007/s004290050104.
- Garcia, V. G., Novaes, V. C. N., Almeida, J. M., Longo, M., Ervolino, E., Bomfim, S. R. M., & Theodoro, L. H. (2015) Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. *Supportive Care in Cancer*, 23(7), 2007–2017. doi: 10.1007/s00520-014-2563-y.
- Gerber, H.P.; Vu, T.H.; Ryan, A.M.; Kowalski, J.; Werb, Z.; Ferrara, N. (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine*, 5(6), 623-628. doi: 10.1038/9467.
- Gietema, J. A., Meinardi, M. T., Messerschmidt, J., Gelevert, T., Alt, F., Uges, D. R., & Sleijfer, D. T. (2000). Circulating plasma platinum more than 10 years after cisplatin treatment for testicular cancer. *Lancet*, 355(9209), 1075–1076. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02044-4.
- Guggenheimer, J., Verbin, R. S., Appel, B. N., & Schmutz, J. (1977) Clinicopathologic effects of cancer chemotherapeutic agents on human buccal mucosa. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 44, 58–63. doi: 10.1016/0030-4220(77)90244-4.
- Half, E., & Arber, N. (2009) Colon cancer: Preventive agents and the present status of chemoprevention. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 10(2), 211–219. doi: 10.1517/14656560802560153 .

- Hapidin, H.; Othman, F.; Soelaiman, I.N.; Shuid, A.N.; Mohamed, N. (2011) Effects of nicotine administration and nicotine cessation on bone histomorphometry and bone biomarkers in Sprague-Dawley male rats. *Calcified Tissue International*, 88(1), 41-7. doi: 10.1007/s00223-010-9426-4.
- Havelka, A. M., Berndtsson, M., Olofsson, M. H., Shoshan, M. C., & Linder, S. (2007) Mechanisms of action of DNA-damaging anticancer drugs in treatment of carcinomas: Is acute apoptosis an “off-target” effect? *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 7(10), 1035–1039. doi: 10.2174/138955707782110196.
- Hecht S.S. (2003) Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 733-744. Review. Erratum in: Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer, 4(1), 84. doi: 10.1038/nrc1190.
- Hollinger, J. O., & Kleinschmidt, J. C. (1990) The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 1(1), 60–68. doi: 10.1097/00001665-199001000-00011.
- <http://cfo.org.br/todas-as-noticias/cresce-o-numero-de-implantes-dentarios-no-brasil/>. Acessado 13 de dezembro de 2018.
- Keller, M.; Steiger, R. (2004) The pi plate: an implant for unstable extension fractures of the distal radius in patients with osteoporotic bone. *Techniques in hand & upper extremity surgery*, 8(4), 212-218.
- Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010) Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLOS Biology*, 29(8), e1000412. doi: 10.1371/journal.pbio.1000412.

- Kim, J. W., Cha, Y., Kim, S. J., Han, S. W., Oh, D. Y., Lee, S. H., ... Bang, Y. J. (2012) Association of oral mucositis with quality of life and symptom clusters in patients with solid tumors receiving chemotherapy. *Supportive Care in Cancer*, 20(2), 395–403. doi: 10.1007/s00520-011-1126-8.
- Lorch, J. H., Goloubeva, O., Haddad, R. I., Cullen, K., SarliS, N., Tishler, R., et al. TAX 324 Study Group (2011) 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. *The Lancet Oncology*, 12(2), 153–159. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70279-5.
- Ma, L.; Zheng, L.W.; Sham, M.H.; Cheung, L.K. (2010) Uncoupled angiogenesis and osteogenesis in nicotine-compromised bone healing. *The Journal of Bone and Mineral Research*, 25(6), 1305-1313. doi: 10.1002/jbmr.19.
- Ma, L.; Zwahlen, R.A.; Zheng, L.W.; Sham, M.H. (2011) Influence of nicotine on the biological activity of rabbit osteoblasts. *Clinical Oral Implants Research*, 22(3), 338-342. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02088.x.
- Matheus, H.R.; Ervolino, E.; Faleiros, P.L.; Novaes, V.C.N.; Theodoro, L.H.; Garcia, V.G.; de Almeida, J.M. (2018) Cisplatin chemotherapy impairs the peri-implant bone repair around titanium implants: An in vivo study in rats. *Journal of clinical Periodontology*, 45(2), 241-252. doi: 10.1111/jcpe.12824.
- Mayr-Wohlfart, U.; Waltenberger, J.; Hausser, H.; Kessler, S.; Günther, K.P.; Dehio, C.; et al. (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone*, 30(3), 472-477. doi: 10.1016/S8756-3282(01)00690-1.
- McGuire, D. B. (2002) Mucosal tissue injury in cancer therapy. More than mucositis and mouthwash. *Cancer Practice*, 10, 179–191. doi: 10.1046/j.1523-5394.2002.104009.x.

- Medeiros, C.A.; Leitão, R.F.; Macedo, R.N.; Barboza, D.R.; Gomes, A.S.; Nogueira, N.A.; Alencar, N.M.; Ribeiro, R.A.; Brito, G.A. (2011) Effect of atorvastatin on 5-Fuorouracil-induced experimental oral mucositis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 67(5), 1085–1100. doi: 10.1007/s00280-010-1409-7.
- Nakasato, T., Izumisawa, M., Akahane, A., Kikuchi, K., Ehara, S., Shoji, S., ... Sugiyama, Y. (2012) Combined intra-arterial infusion and systemic chemoradiotherapy for stage IV squamous cell carcinoma of the mandibular gingiva. *Japanese Journal of Radiology*, 30(9), 752–761. doi: 10.1007/s11604-012-0122-3.
- Noordhuis, P.; Holwerda, U.; Van Der Wilt, C.L.; Van Groeningen, C.J.; Smid, K. Meijer, S.; Pinedo, H.M.; Peters, G.J. (2004) 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Annals of oncology*, 15(7), 1025-1032. doi: 10.1093/annonc/mdh264.
- Okamoto, M.; Kita, T.; Okuda, H.; Tanaka, T.; Nakashima, T. (1994) Effects of aging on acute toxicity of nicotine in rats. *Pharmacology and Toxicology*, 75(1), 1-6. doi: 10.1111/j.1600-0773.1994.tb00316.x.
- Orchard, T. S., Larson, J. C., Alghothani, N., Bout-Tabaku, S., Cauley, J. A., Chen, Z., ... Jackson, R. D. (2014). Magnesium intake, bone mineral density, and fractures: Results from the Women's Health Initiative Observational Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 99, 926–933. doi:10.3945/ajcn.113.067488.
- Organização Mundial da Saúde. (2014). World Cancer Report 2014. Removido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acessado em 25 de maio de 2017.
- Patel, Z.S.; Young, S.; Tabata, Y.; Jansen, J.A.; Wong, M.E.; Mikos, A.G. (2008) Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone*, 43(5), 931-940. doi: 10.1016/j.bone.2008.06.019.

