



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

LAÍS KAWAMATA DE JESUS

**Estudo comparativo da osseointegração de implantes
manufaturados em Ti-cp ou Ti6Al4V com ou sem superfície
modificada por ablação a LASER. Caracterização
topográfica, análises biomecânica, histológica e
imunoistoquímica**

Araçatuba – SP
2021

LAÍS KAWAMATA DE JESUS

**Estudo comparativo da osseointegração de implantes
manufaturados em Ti-cp ou Ti6Al4V com ou sem superfície
modificada por ablação a LASER. Caracterização
topográfica, análises biomecânica, histológica e
imunoistoquímica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia (Área de concentração em Implantodontia).

Orientador: Prof. Dr. Francisley Ávila Souza

Araçatuba – SP
2021

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

J58e Jesus, Laís Kawamata de.
Estudo comparativo da osseointegração de implantes
manufaturados em Ti-cp ou Ti6Al4V com ou sem
superfície modificada por ablação a laser: caracterização
topográfica, análises biomecânica, histológica e
imunoistoquímica / Laís Kawamata de Jesus. –
Araçatuba, 2021
84 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientador: Prof. Francisley Ávila Souza

1. Implantes dentários 2. Topografia 3. Itérbio
4. Osseointegração 5. Propriedades de superfície I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatória

*Aos meus pais, **Milton Santiago de Jesus Filho e Olga Tiyoko Kawamata de Jesus**, que estiveram ao meu lado em toda jornada e não mediram esforços para que meus sonhos se realizassem. Sem eles nada disso seria possível. Todo meu amor, admiração, respeito e gratidão a vocês.*

Agradecimentos

Especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço, primeiramente, ao **Gohouzen e a todos os grandes mestres da Honmon Butsuryu Shu do Brasil (HBS)**, por todas as bênçãos recebidas e por me guiar com sabedoria, força e iluminação em toda minha caminhada, me proporcionando momentos e encontros incríveis até os dias de hoje. **NAMUMYOUHOURENGUEKYOU!**

Aos **meu pais – Milton Santiago de Jesus Filho e Olga Tiyoko Kawamata de Jesus**, por todo amor, apoio, educação, admiração e respeito que tem por mim. Eu sou e serei eternamente grata por tudo que fizeram e que ainda vão fazer por mim. Obrigado por serem esses pais incríveis e exemplares que estão em todos os momentos ao meu lado, me apoiando e orientando. Tudo que faço é por vocês. Vocês são minha maior fonte de inspiração para me tornar uma pessoa melhor a cada dia. Amo muito vocês!

Aos **meus familiares**, por sempre confiar, apoiar e acompanhar meu crescimento, torcendo pela minha felicidade e sucesso. Vocês fazem toda minha dedicação e empenho valer a pena. Obrigada por dividir e participar de tantos momentos especiais. Sou muito feliz e grata por terem vocês comigo.

Ao meu professor e orientador, **Prof. Dr. Francisley Ávila Souza**, por partilhar todo seu conhecimento, sendo essencial para meu conhecimento científico e profissional. Sou grata ao senhor por ter me aceito no seu grupo de pesquisa e por toda dedicação, paciência, esforço, apoio, respeito e confiança. Receba minha enorme admiração, respeito e eterna gratidão por todo aprendizado durante os 7 anos de convívio. Meus sinceros agradecimentos por tudo que já me proporcionou. O senhor é um ser humano incrível.

Ao grupo de pesquisa, **Luara Teixeira Colombo, Henrique Hadad e Ana Flávia Piquera Santos**, por terem me acolhido desde o momento que entrei na pós-graduação. Sou muito grata em fazer parte desse grupo, onde tanto aprendi e cresci. Contem comigo sempre!

Aos meus amigos da pós-graduação, **Henrique Hadad, Ana Flávia Piquera Santos, Rodrigo Capalbo da Silva, Luara Teixeira Colombo, Karen Rawen Tonini, Vinícius Ferreira Bizelli, Hiskell Francine Fernandes e Oliveira, Raquel Barroso Parra da Silva, Jaqueline Suemi Hassumi e Lia Kobayashi Oliveira**, com quem dividi vários momentos dentro e fora da faculdade. Muito obrigada por toda ajuda, cuidado e carinho que tiveram comigo. Muito obrigada por serem vocês!

Ao **Henrique Hadad**, que foi essencial nessa etapa da pós-graduação. Eu só tenho a agradecer por amenizar os dias ruins e por melhorar os dias bons. Obrigada por todos os ensinamentos, ajudas, companheirismo e pela sua amizade que foi fundamental desde o dia que iniciei pós-graduação. Eu amo você e a nossa amizade que vai além da pós-graduação, conte comigo sempre. Você merece o mundo!

A **Letícia Gabriella de Souza Rodrigues**, nossa aula de iniciação científica que sempre esteve de prontidão para ajudar nas pesquisas, trazendo muitas risadas e alegria ao grupo. Tenho certeza que independente da área que decidir seguir, você sempre terá muito sucesso. Obrigada por toda ajuda!

Aos **Pós-Graduandos de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, pelo convívio e por compartilharem tantos conhecimentos.

Aos **Professores Programa de pós-graduação e da Disciplina da Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Implantodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, por dividirem seus conhecimentos comigo. Em especial, gostaria de agradecer a **Profa. Dra. Roberta Okamoto**, pelas coordenadas na pesquisa e por toda prontidão e disponibilidade para atender a qualquer dúvida.

A **todos os professores que passaram pela minha vida**, desde o maternal até a pós-graduação, que de alguma forma participaram da minha formação educacional e intelectual. Obrigada por me inspirarem a ser uma pessoa melhor, pelos inúmeros ensinamentos e principalmente por acreditarem na educação do país.

A **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho (FOA/UNESP)”** no nome do atual diretor **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara** e vice-diretor **Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem**, pela atenção e competência na formação de profissionais, pesquisadores e pessoas formadoras de opiniões. Me sinto realizada e honrada por ter me formada nessa Universidade de renome, e prestes a obter o título de mestre. Sou muito grata por tudo que vivenciei dentro dessa Universidade.

As minhas amigas da graduação que hoje são de profissão, **Erika Kiyoko Chiba, Lara Mariano Pinheiro, Roberta Yoko Kanda e Letícia de Freitas Mendes Brasil**, por toda amizade, companheirismo e apoio que me deram durante tantos anos. É um privilégio ter vocês ao meu lado. Mesmo que a correria do dia a dia tenha mudado a rotina de cada uma, sei que posso contar com vocês. Meu coração enche de orgulho e gratidão por ter pessoas maravilhosas como vocês em minha vida. Obrigada por sempre torcerem por mim. Conte comigo sempre, amo vocês!

A **todos** que direta ou indiretamente participaram do meu trabalho e da minha formação, os meus sinceros agradecimentos.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

A **Faculdade de Odontologia de Araçatuba** – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho (FOA/UNESP)” na pessoa do atual diretor **Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara** e vice-diretor **Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho (FOA/UNESP)” com o atual coordenador **Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço a concessão da bolsa durante os dois anos de mestrado, promovendo o apoio financeiro que permitiu a realização desse trabalho.

Aos funcionários do **Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Paulo Roberto Gratão, Marco Aurélio de Oliveira Ianner e Renato Gomes de Oliveira**. Muito obrigada por todo auxílio, eficiência e ensinamentos.

Aos **funcionários da Pós-graduação e da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, pela disponibilidade e prontidão em nos atender durante todo o mestrado.

Ao **Laboratório para Estudo de Tecidos Mineralizados da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, na pessoa da **Profa. Dra. Roberta Okamoto**, por contribuir com este trabalho e tantos outros realizado pelo grupo de pesquisa.

Ao **Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de Araraquara – UNESP**, na pessoa do **Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi**, por contribuir com esse trabalho na preparação das superfícies dos implantes.

Ao **Departamento de Física e Química de Ilha Solteira – UNESP**, na pessoa do técnico **Élton José de Souza**, pela ajuda e disponibilidade para realizar as análises de MEV-EDX.

Aos **Pacientes da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP**, pela confiança depositada. Minha eterna gratidão por me permitirem ser uma pessoa melhor e uma profissional mais capacitada.

“Não dependa do sentimento que faz pensar existir o amanhã. O aprendizado é um fato que deve acontecer hoje.”

(Nissen Shounin V.56)

Jesus LK. Estudo comparativo da osseointegração de implantes manufacturados em Ti-cp ou Ti6Al4V com ou sem superfície modificada por ablação a LASER. Caracterização topográfica, análises biomecânica, histológica e imunoistoquímica [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista, 2021.

RESUMO

A proposição do trabalho foi avaliar o comportamento biológico e mecânico ao tecido ósseo periimplantar em implantes manufacturados em Ti-cp com superfícies usinada (CPMS) e modificada por LASER (CPLS) e implantes manufacturados em Ti6Al4V com superfícies usinada (ALLOYMS) e modificada por LASER (ALLOYLS). As superfícies foram analisadas por meio da microscopia eletrônica de varredura acoplado a espectroscopia por energia dispersiva de raios X (MEV-EDX) previamente a cirurgia experimental. Noventa e seis ($2 \times 4 \text{ mm}$) implantes foram instalados em leitões cirúrgicos fresados nas tíbias direita e esquerda de 48 ratos *Wistar* machos, sendo um implante de cada material (metal) ou superfície instalado em cada tíbia. Análise biomecânica foi realizada por meio do torque de remoção dos implantes em todos os grupos nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório e as tíbias foram seccionadas e processadas para análise histológica e imunoistoquímica. Posteriormente, foi realizada MEV-EDX dos implantes removidos por torque reverso em todos os períodos de análises. Os dados obtidos na análise biomecânica foram submetidos à análise estatística ($p < 0,05$). MEV-EDX antes da instalação dos implantes apresentou diferença entre as superfícies usinadas e modificadas por LASER, independente do metal do implante. O torque de remoção de ALLOYLS foi estatisticamente superior a CPLS, CPMS e ALLOYMS em 14 e 21 dias ($p < 0,05$), bem como CPLS foi estatisticamente superior a CPMS e ALLOYMS. Aos 42 dias CPLS e ALLOYLS apresentaram diferenças estatística quando comparados com CPMS e ALLOYMS ($p < 0,05$), porém não foi observada diferença entre CPLS e ALLOYLS ($p = 0,07$). O MEV-EDX dos implantes removidos por contra-torque evidenciou o recobrimento ósseo total das superfícies de CPLS e ALLOYLS, independente do período analisado e um aumento gradual de recobrimento ósseo nas superfícies de CPMS e ALLOYMS nos períodos de 14, 21 e 42 dias respectivamente, sendo que o CPLS aos 42 dias apresentou característica de tecido ósseo mais maturo. Na análise histológica qualitativa observa-se um tecido ósseo mais maturo, sugerindo aceleração do

processo de reparo ósseo nos grupos CPLS e ALLOYLS. Para análise imunoistoquímica observou-se uma maior expressão de OPN (osteopontina) para os grupos ALLOYLS 14 e 21 dias pós-operatório, surgindo de maior ativação celular. Os implantes com modificação de superfície por ablação a LASER, independente do material manufaturado, proporcionaram importantes modificações físico-químicas na superfície, permitindo melhor enbricamento mecânico com o tecido ósseo e aceleração do processo de osseointegração quando comparados com implantes com superfície usinada.

Palavras-chave: Implante dentário. Topografia. Itérbio. Osseointegração. Propriedades de superfície.

Jesus LK. Comparative study of osseointegration of implants manufactured in cp-Ti or Ti6Al4V with or without modified surface by LASER beam. Topographic characterization, biomechanical, histological and immunohistochemical analyzes [dissertation]. Araçatuba: São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry; 2021.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the biological and mechanical behavior of peri-implant bone tissue in implants manufactured in cp-Ti with machined surfaces (CPMS) and modified by LASER (CPLS) and implants manufactured in Ti6Al4V with machined surfaces (ALLOYMS) and modified by LASER (ALLOYLS). The surfaces were analyzed using scanning electron microscopy coupled with X-ray dispersive energy spectroscopy (SEM-EDX) prior to experimental surgery. Ninety-six (2x4mm) implants were installed in surgical beds milled in the right and left tibias of 48 male *Wistar* rats, one implant of each material (metal) or surface installed in each tibia. Biomechanical analysis was performed using the implant removal torque in all groups in the periods of 14, 21 and 42 days postoperatively and the tibias were sectioned and processed for histological and immunohistochemical analysis. The data obtained in the biomechanical analysis were submitted to statistical analysis ($p < 0.05$). The SEM-EDX before the installation of the implants showed a difference between the surfaces machined and modified by LASER, regardless of the metal of the implant. The removal torque of ALLOYLS was statistically higher than CPLS, CPMS and ALLOYMS in 14 and 21 days ($p < 0.05$), as well as CPLS was statistically higher than CPMS and ALLOYMS. In 42 days CPLS and ALLOYLS showed statistical differences when compared to CPMS and ALLOYMS ($p < 0.05$), however no difference was observed between CPLS and ALLOYLS ($p = 0.07$). The SEM-EDX of the implants removed by removal torque showed the total bone coverage of the surfaces of CPLS and ALLOYLS, regardless of the analyzed period and a gradual increase in bone coverage on the surfaces of CPMS and ALLOYMS in the periods of 14, 21 and 42 days respectively, CPLS in 42 days showed a mature bone tissue. In the qualitative histological analysis, a mature bone can be observed, suggesting an acceleration of the repair process in the CPLS and ALLOYLS groups. For immunohistochemical analysis, a higher expression of OPN (osteopontin) was observed for the ALLOYLS groups in 14 and 21 days, arising from higher cellular activation. The implants with

surface modification by LASER beam, regardless of the material manufactured, provided important physical-chemical modifications on the surface, allowing better mechanical resistance with bone tissue and acceleration of the osseointegration process when compared to implants with machined surface.

Keywords: Dental implants. Topography. Ytterbium. Osseointegration. Surface properties.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxograma de distribuição dos animais em grupos, de acordo com tempos de análises	31
Figura 2 Retalho descolado e exposição do local de eleição para instalação do implante	33
Figura 3 Osteotomia no local de eleição para instalação do implante. (a): Fresa helicoidal 1.3 mm (Neodent, Curitiba, Brasil) (b): Leito receptor do implante após fresagem	33
Figura 4 Instalação dos implantes por meio da chave digital hexagonal de 1.2 mm (Medens, Itu, Brasil) (a): Implante CPMS (b): Implante CPLS (c): Implante ALLOYMS (d): Implante ALLOYLS	34
Figura 5 MEV-EDX do grupo CPMS pré-instalação. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 2.000x, 5.000x e 10.000x respectivamente (e): EDX	39
Figura 6 MEV-EDX do grupo CPLS pré-instalação. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 2.000x, 5.000x e 10.000x respectivamente (e): EDX	40
Figura 7 MEV-EDX do grupo ALLOYMS pré-instalação. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 2.000x, 5.000x e 10.000x respectivamente (e): EDX	40
Figura 8 MEV-EDX do grupo ALLOYLS pré-instalação. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 2.000x, 5.000x e 10.000x respectivamente (e): EDX	41
Figura 9 Gráfico com valores médios e desvio padrão de torque de remoção (N cm) entre os grupos nos períodos de 14, 21 e 42 dias	42
Figura 10 MEV-EDX do grupo CPMS 14 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX	43
Figura 11 MEV-EDX do grupo CPMS 21 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX	44
Figura 12 MEV-EDX do grupo CPMS 42 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX	44
Figura 13 MEV-EDX do grupo CPLS 14 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX	45

- Figura 14 MEV-EDX do grupo CPLS 21 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX 45
- Figura 15 MEV-EDX do grupo CPLS 42 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX 46
- Figura 16 MEV-EDX do grupo ALLOYMS 14 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX 46
- Figura 17 MEV-EDX do grupo ALLOYMS 21 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX 47
- Figura 18 MEV-EDX do grupo ALLOYMS 42 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX 47
- Figura 19 MEV-EDX do grupo ALLOYLS 14 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX 48
- Figura 20 MEV-EDX do grupo ALLOYLS 21 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX 48
- Figura 21 MEV-EDX do grupo ALLOYLS 42 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX 49
- Figura 22 Grupo CPMS nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório (Coloração HE). (a): Análise histológica de 14 dias (b): Cortical óssea superior (40x) (c): Canal medular (40x) (d): Cortical óssea inferior (40x). (e): Análise histológica de 21 dias (f): Cortical óssea superior (40x) (g): Canal medular (40x) (h): Cortical óssea inferior (40x). (i): Análise histológica de 42 dias (j): Cortical óssea superior (40x) (k): Canal medular (40x) (l): Cortical óssea inferior (40x) 50
- Figura 23 Grupo CPLS nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório (Coloração HE). (a): Análise histológica de 14 dias (b): Cortical óssea superior (40x) (c): Canal medular (40x) (d): Cortical óssea inferior (40x). (e): Análise histológica de 21 dias (f): Cortical óssea superior (40x) (g): Canal medular (40x) (h): Cortical óssea inferior (40x).

(i): Análise histológica de 42 dias (j): Cortical óssea superior (40x) (k): Canal medular (40x) (l): Cortical óssea inferior (40x) 52

Figura 24 Grupo ALLOYMS nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório (Coloração HE). (a): Análise histológica de 14 dias (b): Cortical óssea superior (40x) (c): Canal medular (40x) (d): Cortical óssea inferior (40x). (e): Análise histológica de 21 dias (f): Cortical óssea superior (40x) (g): Canal medular (40x) (h): Cortical óssea inferior (40x). (i): Análise histológica de 42 dias (j): Cortical óssea superior (40x) (k): Canal medular (40x) (l): Cortical óssea inferior (40x) 54

Figura 25 Grupo ALLOYLS nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório (Coloração HE). (a): Análise histológica de 14 dias (b): Cortical óssea superior (40x) (c): Canal medular (40x) (d): Cortical óssea inferior (40x). (e): Análise histológica de 21 dias (f): Cortical óssea superior (40x) (g): Canal medular (40x) (h): Cortical óssea inferior (40x). (i): Análise histológica de 42 dias (j): Cortical óssea superior (40x) (k): Canal medular (40x) (l): Cortical óssea inferior (40x) 56

Figura 26 Imunomarcção das proteínas OPN e OC nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório do grupo CPMS. (a) (b) (c): Imunomarcção da proteína OPN nos períodos de 14 (20x), 21 (10x) e 42 (10x) dias pós-operatório respectivamente. (d) (e) (f): Imunomarcção da proteína OC nos períodos de 14 (20x), 21 (10x) e 42 (10x) dias pós-operatório respectivamente. As setas vermelhas indicam a marcação das proteínas. (Aumento de 10x ou 20x) 58

Figura 27 Imunomarcção das proteínas OPN e OC nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório do grupo CPLS. (a) (b) (c): Imunomarcção da proteína OPN nos períodos de 14 (10x), 21 (20x) e 42 (10x) dias pós-operatório respectivamente. (d) (e) (f): Imunomarcção da proteína OC nos períodos de 14 (10x), 21 (20x) e 42 (10x) dias pós-operatório respectivamente. As setas vermelhas indicam a marcação das proteínas. (Aumento de 10x ou 20x) 59

Figura 28 Imunomarcção das proteínas OPN e OC nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório do grupo ALLOYMS. (a) (b) (c): Imunomarcção da proteína OPN nos períodos de 14 (10x), 21 (10x) e 42 (10x) dias pós-operatório respectivamente. (d) (e) (f): Imunomarcção da proteína OC nos períodos de 14 (20x), 21 (10x) e 42 (20x) dias pós-operatório respectivamente. As setas vermelhas indicam a marcação das proteínas. (Aumento de 10x ou 20x) 59

Figura 29 Imunomarcção das proteínas OPN e OC nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório do grupo ALLOYLS. (a) (b) (c): Imunomarcção da proteína OPN nos

períodos de 14 (10x), 21 (10x) e 42 (20x) dias pós-operatório respectivamente. (d) (e) (f): Imunomarcção da proteína OC nos períodos de 14 (10x), 21 (10x) e 42 (20x) dias pós-operatório respectivamente. As setas vermelhas indicam a marcação das proteínas. As setas azuis incidam as linhas cementantes (Aumento de 10x ou 20x) 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Valores médios e desvio padrão de torque de remoção (N cm) dos implantes nos diferentes grupos e respectivos períodos estudados	42
Tabela 2 Escores representativos das imunomarcações, de acordo com a área/quantidade de células positivas para cada expressão dos marcadores OPN e OC em todos os grupos em 14, 21 e 42 dias pós-operatório. Categorizados como leves/discretos (+), moderados (++) ou intensos (+++)	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ALLOYLS	Grupo liga de Titânio-Alumínio-Vanádio com superfície modificada por LASER
ALLOYMS	Grupo liga de Titânio-Alumínio-Vanádio com superfície usinada
C	Carbono
Ca	Cálcio
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPLS	Grupo titânio comercialmente puro com superfície modificada por LASER
CPMS	Grupo titânio comercialmente puro com superfície usinada
DAB	Diaminobenzidina
EDTA	Ácido Etileno-Diamino-Tetracético
EDX	Espectrometria de energia dispersiva de raios X
HE	Hematoxilina-eosina
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LS	Superfície modificada por LASER
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MEV-EDX	Microscopia eletrônica de varredura acoplado a espectroscopia por energia dispersiva de raios X
MS	Superfície usina
O	Oxigênio
OC	Osteocalcina
OPN	Osteopontina
P	Fósforo
PVP-I	Polivinil Pirrolidona Iodo
Ti	Titânio
Ti ₄ Al ₆ V	Liga de Titânio-Alumínio-Vanádio
Ti-cp	Titânio comercialmente puro
Yb: YAG LASER	LASER Itérbio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVO	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4 RESULTADOS	39
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	70
ANEXOS	78

Introdução

1 INTRODUÇÃO*

Reabilitar o paciente com perda dentária, sempre foi um desafio para a odontologia, e mesmo com as políticas de promoção e prevenção em saúde bucal, ainda há grandes necessidades de reposições dentárias. A partir da descoberta da osseointegração, e concomitantemente com o aumento da expectativa de vida, os implantes passaram a ser aceitos como substitutos dentários e desde então a implantodontia vem sofrendo grandes transformações com finalidade de proporcionar novas opções reabilitadoras, como a substituição das próteses removíveis convencionais por próteses sobre implantes.

