



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba



**Yasmin Comoti Vita Bantim**

**Uso do plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma rico em  
fibrina (PRF) em defeitos peri-implantares: análises  
biomecânica e histomorfométrica**

Araçatuba  
2020



**Yasmin Comoti Vita Bantim**

**Uso do plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma rico em  
fibrina (PRF) em defeitos peri-implantares: análises  
biomecânica e histomorfométrica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, FOA - UNESP, para a obtenção do título de em “Mestre em Odontologia” – Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador:  
Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior  
Coorientadora:  
Profa. Dra. Roberta Okamoto

Araçatuba

2020

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Bantim, Yasmin Comoti Vita

B219d      Uso do plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma rico em fibrina (PRF) em defeitos peri-implantares: análises biomecânica e histomorfométrica / Yasmin Comoti Vita  
Bantim 57 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior  
Coorientadora: Profa. Roberta Okamoto

1. Regeneração óssea 2. Plasma rico em plaquetas 3. Fibrina rica em plaquetas 4. Peri-Implantite I. T.

Black D7  
CDD 617.6

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

## **Dedico este trabalho...**

### **À Deus,**

Pela sua infinita bondade, misericórdia e amor. Nos momentos difíceis, pude sentir sua presença e o Senhor foi meu amparo. A fé em Deus e a perseverança foram os pilares que me mantiveram firme nessa caminhada.

### **À toda minha família,**

Minha base. Sou grata e abençoada por ter um conjunto extraordinário de pessoas únicas com quem posso compartilhar a vida. Obrigada pelas palavras motivacionais, pelo apoio e por todo carinho.

### **Aos meus pais, Mylene e Herbson,**

Mãezinha, a vida me colocou em caminhos diferentes e por eles descobri que não é fácil estar só. Que o colo de alguém que te ama é o melhor lugar do mundo e que não há abraço igual ao de uma mãe. Mas ao seu lado aprendi que não há desafio grande demais que um coração determinado e justo não consiga superar. Seu cuidado e amor, mesmo que de longe, me proporcionaram a esperança para seguir em frente. Obrigada por me ser essa mãe maravilhosa que é. Meu querido pai, que nunca mediu esforços para lutar por minha educação. Obrigada por todo apoio, carinho e por sempre vibrar com as minhas vitórias. O senhor é meu exemplo de caráter e dignidade.

### **À minha avó, Maria,**

Vó, quando passo por alguns percalços, lembro-me de sua história. Uma mulher que ao longo da sua vida, travou duras batalhas, sacrificou muito, sentiu na pele a necessidade, mas nunca virou o rosto à luta. Com muito esforço, carinho e esmero, construiu a linda família que hoje tanto ama. A senhora é uma guerreira. É um privilégio ser sua neta. Obrigada por cuidar de todos nós com tanto amor.

### **Ao meu avô, Antônio (in memoriam),**

Eternamente, agradecerei, com saudosa memória, ao homem da minha vida, meu maior exemplo de simplicidade e humildade. O senhor é minha motivação diária. Sei que zela por mim e me dá forças para continuar em busca do meu propósito. Seu amor puro e as nossas boas lembranças permanecerão intactas em meu coração por toda eternidade.

**Aos meus amigos,**

**Hellen, Miguel, Nathália, Nayara, Wesley e Caio.** Obrigada por todos os momentos únicos e felizes que compartilhamos. E mesmo que distantes, nunca deixaram de me apoiar e de me proporcionar muitas risadas pelo WhatsApp. Vocês são os melhores!

**Ao meu namorado, Gilberto,**

Meu namorado, amigo e conselheiro, que me acompanhou de perto nessa caminhada e me deu forças para continuar. Sua presença foi essencial. Obrigada por viver esse sonho comigo. Você foi meu maior incentivador e serei eternamente grata por todo carinho, cuidado, apoio e paciência que tem comigo.

**Ao meu professor e amigo, Sérgio,**

Minha maior inspiração. Minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem a sua participação. Você é um exemplo de competência e profissionalismo. Agradeço pela amizade, pelos ensinamentos, pelos conselhos, por toda motivação e confiança depositada em mim. Te admiro.

## AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, pela oportunidade de fazer parte de uma universidade inigualável e referência na tríade ensino, pesquisa e extensão universitária. Muito obrigada por me proporcionar a realização de um sonho.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior**. Sempre solícito e de grande coração. Obrigada pela oportunidade de ser sua orientada e por sempre me acolher nos momentos que precisei. O senhor é um exemplo de profissional e ser humano, minha referência na cirurgia, no ensino e na pesquisa. Palavras nunca serão suficientes para expressar a gratidão, admiração e carinho que tenho pelo senhor. Obrigada por tudo!

À minha coorientadora **Profa. Dra. Roberta Okamoto**. Obrigada por ter aceitado o convite de ser minha coorientadora, que sorte a minha conviver com uma pessoa tão humilde e dedicada. A senhora tem minha admiração e respeito.

Ao **Prof. Dr. Francisley Ávila Souza**. Foi um prazer ser sua aluna na pós-graduação. Obrigada pelo carinho e principalmente por todo conhecimento compartilhado durante os momentos que convivemos.

Ao **Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani**, um exemplo de professor, sempre disposto a ajudar seus alunos. Sou eternamente grata pelos ensinamentos e ajuda na minha pesquisa.

Ao **Prof. Dr. André Luis da Silva Fabris**, pela simplicidade e simpatia em todos os momentos que nos encontramos. Obrigada por ter aceitado fazer parte de minha banca examinadora.