- Rabik, C. A., & Dolan, M. E. (2007) Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treatment Reviews*, 33(1), 9–23. doi: 10.1016/j.ctrv.2006.09.006.
- Shen, T.; Le, W.; Yee, A.; Kamdar, O.; Hwang, P.H.; Upadhyay, D. (2010) Nicotine induces resistance to chemotherapy in nasal epithelial cancer. *The American Journal of Rhinology & Allergy*, 24(2), e73–77. doi: 10.2500/ajra.2010.24.3456.
- Shurin, G.V.A.N.; Shurin, M.R. (2009) Cancer Therapy and Dendritic Cell Immunomodulation, in *Dendritic Cells in Cancer*, M.R.S.a.R.D. Salter, Ed, Springer: NY. p. 201-216.
- Simonis, P.; Dufour, T.; Tenenbaum, H. (2010) Long-term implant survival and success: a 10-16-year follow-up of non-submerged dental implants. *Clinical Oral implants Research*, 21(7), 772-777. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.01912.x.
- Siqueira, J.T.; Cavalher-Machado, S.C.; Arana-Chavez, V.E.; Sannomiya, P. (2003) Bone formation around titanium implants in the rat tibia: role of insulin. *Implant Dentistry*, 12(3), 242-51. doi: 10.1097/01.ID.0000074440.04609.4F.
- Stine, K. C., Wahl, E. C., Liu, L., Skinner, R. A., Vanderschilden, J., Bunn, R. C., ... Lumpkin, C. K. (2016) Nutlin-3 treatment spares cisplatin-induced inhibition of bone healing while maintaining osteosarcoma toxicity. *Journal of Orthopaedic Research*, 34(10), 1716–1724. doi: 10.1002/jor.23192.
- Stine, K. C., Wahl, E. C., Liu, L., Skinner, R. A., Vanderschilden, J., Bunn, R. C., ... Lumpkin, C. K. Jr (2014) Cisplatin inhibits bone healing during distraction osteogenesis. *Journal of Orthopaedic Research*, 32(3), 464–470. doi: 10.1002/jor.22527.
- Suda, T.; Takahashi, N.; Udagawa, N.; Jimi, E.; Gillespie, M.T.; Martin, T.J. (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor

- receptor and ligand families. *Endocrine Reviews*, 20(3),345-357. doi: 10.1210/edrv.20.3.0367.
- Vermorken, J. B., Peyrade, F., KrausS, J., Mesía, R., Remenar, E., Gauler, T. C., ... Clement, P. M. (2014) 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). *Annals of Oncology*, 25(3), 682–688. doi: 10.1093/annonc/mdu003.
- Walker, L.M.;Preston, M.R.; Magnay, J.L.; Thomas, P.B.; El Haj, A.J. (2001) Nicotinic regulation of c-fos and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. *Bone*, 28(6), 603-608. doi: 10.1016/S8756-3282(01)00427-6.
- Wang, D., & Lippard, S. J. (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(4), 307–320. doi: 10.1038/nrd1691.
- Warren, G.W.; Romano, M.A.; Kudrimoti, M.R.; Randall, M.E.; McGarry, R.C.; Singh, A.K.; et al. Nicotinic modulation of therapeutic response in vitro and in vivo. *International Journal of Cancer*, 131(11), 2519–2527. doi: 10.1002/ijc.27556.
- Wong, L.S.; Martins-Green, M. (2004) Firsthand cigarette smoke alters fibroblast migration and survival: implications for impaired healing. *Wound Repair and Regeneration*, 12(4), 471-484. doi: 10.1111/j.1067-1927.2004.12403.x
- Wozniak, K., Czechowska, A., & Blasiak, J. (2004) Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. *Chemico- Biological Interactions*, 147(3), 309–318. doi: 10.1016/j.cbi.2004.03.001.

- Yamano, S.; Berley, J.A.; Kuo, W.P.; Gallucci, G.O.; Weber, H.P.; Sukotjo, C. (2010) Effects of nicotine on gene expression and osseointegration in rats. *Clinical Oral Implants Research*, 21(12), 1353-1399. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.01955.x.
- Yin, L.; Morita, A.; Tsuji, T. (2000) Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. *Archives of Dermatological Research*, 292(4), 188-194. doi 10.1007/s004030050476.
- Zhang, J.; Kamdar, O.; Le, W.; Rosen, G.D.; Upadhyay, D. (2009) Nicotine induces resistance to chemotherapy by modulating mitochondrial signaling in lung cancer. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 40(2):135-146. doi: 10.1165/rcmb.2007-0277OC.

Fíguas



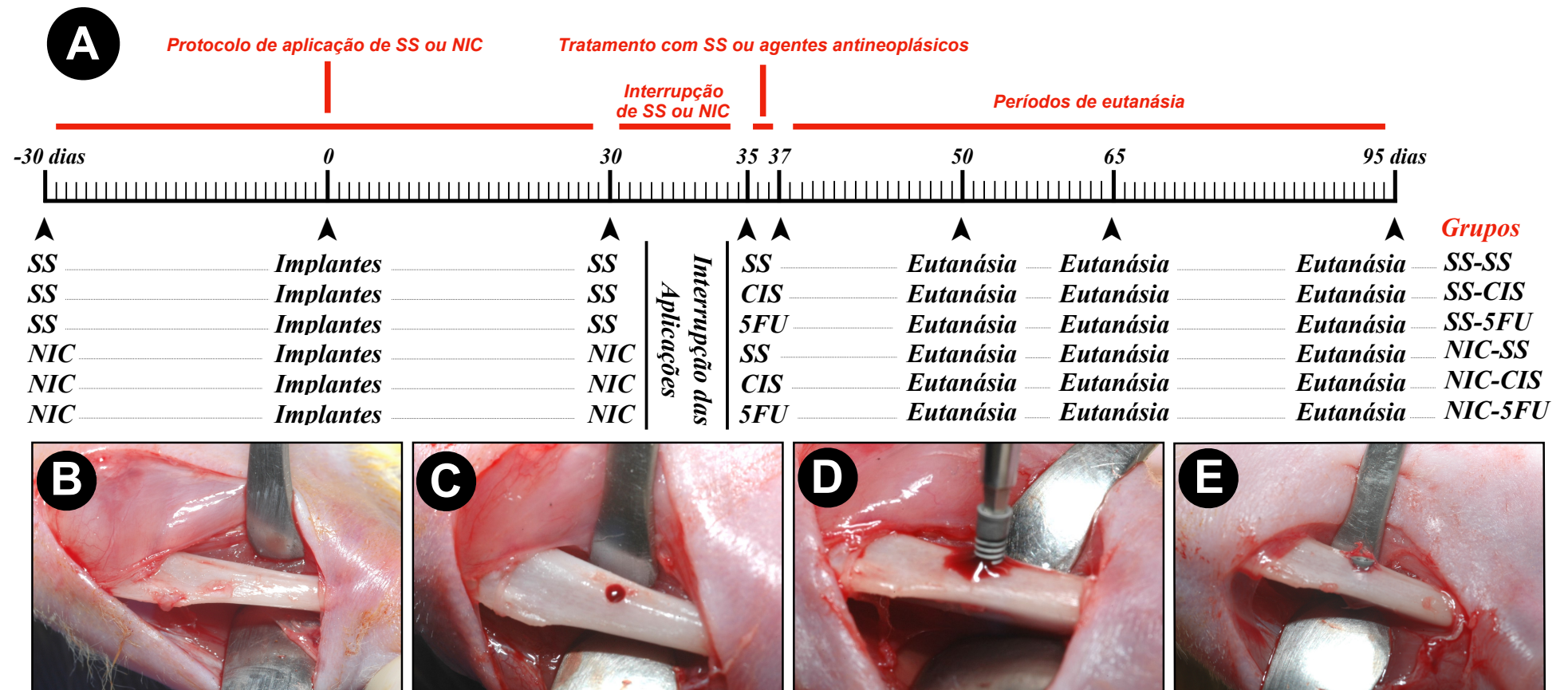


Figura 1: Delineamento experimental e metodologia de instalação dos implantes de titânio em cada tíbia. (A), fluxograma apresentando o delineamento do experimento para cada grupo. (B), exposição da face medial da metáfise tibial. (C), alvéolo confeccionado. (D), instalação do implante de titânio. (E), fixação do implante de titânio em nível ósseo.