Logo a osseointegração modificou a odontologia contemporânea em todos seus aspectos. Osseointegração pode ser definida como uma conexão direta, estrutural e funcional entre o osso e a superfície do implante, sem a presença de tecido fibroso na interface osso-implante e capaz de receber cargas mastigatórias provenientes da oclusão dentária.¹

Desde os estudos iniciais de Bränemark, o titânio comercialmente puro (Ti-cp) ainda tem sido o material de escolha para os implantes dentários, devido a sua natureza inerte e biocompatibilidade, maior módulo de elasticidade quando comparado ao tecido ósseo, aliado a uma excelente resistência a corrosão.²⁻⁴ Este metal comercialmente puro (Ti-cp) está disponível nos graus I, II, III e IV. As ligas de titânio foram desenvolvidas para melhoria das propriedades mecânicas do material, e podem ser considerados substitutos viáveis na fabricação de implantes dentários, por apresentarem alta resistência à tração, biocompatibilidade satisfatória e boa resistência a corrosão e desgaste, quando comparados ao titânio comercialmente puro.⁵⁻⁸ A liga de titânio mais utilizada é a titânio/alumínio/vanádio.⁹

O processo de reparo da interface formada entre osso e implante ocorre pela migração de células osteogênicas derivadas da camada medular óssea, incluindo células mesenquimais indiferenciadas, osteócitos e osteoblastos, direto para um arcabouço fornecido pelo coágulo sanguíneo.¹⁰⁻¹² Este processo é determinante para que ocorra a osseointegração.

* Normalizado de acordo com o guideline do Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials (Anexo B)

A literatura tem sugerido várias medidas para acelerar o processo de osseointegração, que dentre elas destaca-se as modificações da macro e microestrutura da superfície dos implantes,^{13,14} em que o objetivo final é aumentar a estabilidade inicial dos implantes, melhorar os níveis de osseointegração em áreas de baixa densidade, como também fazer o carregamento protético mais rápido.¹⁵⁻¹⁷

Atualmente diferentes métodos de texturização de superfície vêm sendo estudadas, dentre elas a modificação da superfície por feixe de LASER, um tratamento de superfície descoberto recentemente, que tem apresentado resultados favoráveis.¹⁸⁻²⁰ Caracterizada por ter um processamento limpo com um elevado grau de pureza, além de ser executado de uma forma controlada e reprodutível.²⁰⁻²³

As modificações de superfície por LASER mais comuns são os gerados por uma mistura de gases contendo dióxido de carbono (CO₂) e o Yb: YAG LASER (LASER Itérbio). Existe uma tendência para o uso do LASER Itérbio devido às vantagens do feixe ser transportado por fibras ópticas flexíveis e a absorção do LASER pelo metal ser maior.¹⁹ Estudos prévios publicados têm demonstrado que a modificação da superfície por LASER Itérbio proporcionou um maior contato osso/implante²⁴⁻²⁶ e valores mais elevados de torque de remoção dos implantes^{22,23} quando comparados aos implantes de superfície usinada.

Diante do exposto, entendeu-se necessário o estudo comparativo do comportamento biológico e mecânico *in vivo* do tecido ósseo periimplantar diante dos implantes manufaturados em Ti-cp com superfícies usinada (CPMS) e modificada por LASER (CPLS) e implantes manufaturados em Ti6Al4V com superfícies usinada (ALLOYMS) e modificada por LASER (ALLOYLS) instalados em tibia de ratos nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório, empregando estudo experimental *in vivo* em ratos.

Justificativa

As modificações nas propriedades morfológicas, químicas e físico-químicas da superfície dos implantes modulam o processo de osseointegração, e este fato vem sendo amplamente pesquisado pela literatura científica. Trabalhos anteriores publicados compararam o processo de reparo ao redor de implantes manufaturdos

em Ti-cp ou manufacturados em Ti6Al4V.^{17,27-29} No entanto, ainda não existe na literatura científica a comparação do processo de reparo ósseo ao redor de implantes manufacturados em Ti-cp ou Ti6Al4V com ou sem a modificação da superfície por ablação a LASER.

Hipótese – Resultados Previstos

Estudos anteriores publicados por este grupo de pesquisa avaliaram que o LASER acelerou o processo de osseointegração nos implantes manufacturados em Ti-cp.^{22-26,30} Logo, acredita-se que a modificação por ablação a LASER module o processo de reparo ao redor de implantes manufacturados Ti6Al4V, reduzindo o período de osseointegração.

Objetivo

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento biológico e mecânico da interface formada entre osso e implantes manufaturados em Ti-cp com superfícies usinada (CPMS) ou modificada por LASER (CPLS) e implantes manufaturados em Ti6Al4V com superfícies usinada (ALLOYMS) ou modificada por LASER (ALLOYLS).

*Materiais e
Métodos*

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e Grupos Experimentais

Para a realização deste trabalho foram utilizados 48 (quarenta e oito) ratos machos adultos da variação *Wistar*, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, com aproximadamente três meses de idade, peso corporal em torno de 350 a 450g, mantidos em biotério próprio da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, com controle da temperatura e luz ambiente, alimentados com ração sólida e água *ad libitum*, durante todo o experimento. Para determinação do poder da amostra foi considerado um nível de significância de 5% (com desvio padrão de 2%), e com um poder de teste de 80%, sendo definindo alpha como 0,05 (oito ratos por grupo) para comparar os diferentes grupos.

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP. O projeto foi delineado de acordo com as diretrizes da ARRIVE guidelines.³¹

Os animais receberam implantes de 2 mm de diâmetro e 4 mm de comprimento (Medens, Itu, Brasil), instalados aleatoriamente com osteotomia realizada na região proximal da tíbia após fresagem padronizada para implantodontia com broca 1.3 mm de diâmetro (Neodent, Curitiba, Brasil) e 4 mm de profundidade. E em seguida foram enquadrados em 4 (quatro) grupos experimentais, de acordo com o material manufaturado (Ti-cp ou Ti6Al4V) e superfície do implante (usinada ou modificada por ablação a LASER):

- **Grupo CPMS** - Os animais receberam implantes manufaturados em Ti-cp grau IV com superfície usinada (Medens, Itu, Brasil).
- **Grupo CPLS** - Os animais receberam implantes manufaturados em Ti-cp grau IV com superfície modificada por LASER (Medens, Itu, Brasil).
- **Grupo ALLOYMS** - Os animais receberam implantes manufaturados em liga Ti6Al4V (ASTM F67) com superfície usinada (Medens, Itu, Brasil).
- **Grupo ALLOYLS** - Os animais receberam implantes manufaturados

em liga Ti6Al4V (ASTM F67) com superfícies modificada por LASER (Medens, Itu, Brasil).

Os mesmos animais foram enquadrados em 3 (três) períodos de eutanásia: 14, 21, 42 dias pós-operatório, compondo oito animais e oito implantes para cada material (metal) e superfície em cada período de avaliação.

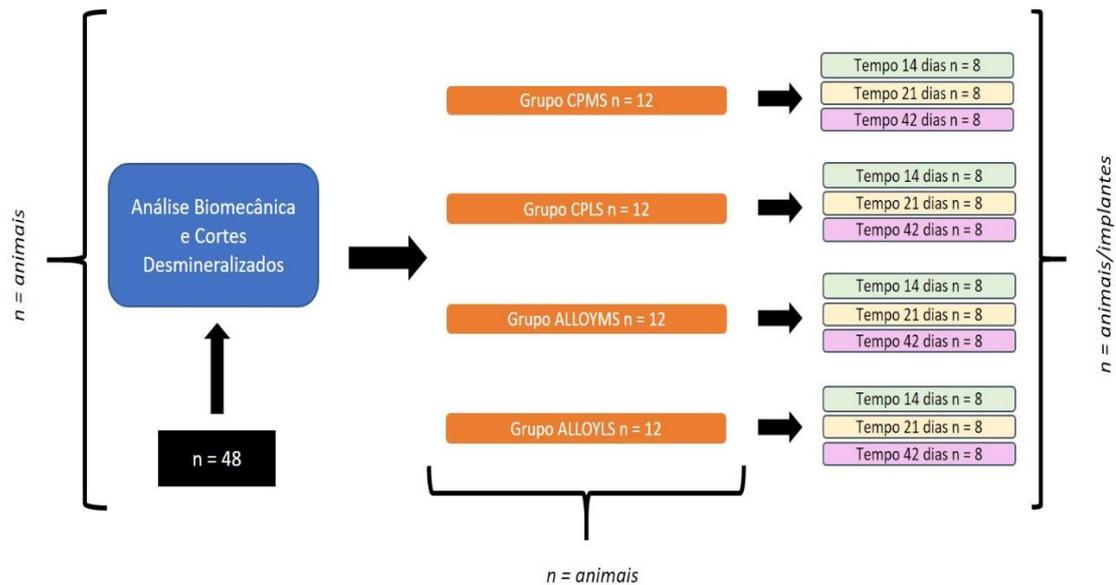


FIGURA 1 Fluxograma de distribuição dos animais em grupos, de acordo com tempos de análises

Preparação das Superfícies Experimentais

Superfície modificada por feixe de LASER (LS):

As preparações das superfícies experimentais foram realizadas no Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de Araraquara – UNESP. Os implantes manufaturados em Ti-cp ou em liga de Ti6Al4V com superfície usinada foram fixados em um torno rotativo, sob o equipamento de LASER Yb: 20W pulsado (Pulsed itérbio Fiber LASER, Sistema OmniMark 20F, Ominitek Tecnologia Ltda, São Paulo, Brasil), com os parâmetros de 140mJ nominal de alimentação e frequência de pulso de 20 KHz. O feixe de LASER foi projetado sobre toda a superfície dos implantes espirais em temperatura ambiente.

Caracterização Topográfica das Superfícies

Previamente a cirurgia experimental foi realizada a análise de caracterização topográfica das superfícies dos implantes nos quatro grupos por meio do microscópio eletrônico de varredura (MEV modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda, 97), acoplado ao sistema de espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDX), para análise semi-quantitativa da composição química das superfícies.

Procedimento Cirúrgico

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP e realizados conforme descrito em trabalhos prévios publicados.³²⁻³⁶

Anestesia

Todos os animais foram mantidos em jejum por dose horas antes do procedimento cirúrgico, seguido da anestesia geral sob sedação com aplicação intramuscular de 50mg/kg de Ketamina (Vetaset® - Fort Dodge Animal Health Ltda., Campinas, SP, Brasil) e 5mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Dopaser - Laboratórios Calier do Brasil Ltda., Osasco SP, Brasil). No intuito de complementação anestésica e hemostasia do campo operatório foi empregada a anestesia local de Cloridrato de Mepivacaína 2% com Epinefrina 1:100.000 (MEPIADRE® - DFL Indústria e Comércio S.A., Jacarepaguá RJ, Brasil).

Acesso Cirúrgico

A região anterior das tíbias direita e esquerda foram tricotomizadas e posteriormente realizada a antisepsia pré-operatória com Polivinil Pirrolidona Iodo degermante (PVP-I 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto). O acesso cirúrgico foi realizado por meio de uma incisão dermo-periosteal empregando-se uma lâmina de bisturi n.15 (Feather, Feather Safety, Japan) montada em cabo de bisturi n.3 (Hu-Friedy, German) na margem anterior da tíbia, iniciada a 5

milímetros abaixo da articulação tíbio-femoral, medindo aproximadamente 2 centímetro de comprimento. Após incisão o retalho foi deslocado, com consequente exposição da tíbia, local de eleição para a osteotomia (Figura 2).

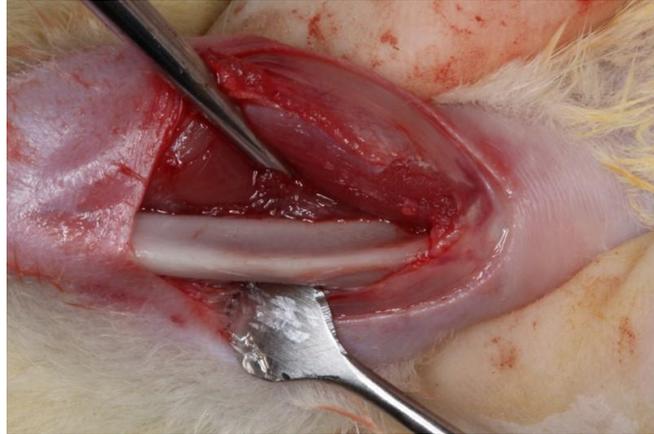


FIGURA 2 Retalho descolado e exposição do local de eleição para instalação do implante

Osteotomia

Após a exposição da tíbia foi realizada osteotomia de 1.3 mm de diâmetro e 4 mm de comprimento em cada tíbia por meio de uma fresa helicoidal (Neodent, Curitiba, Brasil) montada em contra ângulo redutor 20:1 (Kavo do Brasil, Joinvile, Brasil), acoplado em motor elétrico (Kavo do Brasil, Joinvile, Brasil), a uma velocidade de 1200 rpm, sob irrigação constante de solução fisiológica a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) (Figura 3a e 3b).

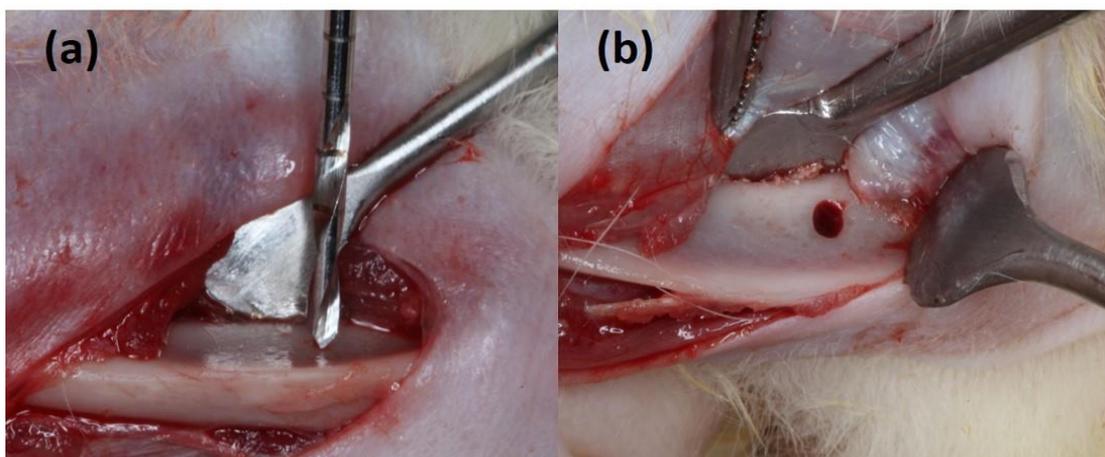


FIGURA 3 Osteotomia no local de eleição para instalação do implante. **(a)**: Fresa helicoidal 1.3 mm (Neodent, Curitiba, Brasil) **(b)**: Leito receptor do implante após fresagem

Instalação dos Implantes

Os implantes foram instalados nas tíbias dos animais, por meio de uma chave digital hexagonal de 1.2 mm (Medens, Itu, Brasil), sendo que cada tíbia recebeu apenas um implante de acordo com o material manufaturado (Ti-cp ou Ti6Al4V) e superfície do implante (usinada ou modificada por LASER) (Figuras 4a; 4b; 4c e 4d) e foram implantados em nível ósseo.

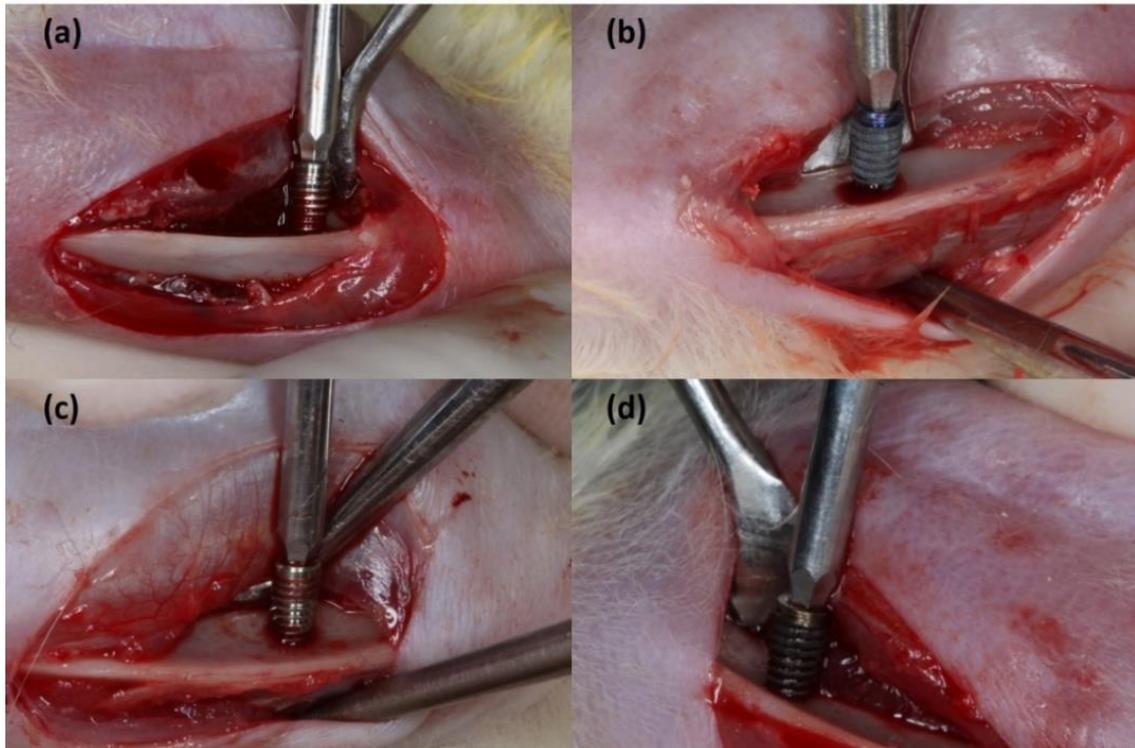


FIGURA 4 Instalação dos implantes por meio da chave digital hexagonal de 1.2 mm (Medens, Itu, Brasil). (a): Implante CPMS (b): Implante CPLS (c): Implante ALLOYMS (d): Implante ALLOYLS

Sutura

O tecido mole foi reposicionado e suturado em planos. A sutura muscular foi realizada com fio absorvível de poligalactina 910 (VICRYL® 5.0, Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil). No plano cutâneo a sutura foi realizada com fio de nylon 5.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil). Após a sutura foi novamente realizada a antisepsia da área com Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico (PVP-I 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto).

Prescrição Pós-Operatória

No pós-cirúrgico os animais receberam injeções intramusculares de Pentabiótico (0,1 ml/kg; Fort Dodge Saúde Animal Ltda) com Dipirona Sódica (1 mg/kg; Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo Brasil).

Eutanásia e Coleta do Material

Nos períodos de 14, 21 e 42 dias os animais foram mantidos em jejum por dose horas antes do procedimento de eutanásia. Para tal foi realizada sedação por injeção intramuscular de 50mg/kg de Ketamina (Vetaset® - Fort Dodge Animal Health Ltda., Campinas, SP, Brasil) e 5mg/kg de Cloridrato de Xilazina (Dopaser - Laboratórios Calier do Brasil Ltda., Osasco SP, Brasil). Após o ato anestésico, foi realizado nos implantes localizados nas tíbias direita e esquerda a análise biomecânica por meio do torque de remoção dos implantes, *in vivo*. Posteriormente foi realizada a eutanásia com dose excessiva anestésica com Tiopental Sódico, 150mg/kg (Cristália Ltda., Itapira, SP, Brasil), em seguida as tíbias direita e esquerda foram seccionadas, o tecido mole excedente eliminado, e fixadas em formol neutro tamponado a 10% (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltd., Catanduva, SP, Brazil).

Forma de Análise dos Resultados

Análise Biomecânica – Torque de Remoção dos Implantes

Os implantes foram removidos por meio de um torquímetro digital (HOMINS, São Paulo, Brasil) acoplado em chave digital de 1.2 mm (Medens, Itu, Brasil). Foi mensurado em N cm o valor necessário para a remoção do implante.^{23,24} Os valores dos 4 grupos compondo oito valores por cada material (metal) e superfície em cada período de eutanásia foram anotados e tabulados para posterior análise estatística.

Caracterização Topográfica da Superfície dos Implantes Removidos por Contra-Torque

A topografia da superfície dos implantes removidos pela análise de contra-torque nos períodos de 14, 21 e 42 dias foi realizada por meio do microscópio eletrônico de varredura (MEV modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda, 97), acoplado ao sistema de espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDX), para análise semi-quantitativa do tecido neoformado.^{22,23}

Análise Histológica Qualitativa

Após a eutanásia dos animais as tíbias direita e esquerda foram seccionadas e fixadas em formol neutro tamponado a 10% (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltd., Catanduva, SP, Brazil) e posteriormente levadas para o processo de descalcificação em EDTA (Ácido Etileno-Diamino-Tetracético, Merck) a 20% dissolvida em água deionizada por um período de 70 dias em temperatura ambiente. Após o término da etapa de descalcificação, o tecido ósseo ao redor do leito receptor do implante removido pelo contra-torque foi reduzido com margens de 20mm ao redor de toda área negativa do implante. As tíbias foram desidratadas usando uma sequência crescente de álcoois, seguido da diafanização em xilol e embebidas em parafina para obtenção de cortes transversais com espessura de 5 µm para montagem das lâminas previamente gelatinizadas. Posteriormente foram submetidas ao processamento de coloração com hematoxilina-eosina (HE, Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA) no laboratório de Histologia do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. A leitura foi capturada em microscopia óptica e em seguida foi realizada análise histológica qualitativa.

Análise Imunoistoquímica

Os cortes seguintes das amostras coradas por hematoxilina-eosina (HE, Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA) de cada grupo e período de estudo, foram separados em lâminas silanizadas para posterior análise imunoistoquímica para cada

proteína.