Ao **Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin**, por todo carinho e respeito que tem por mim. Obrigada por ter me aceitado no estágio voluntário na disciplina de anatomia, lugar onde pude aprender, ensinar e conviver com pessoas maravilhosas como o senhor.

Aos Professores **Oswaldo Magro Filho, Alessandra Marcondes Aranega, Daniela Ponzoni, Ana Paula Farnezi Bassi**, por serem os grandes docentes, sempre dispostos a ensinar e ajudar, nos fazendo sentir em casa. Um grande abraço!

Ao meu amigo e irmão que o mestrado me deu, **Breno dos Reis Fernandes**. Cara, nunca conheci alguém que tenha o coração tão puro como o seu! Você é uma das pessoas das quais jamais quero perder o contato. Obrigada pelos puxões de orelha, pelas risadas (que foram muitas), por me ouvir nos momentos em que eu precisava desabafar com alguém e por todos os momentos que compartilhamos.

A todos os **colegas do Mestrado e Doutorado**, que em algum momento se dedicaram em me ajudar durante essa trajetória, minha gratidão! Levarei comigo um pedacinho de

cada um de vocês. Obrigada pelos momentos agradáveis que passamos juntos na pós-graduação.

À **Sabrina Ferreira**, por toda ajuda e incentivo. Muito obrigada por todo tempo que disponibilizou para me ajudar com a minha pesquisa e carinho comigo sempre.

Aos funcionários da pós-graduação **Valéria, Lilian e Cristiane**, pela disponibilidade, atenção e educação. Obrigada por me ajudarem com tanta dedicação e competência.

Às funcionárias **Michele, Fran, Camila e Héliide**, que sempre me acompanharam durante essa jornada e sabem das dificuldades e dos percalços. Obrigada por toda a ajuda, por serem amigas, por fazerem coisas impossíveis se tornarem possíveis.

Aos funcionários do departamento **Marco, Paulo, Renato, Arnaldo, João e Fausto**, por todo suporte laboratorial, da secretaria, respeito e auxílio durante todo o curso.

Aos funcionários **Dirce e Gilmar**, que mesmo aposentados sempre se fazem presentes para nos ajudar a manter um trabalho de qualidade. Obrigada por me socorrer sempre, vocês são sensacionais.

Aos **pacientes**, pela confiança depositada a nós pós-graduandos, permitindo-nos aprimorar as habilidades cirúrgicas. Minha gratidão.

*Existe um momento na vida de cada pessoa que é possível sonhar e realizar nossos sonhos. E esse momento tão fugaz chama-se presente e tem a duração do tempo que passa.*

*(Mario Quintana)*



Bantim, YCV. Uso do plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma rico em fibrina (PRF) em defeitos peri-implantares: análises biomecânica e histomorfométrica [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2020.

## **RESUMO**

O presente trabalho teve o objetivo avaliar o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma rico em fibrina (PRF) em defeitos peri-implantares por meio das análises biomecânica e histomorfométrica. Para tanto, 36 ratos machos adultos foram divididos em 3 grupos: controle (CO), plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma rico em fibrina (PRF). Previamente à realização dos procedimentos cirúrgicos, foram coletados 3 ml de sangue de cada animal via punção cardíaca, seguindo-se pelos respectivos protocolos de centrifugação para obtenção de PRP e PRF. Um defeito ósseo foi preparado na tibia esquerda e um implante foi instalado manualmente. Conforme o grupo experimental, o defeito peri-implantar não sofreu intervenção ou foi preenchido com PRP ou PRF. A eutanásia foi realizada em 20 e 40 dias. Os resultados mostraram que houve diferença estatística significativa presente intergrupos e interperíodos ( $p < 0,05$ ) na análise biomecânica. Os resultados histológicos apresentaram maior atividade celular nos grupos experimentais em relação ao grupo controle. Os dados sobre a área óssea neoformada (AON) demonstraram uma maior formação óssea nos grupos PRP e PRF em relação ao grupo controle. Entretanto, entre todos os grupos não houve diferença estatística significativa, assim como na análise entre os grupos e os períodos. Contudo, entre os períodos houve diferença estatística significativa ( $p < 0,001$ ). A aplicação de PRP nos defeitos peri-implantares em tíbias de ratos mostrou-se mais eficaz na resposta de estabilidade do implante e na neoformação óssea sendo superior ao plasma rico em fibrina (PRF) e ao grupo controle (coágulo).

**Relevância Clínica:** os defeitos peri-implantares são uma realidade clínica e o uso de concentrados plaquetários é uma alternativa para um tratamento. A literatura apresenta resultados satisfatórios em relação às altas concentrações de fatores de crescimento que podem afetar o processo de regeneração tecidual e neoformação óssea.

**Palavras-chaves:** regeneração óssea, plasma rico em plaquetas, plasma rico em fibrina, peri-implantite

Bantim, YCV. The use of platelet rich plasma (PRP) and fibrin rich plasma (PRF) in peri-implant defects: biomechanical and histomorphometric analyzes [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2020.