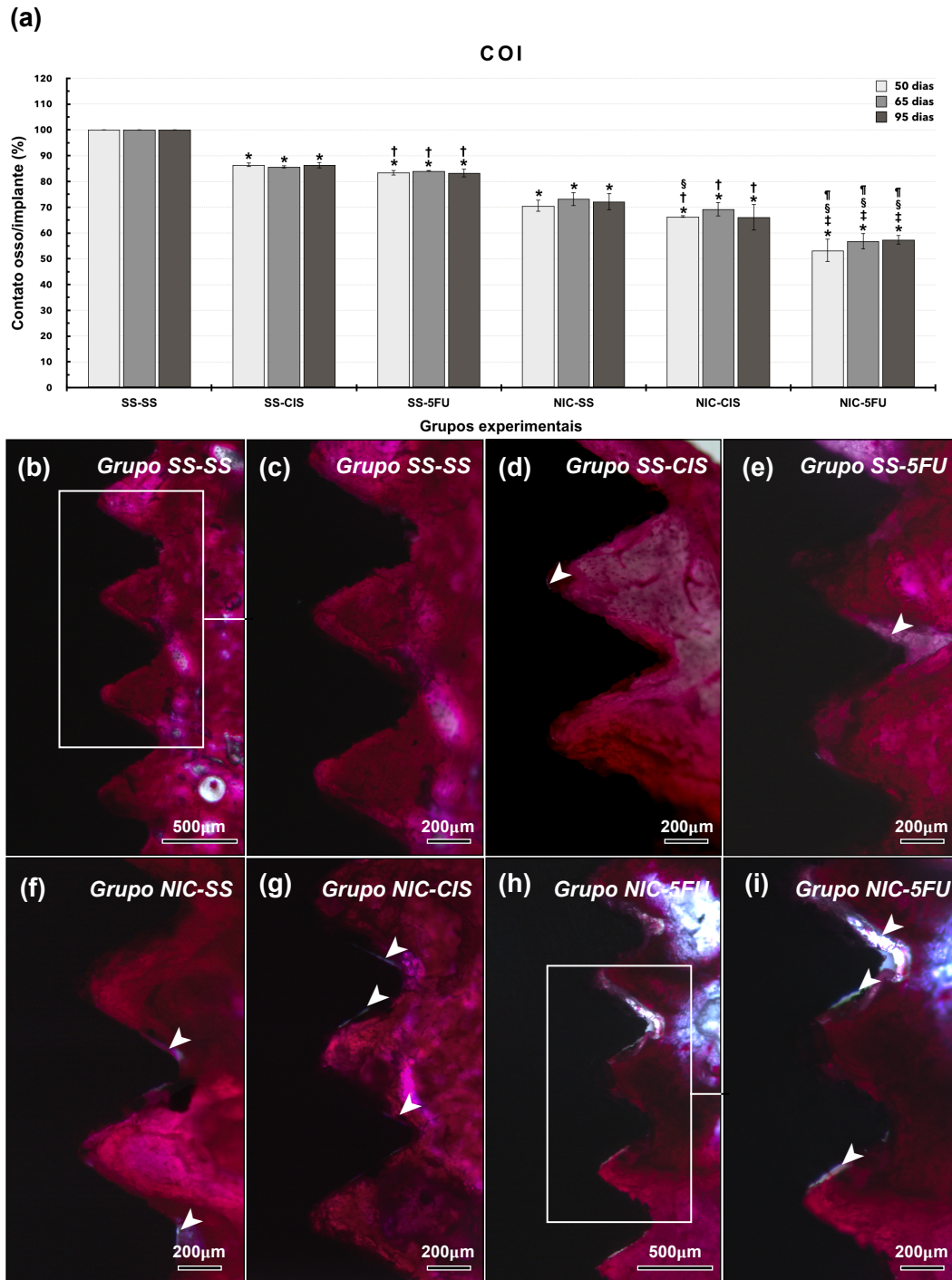


Figura 2: Contato osso/implante para cada grupo experimental. (a) médias e desvios padrão ($M \pm DP$) de contato osso/implante (COI) na região peri-implantar para cada grupo e período. Teste estatístico: ANOVA e Tukey. Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS-SS no mesmo período ($p \leq 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS-CIS no mesmo período ($p \leq 0,05$); ‡, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS-5FU no mesmo período ($p \leq 0,05$); §, diferença estatisticamente significativa com o grupo NIC-SS no mesmo período ($p \leq 0,05$); ¶, diferença estatisticamente significativa com o grupo NIC-CIS no mesmo período ($p \leq 0,05$). (b-i) Fotomicrografias mostrando o padrão de COI aos 65 dias em SS-SS (b,c); SS-CIS (d), SS-5FU (e); NIC-SS (f), NIC-CIS (g) e NIC-5FU (h,i). Setas brancas: regiões sem contato osso/implante. Coloração: fucsina básica. Barras de escala: b e h: 500 µm; c, d, e, f, g e i: 200 µm.