Os anticorpos primários utilizados foram contra Osteopontina – OPN (Goat anti-opn – Santa Cruz Biotechnology) e Osteocalcina OC (Goat anti-oc – Santa Cruz Biotechnology). O método de detecção usado foi imunoperoxidase, utilizando como cromógeno a Diaminobenzidina (DAB – Sigma, St. Louis, MO, USA).

As análises foram realizadas em microscopia óptica para observar a citoarquitetura do tecido periimplantar nas quatro superfícies estudadas, bem como a expressão das proteínas OPN e OC. A imunomarcação das proteínas foi quantificada por meio de escores, conforme apresentado abaixo:

- Marcação ausente (escore “–”) – representa ausência de marcação positiva;
- Marcação leve/discreta (escore “+”) – quando 25% da área de interesse apresenta marcação positiva;
- Marcação moderada (escore “++”) – quando 50% da área de interesse apresenta marcação positiva;
- Marcação intensa (escore “+++”) – quando 75% da área de interesse apresenta marcação positiva.

Após essas etapas, foi realizada a análise qualitativa da expressão da imunomarcação das proteínas a serem avaliadas (OPN e OC).^{37,38}

Análise Estatística

A análise foi realizada no software Sigma Plot 12.0 (Exakt Graph and Data Analysis). Os valores obtidos na análise biomecânica foram tabulados e levados a análise estatística (TWO-AWAY ANOVA) e submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da homogeneidade de distribuição, seguido do teste de múltiplas comparações de Holm-Sidak ($p < 0,05$).

Resultados

4 RESULTADOS

Caracterização Topográfica das Superfícies dos Implantes Antes da Instalação

A microscopia eletrônica de varredura das superfícies analisadas previamente a cirurgia experimental demonstrou diferenças topográficas quando comparado as superfícies usinadas (MS) com as superfícies modificadas por LASER (LS), independente do processo de manufatura do implante.

As superfícies CPMS e ALLOYMS apresentaram topografias de superfícies lisas, com discretas ranhuras e restos de usinagem (Figuras 5a, 5b, 5c, 5d e 7a, 7b, 7c e 7d). Enquanto as superfícies CPLS e ALLOYLS apresentaram topografias com padrões morfológicos de subtração, apresentando rugosidades homogêneas nas superfícies, semelhantes a favo de mel (Figuras 6a, 6b, 6c, 6d e 8a, 8b, 8c e 8d). No entanto quando se observou CPLS e ALLOYLS em maior aumento pode-se notar a presença de rugosidades nas superfícies dos implantes em escala nanométrica e uma pequena diferença no padrão de rugosidade (Figuras 6d e 8d). Este fato pode ser explicado pela maior dureza e resistência mecânica da liga Ti6Al4V.

A análise por EDX não revelou qualquer contaminação das superfícies analisadas, apresentando picos de Ti para CPMS (Figura 5e) e de Ti e O para CPLS (Figura 6e); para ALLOYMS observou-se picos de Ti, Al e V (Figura 7e) e de Ti, Al, V e O para ALLOYLS (Figura 8e). A presença de picos de oxigênio para os grupos CPLS e ALLOYLS (Figuras 6e e 8e) foi resultado das modificações das superfícies.

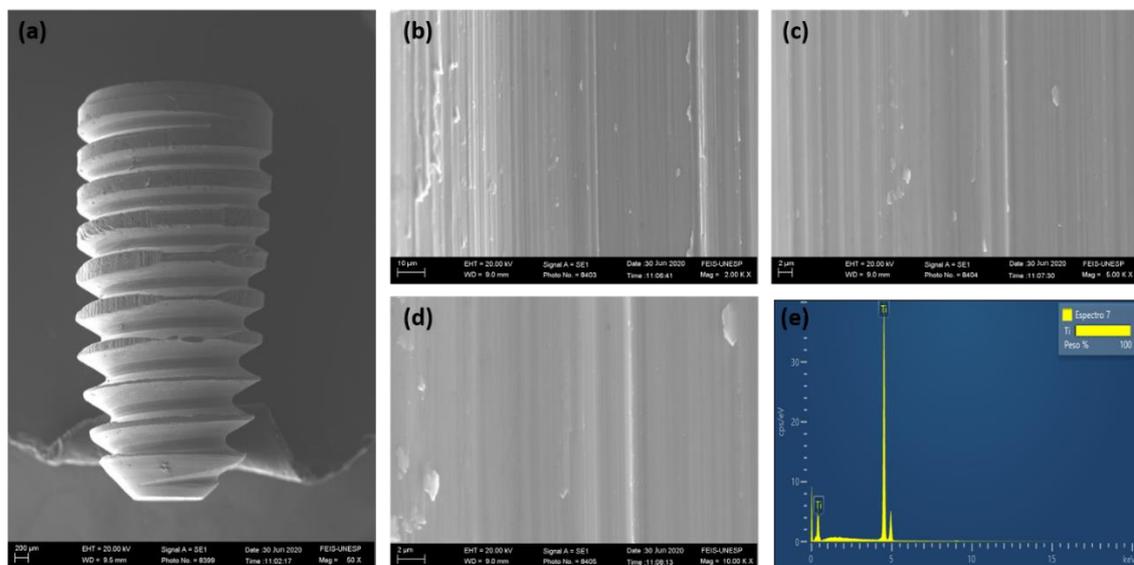


FIGURA 5 MEV-EDX do grupo CPMS pré-instalação. **(a) (b) (c) (d)**: MEV em aumentos de 50x, 2.000x, 5.000x e 10.000x respectivamente **(e)**: EDX

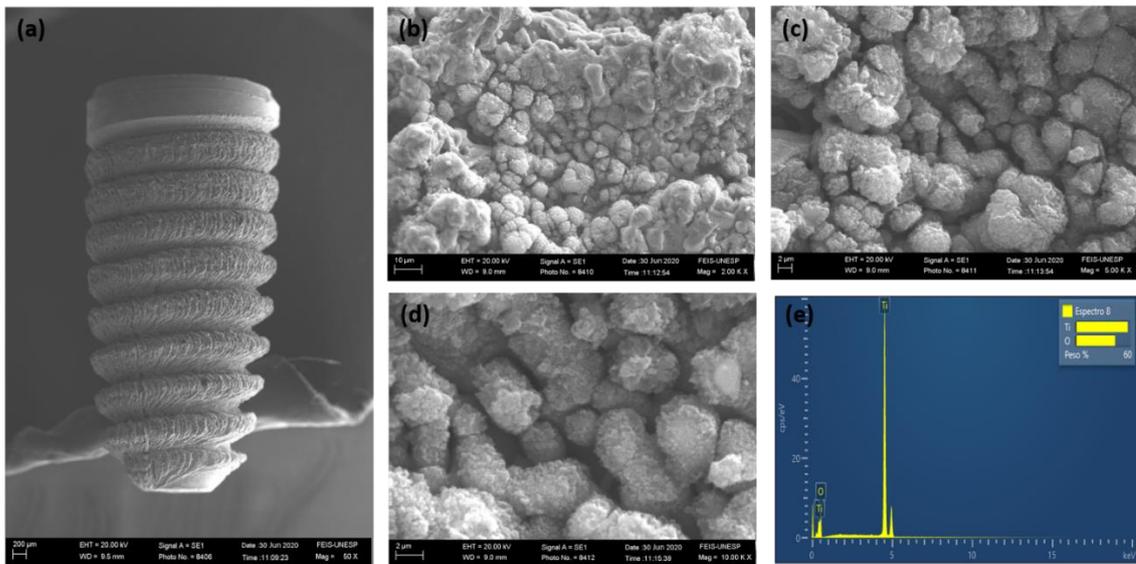


FIGURA 6 MEV-EDX do grupo CPLS pré-instalação. **(a) (b) (c) (d):** MEV em aumentos de 50x, 2.000x, 5.000x e 10.000x respectivamente **(e):** EDX

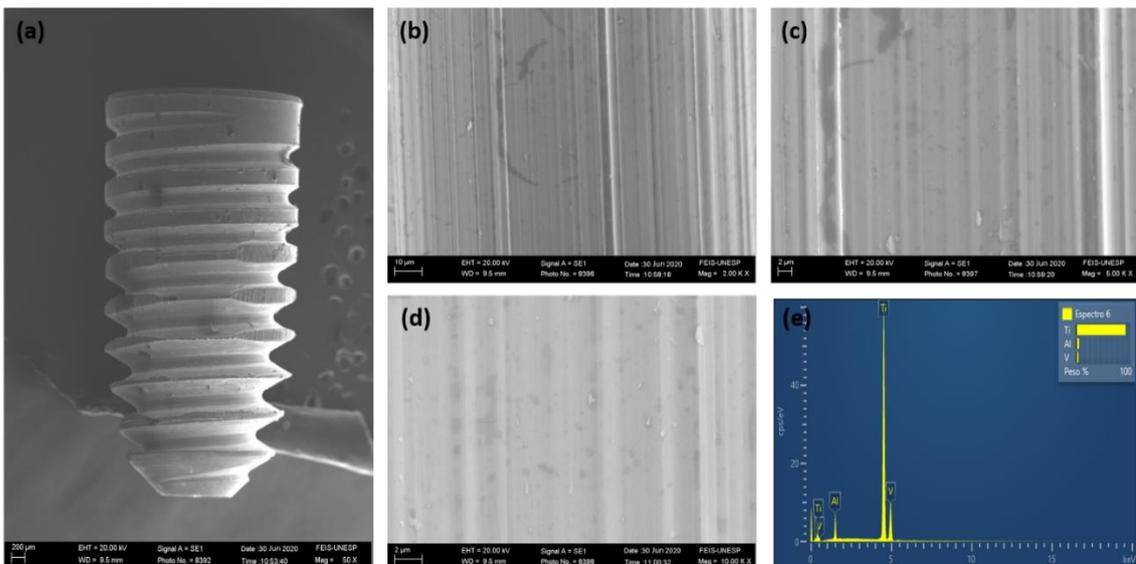


FIGURA 7 MEV-EDX do grupo ALLOYMS pré-instalação. **(a) (b) (c) (d):** MEV em aumentos de 50x, 2.000x, 5.000x e 10.000x respectivamente **(e):** EDX.

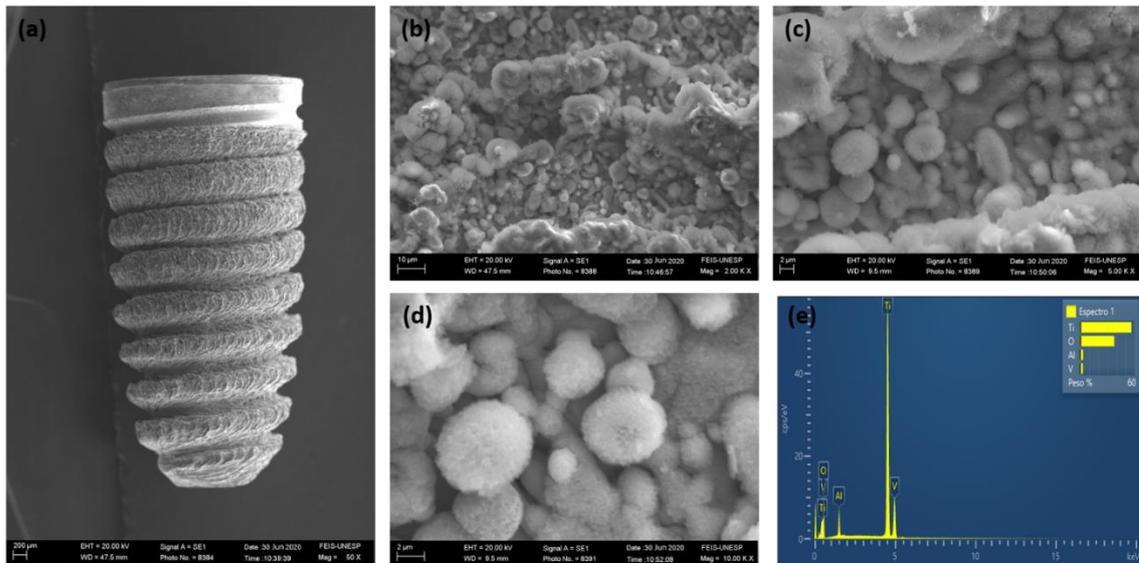


FIGURA 8 MEV-EDX do grupo ALLOYLS pré-instalação. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 2.000x, 5.000x e 10.000x respectivamente (e): EDX

Análise Biomecânica – Remoção dos Implantes por Torque de Remoção

Foi observada diferença estatística no grupo ALLOYLS quando comparado com CPMS ($p < 0,001$) e ($p < 0,001$), CPLS ($p = 0,012$) e ($p = 0,003$), e ALLOYMS ($p < 0,001$) e ($p < 0,001$) nos períodos de 14 e 21 dias respectivamente; e no grupo CPLS quando comparado com CPMS ($p = 0,009$) e ($p < 0,001$), e ALLOYMS ($p < 0,002$) e ($p < 0,001$) em 14 e 21 dias pós-operatório respectivamente. E aos 42 dias observou-se diferença estatística entre o grupo ALLOYLS quando comparado com os grupos CPMS ($p < 0,001$) e ALLOYMS ($p < 0,001$); e entre o grupo CPLS quando comparado com os grupos CPMS ($p < 0,001$) e ALLOYMS ($p < 0,001$) (Tabela 1 e Figura 9).

TABELA 1 Valores médios e desvio padrão de torque de remoção (N cm) dos implantes nos diferentes grupos e respectivos períodos estudados

	CPMS	CPLS	ALLOYMS	ALLOYLS
14 dias	4.36 ± 1.22 <i>Aa</i>	7.84 ± 1.02 <i>Ab</i>	3.58 ± 1.05 <i>Aa</i>	11.36 ± 1.80 <i>Ac</i>
21 dias	4.97 ± 1.53 <i>Aa</i>	11.56 ± 2.19 <i>Bb</i>	5.77 ± 1.27 <i>Aa</i>	15.50 ± 3.16 <i>Bc</i>
42 dias	8.43 ± 2,06 <i>Ba</i>	20.90 ± 3.64 <i>Cb</i>	6.25 ± 2.31 <i>Aa</i>	18.35 ± 4.48 <i>Cb</i>

Letras maiúsculas distintas representam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tempos no mesmo grupo, dentro de cada coluna.

Letras minúsculas distintas representam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos no mesmo tempo, dentro de cada linha.

Análise Biomecânica

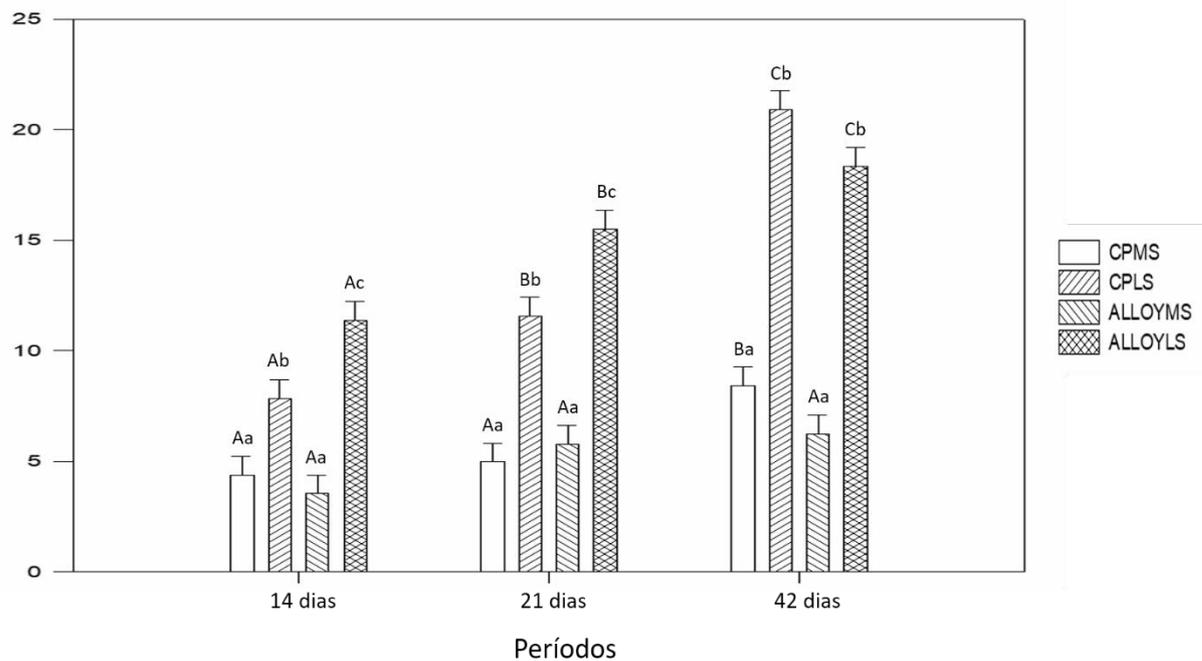


FIGURA 9 Gráfico com valores médios e desvio padrão de torque de remoção (N cm) entre os grupos nos períodos de 14, 21 e 42 dias

Letras maiúsculas distintas representam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tempos no mesmo grupo.

Letras minúsculas distintas representam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos no mesmo tempo.

Caracterização Topográfica da Superfície dos Implantes Removidos por Contra-Torque

Nos grupos CPMS e ALLOYMS a análise das superfícies dos implantes removidos por contra-torque aos 14 dias apresentaram baixos níveis de recobrimento ósseo praticamente desprezíveis (Figuras 10a e 16a). Aos 21 dias observou-se um maior nível de recobrimento ósseo (Figuras 11a, 11b, 17a e 17b) que aumentou progressivamente aos 42 dias (Figuras 12a e 18a). Para os grupos CPLS e ALLOYLS, pode-se observar o total recobrimento ósseo nas superfícies dos implantes, independente do tempo de estudo (Figuras 13, 14, 15, 19, 20 e 21), sendo que o grupo CPLS aos 42 dias apresentou característica de tecido ósseo mais maturo (Figura 15d).

O EDX mostrou picos de Ti, C, Ca, P e O para CPMS e CPLS em todos os períodos de estudo. ALLOYMS apresentou picos de Ti, Al, V, C e O aos 14 dias, aos 21 dias picos de Ti, Al, V, C, Ca e O, e aos 42 dias picos de Ti, Al, V, C, Ca, P e O. Para o grupo ALLOYLS foi possível observar picos de Ti, Al, V, Ca, P e O aos 14 dias e nos períodos de 21 e 42 dias picos de Ti, Al, V, C, Ca, P e O. No entanto os picos de Ca, P e O foram maiores para CPLS e ALLOYLS.

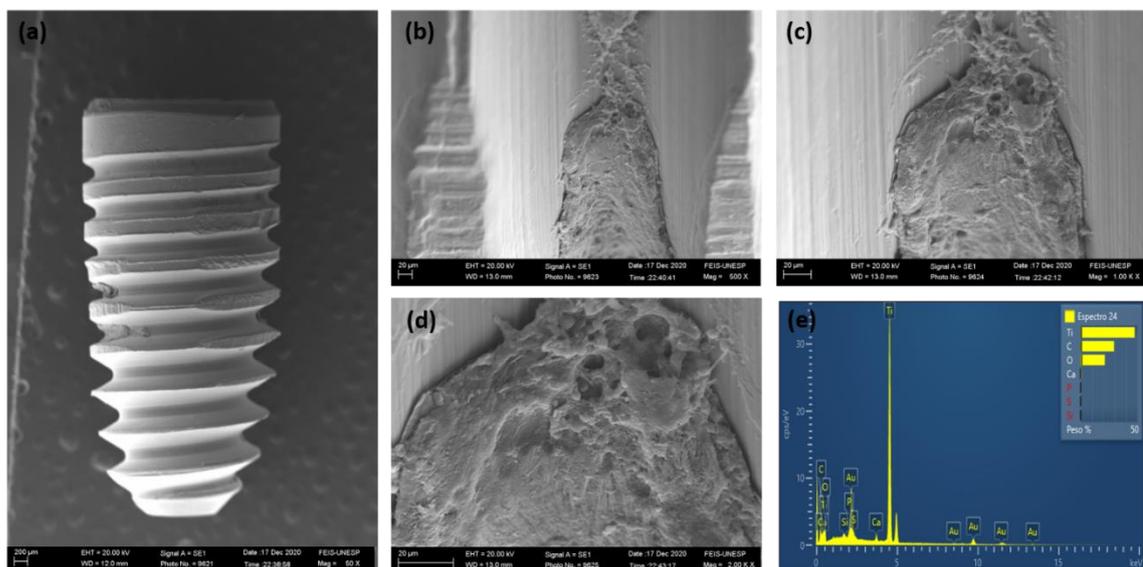


FIGURA 10 MEV-EDX do grupo CPMS 14 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX

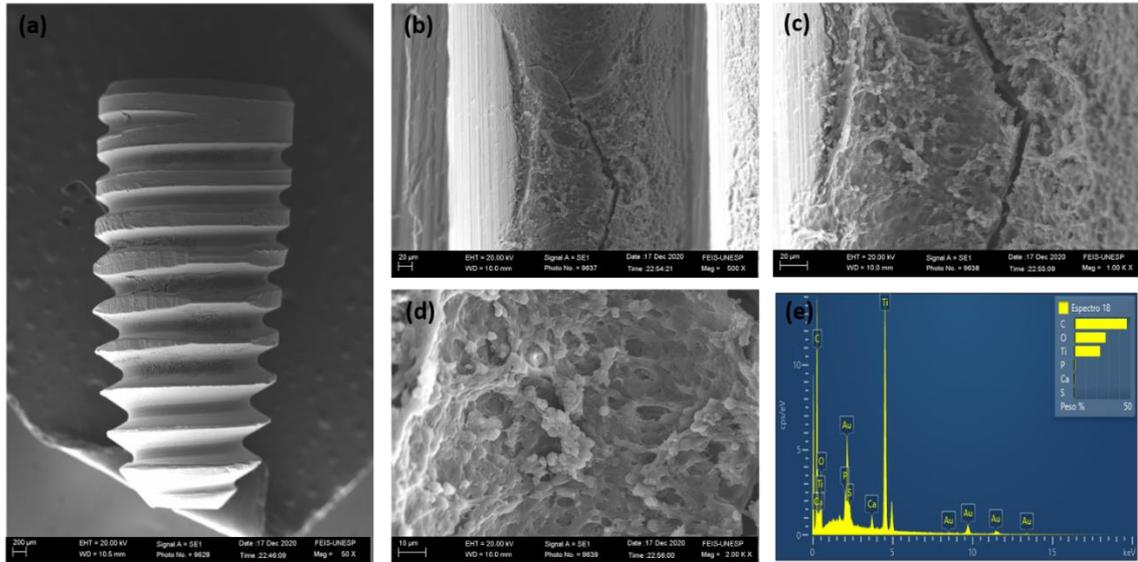


FIGURA 11 MEV-EDX do grupo CPMS 21 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX

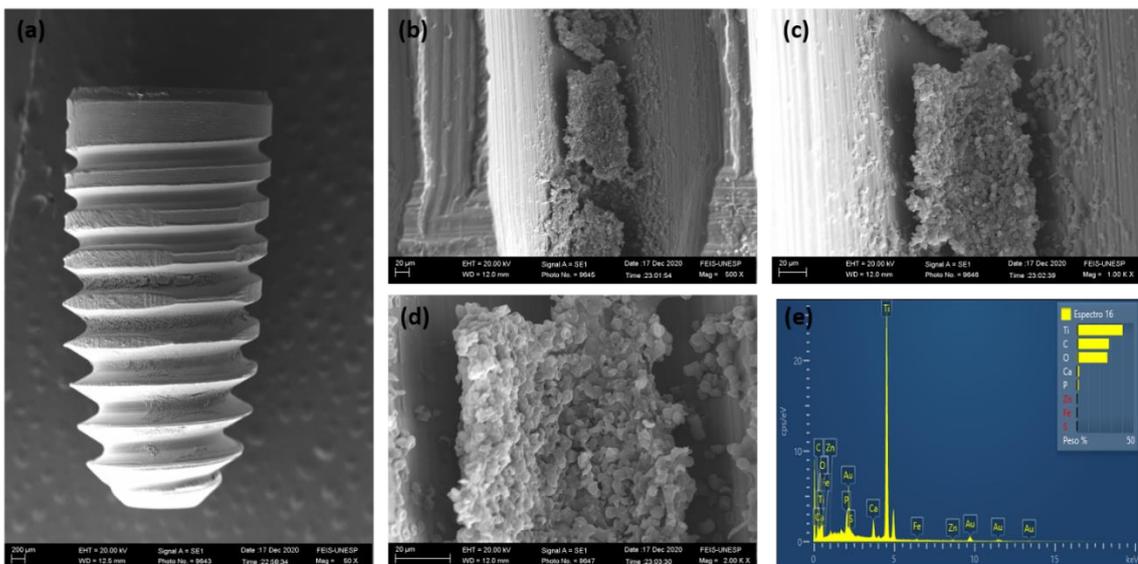


FIGURA 12 MEV-EDX do grupo CPMS 42 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX

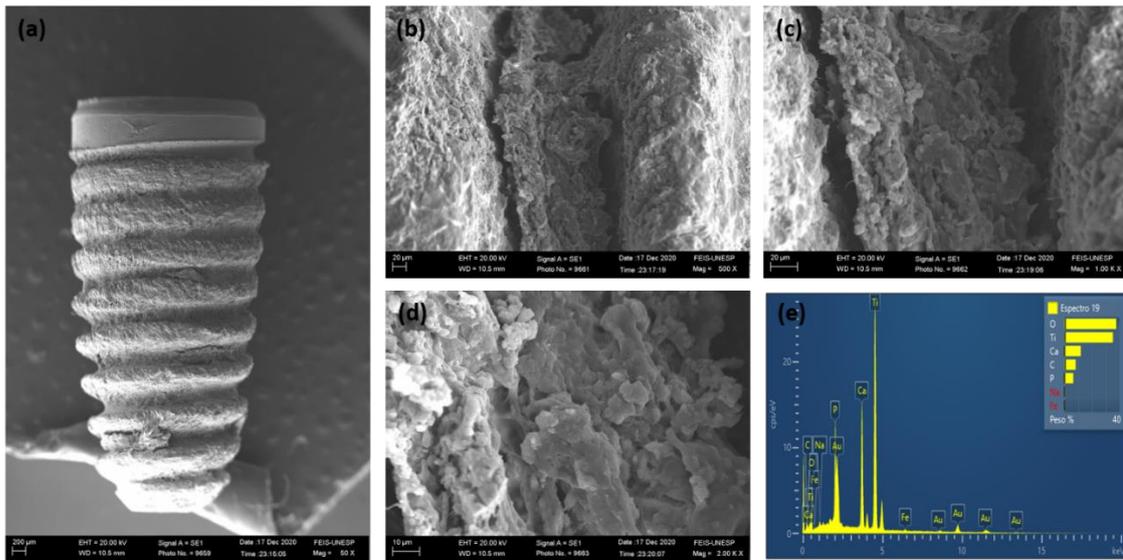


FIGURA 13 MEV-EDX do grupo CPLS 14 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX

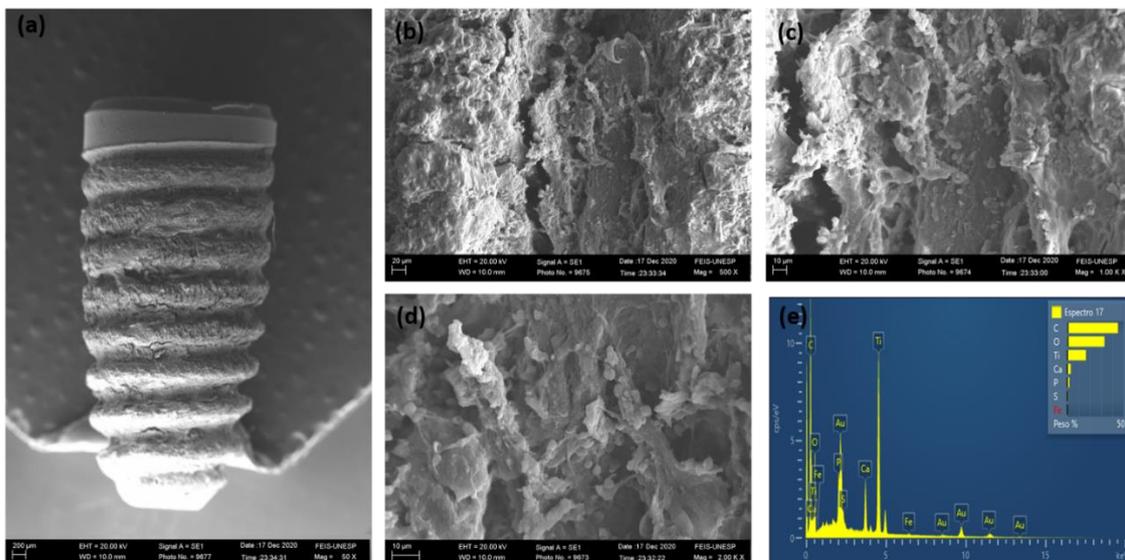


FIGURA 14 MEV-EDX do grupo CPLS 21 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX

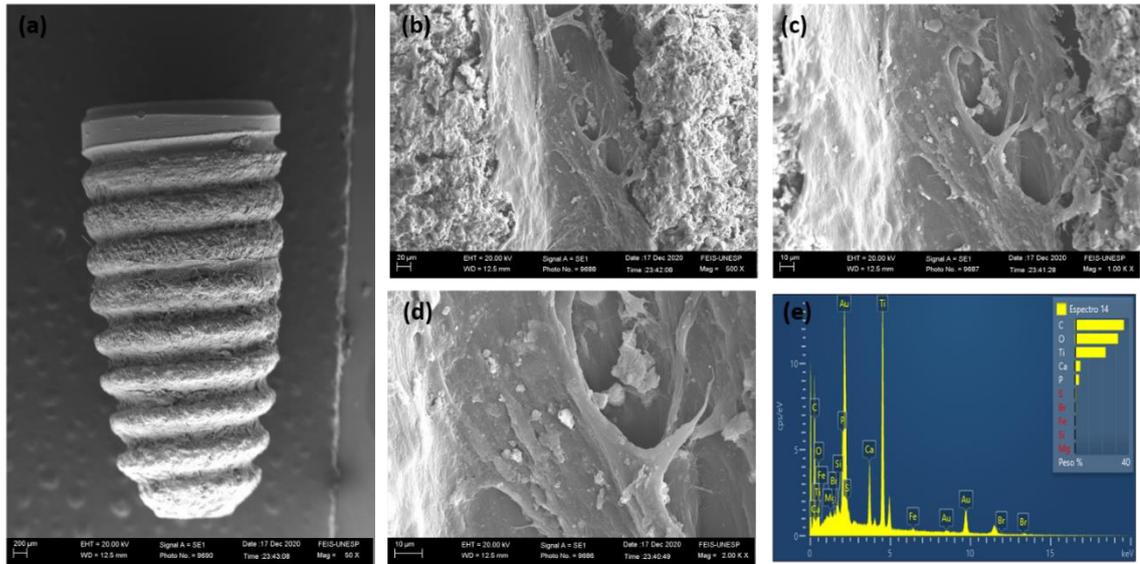


FIGURA 15 MEV-EDX do grupo CPLS 42 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX

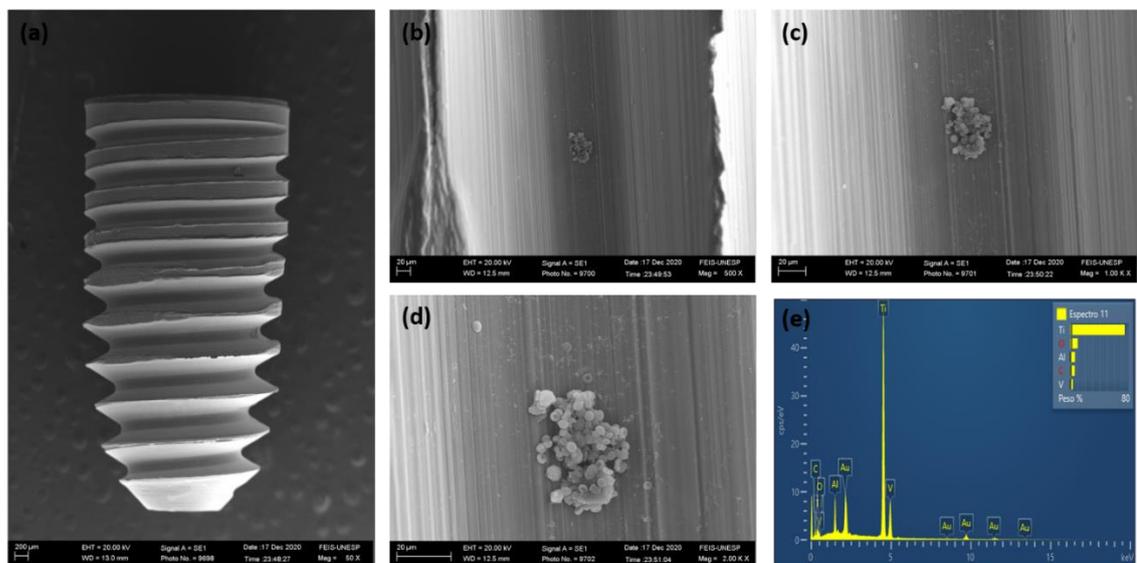


FIGURA 16 MEV-EDX do grupo ALLOYMS 14 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX

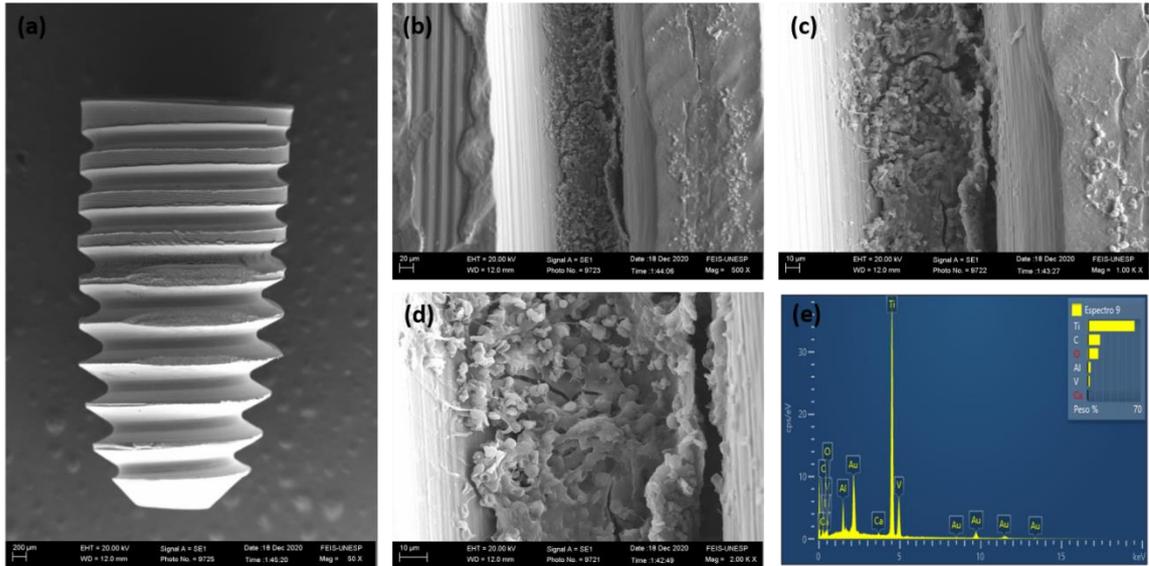


FIGURA 17 MEV-EDX do grupo ALLOYMS 21 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX

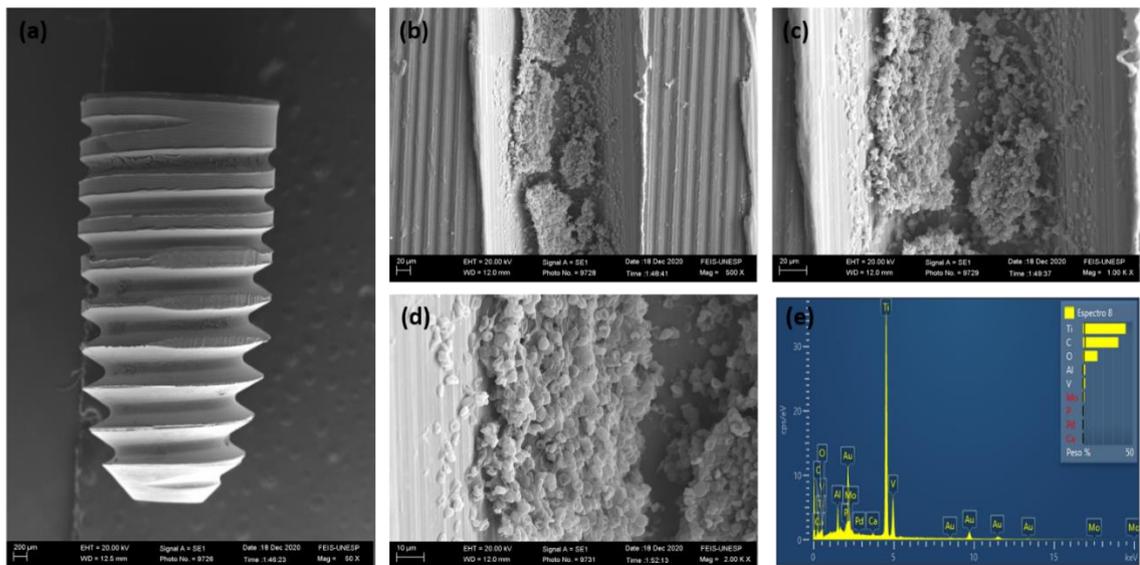


FIGURA 18 MEV-EDX do grupo ALLOYMS 42 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX

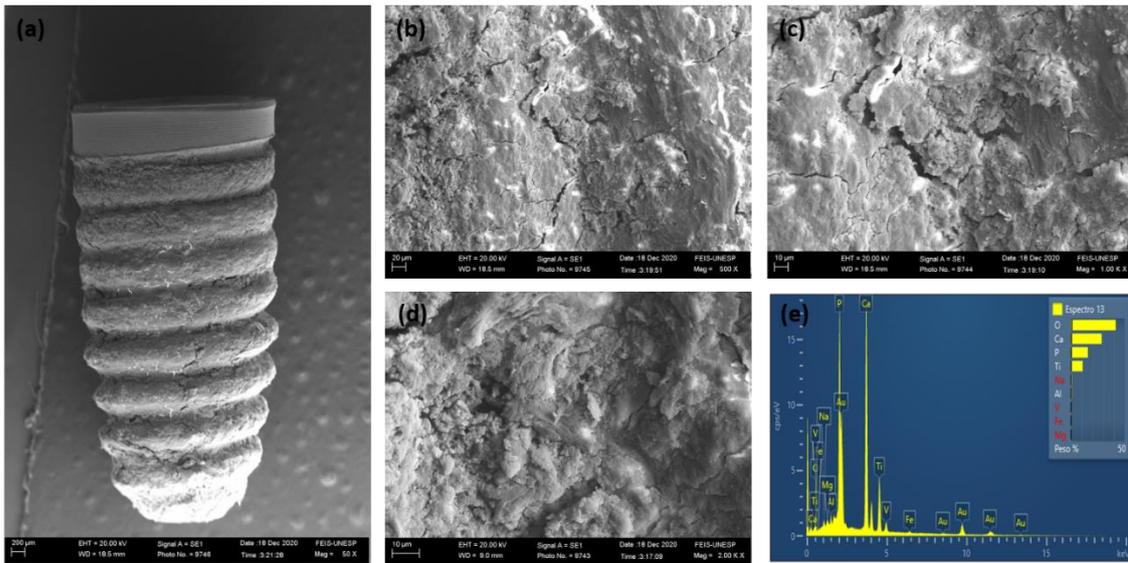


FIGURA 19 MEV-EDX do grupo ALLOYLS 14 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX

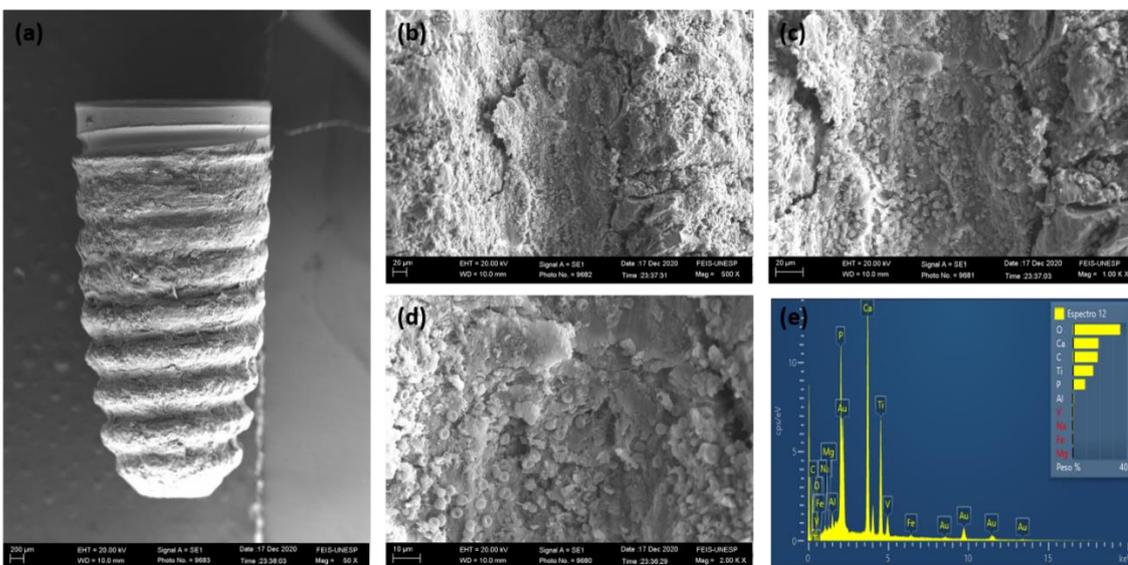


FIGURA 20 MEV-EDX do grupo ALLOYLS 21 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX

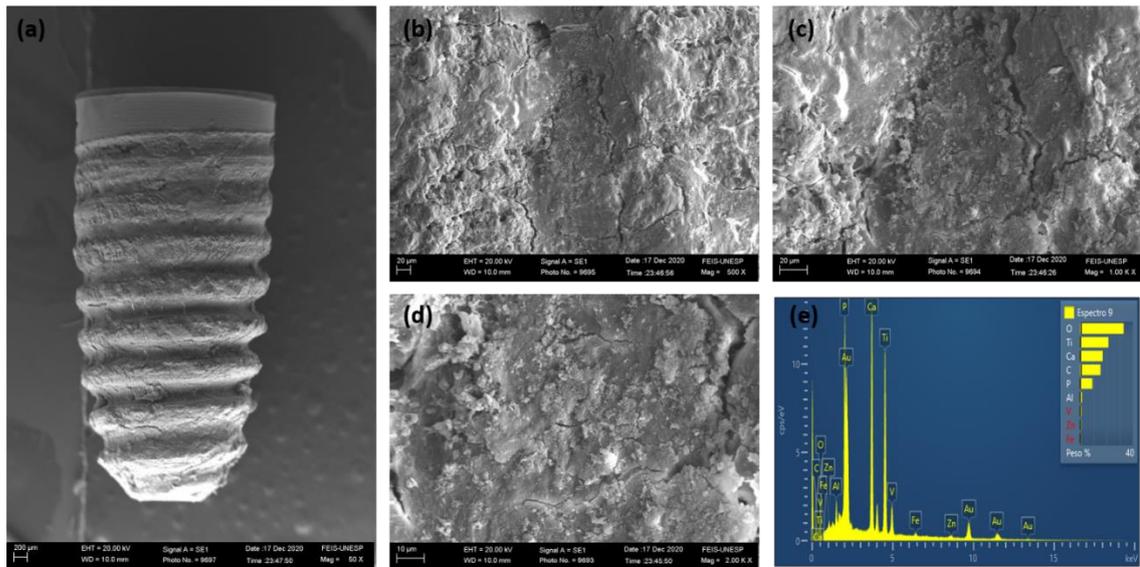
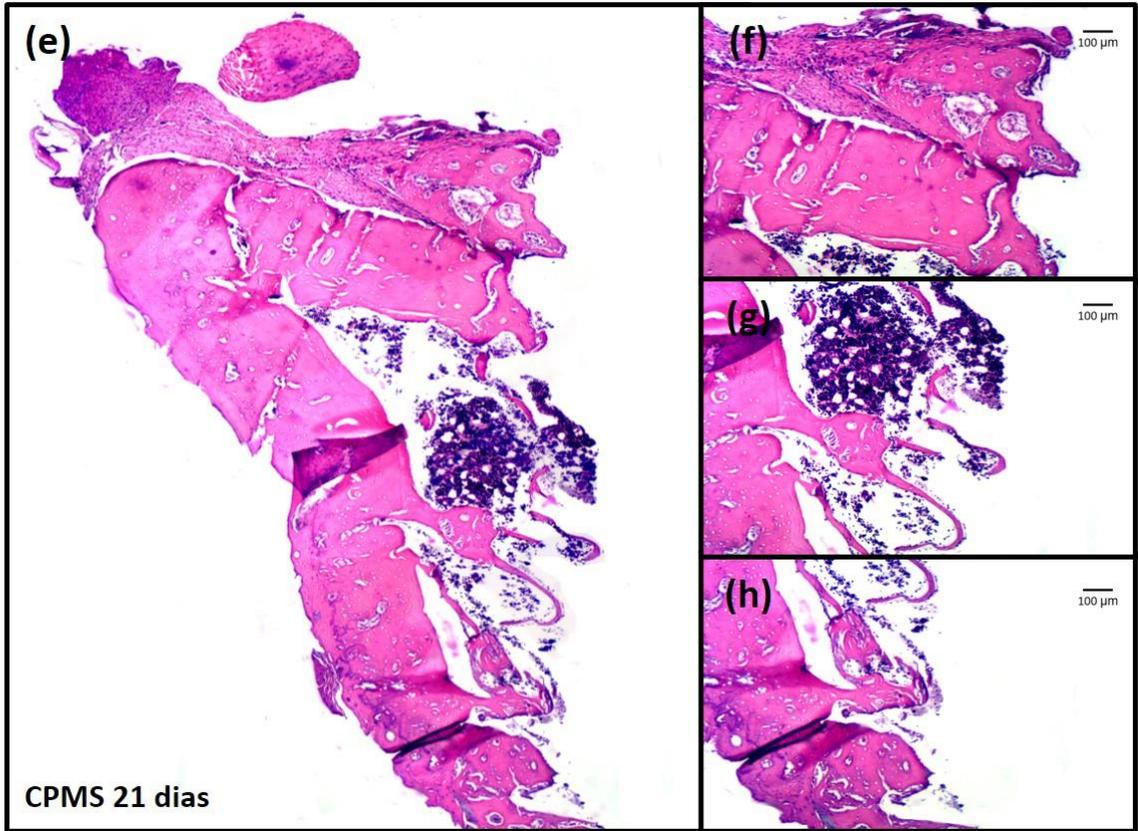
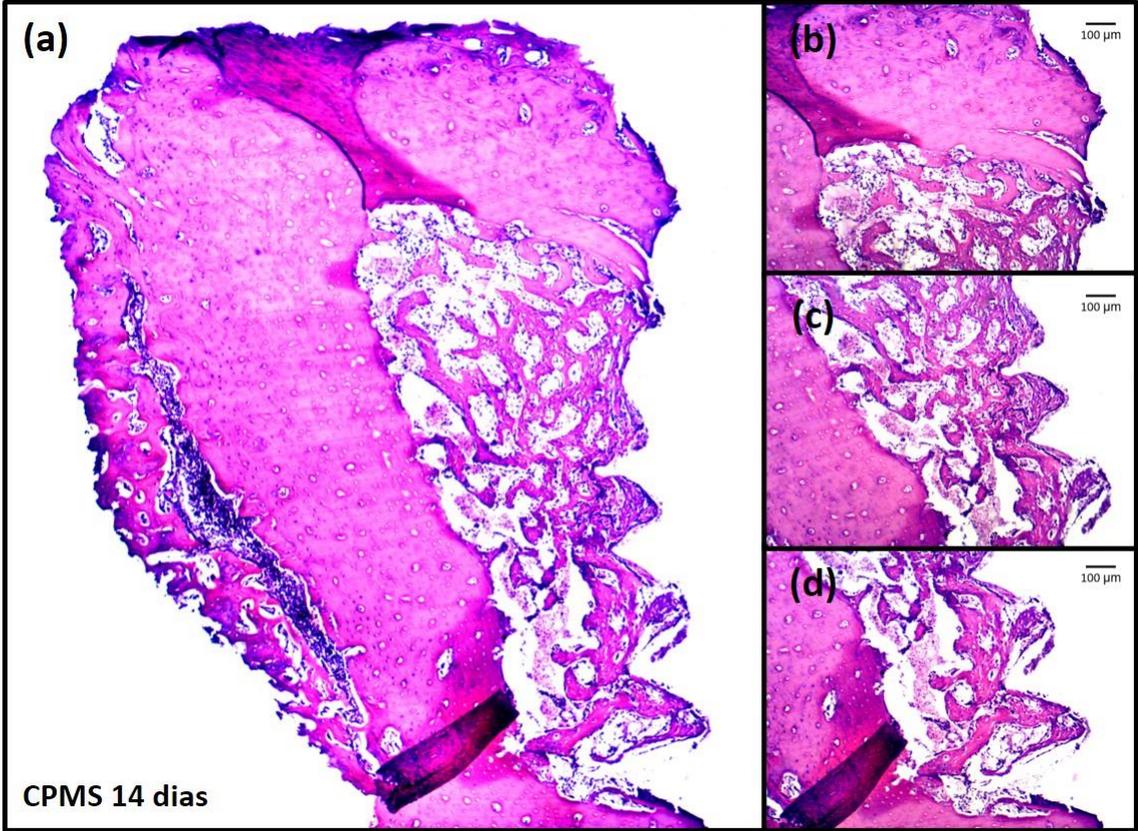


FIGURA 21 MEV-EDX do grupo ALLOYLS 42 dias após instalação dos implantes removidos por contra-torque. (a) (b) (c) (d): MEV em aumentos de 50x, 500x, 1.000x e 2.000x respectivamente (e): EDX

Análise Histológica Qualitativa

Nos grupos CPMS e ALLOYMS foi possível observar um tecido ósseo cortical superior e inferior com características de retardo no processo de reparação óssea, sendo mais visível nos períodos de 14 e 21 dias (Figuras 22a, 22e, 24a e 24e) e um pouco menos visível no período de 42 dias (Figuras 22i e 24i). Outro fato observado foi a presença do formato das roscas no tecido ósseo (Figuras 22 e 24), sugerindo que a fratura por contra-torque ocorreu na interface e não no tecido ósseo adjacente. Por inferência sugere-se que o implante desrosqueou, demonstrando um processo de osseointegração em suas fases bem iniciais.

Nos grupos CPLS e ALLOYLS foi possível observar um tecido ósseo mais maturo (Figuras 23i e 25i) quando comparado com os grupos CPMS e ALLOYMS, sugerindo aceleração do processo de reparo em todos os períodos analisados. E pode-se notar a dilaceração do tecido ósseo e a ausência de roscas residuais (Figuras 23 e 25), sugerindo que a fratura provocada pelo contra-torque ocorreu no tecido ósseo adjacente a interface formada entre osso e implante.



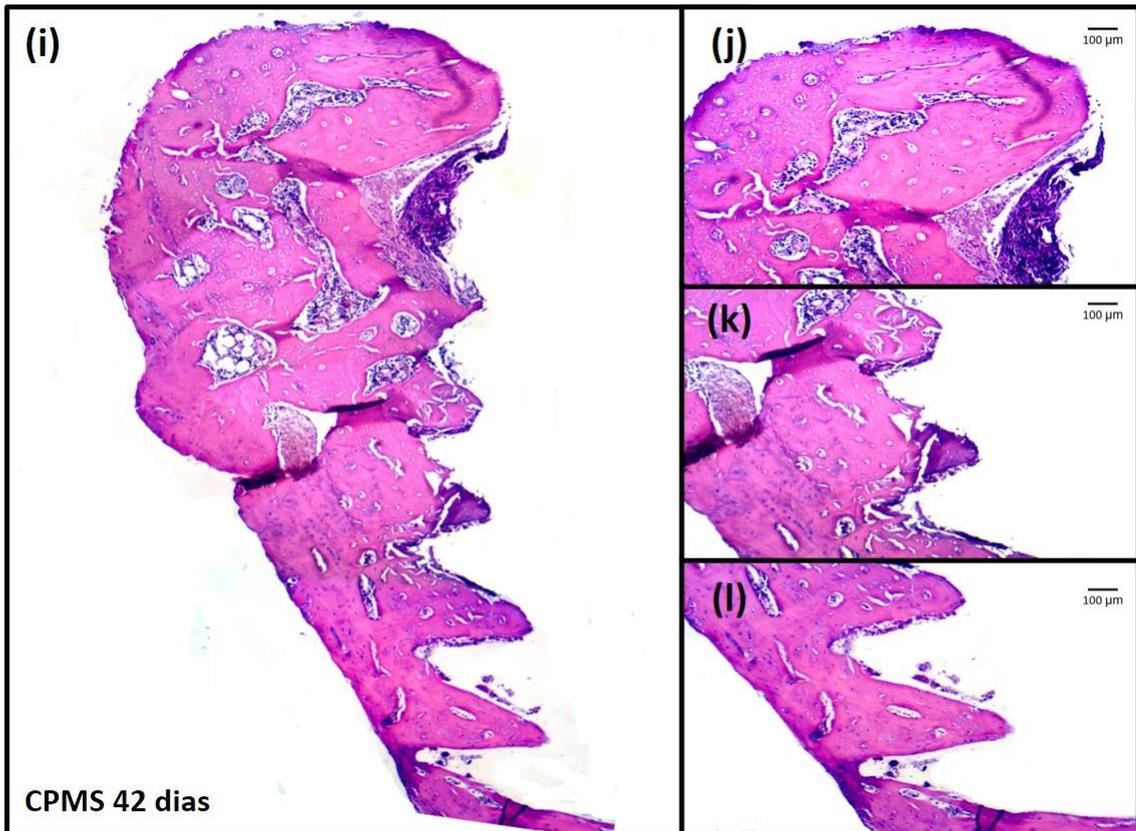
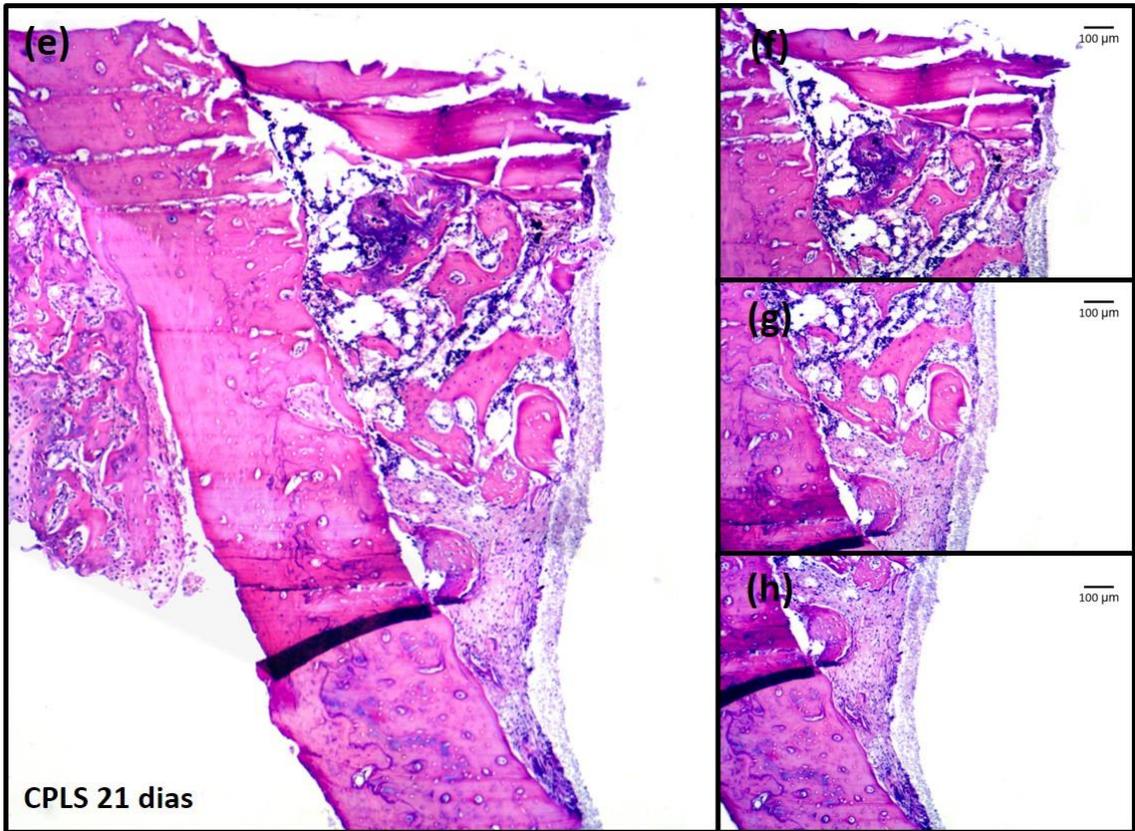
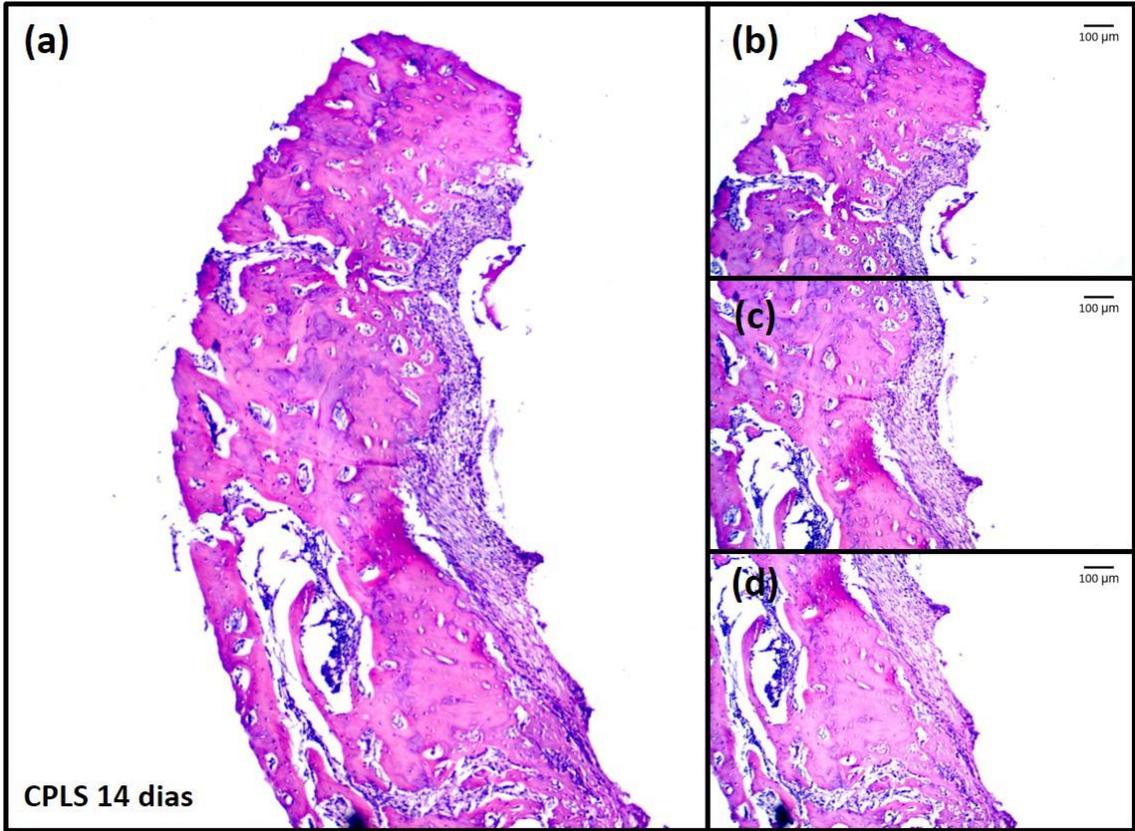


FIGURA 22 Grupo CPMS nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório (Coloração HE). **(a): Análise histológica de 14 dias** (b): Cortical óssea superior (40x) (c): Canal medular (40x) (d): Cortical óssea inferior (40x). **(e): Análise histológica de 21 dias** (f): Cortical óssea superior (40x) (g): Canal medular (40x) (h): Cortical óssea inferior (40x). **(i): Análise histológica de 42 dias** (j): Cortical óssea superior (40x) (k): Canal medular (40x) (l): Cortical óssea inferior (40x)



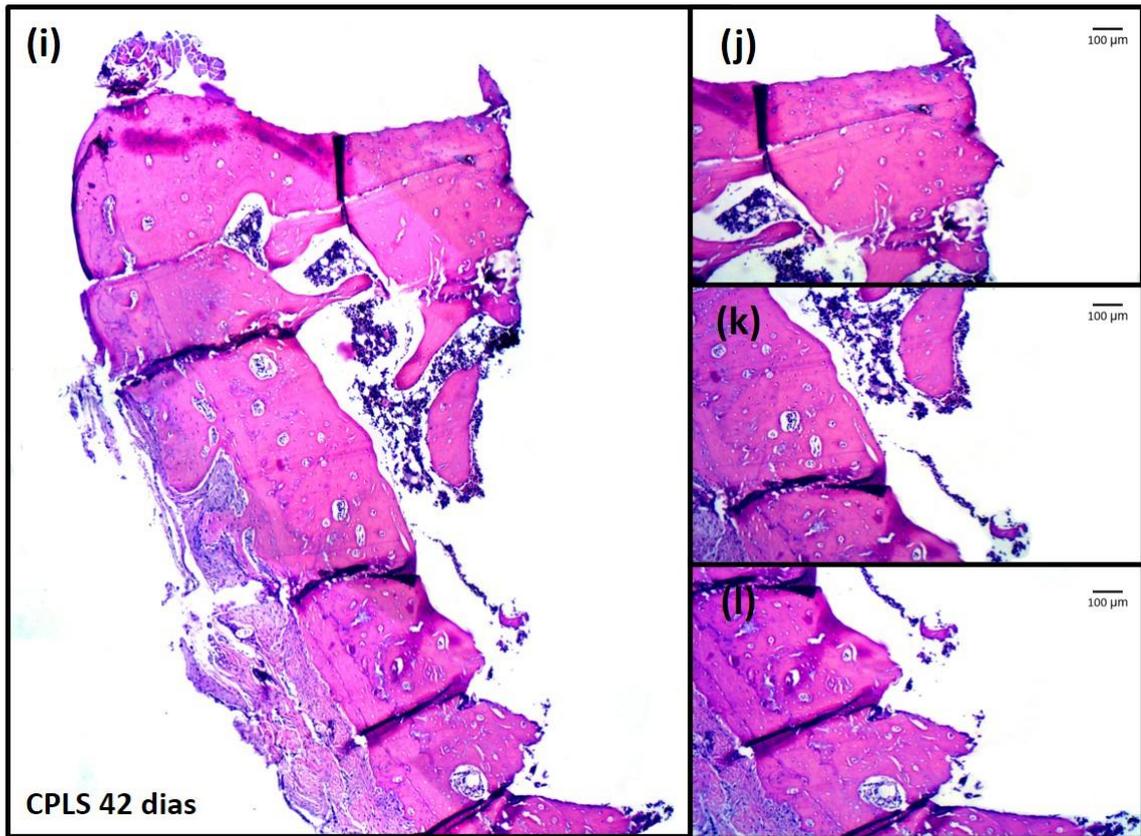
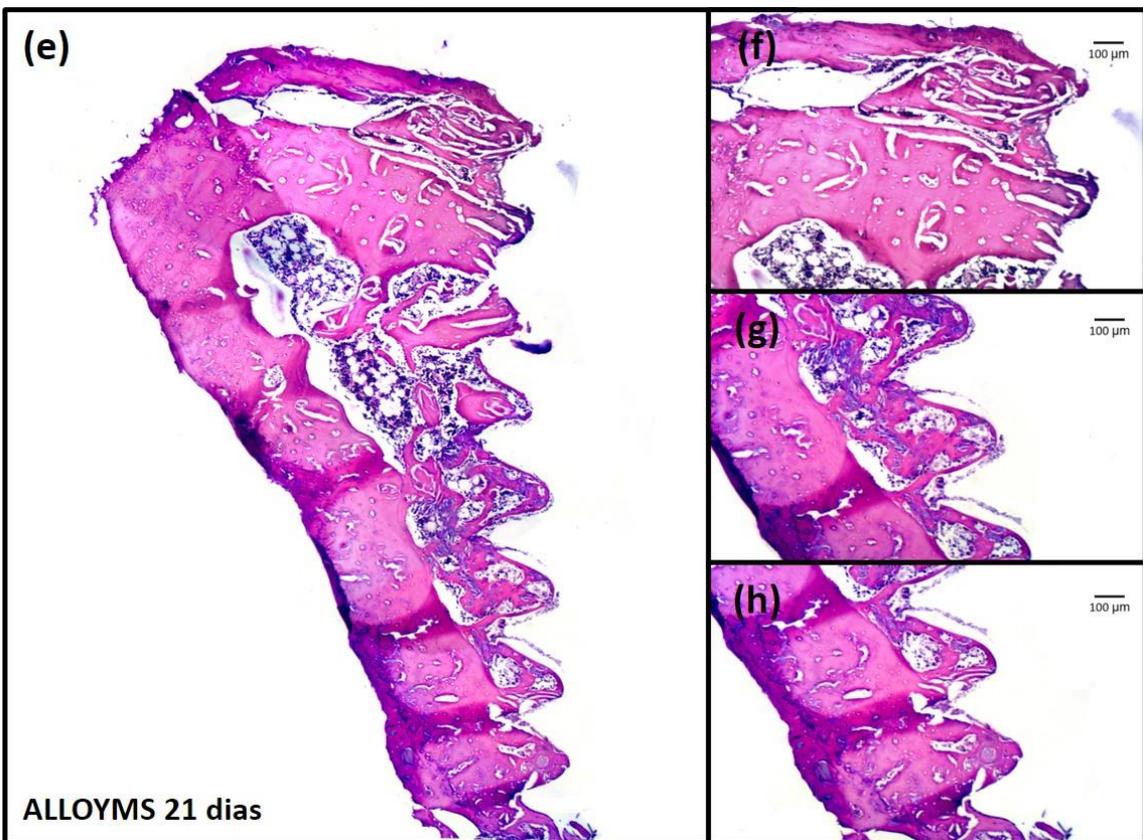
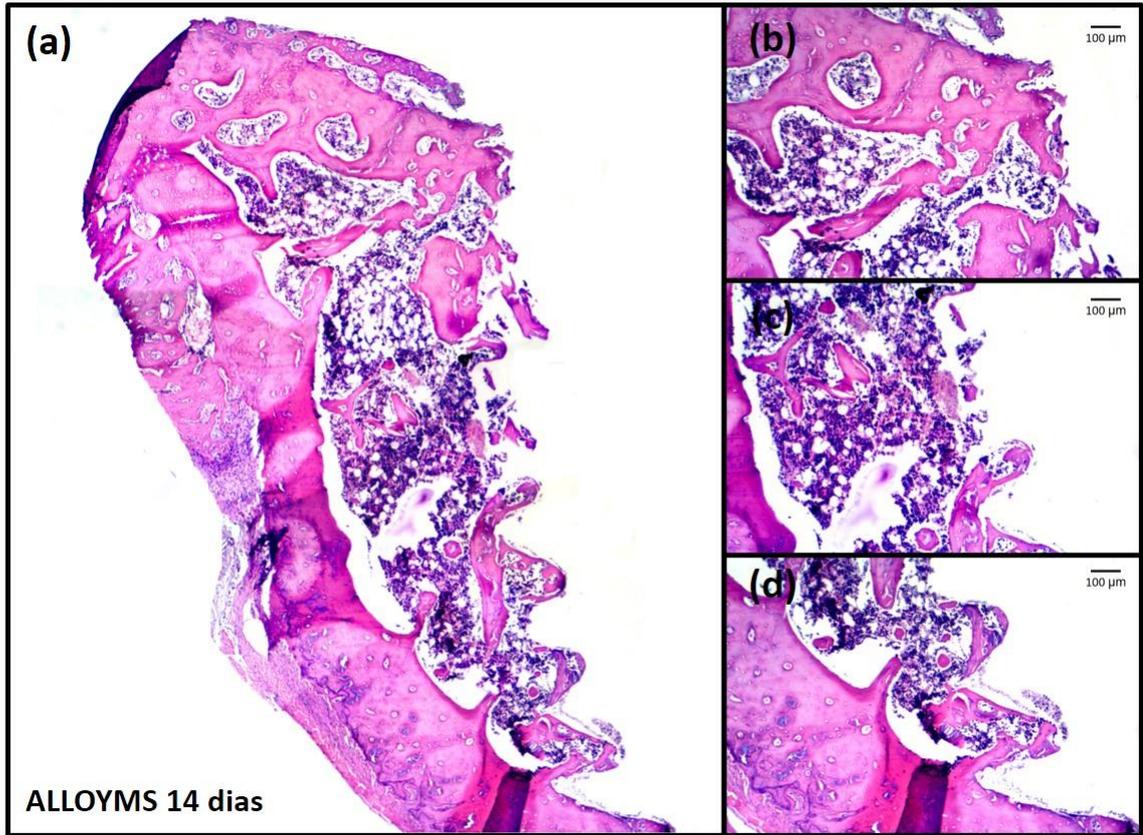