## **ABSTRACT**

The aim of the present study was to evaluate the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet rich fibrin (PRF) in peri-implant defects submitted to biomechanical and histomorphometric analysis. Thirty-six adult male rats were divided into 3 groups: control (CO), platelet rich plasma (PRP) and fibrin rich plasma (PRF). Prior to the surgical procedures, 3 ml of blood were collected from each animal via cardiac puncture, followed by the respective centrifugation protocols to obtain PRP and PRF. A bone defect was prepared in the left tibia and an implant was manually installed. The defect was filled with PRP, PRF or own clot. Euthanasia was performed at 20 and 40 days. The results showed that there was statistically significant difference between groups and periods ( $p < 0.05$ ) in the biomechanical analysis. The histological results showed higher cellular activity in the experimental groups compared to the control group. Data on the newly bone area showed a higher bone formation in the PRP and PRF groups compared to the control group. However, there was no statistically significant difference in all groups, as well as in the analysis between groups and periods. Only between the periods there was a statistically significant difference ( $p < 0.001$ ). The application of PRP to peri-implant defects in rat tibias was more effective in implant stability response and bone neoformation being superior to fibrin-rich plasma (PRF) and control group (clot).

**Key words:** bone regeneration, platelet-rich fibrin, platelet-rich plasma; peri-implantitis

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Procedimento cirúrgico: (a) região de metáfise tibial externa; (b) tecido mole foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo; (c) preparo do defeito ósseo; (d) defeito ósseo   5 mm; (e) instalação do implante   diâmetro de 1,6 mm e altura de 3,0 mm; (f) defeito ósseo foi preenchido com PRP; (g) defeito ósseo foi preenchido PRF; (h) tecidos suturados em posição. ....	25
Figura 2 - Aspecto do plasma rico em plaquetas   PRP .....	26
Figura 3 - Aspecto do plasma rico em fibrina   PRF .....	27
Figura 4 - Grupos CO, PRP e PRF nos períodos de 20 e 40 dias, torque (N.cm), média e desvio padrão. ....	31
Figura 5 - Prancha com as imagens histológicas apresentando aspecto dos grupos PRP (A), controle (B) e PRF (C) no período de 20 dias. HE   aumento de 125X. ....	32
Figura 6 - Prancha com as imagens histológicas apresentando aspecto dos grupos PRP (A), controle (B) e PRF (C) no período de 40 dias. HE   aumento de 125X. ....	33
Figura 7 - Gráfico das médias obtidas a partir da mensuração de Área Óssea Neoformada (AON) em $\mu\text{m}$ nos períodos de 20 e 40 dias. ....	35

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Grupos CO, PRP e PRF nos períodos de 20 e 40 dias, torque (N.cm), média e desvio padrão. ....	31
---	----

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

PRP	Plasma rico em plaquetas	Platelet-rich plasma
PRF	Plasma rico em fibrina	Platelet-rich fibrin
CGF	fator de crescimento concentrado	Concentrated growth factor
CO	controle	Grupo controle
ELCOI	extensão linear de contato osso-implante	

# SUMÁRIO

1 Introdução .....	16
2 Proposição .....	21
3 Material e Método.....	23
3.1 Desenho Experimental.....	23
3.1.1 Preparação do espécime .....	23
3.2 Procedimento cirúrgico .....	23
3.2.1 Preparo do defeito ósseo .....	24
3.2.2 Instalação do implante .....	24
3.2.3 Protocolo de centrifugação para obtenção do PRP .....	25
3.2.4 Protocolo de centrifugação para obtenção do PRF.....	26
3.3 Análise biomecânica .....	27
3.4 Análise histomorfométrica.....	28
3.5 Análise estatística .....	28
4. Resultado .....	31
4.1 Análise biomecânica .....	31
4.2 Análise histomorfométrica.....	31
4.3 Análise estatística .....	34
5 Discussão.....	37
5 Conclusão .....	42
Referências .....	44
Anexos .....	53

# **INTRODUÇÃO**

## 1 Introdução

Os implantes osseointegrados são frequentemente utilizados em cirurgias reconstrutivas e reabilitadoras, tanto no campo ortopédico quanto na odontologia, restabelecendo a função e melhorando a qualidade de vida dos pacientes [1]. A osseointegração envolve uma técnica cirúrgica específica, um material biocompatível e um ambiente de cicatrização adequado [2]. Nesta tríade, as superfícies dos implantes foram modificadas com a finalidade diminuir o tempo de regeneração para a osseointegração [3–7]. Os implantes, além do ajuste adequado ao osso, devem promover a ativação de osteoblastos no tecido comprometido, estimulando a osteogênese [6] e a formação óssea por meio da diferenciação dos osteoblastos, produção de fatores osteogênicos, citocinas e fatores de crescimento [8].

Os tratamentos com implantes dentários osseointegrados são seguros e apresentam altas taxas de sucesso e mínima reabsorção óssea a longo prazo [9]. Entretanto, a ocorrência de defeitos peri-implantares é uma realidade e pode surgir durante a colocação do implante dentário imediato, onde uma deformidade óssea entre as paredes do alvéolo remanescente e o implante pode surgir [10]. A peri-implantite é outro fator presente nos tratamentos [11] e sua prevalência é dependente do tempo funcional do implante dentário [12]. A infecção bacteriana, o estresse mecânico intenso e a corrosão do implante são fatores etiológicos das doenças peri-implantares [13]. Os pacientes com diagnóstico de peri-implantite necessitam de intervenção precoce com o intuito de evitar a perda do implante [14, 15].