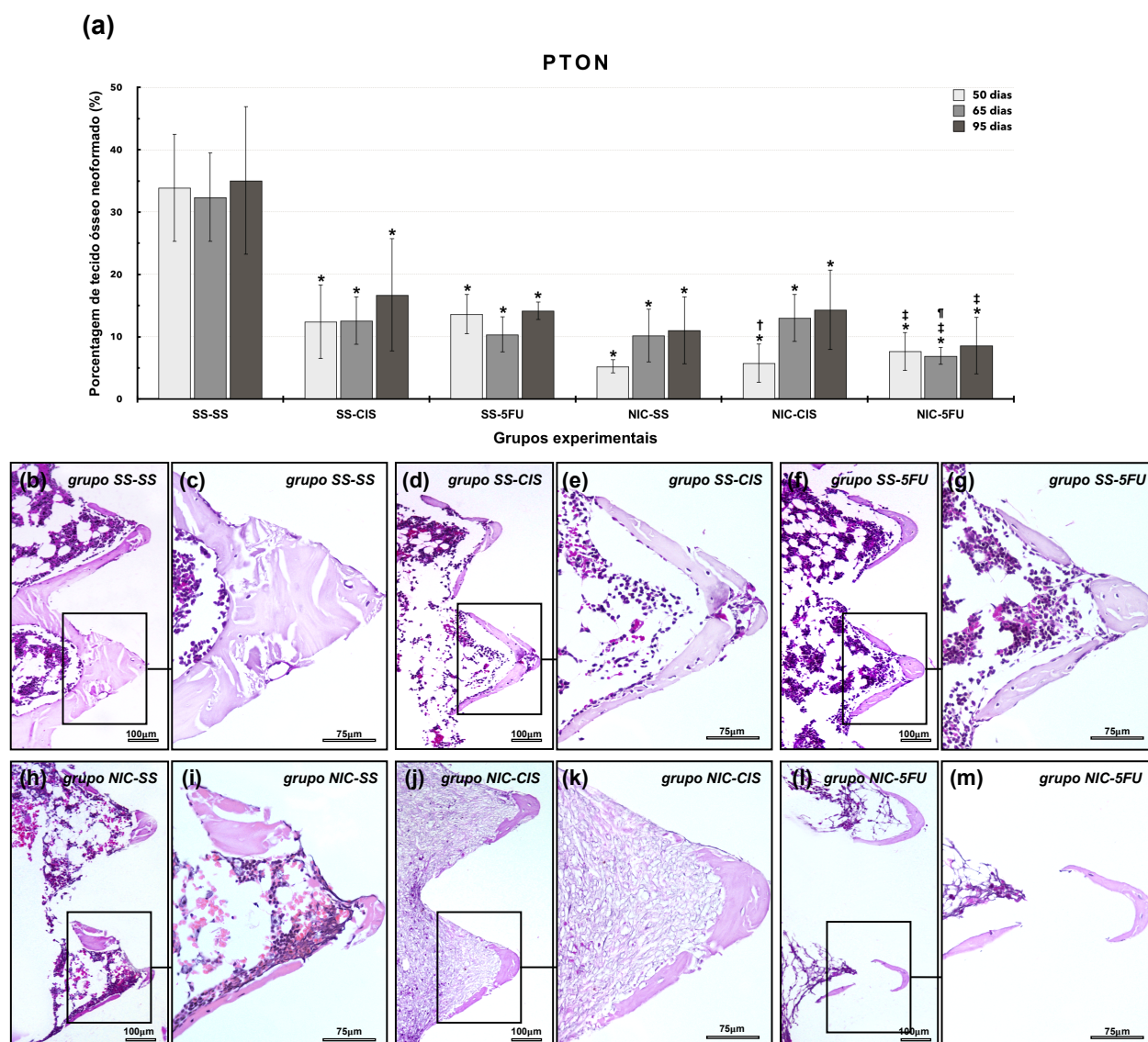


Figura 3: Porcentagem de tecido ósseo neoformado e características histológicas dos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental. (a) médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTON) na região peri-implantar para cada grupo e período. Teste estatístico: ANOVA e Tukey. Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS-SS no mesmo período ($p \leq 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS-CIS no mesmo período ($p \leq 0,05$); ‡, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS-5FU no mesmo período ($p \leq 0,05$); ¶, diferença estatisticamente significativa com o grupo NIC-CIS no mesmo período ($p \leq 0,05$). (b-m) fotomicrografias mostrando as características histológicas dos tecidos peri-implantares para cada grupo aos 65 dias em SS-SS (b,c); SS-CIS (d,e), SS-5FU (f,g); NIC-SS (h,i), NIC-CIS (j,k) e NIC-5FU (l,m). Coloração: hematoxilina e eosina. Barras de escala: b, d, f, h, j e l: 100 μ m; c, e, g, i, k e m: 75 μ m.

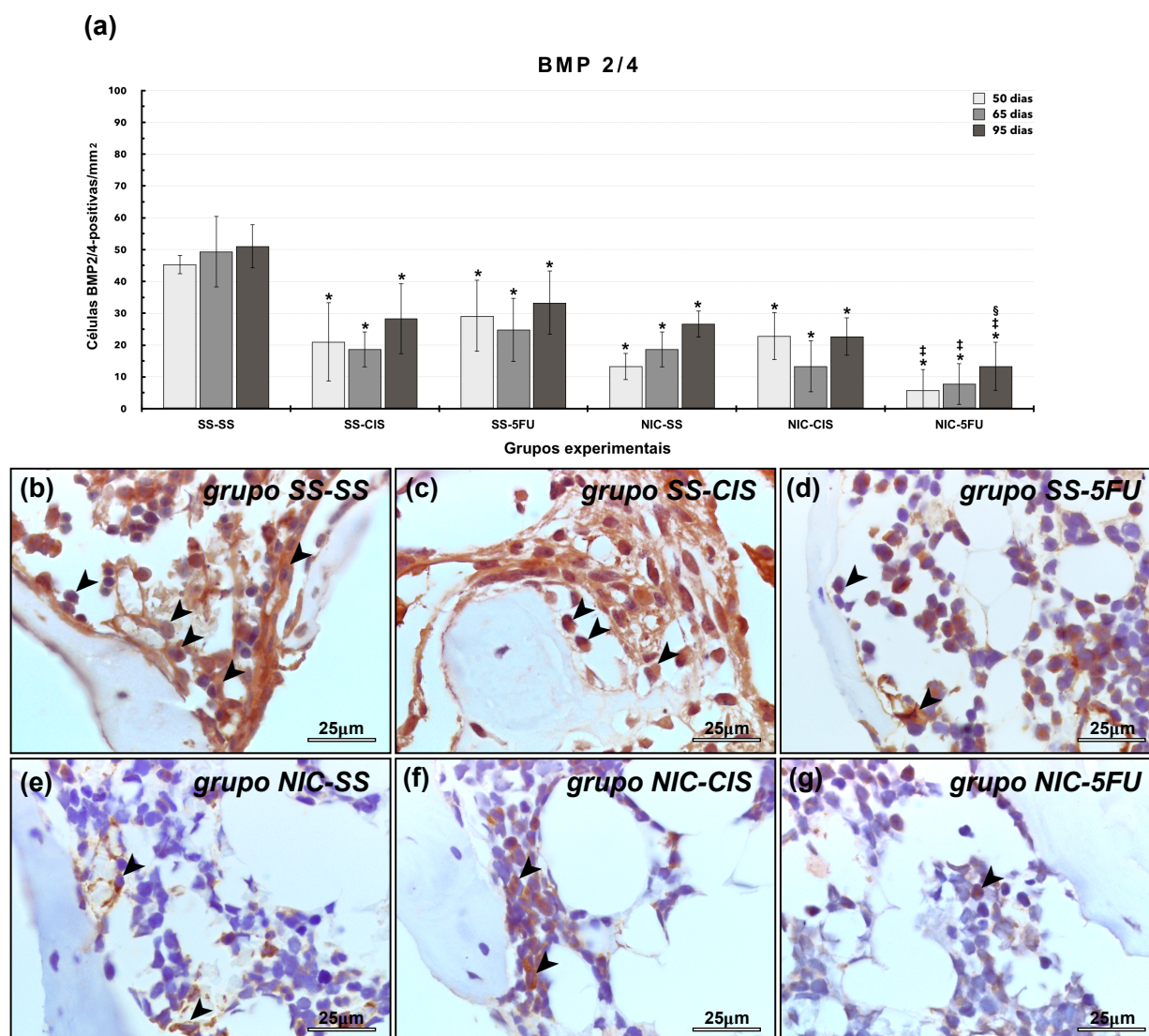


Figura 4: Padrão de imunomarcção de BMP2/4 nos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental. (a) médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da contagem de células BMP2/4-positivas/ mm^2 . Teste estatístico: Kruskal Wallis e Student-Newman-Keuls. Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS-SS no mesmo período ($p \leq 0,05$); ‡, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS-5FU no mesmo período ($p \leq 0,05$); §, diferença estatisticamente significativa com o grupo NIC-SS no mesmo período ($p \leq 0,05$). (b-g) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para BMP2/4 e células BMP2/4-positivas (*setas pretas*) aos 50 dias em SS-SS (b); SS-CIS (c), SS-5FU (d); NIC-SS (e), NIC-CIS (f) e NIC-5FU (g). Contra coloração: hematoxilina de Harris. Barras de escala: 25 µm.