FIGURA 23 Grupo CPLS nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório (Coloração HE). **(a): Análise histológica de 14 dias** (b): Cortical óssea superior (40x) (c): Canal medular (40x) (d): Cortical óssea inferior (40x). **(e): Análise histológica de 21 dias** (f): Cortical óssea superior (40x) (g): Canal medular (40x) (h): Cortical óssea inferior (40x). **(i): Análise histológica de 42 dias** (j): Cortical óssea superior (40x) (k): Canal medular (40x) (l): Cortical óssea inferior (40x)



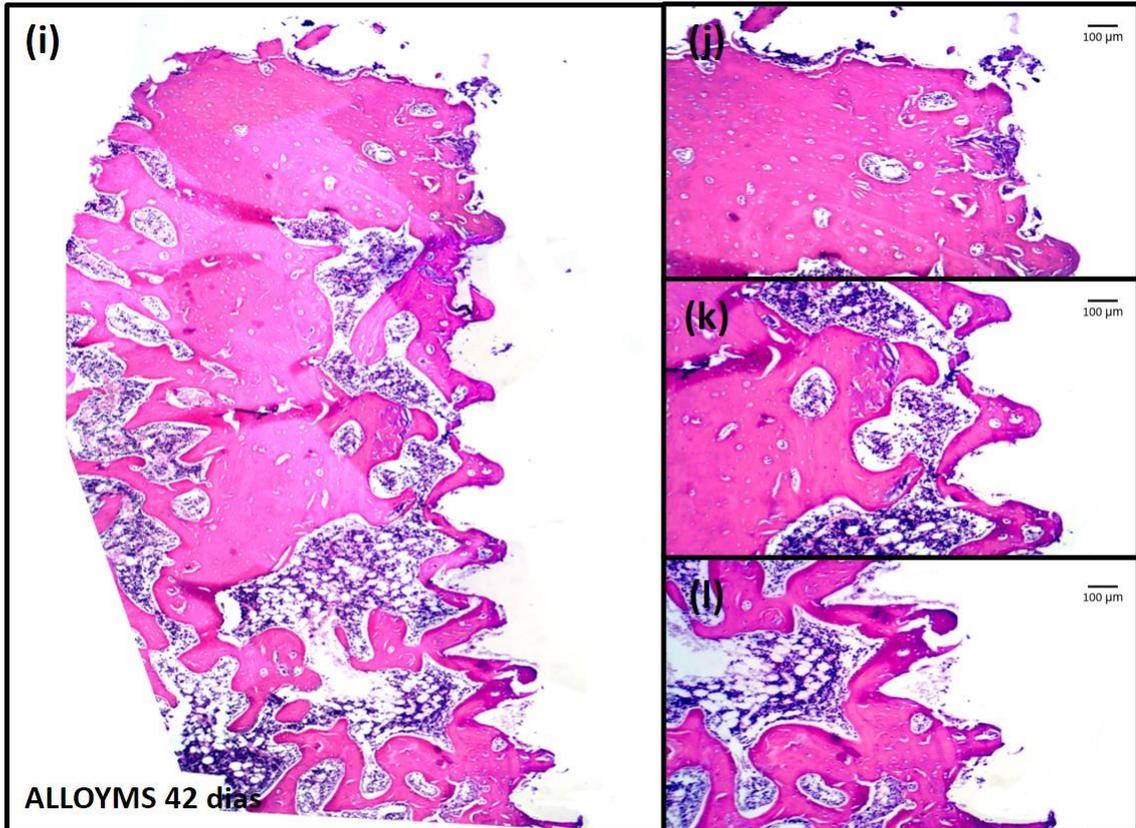
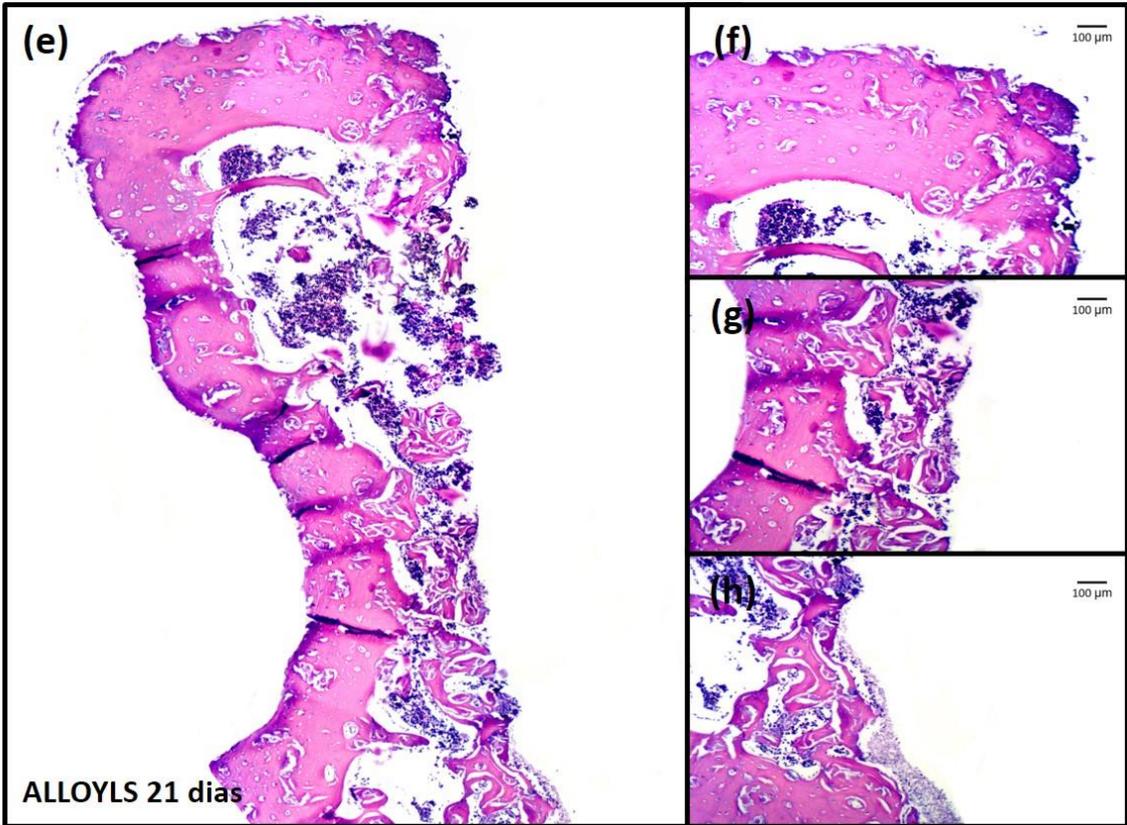
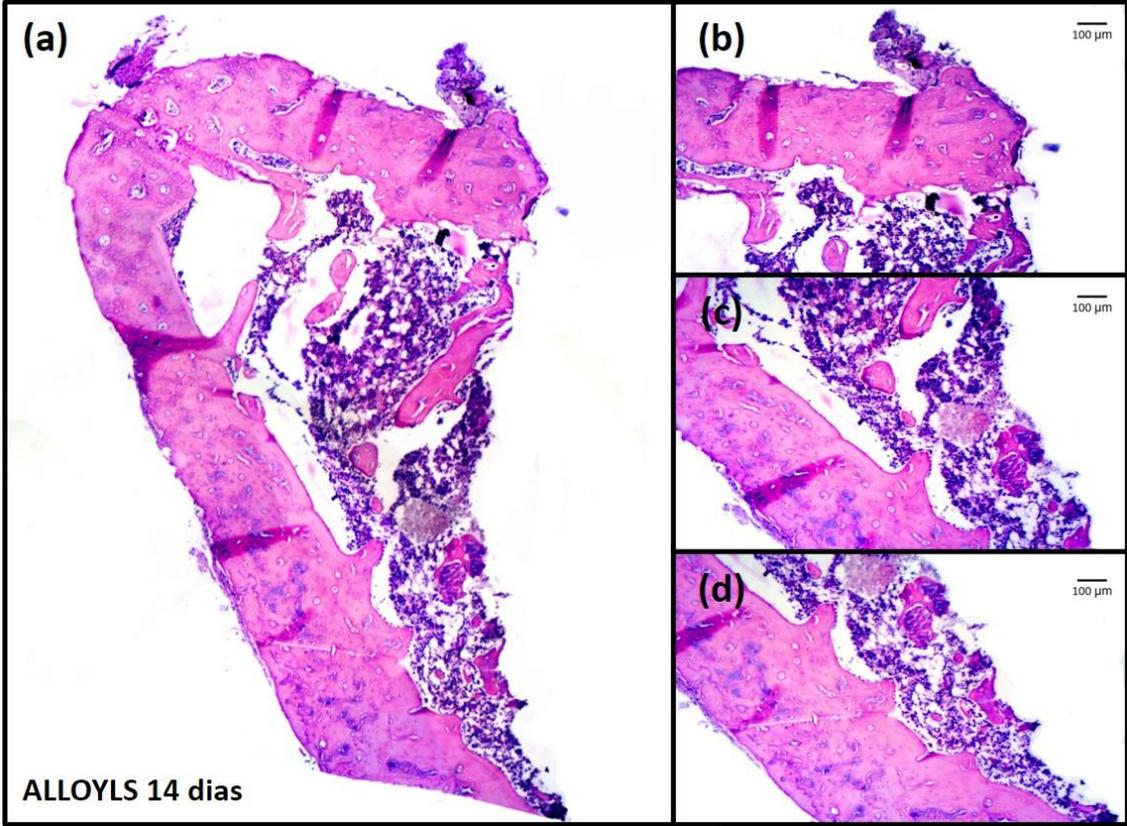


FIGURA 24 Grupo ALLOYMS nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório (Coloração HE). **(a):** Análise histológica de 14 dias (b): Cortical óssea superior (40x) (c): Canal medular (40x) (d): Cortical óssea inferior (40x). **(e):** Análise histológica de 21 dias (f): Cortical óssea superior (40x) (g): Canal medular (40x) (h): Cortical óssea inferior (40x). **(i):** Análise histológica de 42 dias (j): Cortical óssea superior (40x) (k): Canal medular (40x) (l): Cortical óssea inferior (40x)



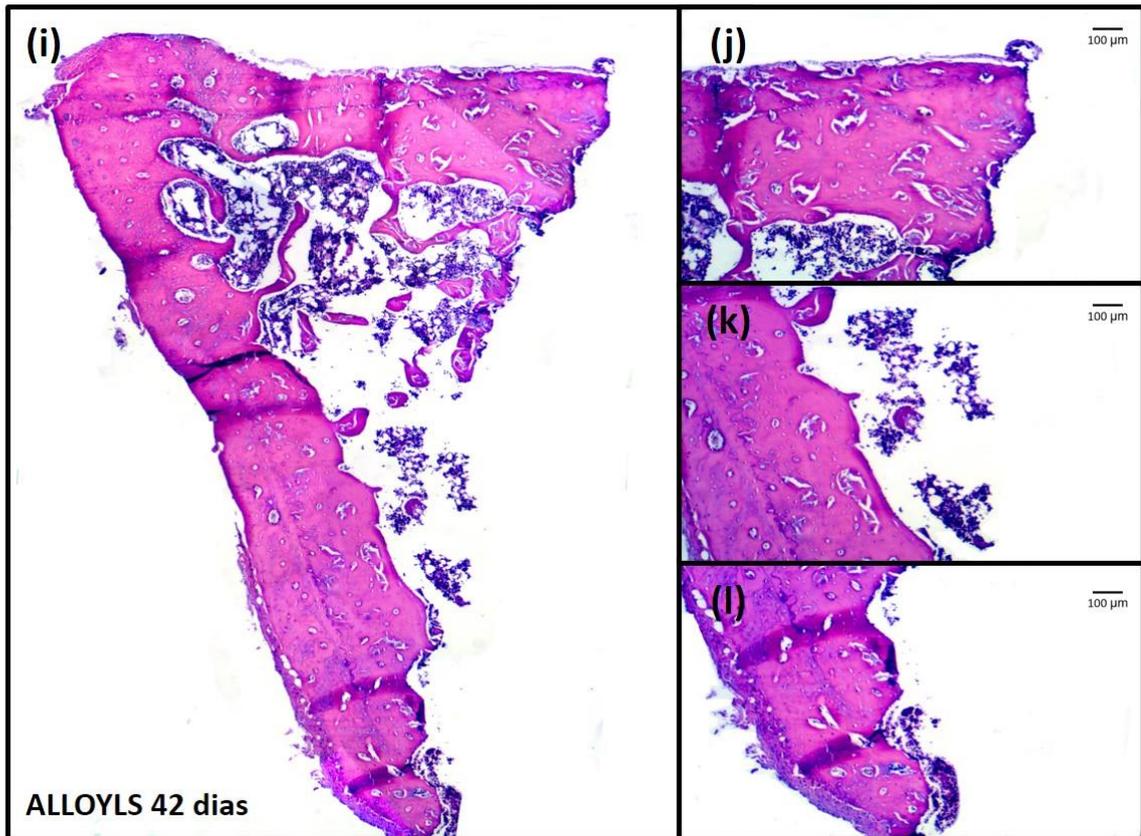


FIGURA 25 Grupo ALLOYLS nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório (Coloração HE). **(a): Análise histológica de 14 dias** (b): Cortical óssea superior (40x) (c): Canal medular (40x) (d): Cortical óssea inferior (40x). **(e): Análise histológica de 21 dias** (f): Cortical óssea superior (40x) (g): Canal medular (40x) (h): Cortical óssea inferior (40x). **(i): Análise histológica de 42 dias** (j): Cortical óssea superior (40x) (k): Canal medular (40x) (l): Cortical óssea inferior (40x)

Análise Imunoistoquímica

Os marcadores escolhidos foram a osteopontina (OPN) e a osteocalcina (OC), estes marcadores encontram-se presentes nas células da linhagem osteoblástica assim como na matriz extracelular não mineralizada (tecido conjuntivo) e mineralizada (tecido ósseo formado). Vale destacar também que a osteopontina se precipita nas chamadas linhas cementantes (linhas de reversão) (Figura 29b).

Osteopontina (OPN):

Foi possível observar que nos grupos ALLOYLS 14 e 21 dias pós-operatório (Figuras 29a e 29b) apresentaram marcações moderadas (++) (Tabela 2), sugerindo maior atividade celular principalmente para os implantes de liga de Ti6Al4V modificados por LASER. Para o grupo ALLOYMS 21 dias (Figura 28b) a imunomarcagem foi de discreta a moderada (+/++) (Tabela 2). E os demais grupos apresentaram marcações discretas (+) (Tabela 2).

Osteocalcina (OC):

Pode-se observar que as imunomarcações se mantiveram semelhantes praticamente para todos os grupos e período de análise, sendo ela moderada (++) ou de moderada a intensa (++) (Tabela 2). Apesar do grupo CPLS 42 dias (Figura 27f) apresentar imunomarcação leve/discreta (+) (Tabela 2), vale ressaltar que a mesma ocorreu em tecido ósseo formado, indicando a presença de mineralização e maturação do tecido ósseo periimplantar.