As intervenções clínicas em peri-implantites podem ser conservadoras ou cirúrgicas. A intervenção clínica não-cirúrgica consiste na higienização mecânica das superfícies e por polimento a ar, aliados à lavagem antisséptica com antibióticos locais ou administração de antibioticoterapia sistêmica. A fotodinâmica e utilização de laser auxiliam a terapia [16]. As intervenções cirúrgicas podem ser ressectivas ou regenerativas. O tratamento da bolsa periodontal e manutenção da superfície óssea descrevem a técnica ressectiva,



enquanto que a técnica regenerativa busca reparar o osso perdido em decorrência da peri-implantite com o uso de enxertos ósseos autógenos, alógenos, xenógenos ou sintéticos, em conjunto ou não com membranas [17].

Os enxertos destinados ao tratamento de peri-implantite podem ter como coadjuvante os concentrados plaquetários: plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma rico em fibrina (PRF). Esses concentrados plaquetários vêm sendo investigados na cirurgia oral e maxilo-facial [18–25] em animais [10, 25–32] e humanos [33–37], inclusive sua aplicação no tratamento de peri-implantite [19, 26, 27, 34] e defeitos peri-implantares experimentais [10, 30]. Porém, não há um consenso sobre qual é o melhor método [10].

O PRP é a primeira geração dos concentrados plaquetários sendo um conjunto autólogo de plaquetas em um pequeno volume de plasma [38]. Sua concentração chega a ser 4 a 6 vezes acima dos níveis fisiológicos, ou seja, aproximadamente 1 milhão de plaquetas por microlitros [38–40]. A segunda geração é o PRF [41–44] que consiste em uma malha forte e flexível de fibrina na qual plaquetas, leucócitos, citocinas e fatores de crescimento são aglutinados durante a centrifugação [45, 46]. O uso de PRP e PRF facilitam a neoformação óssea acelerando o processo de cicatrização em defeitos ósseos [18, 47].

A análise da região peri-implantar pós-aplicação de PRP foi investigada em radiografias panorâmicas realizando-se uma avaliação baseada na textura das imagens associada às propriedades de formação óssea. Os resultados demonstraram que a adição de PRP teve um efeito positivo significativo na formação óssea [48]. A influência de PRP na cicatrização óssea em implantes dentais também foi observada em análises histológica e histomorfométrica, constando na fase inicial da cicatrização um maior contato osso-implante após a aplicação tópica de PRP [49].

Ensaios científicos estudaram o PRP e sua relação com a regeneração óssea [47, 48, 50–54]. O PRP tem amplo uso em procedimentos maxilo-faciais como em fraturas não consolidadas, osteomielite, osteorradionecrose, cicatrização de alvéolo pós-extração de molares impactados, regeneração nervosa em cirurgia estética, incluindo cirurgia de transplante capilar. É potencialmente eficaz no manejo de feridas complexas e defeitos de tecidos

duros e moles na região maxilo-facial com mínima morbidade do doador [55]. O conceito de aproveitar o sangue do próprio paciente para facilitar a cura, fato existente desde o início dos anos 1980 [56], permitiu o uso do PRP como um acelerador da osseointegração em implante dentário [50].

Igualmente, o PRF tem compatibilidade e capacidade de induzir a regeneração óssea e de tecidos moles apresentando resultados surpreendentes em cirurgias de enxerto ósseo no seio maxilar, em cirurgias periodontais, assim como em procedimentos para reduzir a inflamação ao redor de implantes [46]. O PRF preserva eficientemente os fatores angiogênicos de tal forma que funcionem não apenas como um material de suporte, mas como um reservatório de fatores de regeneração das feridas [52].

A comparação dos efeitos do PRP, PRF e o fator de crescimento concentrado (CGF) na cicatrização óssea foi analisada por radiografia, microtomografia computadorizada e histomorfometria. Baseado nos métodos de preparo do PRP, PRF e CGF utilizados, a amostra e o tamanho do defeito, os resultados mostraram que a aplicação de fatores de crescimento, bem como outros tratamentos, como enxerto ósseo para uma área onde a regeneração é necessária, podem acelerar a cicatrização do enxerto ósseo e diminuir o tempo para a colocação do implante dentário, minimizando o período em que os pacientes permanecem edêntulos [47].

Estudos do PRP ou PRF isolados em comparação com um grupo controle de coágulo vem sendo realizados em humanos. Um protocolo em que o implante dentário foi mergulhado em PRP, analisou a estabilidade e níveis ósseos em casos de implantes de carga imediata. Constataram que as superfícies de implante tratadas com o PRP aumentaram a estabilidade e qualidade óssea nas regiões analisadas [57]. Uma maior estabilidade também foi constatada em uma investigação nos procedimentos incluídos com PRF em comparação ao grupo controle (coágulo) em casos de implante de carga imediata ou não [35, 58].

A literatura apresenta resultados satisfatórios em relação aos concentrados plaquetários sem, no entanto, descrever claramente como esses manipulados atuam na aceleração da remodelação óssea [19]. Mais estudos necessitam ser realizados para verificar as consequências do uso do PRP e PRF

em longo prazo [47] na regeneração óssea e conseqüentemente na sua aplicação na correção de defeitos peri-implantares.

**PROPOSIÇÃO**

## **2 Proposição**

O presente trabalho teve o objetivo avaliar o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) e plasma rico em fibrina (PRF) em defeitos peri-implantares por meio das análises biomecânica e histomorfométrica.

# **MATERIAL E MÉTODO**

## **3 Material e Método**

### **3.1 Desenho Experimental**

#### *3.1.1 Preparação do espécime*

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais | CEUA do Câmpus Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (UNESP) sob o processo FOA nº 00555/2018, seguindo as recomendações da *Arrive Guidelines*. Foram utilizados 36 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus albinus*, *Wistar*), de cinco meses de idade, pesando aproximadamente 500g. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (quatro animais/caixa), com temperatura em  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , ciclo de luz controlado (12/12 h) com ração e água *ad libitum* no Biotério da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba–UNESP.