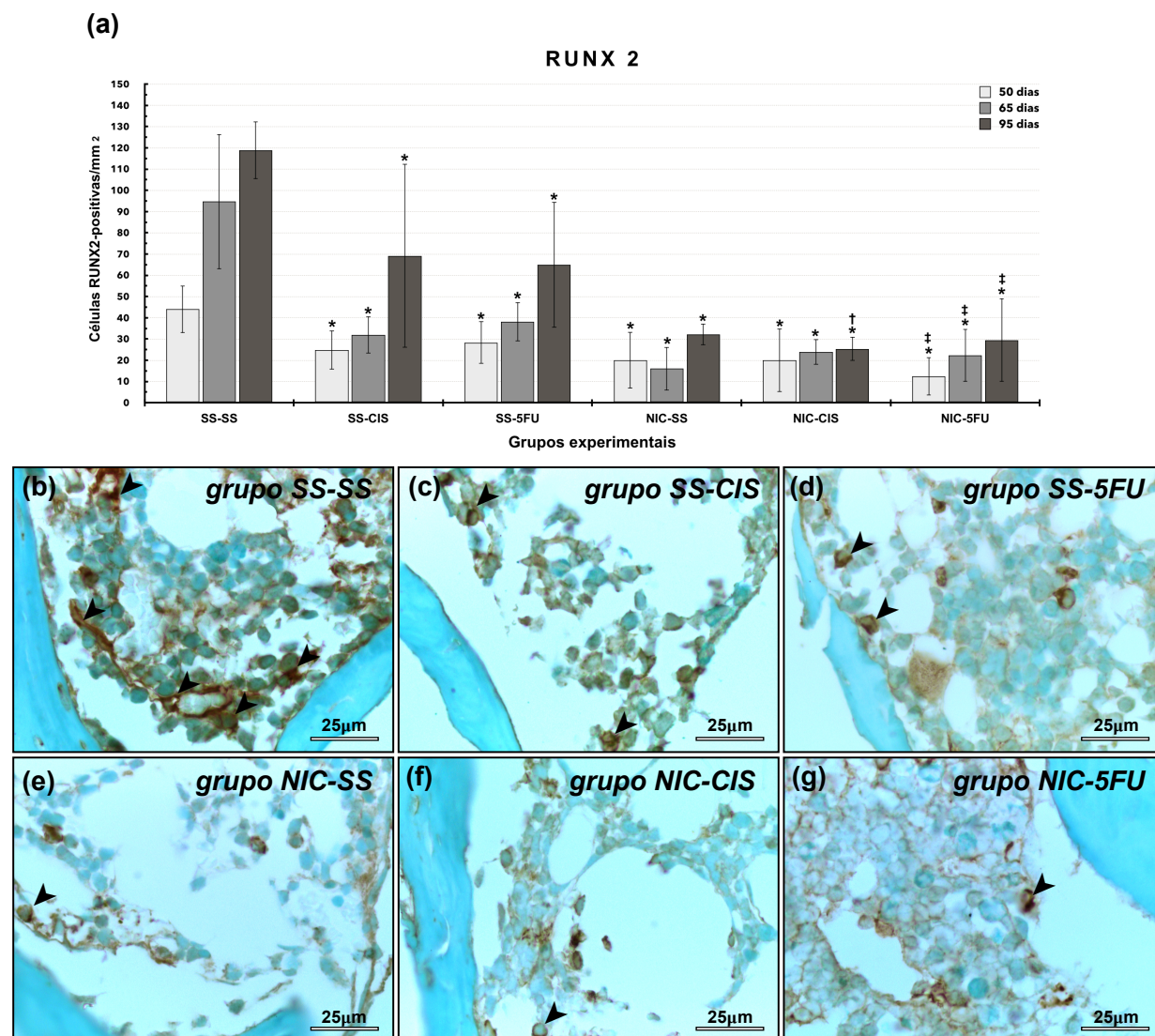


Figura 5: Padrão de imunomarcção de RUNX2 nos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental. (a) médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da contagem de células RUNX2-positivas/ mm^2 . Teste estatístico: ANOVA e Tukey. Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS-SS no mesmo período ($p \leq 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS-CIS no mesmo período ($p \leq 0,05$); ‡, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS-5FU no mesmo período ($p \leq 0,05$). (b-g) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para RUNX2 e células RUNX2-positivas (*setas pretas*) aos 50 dias em SS-SS (b); SS-CIS (c), SS-5FU (d); NIC-SS (e), NIC-CIS (f) e NIC-5FU (g). Contra coloração: fast green. Barras de escala: 25 µm.

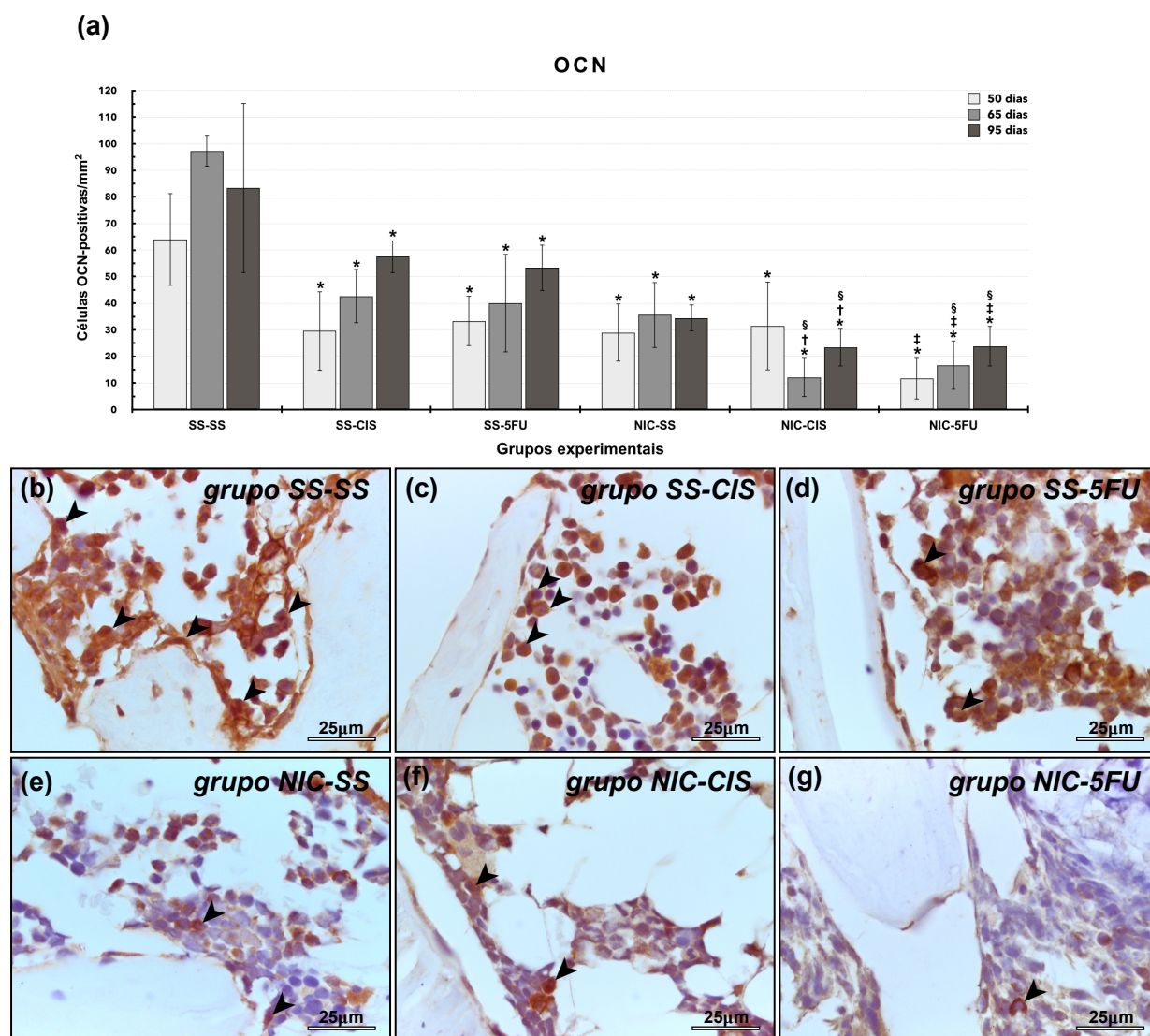


Figura 6: Padrão de imunomarcção de OCN nos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental. (a) médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da contagem de células OCN-positivas/mm². Teste estatístico: Kruskal Wallis e Student-Newman-Keuls. Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS-SS no mesmo período ($p \leq 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS-CIS no mesmo período ($p \leq 0,05$); ‡, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS-5FU no mesmo período ($p \leq 0,05$); §, diferença estatisticamente significativa com o grupo NIC-SS no mesmo período ($p \leq 0,05$). (b-g) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para OCN e células OCN-positivas (setas pretas) aos 95 dias em SS-SS (b); SS-CIS (c), SS-5FU (d); NIC-SS (e), NIC-CIS (f) e NIC-5FU (g). Contra coloração: hematoxilina de Harris. Barras de escala: 25 µm.