CPMS

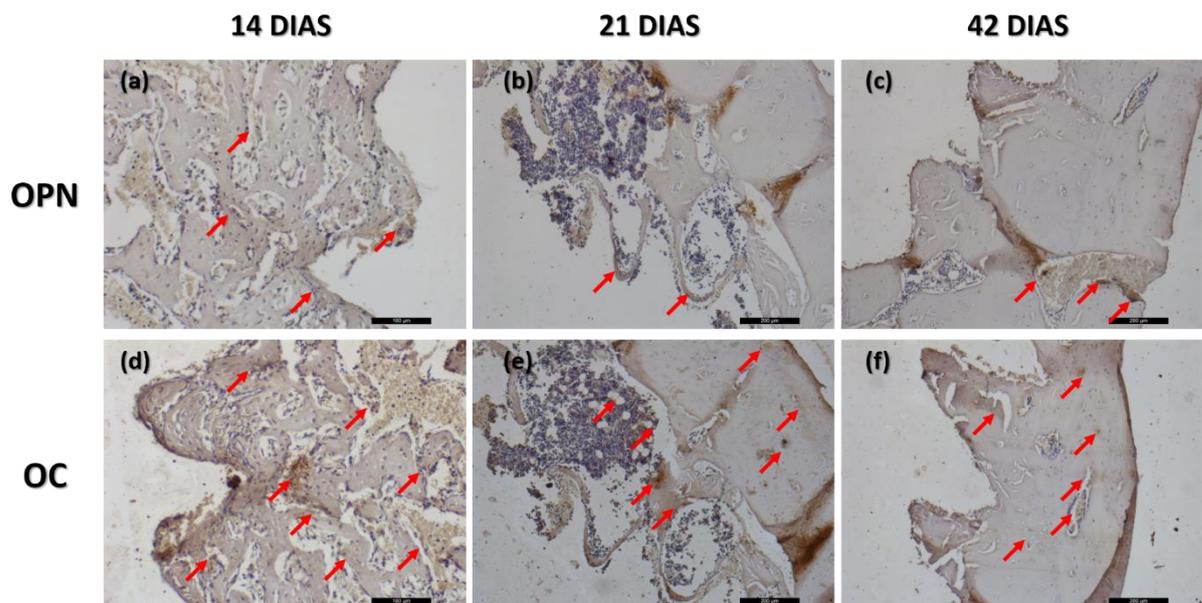


FIGURA 26 Imunomarcação das proteínas OPN e OC nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório do grupo CPMS. **(a) (b) (c)**: Imunomarcação da proteína OPN nos períodos de 14 (20x), 21 (10x) e 42 (10x) dias pós-operatório respectivamente. **(d) (e) (f)**: Imunomarcação da proteína OC nos períodos de 14 (20x), 21 (10x) e 42 (10x) dias pós-operatório respectivamente. As setas vermelhas indicam a marcação das proteínas. (Aumento de 10x ou 20x)

CPLS

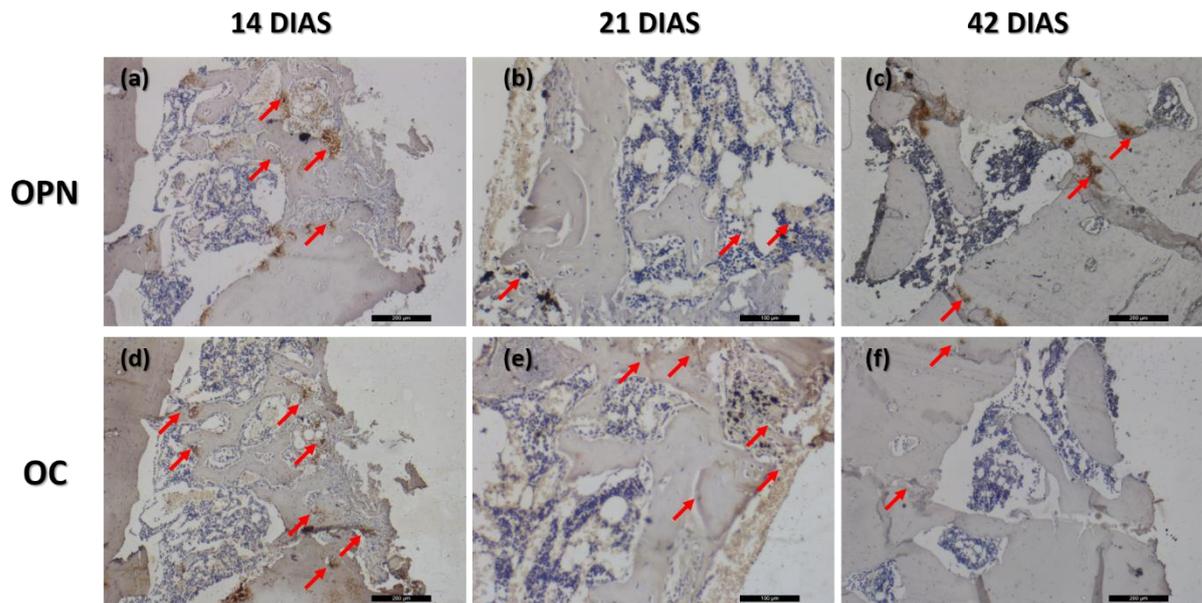


FIGURA 27 Imunomarcção das proteínas OPN e OC nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório do grupo CPLS. **(a) (b) (c)**: Imunomarcção da proteína OPN nos períodos de 14 (10x), 21 (20x) e 42 (10x) dias pós-operatório respectivamente. **(d) (e) (f)**: Imunomarcção da proteína OC nos períodos de 14 (10x), 21 (20x) e 42 (10x) dias pós-operatório respectivamente. As setas vermelhas indicam a marcação das proteínas. (Aumento de 10x ou 20x)

ALLOYMS

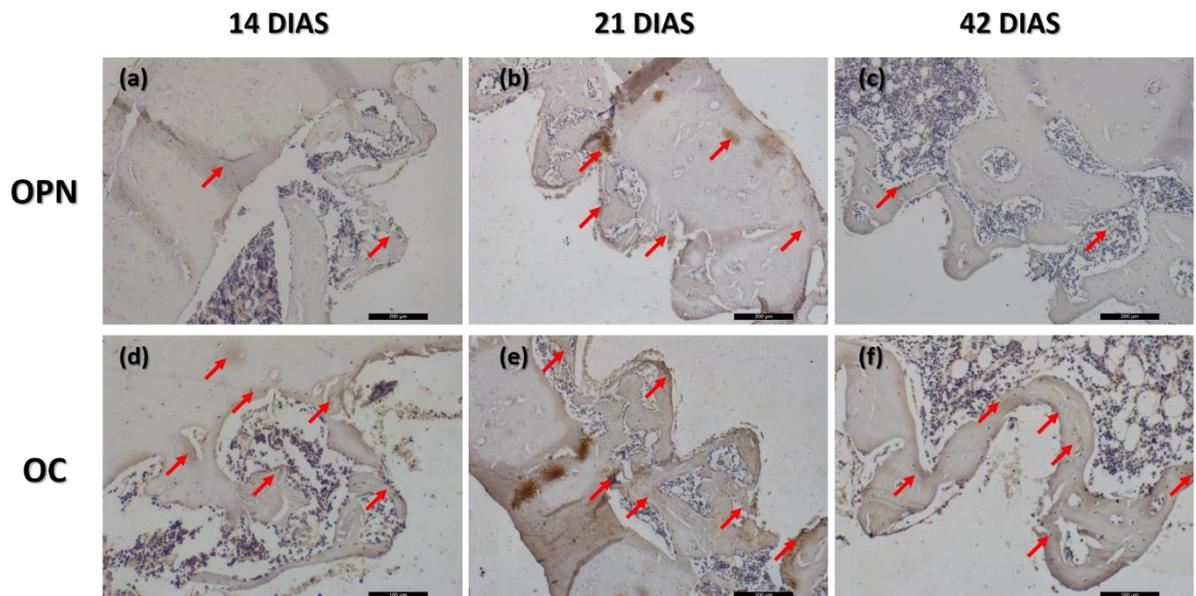


FIGURA 28 Imunomarcção das proteínas OPN e OC nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório do grupo ALLOYMS. **(a) (b) (c)**: Imunomarcção da proteína OPN nos períodos de 14 (10x), 21 (10x) e 42 (10x) dias pós-operatório respectivamente. **(d) (e) (f)**: Imunomarcção da proteína OC nos períodos de 14 (20x), 21 (10x) e 42 (20x) dias pós-operatório respectivamente. As setas vermelhas indicam a marcação das proteínas. (Aumento de 10x ou 20x)

ALLOYLS

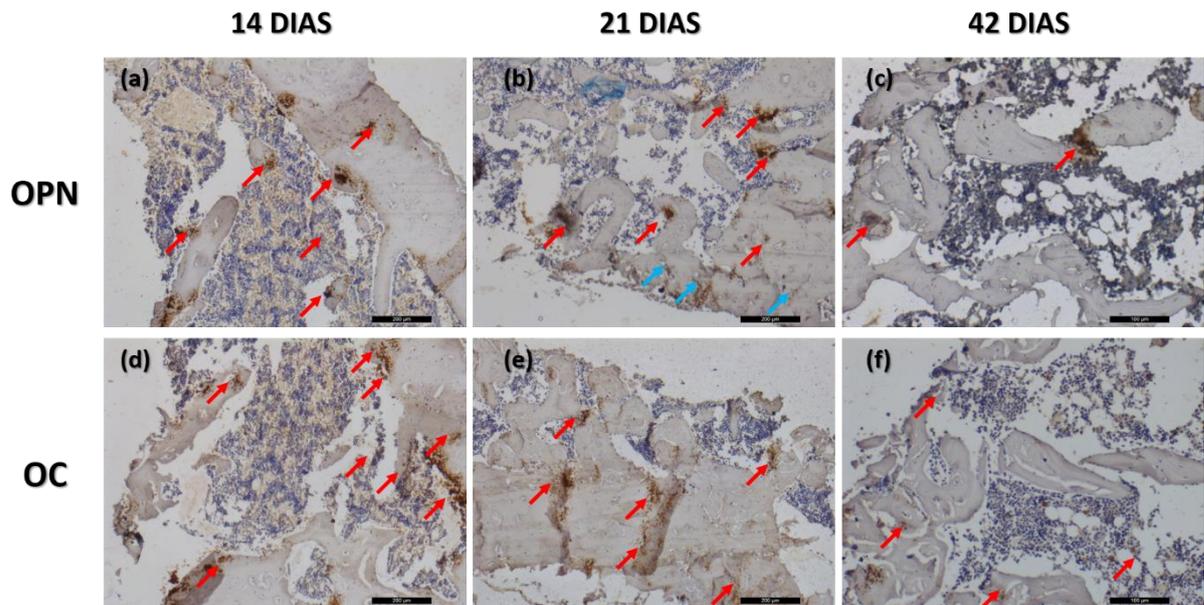


FIGURA 29 Imunomarcaco das proteínas OPN e OC nos períodos de 14, 21 e 42 dias pós-operatório do grupo ALLOYLS. **(a) (b) (c)**: Imunomarcaco da proteína OPN nos períodos de 14 (10x), 21 (10x) e 42 (20x) dias pós-operatório respectivamente. **(d) (e) (f)**: Imunomarcaco da proteína OC nos períodos de 14 (10x), 21 (10x) e 42 (20x) dias pós-operatório respectivamente. As setas vermelhas indicam a marcao das proteínas. As setas azuis incidam as linhas cementantes (Aumento de 10x ou 20x)

TABELA 2 Escores representativos das imunomarcações, de acordo com a área/quantidade de células positivas para cada expressão dos marcadores OPN e OC em todos os grupos em 14, 21 e 42 dias pós-operatório. Categorizados como leves/discretos (+), moderados (++) ou intensos (+++)

		OSTEOPONTINA (OPN)	OSTEOCALCINA (OC)
14 dias			
	CPMS	+	++/+++
	CPLS	+	++
	ALLOYMS	+	++
	ALLOYLS	++	++/+++
21 dias			
	CPMS	+	++
	CPLS	+	++
	ALLOYMS	+ / ++	++
	ALLOYLS	++	++
42 dias			
	CPMS	+	++
	CPLS	+	+
	ALLOYMS	+	++
	ALLOYLS	+	++

Discussão

5 DISCUSSÃO

Após a instalação do implante dentário inicia-se o processo de reparação óssea, promovendo eventos moleculares e celulares coordenados e organizados.^{39,40} resultando em uma aposição de tecido ósseo neoformado na superfície do implante.⁴¹ As superfícies modificadas fornecem locais mais adequados para que ocorra adesão de proteínas iniciais, proliferação celular e deposição de tecido ósseo que são acontecimentos importantes para o processo contínuo de cicatrização óssea.^{11,42-45} O processo de formação óssea após a instalação do implante pode ocorrer pela via osteogênese de contato, em que as células óssea migram até a superfície do implante para nova aposição óssea, ou via osteogênese a distância, em que a formação óssea ocorre às custas do tecido ósseo circundante já existente.^{12,46-48} Neste estudo pelos resultados obtidos sugere-se que ALLOYLS e CPLS apresentaram osteogênese por contato. Enquanto CPMS e AALOYMS apresentaram osteogênese à distância.

Desde a descoberta da osseointegração por Brånemark,⁴⁹ vários estudos vêm sendo realizados no intuito de melhorar e acelerar o processo de osseointegração, e juntamente com os avanços das pesquisas as superfícies dos implantes dentários deixaram de apresentar superfície usinada para serem superfícies tratadas.^{41,50-53} Essas modificações de superfícies tornaram-se fundamentais para acelerar o processo de reparação óssea^{14,42,54-56} objetivando a redução do tempo de espera para reabilitação de prótese sobre implante em pacientes parcial ou totalmente desdentados.

A análise biomecânica por meio do torque de remoção dos implantes têm como princípio medir a força necessária para remoção do implante, representando o travamento mecânico entre implante e osso adjacente,^{21,57-59} mesmo que de forma indireta permite avaliar em qualidade e quantidade,⁶⁰⁻⁶² fornecendo medidas indiretas sobre a taxa de BIC (Bone Implant Contact).^{46,57} Esta forma de análise é considerada pela literatura um importante método para avaliar o processo de osseointegração^{15,63-65} e têm sido empregada em várias pesquisas em animais^{15,60,65-67} por apresentar uma forma de teste destrutivo com praticidade clínica limitada.⁴⁶

Alguns estudos encontrados na literatura empregando o método de tratamento de superfície modificada por LASER apresentaram melhores resultados de torque de remoção quando comparado com implantes de superfície usinada.²¹⁻

^{23,26,43,68,69} E estudos recentes publicados pelo nosso grupo de pesquisa,^{22,23,26} demonstraram que os implantes com tratamento de superfície por ablação a LASER apresentam melhores propriedades físico-químicas e topográficas quando comparado à superfície usinada, favorecendo o processo de osseointegração. Fato encontrado no presente estudo, em que os implantes modificados por LASER, independente do material de manufaturamento e período de análise, apresentaram diferenças estatísticas de contra-torque quando comparado com a superfície usinada ($p < 0,05$). Além disso foi possível observar que as modificações das superfícies por LASER proporcionaram melhorias nas propriedades biológicas das ligas de Ti6Al4V, apresentando valores de contra-torque superiores para o grupo ALLOYLS quando comparado com os grupos CPMS, CPLS e ALLOYMS ($p < 0,05$) nos períodos de 14 e 21 dias pós-operatório. Em síntese pressupõe-se que a presença de rugosidades nas superfícies modificadas por LASER em escala nanométrica, modularam as respostas celulares, bem como a aceleração do processo de osseointegração para o grupo ALLOYLS.

Sabendo que a osseointegração é tempo dependente a caracterização topográfica da superfície dos implantes removidos por contra-torque (MEV-EDX), complementou os resultados encontrados na análise biomecânica. Foi possível observar que os implantes modificados por LASER, independe do material do implante e dos períodos de estudo, apresentaram recobrimento ósseo total nas superfícies dos implantes (CPLS e ALLOYLS), corroborando com os valores encontrados na análise biomecânica. E para os implantes com superfície usinada (CPMS e ALLOYMS) foi possível observar um aumento gradual de recobrimento ósseo nas superfícies dos implantes nos períodos de 14, 21 e 42 dias respectivamente.

Para o EDX foi possível observar que em todos os períodos analisados os grupos CPLS e ALLOYLS apresentaram picos de cálcio (Ca) e fósforo (P), sendo eles os principais componentes da matriz óssea inorgânica, sugerindo a presença de tecido ósseo nas superfícies dos implantes. Embora o grupo CPMS tenha apresentado picos de Ca e P nos 3 períodos de estudo, os mesmos foram menores quando comparado com os grupos CPLS e ALLOYLS. Este fato foi possível observar somente aos 42 dias pós-operatório para o grupo ALLOYMS. Com isto pode-se afirmar que CPLS e ALLOYLS apresentaram uma distribuição mais fisiológica de Ca e P.

Achados histológicos qualitativos encontrados no presente estudo corroboraram com os resultados obtidos na análise biomecânica e na caracterização topográfica da superfície dos implantes removidos por contra-torque, sugerindo que a ruptura provocada pelo torque de remoção dos implantes com superfície modificada por LASER (LS), independe do metal ou período avaliado, ocorreu no osso adjacente a interface formada entre osso e implante, explicando a ausência dos formatos das roscas na área negativa ao redor dos implantes. Diferentemente dos implantes com superfície usinada (MS) em que se pode notar a presença da arquitetura das roscas no tecido ósseo, inferindo que os implantes foram desrosqueados de forma com que não houve fratura entre a interface do implante e tecido ósseo.

A análise imunoistoquímica foi realizada com objetivo de avaliar de forma mais refinada, as proteínas envolvidas no processo de reparação óssea, proporcionando um melhor entendimento da biologia óssea,^{38,70-72} uma vez que a presença de OPN é expressa em fases iniciais⁷³ e a OC em fases mais tardias do processo de mineralização.^{74,75} Os resultados encontrados no presente estudo, demonstraram respostas teciduais favoráveis para o processo de reparo ósseo perimplantar, independente do manufaturamento e da superfície do implante. Uma vez que a expressão da osteopontina apresenta-se em um escore menor do que osteocalcina, mostra que o tecido ósseo está em um estágio de mineralização mais avançada. Apesar do grupo CPLS 42 dias apresentar imunomarcação leve/discreta (+) e o grupo ALLOYLS 21 dias marcação moderada (++) , não observando a diferenç a dos escores das proteínas, as imunomarcações para osteocalcina ocorrem em tecido ósseo formado, indicando a presenç a de mineralização e maturação do tecido ósseo periimplantar.

De forma geral ao avaliar a presenç a dos marcadores tanto nas células osteoblásticas como também na matriz mineralizada ou não mineralizada, os implantes de liga de Ti6Al4V (ALLOY) apresentaram maior ativação celular devido a maior expressão da osteopontina, mesmo mantendo a expressão de osteocalcina semelhante aos padrões observados aos implantes de titânio comercialmente puro (CP). Esta observação   válida principalmente para os implantes do grupo ALLOYLS 14 e 21 dias em que se observou uma maior expressão de OPN, uma vez que as modificações de superfícies por LASER proporcionam rugosidades em escalas

nanométricas, favorecendo as respostas e interações celulares, bem como maiores valores de contra-torque ($p < 0,05$).

Diante dos resultados encontrados no presente estudo sugeriram que os implantes com modificação de superfície por ablação a LASER podem influenciar de forma positiva no processo de aceleração, bem como a qualidade e resistência da osseointegração e conseqüentemente na melhora da estabilidade secundária, bem como a diminuição do tempo de cicatrização óssea.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos concluiu-se que os implantes com modificação de superfície por ablação a LASER, independente do material manufaturado, proporcionaram importantes modificações físico-químicas na superfície, permitindo melhor embricamento mecânico com o tecido ósseo e aceleração do processo de osseointegração quando comparados com implantes com superfície usinada.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Brånemark PI, Adell R, Albrektsson T, Lekholm U, Lundkvist S, Rockler B. Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. *Biomaterials*. 1983;4:25-28.
2. Aparicio C, Gil FJ, Fonseca C, Barbosa M, Planell JA. Corrosion behaviour of commercially pure titanium shot blasted with different materials and sizes of shot particles for dental implant applications. *Biomaterials*. 2003;24:263-273.
3. Mabileau G, Bourdon S, Joly-Guillou ML, Filmon R, Baslé MF, Chappard D. Influence of fluoride, hydrogen peroxide and lactic acid on the corrosion resistance of commercially pure titanium. *Acta Biomater*. 2006;2:121-129.
4. Suzuki K, Takano T, Takemoto S, Ueda T, Yoshinari M, Sakurai K. Influence of grade and surface topography of commercially pure titanium on fatigue properties. *Dent Mater J*. 2018;37:308-316.
5. Yamazoe J, Nakagawa M, Matono Y, Takeuchi A, Ishikawa K. The development of Ti alloys for dental implant with high corrosion resistance and mechanical strength. *Dent Mater J*. 2007;26:260-267.
6. Mathew MT, Barão VA, Yuan JC, Assunção WG, Sukotjo C, Wimmer MA. What is the role of lipopolysaccharide on the tribocorrosive behavior of titanium? *J Mech Behav Biomed Mater*. 2012;8:71-85.
7. Cordeiro JM, Barão VAR. Is there scientific evidence favoring the substitution of commercially pure titanium with titanium alloys for the manufacture of dental implants? *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;71:1201-1215.
8. Cordeiro JM, Beline T, Ribeiro ALR, Rangel EC, da Cruz NC, Landers R, Faverani LP, Vaz LG, Fais LMG, Vicente FB, Grandini CR, Mathew MT, Sukotjo C, Barão VAR. Development of binary and ternary titanium alloys for dental implants. *Dent Mater*. 2017;33:1244-1257.
9. Gittens RA, Olivares-Navarrete R, McLachlan T, Cai Y, Hyzy SL, Schneider JM, Schwartz Z, Sandhage KH, Boyan BD. Differential responses of osteoblast lineage cells to nanotopographically-modified, microroughened titanium-aluminum-vanadium alloy surfaces. *Biomaterials*. 2012;33:8986-8994.

10. Ducheyne P, Healy KE. The effect of plasma-sprayed calcium phosphate ceramic coatings on the metal ion release from porous titanium and cobalt-chromium alloys. *J Biomed Mater Res.* 1988;22:1137-1163.
11. Davies JE. Mechanisms of endosseous integration. *Int J Prosthodont.* 1998;11:391-401.
12. Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ.* 2003;67:932-949.
13. Elias CN, Oshida Y, Lima JH, Muller CA. Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2008;1:234-242.
14. Novaes AB Jr, de Souza SL, de Barros RR, Pereira KK, Iezzi G, Piattelli A. Influence of implant surfaces on osseointegration. *Braz Dent J.* 2010;21:471-481.
15. Johansson C, Albrektsson T. Integration of screw implants in the rabbit: a 1-year follow-up of removal torque of titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1987;2:69-75.
16. Johansson CB, Sennerby L, Albrektsson T. A removal torque and histomorphometric study of bone tissue reactions to commercially pure titanium and Vitallium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1991;6:437-441.
17. Johansson CB, Han CH, Wennerberg A, Albrektsson T. A quantitative comparison of machined commercially pure titanium and titanium-aluminum-vanadium implants in rabbit bone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998;13:315-321.
18. Gaggi A, Schultes G, Müller WD, Kärcher H. Scanning electron microscopical analysis of laser-treated titanium implant surfaces: a comparative study. *Biomaterials.* 2000;21:1067-1073.
19. Braga FJC, Marques RFC, Almeida-Filho E, Guastaldi AC. Surface modification of Ti dental implants by Nd:YVO4 laser irradiation. *Appl Surf Sci.* 2007;253:9203-9208.
20. Faeda RS, Tavares HS, Sartori R, Guastaldi AC, Marcantonio E Jr. Biological performance of chemical hydroxyapatite coating associated with implant surface modification by laser beam: biomechanical study in rabbit tibias. *J Oral Maxillofac*

- Surg.* 2009;67:1706-1715.
21. Cho SA, Jung SK. A removal torque of the laser-treated titanium implants in rabbit tibia. *Biomaterials*. 2003;24:4859-4863.
 22. Queiroz TP, Souza FÁ, Guastaldi AC, Margonar R, Garcia-Júnior IR, Hochuli-Vieira E. Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite. Biomechanical and topographical analysis in rabbits. *Clin Oral Implants Res*. 2013;24:896-903.
 23. Souza FA, Queiroz TP, Guastaldi AC, Garcia-Júnior IR, Magro-Filho O, Nishioka RS, Sisti KE, Sonoda CK. Comparative in vivo study of commercially pure Ti implants with surfaces modified by laser with and without silicate deposition: biomechanical and scanning electron microscopy analysis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013;101:76-84.
 24. Sisti KE, Piattelli A, Guastaldi AC, Queiroz TP, de Rossi R. Nondecalcified histologic study of bone response to titanium implants topographically modified by laser with and without hydroxyapatite coating. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2013;33:689-696.
 25. Souza FÁ, Queiroz TP, Sonoda CK, Okamoto R, Margonar R, Guastaldi AC, Nishioka RS, Garcia Júnior IR. Histometric analysis and topographic characterization of cp Ti implants with surfaces modified by laser with and without silica deposition. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014;102:1677-1688.
 26. Queiroz TP, de Molon RS, Souza FÁ, Margonar R, Thomazini AH, Guastaldi AC, Hochuli-Vieira E. In vivo evaluation of cp Ti implants with modified surfaces by laser beam with and without hydroxyapatite chemical deposition and without and with thermal treatment: topographic characterization and histomorphometric analysis in rabbits. *Clin Oral Investig*. 2017;21:685-699.
 27. Han CH, Johansson CB, Wennerberg A, Albrektsson T. Quantitative and qualitative investigations of surface enlarged titanium and titanium alloy implants. *Clin Oral Implants Res*. 1998;9:1-10.
 28. Shah FA, Trobos M, Thomsen P, Palmquist A. Commercially pure titanium (cp-Ti) versus titanium alloy (Ti6Al4V) materials as bone anchored implants - Is one truly better than the other? *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;62:960-966.