Os ratos (n=36) foram divididos aleatoriamente em 3 grupos distintos para os experimentos: grupo (1) controle (CO) (n=12), grupo (2) implante com loja cirúrgica tratada com plasma rico em plaquetas (PRP) (n=12), e grupo (3) implante com loja cirúrgica tratada com plasma rico em fibrina (PRF) (n=12).

#### **3.2 Procedimento cirúrgico**

Os animais foram submetidos a jejum de 8 horas antes da cirurgia e foram anestesiados com 50mg/kg de Ketamina intramuscular (Vetaset – Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5mg/Kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil Ltda – Osasco, São Paulo, Brasil) e cloridrato de mepivacaína (0.3 mL/Kg, Scandicaíne 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e para hemostasia do campo operatório. Após a sedação dos animais foi realizada tricotomia na porção medial da tíbia esquerda. A antissepsia da região foi realizada com Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante (PVPI 10%, Riodeíne Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil). Com uma lâmina número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) cada tíbia teve realizada uma incisão de aproximadamente 2 cm de comprimento na região de metáfise tibial externa e a

seguir, o tecido mole foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo.

### *3.2.1 Preparo do defeito ósseo*

Os defeitos ósseos foram preparados pelo mesmo operador. Após a exposição cirúrgica da parte medial da diáfise proximal da tíbia esquerda, um defeito ósseo de formato retangular com extremidades arredondadas foi preparado medindo 05 mm utilizando-se broca esférica (Broca Carbide Cirúrgica FG 8 Kavo, Joinville, SC, Brasil) sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Para tanto, um medidor de profundidade para implante foi posicionado paralelamente à superfície óssea permitindo mensurar o comprimento proposto para o defeito ósseo que alcançou a profundidade do diâmetro da broca.

### *3.2.2 Instalação do implante*

Foram instalados 36 implantes de titânio que receberam tratamento de superfície por duplo ataque ácido (Implalife Biotecnologia), com diâmetro de 1,6 mm e altura de 3,0 mm, esterilizados por raios gama. Estes implantes apresentavam o módulo de rebordo quadrado. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa de 1,4 mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), e contra-ângulo com redução 16:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany) e profundidade de 3,0 mm

Cada animal recebeu um (01) implante, com travamento e estabilidade inicial. Os implantes foram colocados manualmente com uma chave digital quadrada e foram instalados na tíbia esquerda de cada animal. Finalizada a instalação do implante, o defeito ósseo foi preenchido pelo próprio coágulo (grupo controle) ou pelo preparado de PRP (grupo PRP) ou com o preparado de fibrina (grupo PRF), conforme respectivo protocolo cirúrgico. Os defeitos ósseos



foram deixados para cicatrizar por 20 e 40 dias. A eutanásia dos ratos foi realizada por meio de superdosagem anestésica 150mg/kg (Thiopental - Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil).

Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos por planos. No pós-operatório imediato, cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP) e dipirona sódica (1 mg / kg / 1 dia; Ariston, Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda, São Paulo, Brasil).

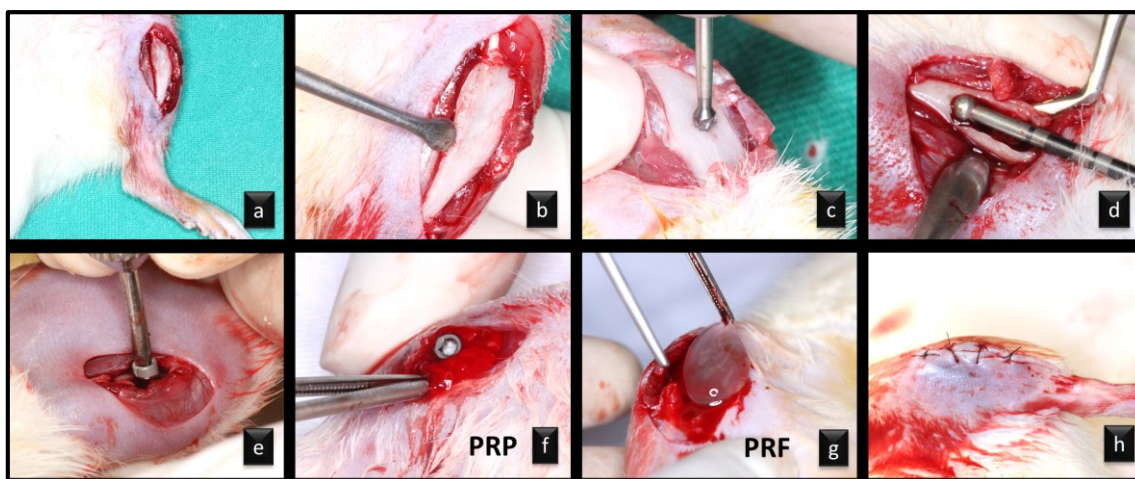


Figura 1 - Procedimento cirúrgico: (a) região de metáfise tibial externa; (b) tecido mole foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo; (c) preparo do defeito ósseo; (d) defeito ósseo | 5 mm; (e) instalação do implante | diâmetro de 1,6 mm e altura de 3,0 mm; (f) defeito ósseo foi preenchido com PRP; (g) defeito ósseo foi preenchido PRF; (h) tecidos suturados em posição.