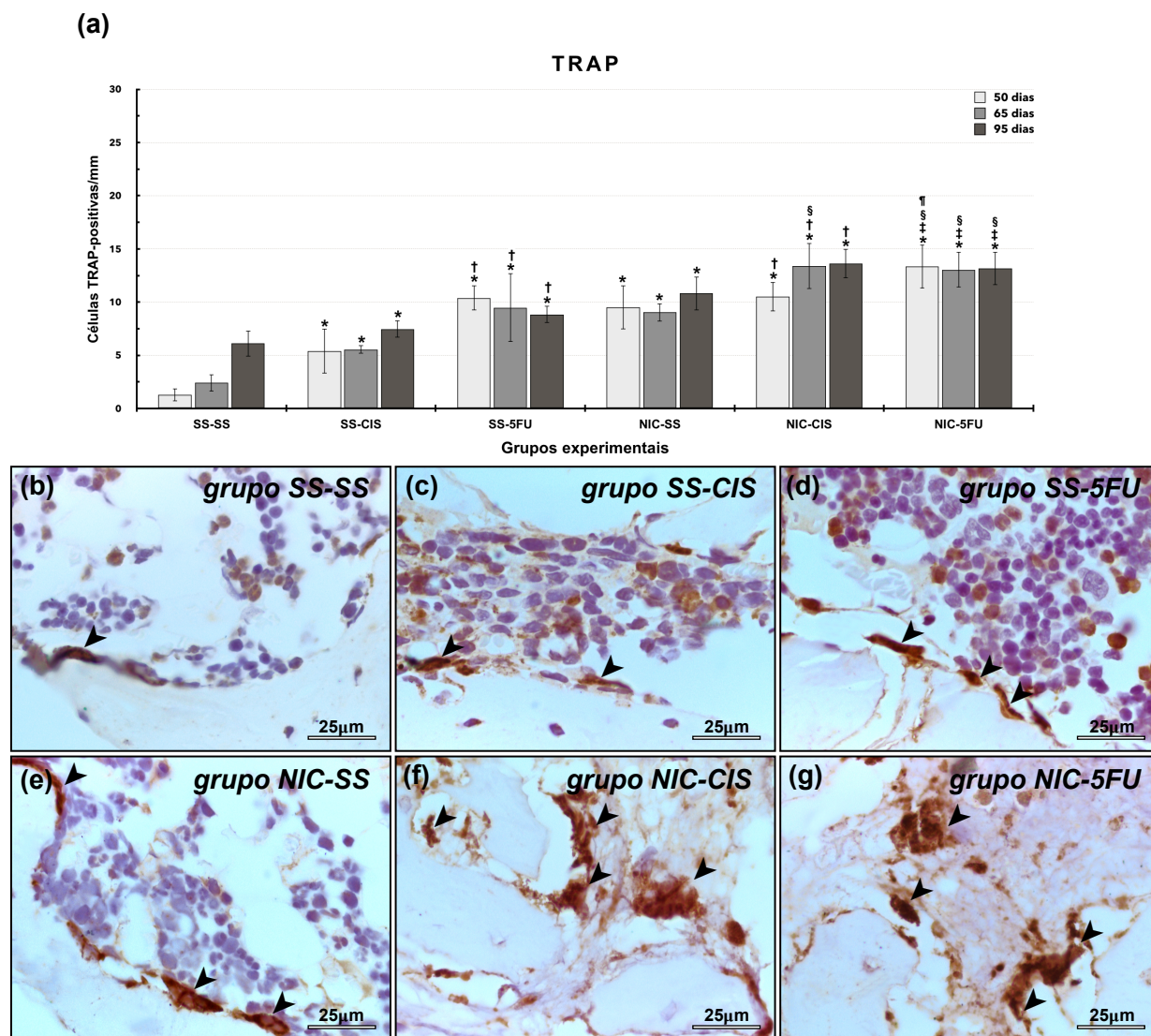


Figura 7: Padrão de imunomarcção de TRAP nos tecidos peri-implantares para cada grupo experimental. (a) médias e desvios padrão ($M \pm DP$) da contagem de células TRAP-positivas/mm. Teste estatístico: ANOVA e Tukey. Símbolos: *, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS-SS no mesmo período ($p \leq 0,05$); †, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS-CIS no mesmo período ($p \leq 0,05$); ‡, diferença estatisticamente significativa com o grupo SS-5FU no mesmo período ($p \leq 0,05$); §, diferença estatisticamente significativa com o grupo NIC-SS no mesmo período ($p \leq 0,05$); ¶, diferença estatisticamente significativa com o grupo NIC-CIS no mesmo período ($p \leq 0,05$). (b-g) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para TRAP e células TRAP-positivas (*setas pretas*) aos 65 dias em SS-SS (b); SS-CIS (c), SS-5FU (d); NIC-SS (e), NIC-CIS (f) e NIC-5FU (g). Contra coloração: hematoxilina de Harris. Barras de escala: 25 µm.