29. Hung KY, Lin YC, Feng HP. The Effects of acid etching on the nanomorphological surface characteristics and activation energy of titanium medical materials. *Materials*. 2017;10:1164.
30. Sisti KE, de Andrés MC, Johnston D, Almeida-Filho E, Guastaldi AC, Oreffo RO. Skeletal stem cell and bone implant interactions are enhanced by LASER titanium modification. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;473:719-725.
31. NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Exp Physiol*. 2010;95:842-844.
32. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Prado FB, Garcia IR Jr, Okamoto R. Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44:798-805.
33. Oliveira D, Hassumi JS, Gomes-Ferreira PH, Polo TO, Ferreira GR, Faverani LP, Okamoto R. Short term sodium alendronate administration improves the peri-implant bone quality in osteoporotic animals. *J Appl Oral Sci*. 2017;25:42-52.
34. Faverani LP, Polo TOB, Ramalho-Ferreira G, Momesso GAC, Hassumi JS, Rossi AC, Freire AR, Prado FB, Luvizuto ER, Gruber R, Okamoto R. Raloxifene but not alendronate can compensate the impaired osseointegration in osteoporotic rats. *Clin Oral Investig*. 2018;22:255-265.
35. Palin LP, Polo TOB, Batista FRS, Gomes-Ferreira PHS, Garcia Junior IR, Rossi AC, Freire A, Faverani LP, Sumida DH, Okamoto R. Daily melatonin administration improves osseointegration in pinealectomized rats. *J Appl Oral Sci*. 2018;26:e20170470.
36. Mulinari-Santos G, de Souza Batista FR, Kirchweger F, Tangl S, Gruber R, Okamoto R. Losartan reverses impaired osseointegration in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29:1126-1134.
37. Queiroz TP, Souza FA, Okamoto R, Margonar R, Pereira-Filho VA, Garcia Júnior IR, Vieira EH. Evaluation of immediate bone-cell viability and of drill wear after implant osteotomies: immunohistochemistry and scanning electron microscopy analysis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66:1233-1240.
38. Avila Souza F, Pereira Queiroz T, Rodrigues Luvizuto E, Nishioka RS, Garcia IR

- Jr, de Carvalho PS, Okamoto R. Rank protein immunolabeling during bone-implant interface healing process. *Int J Dent*. 2010;2010:513461.
39. Nguyen DT, Orgill DP, Murphy GF. Biomaterials for treating skin loss. Nguyen DT, Orgill DP, Murphy GF. *The pathophysiologic basis for wound healing and cutaneous regeneration*, Boca Raton: CRC Press; 2009:25–27.
40. Terheyden H, Lang NP, Bierbaum S, Stadlinger B. Osseointegration--communication of cells. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23:1127-1135.
41. Pellegrini G, Francetti L, Barbaro B, Del Fabbro M. Novel surfaces and osseointegration in implant dentistry. *J Investig Clin Dent*. 2018;9:e12349.
42. Albrektsson T, Wennerberg A. On osseointegration in relation to implant surfaces. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019;21:4-7.
43. Faeda RS, Tavares HS, Sartori R, Guastaldi AC, Marcantonio E Jr. Evaluation of titanium implants with surface modification by laser beam. Biomechanical study in rabbit tibias. *Braz Oral Res*. 2009;23:137-143.
44. Schneider GB, Zaharias R, Seabold D, Keller J, Stanford C. Differentiation of preosteoblasts is affected by implant surface microtopographies. *J Biomed Mater Res A*. 2004;69:462-468.
45. Shibli JA, Grassi S, de Figueiredo LC, Feres M, Marcantonio E Jr, Iezzi G, Piattelli A. Influence of implant surface topography on early osseointegration: a histological study in human jaws. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;80:377-385.
46. Rittel D, Dorogoy A, Shemtov-Yona K. Modeling the effect of osseointegration on dental implant pullout and torque removal tests. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2018;20:683-691.
47. Hoornaert A, Vidal L, Besnier R, Morlock JF, Louarn G, Layrolle P. Biocompatibility and osseointegration of nanostructured titanium dental implants in minipigs. *Clin Oral Implants Res*. 2020;31:526-535.
48. Insua A, Monje A, Wang HL, Miron RJ. Basis of bone metabolism around dental implants during osseointegration and peri-implant bone loss. *J Biomed Mater Res A*. 2017;105:2075-2089.

49. Brånemark PI. Osseointegration and its experimental background. *J Prosthet Dent.* 1983;50:399-410.
50. Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindström J, Hallén O, Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw: experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl.* 1977;16:1-132.
51. Bosshardt DD, Chappuis V, Buser D. Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. *Periodontol 2000.* 2017;73:22-40.
52. Smeets R, Stadlinger B, Schwarz F, Beck-Broichsitter B, Jung O, Precht C, Kloss F, Gröbe A, Heiland M, Ebker T. Impact of dental implant surface modifications on osseointegration. *Biomed Res Int.* 2016;2016:6285620.
53. Velasco-Ortega E, Ortiz-García I, Jiménez-Guerra A, Monsalve-Guil L, Muñoz-Guzón F, Perez RA, Gil FJ. Comparison between Sandblasted Acid-Etched and Oxidized Titanium Dental Implants: in vivo study. *Int J Mol Sci.* 2019;20:3267.
54. Novaes AB Jr, Souza SL, de Oliveira PT, Souza AM. Histomorphometric analysis of the bone-implant contact obtained with 4 different implant surface treatments placed side by side in the dog mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17:377-383.
55. Le Guéhennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater.* 2007;23:844-854.
56. Jemat A, Ghazali MJ, Razali M, Otsuka Y. Surface modifications and their effects on titanium dental implants. *Biomed Res Int.* 2015;2015:791725.
57. Klokkevold PR, Nishimura RD, Adachi M, Caputo A. Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface: a torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res.* 1997;8:442-447.
58. Sul YT, Johansson CB, Jeong Y, Wennerberg A, Albrektsson T. Resonance frequency and removal torque analysis of implants with turned and anodized surface oxides. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13:252-259.
59. Kang HG, Jeong YS, Huh YH, Park CJ, Cho LR. Impact of surface chemistry modifications on speed and strength of osseointegration. *Int J Oral Maxillofac*

- Implants*. 2018;33:780-787.
60. Sennerby L, Thomsen P, Ericson LE. A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1992;7:62-71.
 61. Ivanoff CJ, Widmark G, Johansson C, Wennerberg A. Histologic evaluation of bone response to oxidized and turned titanium micro-implants in human jaw bone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18:341-348.
 62. Gehrke SA, Eliers Treichel TL, Pérez-Díaz L, Calvo-Guirado JL, Aramburú Júnior J, Mazón P, de Aza PN. Impact of different titanium implant thread designs on bone healing: a biomechanical and histometric study with an animal model. *J Clin Med*. 2019;8:777.
 63. Baker D, London RM, O'Neal R. Rate of pull-out strength gain of dual-etched titanium implants: a comparative study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14:722-728.
 64. Favero LG, Pisoni A, Paganelli C. Removal torque of osseointegrated mini-implants: an in vivo evaluation. *Eur J Orthod*. 2007;29:443-448.
 65. Margonar R, Sakakura CE, Holzhausen M, Pepato MT, Alba JR, Marcantonio JE. The influence of diabetes mellitus and insulin therapy on biomechanical retention around dental implants: a study in rabbits. *Implant Dent*. 2003;12:333-339.
 66. Steigenga J, Al-Shammari K, Misch C, Nociti FH, Wang H-L. Effects of implant thread geometry on percentage of Osseointegration and resistance to reverse torque in the tibia of rabbits. *J Periodontol*. 2004;75:1233–1241.
 67. Gehrke SA, Marin GW. Biomechanical evaluation of dental implants with three different designs: removal torque and resonance frequency analysis in rabbits. *Ann Anat*. 2015;199:30–35.
 68. Shah FA, Johansson ML, Omar O, Simonsson H, Palmquist A, Thomsen P. Laser-modified surface enhances osseointegration and biomechanical anchorage of commercially pure titanium implants for bone-anchored hearing systems. *PLoS One*. 2016;11:e0157504.
 69. Sisti KE, de Rossi R, Antonioli AM, Aydos RD, Guastaldi AC, Queiroz TP, Garcia

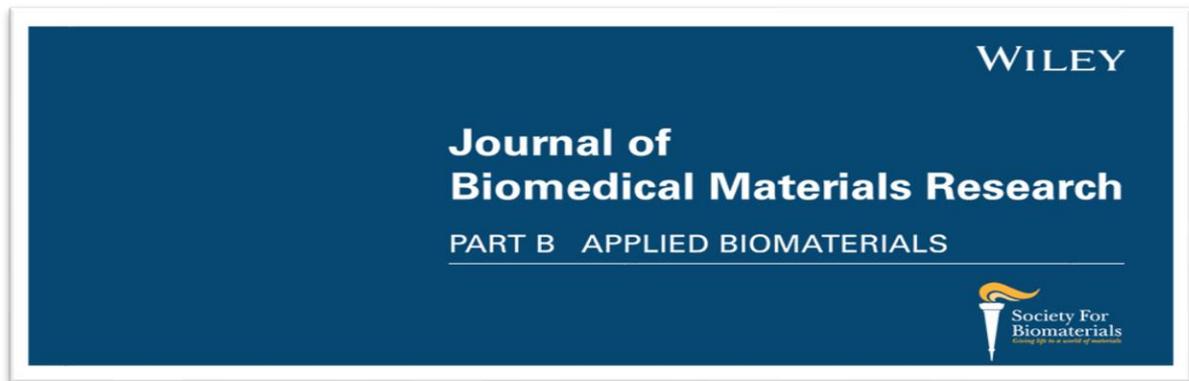
- IR Jr, Piattelli A, Tavares HS. Surface and biomechanical study of titanium implants modified by laser with and without hydroxyapatite coating, in rabbits. *J Oral Implantol*. 2012;38:231-237.
70. Devlin H, Hoyland J, Newall JF, Ayad S. Trabecular bone formation in the healing of the rodent molar tooth extraction socket. *J Bone Miner Res*. 1997;12:2061-2067.
71. Nagata M, Messori M, Okamoto R, Campos N, Pola N, Esper L, Sbrana M, Fucini S, Garcia V, Bosco A. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. *Bone*. 2009;45:339-345.
72. Souza FÁ, Furtado TSM, Dayube URC, Melo WM, Nishioka RS, Poli PP, Maiorana C, de Carvalho PSP. Comparative in vivo study of alloy titanium implants with two different surfaces: biomechanical and SEM analysis. *Clin Oral Investig*. 2019;23:4383-4397.
73. McKee MD, Nanci A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc Res Tech*. 1996;33:141-164.
74. Thorwarth M, Rupprecht S, Falk S, Felszeghy E, Wiltfang J, Schlegel KA. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (prp)--an immunohistochemical analysis. *Biomaterials*. 2005;26:2575-2584.
75. Dos Santos Pereira R, Boos FB, Gorla LF, Garcia IR Jr, Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Maxillary Sinus Elevation Surgery with ChronOS and Autogenous Bone Graft: Immunohistochemical Assessment of RUNX2, VEGF, TRAP, and Osteocalcin. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2017;37:e321–e327.

ANEXOS

ANEXO A – Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP

unesp	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 "Estudo comparativo da osseointegração de implantes manufaturados em Ti-CP ou Ti6AL4V com o sem modificação da superfície por ablação a laser. Análises biomecânica, histométrica e caracterização topográfica", Processo FOA nº 00529-2019, sob responsabilidade de Francisley Ávila Souza apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 30 de Julho de 2019.		
VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Junho de 2021. DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Julho de 2021.		
CERTIFICATE		
We certify that the study entitled "Comparative study of the osseointegration of manufactured implants in Ti-CP or Ti6AL4V with or without modification of the surface by laser ablation. Biochemical analysis, histométrica and topographic characterization", Protocol FOA nº 00529-2019, under the supervision of Francisley Ávila Souza presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on July 30, 2019.		
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: June 01, 2021. DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: July 01, 2021.		
 Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani Coordenador da CEUA CEUA Coordinator		
<hr/> 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		

ANEXO B – Normas do Periódico



Author Guidelines

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials Information for Contributors

Aims and Scope

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials is an official journal of the Society for Biomaterials, the Japanese Society for Biomaterials, the Australasian Society for Biomaterials, and the Korean Society for Biomaterials. It is a peer-reviewed journal serving the needs of biomaterials professionals who devise, promote, apply, regulate, produce, and market new biomaterials and medical devices. Papers are published on device development, implant retrieval and analysis, manufacturing, regulation of devices, liability and legal issues, standards, reviews of different device areas, and clinical applications. Published manuscripts fit into one of six categories: original research reports, clinical device-related articles, short research and development reports, review, special report, or columns and editorials. Manuscripts from all countries are invited but must be in English. Authors are not required to be members of a Society for Biomaterials.

Types of Articles Considered for Publication

Original Research Reports: Full-length papers consisting of complete and detailed descriptions of a research problem, the experimental approach, the findings, and appropriate discussion. Findings should represent significant new additions to knowledge.

Clinical Device-Related Articles: Full-length papers addressing such issues as material processing, device construction, regulatory matters, clinical trials, and device retrieval.

Reviews: Scholarly and critical topic-oriented reviews that present a state-of-the-art view. While most reviews are solicited, persons interested in contributing may contact the Editor.

Special Reports: Reports of special topic-oriented symposia, device retrieval protocols, or other special reports not described in the above categories, yet of interest to the applied biomaterials research and development community. Potential contributors should contact the Editor before submitting special reports.

Columns and Editorials: While columns and guest editorials are preponderantly solicited, persons interested in becoming columnists or contributing editorials are encouraged to contact the Editor.

Submission of Manuscripts

Online Submission:

Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials is now receiving submitted manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/jbmr-b>.

Submit all new manuscripts online. Launch your web browser and go to <http://mc.manuscriptcentral.com/jbmr-b>. Check for an existing user account. If you are submitting for the first time, and you do not find an existing account, create a new account. Follow all instructions.

At the end of a successful submission, a confirmation screen with manuscript number will appear and you will receive an e-mail confirming that the manuscript has been received by the journal. If this does not happen, please check your submission and/or contact tech support using the Get Help Now link in the right corner of any screen.

Article Preparation Support

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

Also, check out our resources for **Preparing Your Article** for general guidance about writing and preparing your manuscript.

Upon Acceptance: Manuscript files will now automatically be sent to the publisher for production. It is imperative that files be in the correct format to avoid a delay in the production schedule.

JBMR Part B has adopted a policy that requires authors to make a statement concerning potential conflict of interest relating to their submitted articles. The Editorial Board asks authors of original reports and reviews to disclose, at the time of submission: (1) any financial or employment arrangements they may have with a company whose product figures prominently in the submitted manuscript or with a company making a competitive product; and (2) any grants or contracts from a government agency, a nonprofit foundation, or a company supporting the preparation of the manuscript or the described research. This information will be available to the reviewers of the manuscript. If the article is accepted for publication, the editor will discuss with the authors the manner in which such information may be communicated to the reader.

At the time of submission, *JBMR Part B* asks authors to certify that all animals utilized in their research were cared for according to the policies and principles established by the Animal Welfare Act and the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals.

Review Process: All original reports and reviews receive critical review by at least two reviewers with expertise in the major subject area of the paper. Reviewers may recommend "Acceptance as is," "Acceptance with modification," or "Rejection." If modification is required, the manuscript is returned to the author(s). The revised manuscript is then re-reviewed by the original reviewers, and even re-revised if necessary. Differences in opinion are resolved by submission either to a third reviewer or the Editor.

Copyright/Licensing

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>.

Publication Ethics

The *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* is a member of the Committee on Publication Ethics and subscribes to its recommendations (Committee on Publication Ethics [COPE]: guidelines on good publication practice, www.publicationethics.org). The policy of Wiley and of JBMR Part B on the major ethical principles of academic publishing are described in our Best Practice Guidelines on Publication Ethics: <https://authorservices.wiley.com/ethics-guidelines/index.html> (Graf C, Wager E, Bowman A, et al., *Int J Clin Pract* 2007; 61 [suppl 152]: 126). The Editors reserve the right to reject a paper on ethical grounds. All authors are responsible for adhering to guidelines on good publication practice.

Organization and File Formats

Manuscript: For optimal production, prepare manuscript text in size 12 font on 8-1/2 x 11 inch page, double-spaced, with at least 1-inch margins on all sides. Text files should be formatted as .doc or .rtf files. The results and discussion sections must be written separately

and cannot be combined. Refrain from complex formatting; the Publisher will style your manuscript according to the Journal design specifications. Do not use desktop publishing software such as PageMaker or Quark Xpress or other software such as LaTeX. If you prepared your manuscript with one of these programs, export the text to a word processing format. Please make sure your word processing programs "fast save" feature is turned off. Please do not deliver files that contain hidden text: for example, do not use your word processor's automated features to create footnotes or reference lists. Manuscripts including references (but not figures or tables) should be no longer than 18 pages.

Please be sure to submit your illustrations and tables as separate files; the system will automatically create a pdf file of your paper for the reviewers.

Original research and short reports should appear in the following order: title page (including authors and affiliations), abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgments, references, figure legends. Number pages consecutively starting with the title page as page 1. Abbreviations must conform to those listed in Council of Biology Editors' CBE Style Manual, 5th Edition.

When mentioning a material, chemical reagent, instrument, or other product, use the generic name only. If further identification (proprietary name, manufacturer's name and address) is absolutely required, list it in parentheses.

Title Page: List the full title of the paper and each author's full name (first name, middle initial(s), surname), department, institution, city, and state (and country if other than the United States). Indicate the name and address of the author to whom reprint requests should be sent.

Abstract and Keywords: Include an abstract of about 200 words maximum summarizing the aims, findings, and conclusions of the paper. Below the abstract, list five keywords or phrases that best characterize the subject matter of the manuscript.

Running Heads: Supply a short title of no more than 65 characters, including spaces and punctuations, to be used for running head copy.

References: Number references consecutively as they appear in the text. Material accepted for publication but not yet published may be listed in the References, but unpublished observations, personal communications, and material submitted for publication but not yet accepted should be cited parenthetically within the text (and not included among the numbered references). Style reference entries using the Council of Biology Editors Style Manual, 5th Edition formats:

For journal articles:

Alexander A, Green WS. Total hip replacements: A second look. *J Soc Biomater* 1989;45:345–366.

For books/chapters:

Ricci JL, Guichet J-M. Total hip replacement: A third look. Cindra AB, Franklin DE, editors. *State of the art orthopaedics*, vol 3, Hips. New York: Wiley; 1988:56–59.

For abstracts:

Davidson GRH. Total hip replacement: A fifth look. *Trans ABCS* 1987;22-341–345.

For presentations:

Goodenough T. Total hip replacement: A sixth look. Presented at the 3rd Annu Mtg Orthop

Res Soc, Boston, December 5–7, 1989.

Figure Legends: Please supply complete captions for all figures. Captions are to appear on a separate page at the end of the manuscript.

Tables: Please save Tables separately and supply numbers and titles for all. All table columns should have an explanatory heading. Tables should be submitted as doc or rtf files (it is preferred that tables are prepared using Word's table edit tool.)

Illustrations: When preparing digital art, please consider:

Resolution:

The minimum requirements for resolution are:

1200 DPI/PPI for black and white images, such as line drawings or graphs.

300 DPI/PPI for picture-only photographs

600 DPI/PPI for photographs containing pictures and line elements, i.e., text labels, thin lines, arrows.

These resolutions refer to the output size of the file; if you anticipate that your images will be enlarged or reduced, resolutions should be adjusted accordingly.

Formats:

For the editorial review process, GIF and JPEG files are acceptable; upon submission of a revision, TIFF or EPS files will be required. For the editorial review process, color images may be submitted in RGB color; upon revision, CMYK color will be required. Delivery of production-quality files early in the review process may facilitate smooth and rapid publication once a manuscript has been accepted.

Note that these figure file formats are not acceptable for publication: ONG, PCX, PNG, XBM, Word, and Excel. We recommend creating your graphics in Photoshop, Illustrator, or Freehand and importing them into your page applications as TIFFs with all fonts included. Do not scan figures as JPEGs and convert to TIFFs. For further guidance on preparing digital figurefiles, authors are encouraged to visit [Wiley's guidelines for figure preparation](#).

A legend must be provided for each illustration and must define all abbreviations used therein. Legends should be placed at the end of the manuscript text file.

Color Illustrations: All color figures will be reproduced in full color in the online edition of the journal at no cost to authors. For best reproduction, bright, clear colors should be used. Dark colors against a dark background do not reproduce well; please place your color images against a white background wherever possible.

Article Promotion Support

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

Cover Image Submissions

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

Data Sharing and Data Availability

This journal expects data sharing. Review [Wiley's Data Sharing policy](#) where you will be able to see and select the data availability statement that is right for your submission.

Note to NIH Grantees:

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.