### 3.2.3 Protocolo de centrifugação para obtenção do PRP

Previamente à realização dos procedimentos cirúrgicos, foram coletados 3 ml de sangue de cada animal via punção cardíaca, utilizando uma seringa descartável de 5 ml. Após a coleta, o sangue foi transferido para outro tubo contendo 0,3 ml de citrato de sódio a 3,2% como anticoagulante.

O preparo do PRP foi realizado de acordo com o protocolo de Nagae et al. [59] onde cada amostra coletada foi inicialmente submetida a uma centrifugação (Hermle Z323K, Hermle Labortechnik GmbH., Wehingen, Baden-Württemberg, Alemanha) por 10 minutos a 1800 RPM (250 X g), para separar o

plasma contendo as plaquetas das células vermelhas, no qual o sangue, de acordo com o gradiente de densidade, dividiu-se em três camadas: 1 - plasma pobre em plaquetas (PPP); 2 - Zona de névoa (plaquetas e leucócitos); 3 - hemácias.

O sobrenadante, juntamente com a zona de névoa e pequena quantidade de hemácias, com auxílio de pipeta, foi transferido para outro tubo que foi submetido a uma segunda centrifugação por 10 minutos a 3.600 RPM (1.000 X g).



Figura 2 - Aspecto do plasma rico em plaquetas | PRP

#### *3.2.4 Protocolo de centrifugação para obtenção do PRF*

Seguindo o mesmo protocolo de coleta sanguínea, antes da realização dos procedimentos cirúrgicos, foram coletados 3,0 ml de sangue de cada animal via punção cardíaca, utilizando uma seringa descartável de 5 ml, sem a adição de anticoagulante.

O preparo da PRF foi realizado de acordo com uma adaptação do protocolo de Dohan et al. [60] cada amostra coletada foi imediatamente centrifugada (Hermle Z323K, Hermle Labortechnik GmbH., Wehingen, Baden

Württemberg, Alemanha) somente uma vez, a 3.000 RPM (400 X g) por 10 minutos, dividindo a amostra em 3 segmentos. Um coágulo de fibrina (PRF) foi obtido na porção intermediária do tubo, entre os corpúsculos vermelhos localizados na porção inferior e o plasma acelular (PPP) localizado na porção superior do tubo. Este PPP foi, então, descartado e a PRF foi pinçada do interior do tubo e separada da porção de corpúsculos vermelhos com o uso de uma lâmina de bisturi número 15.



Figura 3 - Aspecto do plasma rico em fibrina | PRF

### 3.3 Análise biomecânica

Para a análise biomecânica foram destinados 2 animais por cada grupo (CO, PRP e PRF) nos períodos de 20 e 40 dias, sendo conduzida a realização do teste de torque reverso imediatamente após a eutanásia. As metáfises das tíbias foram reabertas para exposição dos implantes e o torque reverso foi aplicado por meio do torquímetro analógico (Tohnichi Torque Gauge BTG90CN-S [10~90cNm], Tokyo, Japan). Foi realizado um movimento anti-horário aumentando-se o torque reverso até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, rompendo-se completamente a interface osso/implante, momento em que o torquímetro registrou o pico máximo de torque para esse rompimento, registrado os valores em Newton por centímetro (N.cm). Os valores obtidos

foram agrupados e submetidos à análise estatística mais adequada de acordo com a distribuição na curva de normalidade, adotando nível de significância a 5% [61–63].

### **3.4 Análise histomorfométrica**

Quatro tíbias de cada grupo experimental (CO, PRP, PRF) foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por 5 semanas, desidratadas em sequência de álcoois e diafanizadas. As peças obtidas foram incluídas em parafina separadamente e receberam cortes de 6 µm de espessura para a montagem em lâminas histológicas.

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E | Merck & Co., Inc.). Em seguida, a célula osteoblástica, o osso trabecular, a lacuna óssea e o reparo dos vasos sanguíneos do osso recém-formado foram analisados ao microscópio óptico (Jenamed 2 Histology, Carl Zeiss, Alemanha) e as imagens capturadas por meio de uma câmera fotográfica (sistema AxioCam ICc1, Carl Zeiss Microimaging) acoplada ao microscópio e ao computador. A captura das imagens foi feita através do aplicativo Axio Vision Release 4.8.2 SP1 (12-2011), Carl Zeiss, Alemanha.

As análises histomorfométricas foram realizadas por meio do software de análise de imagens ImageJ (ImageJ 1.52a, National Institute of Health, EUA). A extensão linear de contato osso-implante (ELCOI) foi mensurada a partir da primeira espira registrada no tecido da margem óssea em µm (micrômetro). Também foi analisada a área óssea neoformada. Os valores obtidos foram registrados em tabela, comparados para cada grupo entre si e para os diferentes grupos em cada período de avaliação. Os dados obtidos em cada tipo de comparação foram submetidos à análise estatística.

### **3.5 Análise estatística**

Para a análise estatística, os dados obtidos foram submetidos a um teste de normalidade e homocedasticidade (teste Shapiro-Wilk,  $p > 0,05$ ) o qual foi utilizado para avaliar a distribuição das amostras, que foram paramétricas. Após

a confirmação da distribuição normal destas, o teste Anova 2 Fatores seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas, quando necessário. Os testes foram realizados por meio do programa Sigma Plot versão 12.0. Para todos os dados, um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) foi considerado significativo.