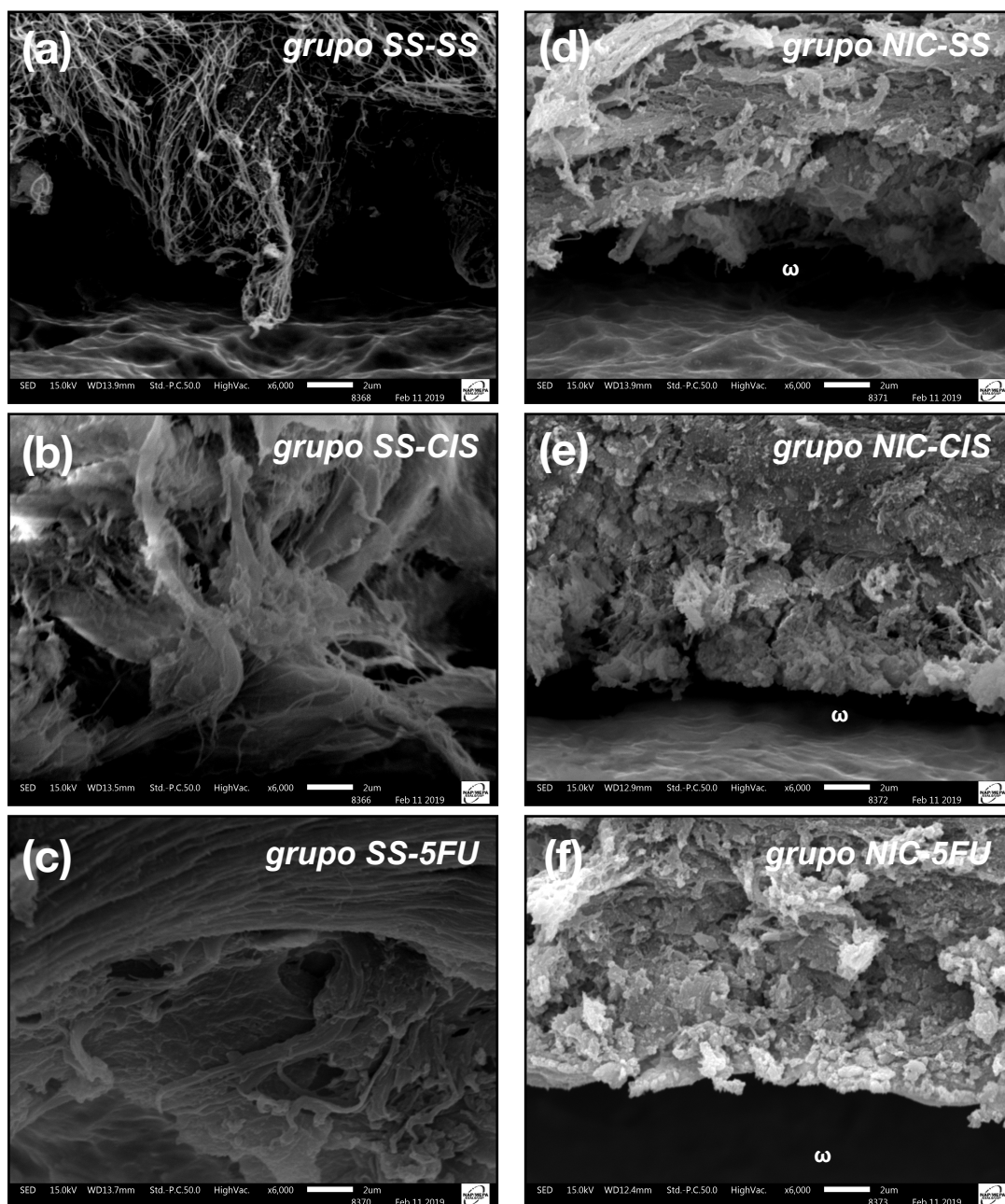
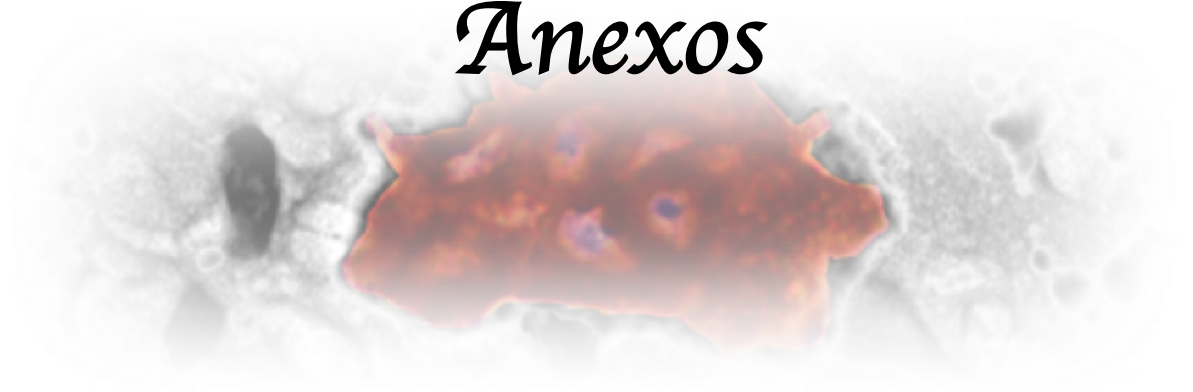


Figura 8: Aspectos ultraestruturais da interface osso/implante para cada grupo experimental. Símbolo: ω , *gap* entre o tecido peri-implantar e a superfície do titânio. (a-f) Fotomicrografias mostrando o padrão de estruturação do tecido peri-implantar aos 65 dias em SS-SS (a); SS-CIS (b), SS-5FU (c); NIC-SS (d), NIC-CIS (e) e NIC-5FU (f). Aumento original: 6000 x. Barras de escala: 2 μ m.

Anexos



Anexo A – Normas para publicação no Periódico “Clinical Oral Implants Research”.

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Submission of Manuscripts, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance.

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>.

Useful Websites: Submission Site, Articles published in Clinical Oral Implants Research, Author Services, Wiley’s 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

Clinical Oral Implants Research conveys scientific progress in the field of implant dentistry and its related areas to clinicians, teachers and researchers concerned with the application of this information for the benefit of patients in need of oral implants. The journal addresses itself to clinicians, general practitioners, periodontists, oral and maxillofacial surgeons and prosthodontists, as well as to teachers, academicians and scholars involved in the education of professionals and in the scientific promotion of the field of implant dentistry.

Clinical Oral Implants Research publishes:

Original research articles of high scientific merit in the field of material sciences, physiology of wound healing, biology of tissue integration of implants, diagnosis and treatment planning, prevention of pathologic processes jeopardizing the longevity of implants, clinical trials on implant systems, stoma-tognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation.

Review articles by experts on new developments in basic sciences related to implant dentistry and clinically applied concepts.

Case reports and case series only if they provide or document new fundamental knowledge.

Novel developments if they provide a technical novelty for any implant system.

Short communications of important research findings in a concise format and for rapid

publication.

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

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 *Clinical Oral Implants Research*. Authors are encouraged to visit [Wiley-Blackwell Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Clinical Oral Implants Research adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

The list of authors should accurately illustrate who contributed to the work and how. All those listed as authors should qualify for authorship according to the following criteria:

1. Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data;
2. Been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content;
3. Given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content; and
4. Agreed to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section (for example, to recognize contributions from people who provided technical help, collation of data, writing assistance, acquisition of funding, or a department chairperson who provided general support). Prior to submitting the article all authors should agree on the order in which their names will be listed in the manuscript.

Additional Authorship Options. Joint first or senior authorship: In the case of joint first authorship, a footnote should be added to the author listing, e.g. 'X and Y should be considered joint first author' or 'X and Y should be considered joint senior author.'

Acknowledgements: Contributions from anyone who does not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version, 2013) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editor reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

Clinical Oral Implants Research requires authors of pre-clinical animal studies submit with their manuscript the Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines checklist.

Clinical Oral Implants Research requires authors of human observations studies in epidemiology to review and submit a STROBE statement. Authors who have completed the ARRIVE guidelines or STROBE checklist should include as the last sentence in the Methods section a sentence stating compliance with the appropriate guidelines/checklist. Checklists should be included in the submission material under “Supplementary Files for Review”. Please indicate on the STROBE checklist the page number where the corresponding item can be located within the manuscript e.g Page 4. Information on PRISMA - TRANSPARENT REPORTING of SYSTEMATIC REVIEWS and META-ANALYSES can be found on <http://www.prisma-statement.org/PRISMAStatement/Default.aspx>

Additional guidance on compliance with various research guidelines can be found on the Guideline Information - Enhancing the Quality and Transparency of Health Research: www.equator-network.org.

The ARRIVE guidelines can be found here: www.nc3rs.org.uk/downloadaddoc.asp?id=1206&page=1357&skin=0

The STROBE checklists can be found here: www.strobe-statement.org/index.php?id=strobe-home

2.3 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 under “Supplementary Files for Review”.

If your study is a randomized clinical trial, you will need to fill in all sections of the CONSORT Checklist. If your study is not a randomized trial, not all sections of the checklist might apply to your manuscript, in which case you simply fill in N/A.

All prospective clinical trials which have a commencement date after the 31st January 2017 must be registered with a public trials registry.

The CONSORT checklist can be downloaded from: mc.manuscriptcentral.com/societyimages/jdr/CONSORT+2010+checklist%5b1%5d.doc

2.4 Conflict of Interest and Source of Funding

Clinical Oral Implants Research requires that all authors (both the corresponding author and co-authors) disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or

stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. If authors are unsure whether a past or present affiliation or relationship should be disclosed in the manuscript, please contact the editorial office at CLROffice@wiley.com. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

The above policies are in accordance with the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals produced by the International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org/>).