**RESULTADO**

## 4. Resultado

Os atos cirúrgicos foram bem tolerados pelos ratos não havendo intercorrências e a recuperação dos animais ocorreu sem sinais de infecção. Após a eutanásia, nenhum sinal de reações adversas nos tecidos foi visualizado. Todos os implantes estavam *in situ* quando houve a eutanásia e todos os espécimes estavam disponíveis para a análise.

### 4.1 Análise biomecânica

Para a análise biomecânica foram considerados os valores absolutos de torque reverso, em N.cm, nos grupos CO, PRP e PRF (n=2), nos períodos de 20 e 40 dias. Esses valores estão demonstrados na tabela 1, destacando as médias e desvios padrão. A figura 5 apresenta os valores médios e desvio padrão dos torques reversos aplicados nos grupos CO, PRP e PRF.

Tabela 1 – Grupos CO, PRP e PRF nos períodos de 20 e 40 dias, torque (N.cm), média e desvio padrão.

GRUPO	Períodos						Períodos					
	20			40			20			40		
TORQUE (N.cm)	CO	CO	PRF	PRF	PRP	PRP	CO	CO	PRF	PRF	PRP	PRP
	5	5	9	8	9	9	13	13	15	15	20	19
MÉDIA	5		8,5		9		13		15		19,5	
DESV PAD	0		0,5		0		0		0		0,5	

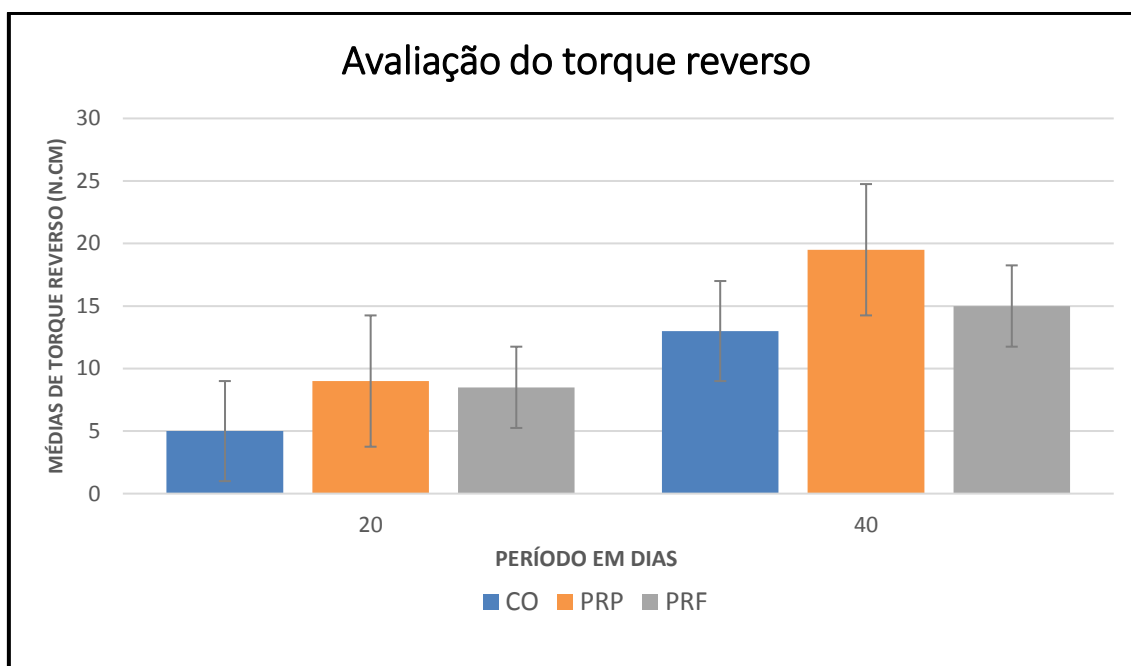


Figura 4 - Grupos CO, PRP e PRF nos períodos de 20 e 40 dias, torque (N.cm), média e desvio padrão.

### 4.2 Análise histomorfométrica

O período de 20 dias revela discreta formação de osso imaturo no grupo controle (Fig. 7B), fato mais evidente nos grupos experimentais.