It is the responsibility of the corresponding author to have all authors of a manuscript fill out a conflict of interest disclosure form, and to upload all forms together with the manuscript on submission. Please find the form below:

[Conflict of Interest Disclosure Form](#)

(If you encounter any problems when accessing the above form, please copy the link and open the form in an Internet Explorer browser)

2.5 Appeal of Decision

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

2.6 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.

2.7 Copyright Assignment

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere.

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into 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 OnlineOpen 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 OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements(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 FAQs hosted on Wiley Author Services

http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit

<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) 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>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services

http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit

<http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

2.8 OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see

http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at:

https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site

<http://mc.manuscriptcentral.com/coir>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from the Editorial Office at CLRoffice@wiley.com.

3.1. Getting Started

Launch your web browser and go to the journal's online Submission Site:

<http://mc.manuscriptcentral.com/coir>

- Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user.
- If you are creating a new account.
 - After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address

as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.

- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/coir> and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select Corresponding Author Center.

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged in, click the 'Submit a Manuscript' link in the menu bar.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop-down menu next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before sending to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Single Blind Review

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

3.5. Suggest a Reviewer

Clinical Oral Implants 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 one potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the journal editor will choose one or two reviewers as well.

3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.7. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation email after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our email server

(uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.9. Submission of Revised Manuscripts

To submit your revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original research articles of high scientific merit in the field of material sciences, physiology of wound healing, biology of tissue integration of implants, diagnosis and treatment planning, prevention of pathologic processes jeopardizing the longevity of implants, clinical trials on implant systems, stomatognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation.

Review articles by experts on new developments in basic sciences related to implant dentistry and clinically applied concepts. Reviews are generally by invitation only and have to be approved by the Editor-in-Chief before submission.

Case reports and case series, but only if they provide or document new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician.

Novel developments if they provide a technical novelty for any implant system.

Short communications of important research findings in a concise format and for rapid publication.

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

Proceedings of international meetings may also be considered for publication at the discretion of the Editor.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 10 published pages are subject to a charge of USD 160 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters (excluding figures and tables).

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language might choose to have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. 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, Symbols and Nomenclature: The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro*, *in vivo*, *in situ* and other Latin expressions are to be italicised. 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. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. 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 on 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 capitalised 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. If a proprietary name is used, it must be attached when the term is first used.

5.2. Structure

All manuscripts submitted to *Clinical Oral Implants Research* should include Title Page, Abstract, Main Text and Acknowledgements, Tables, Figures and Figure Legends as appropriate.

Title Page: should contain the title of the article, full name(s) of the authors (no more than 6) and institutional affiliation(s), a running title not exceeding 60 letters and spaces, and the name, telephone and fax numbers, email and complete mailing address of the author responsible for correspondence. Please provide a statement listing the contributions made by each of the authors. Example: A.S. and K.J. conceived the ideas; K.J. and R.L.M. collected the data; R.L.M. and P.A.K. analysed the data; and A.S. and K.J. led the writing. The author must list appropriate key words for indexing purposes.

Abstract: should not to exceed 250 words. This should be structured into: objectives, material and methods, results, conclusions, and no other information.

Main Text of Original Research Article should include Introduction, Material and Methods, Results and Discussion.

Introduction: Summarise the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively. State clearly the working hypothesis.

Material and Methods: Material 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. Indicate the statistical methods used, if applicable.

Clinical trial registration number and name of the trial register should be included in the Materials and Methods at the submission stage.

Authors who have completed the ARRIVE guidelines or STROBE checklist should include as the last sentence in the Methods section a sentence stating compliance with the appropriate guidelines/checklist.

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

Discussion: Summarise 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 Short Communications: Short communications are limited to two printed pages including illustrations and references and need not follow the usual division into

material and methods, etc., but should have an abstract.

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 should be acknowledged.

5.3. References

APA – American Psychological Association

References should be prepared according to the Publication Manual of the American Psychological Association (6th edition). This means in text citations should follow the author-date method whereby the author's last name and the year of publication for the source should appear in the text, for example, (Jones, 1998). The complete reference list should appear alphabetically by name at the end of the paper.

A sample of the most common entries in reference lists appears below. Please note that a DOI should be provided for all references where available. For more information about APA referencing style, please refer to the [APA FAQ](#). Please note that for journal articles, issue numbers are not included unless each issue in the volume begins with page one.

Journal article

Beers, S. R. , & De Bellis, M. D. (2002). Neuropsychological function in children with maltreatment-related posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry*, 159, 483–486. doi:[10.1176/appi.ajp.159.3.483](https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.3.483)

Book edition

Bradley-Johnson, S. (1994). *Psychoeducational assessment of students who are visually impaired or blind: Infancy through high school* (2nd ed.). Austin, TX: Pro-ed.

Internet Document

Norton, R. (2006, November 4). How to train a cat to operate a light switch [Video file]. Retrieved from <http://www.youtube.com/watch?v=Vja83KLQXZs>

In-text citations

If your source has two authors, always include both names in each in-text citation.

If your source has three, four, or five authors, include all names in the first in-text citation along with the date. In the following in text citations, only include the first author's name and follow it with et al.

Example:

1st in-text citation: (Gilley, Johnson, Witchell, 2015)

2nd and any other subsequent citations: (Gilley, et al.)

If your source has six or more authors, only include the first author's name in the first citation and follow it with et al. Include the year the source was published and the page numbers (if it is a direct quote).

Example:

1st in-text citation: (Jasper, et al., 2017)

2nd and any other subsequent citations: (Jasper, et al., 2017)

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them 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 (81 mm) after reduction, although in exceptional cases 120mm (double-column) and 168 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. Each figure should have a legend

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.

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

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

Articles should not normally exceed 10 printed pages, including illustrations and references. Additional pages will be charged to the author(s) at the rate of USD 160 per page.

6.2 Accepted Articles

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online shortly after acceptance,

prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance and appear in PDF format only. They are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked and are indexed by PubMed. After the final version article is published (the article of record), the DOI remains valid and can still be used to cite and access the article.

Accepted Articles will be indexed by PubMed; submitting authors should therefore carefully check the names and affiliations of all authors provided in the cover page of the manuscript so it is accurate for indexing. Subsequently, the final copyedited and proofed articles will appear in an issue on Wiley Online Library; the link to the article in PubMed will update automatically.

6.3 Early View

Clinical Oral Implants 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.

6.4 Author Services

Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell'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. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including

6.5 Guidelines for Cover Submissions

If you would like to send suggestions for artwork related to your manuscript to be considered to appear on the cover of the journal, please [follow these general guidelines](#).

6.6 Video Abstracts

A video abstract can be a quick way to make the message of your research accessible to a much larger audience. Wiley and its partner Research Square offer a service of professionally produced video abstracts, available to authors of articles accepted in this journal. You can learn more about it at www.wileyauthors.com/videoabstracts. If you have any questions, please direct them to videoabstracts@wiley.com.

Anexo B – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal



**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 **"Avaliação da influência da quimioterapia com cisplatina ou 5-Fluorouracil sobre o processo de reparo ósseo em implantes osseointegrados instalados em tíbias de ratos expostos ou não à nicotina"**, Processo FOA nº 00595-2017, 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 05 de Julho de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 31 de Julho de 2020.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Agosto de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Evaluation of the influence of chemotherapy with cisplatin or 5-Fluorouracil over the peri-implant bone repair process of osseointegrated implants inserted in tibiae of rats modified or not by nicotine"**, Protocol FOA nº 00595-2017, 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 July 05, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 31, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 30, 2020.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
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