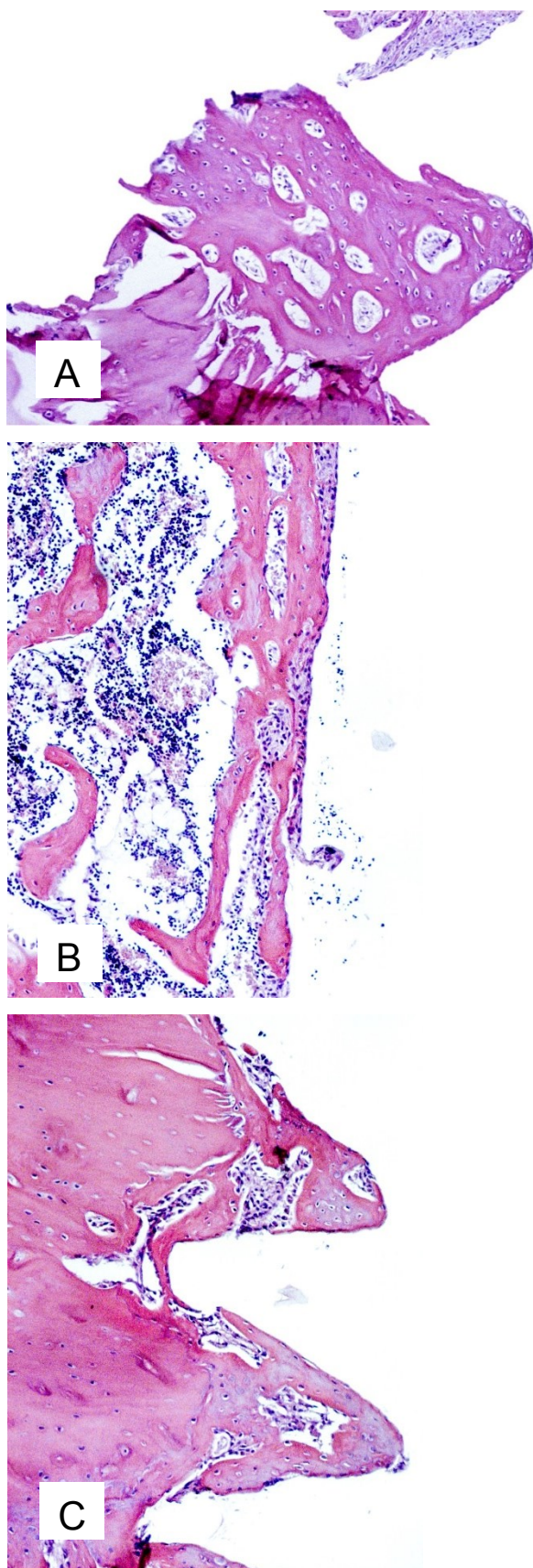


Figura 5 - Prancha com as imagens histológicas apresentando aspecto dos grupos PRP (A), controle (B) e PRF (C) no período de 20 dias. HE | aumento de 125X.



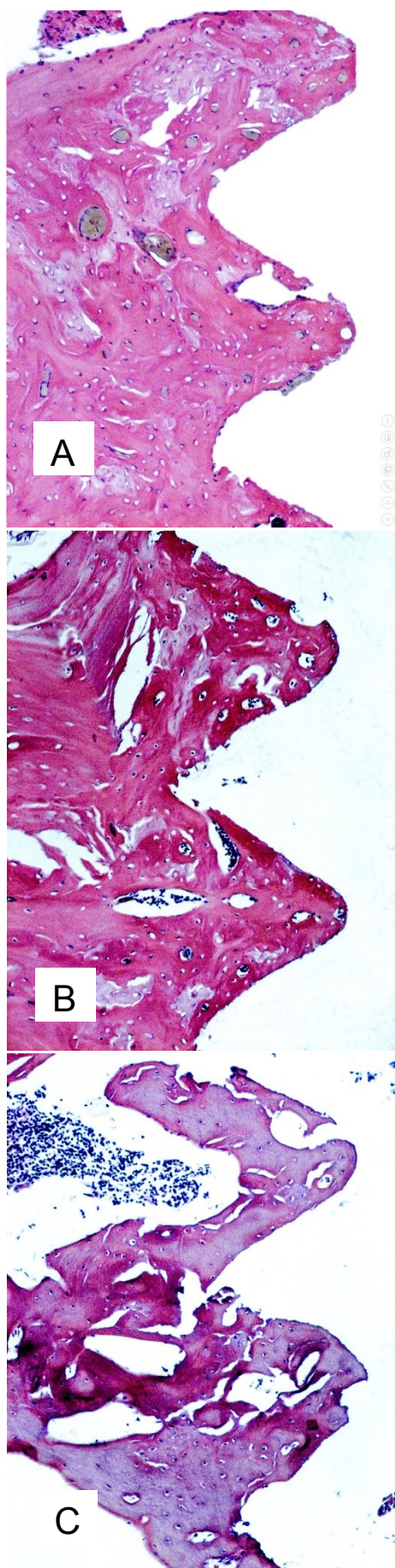


Figura 6 - Prancha com as imagens histológicas apresentando aspecto dos grupos PRP (A), controle (B) e PRF (C) no período de 40 dias. HE | aumento de 125X.

Os resultados histológicos no período de 40 dias demonstram osso neoformado em todos os grupos, corticalizado e presença de osteócitos.

### **4.3 Análise estatística**

O estudo biomecânico demonstrou valores médios e desvio padrão dos torques reversos aplicados nos grupos CO, PRP e PRF presentes na figura 5. Esses resultados permitem observar que em todos os períodos os grupos experimentais apresentaram valores superiores em relação ao grupo controle. A análise estatística dos dados demonstra que na comparação de cada grupo entre si observou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Em relação aos períodos em nosso estudo, também houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) com aumento gradativo do valor do torque de acordo com o tempo. A análise estatística no período de 20 dias demonstrou resultados com diferença estatística significativa entre o grupo controle (CO) e os grupos experimentais (PRP e PRF). Entre os grupos experimentais não houve diferença estatística significativa.

Os resultados biomecânicos encontrados na avaliação no período de 40 dias apresentaram diferença estatística entre todos os grupos. O grupo PRP obteve valor maior que o PRF que foi maior que o grupo CO ( $p < 0,05$ ), demonstrando maior estabilidade e resistência biomecânica.

A análise dos dados demonstrou que não houve diferença estatística significativa entre os valores obtidos a partir das mensurações da ELCOI na comparação entre os grupos, assim como entre os períodos, nem entre grupos e períodos. Os dados sobre a AON demonstraram uma maior formação óssea nos grupos PRP e PRF em relação ao grupo controle. Entretanto, entre todos os grupos não houve diferença estatística significativa, assim como na análise entre os grupos e os períodos. Contudo, entre os períodos houve diferença estatística significativa ( $p < 0,001$ ).

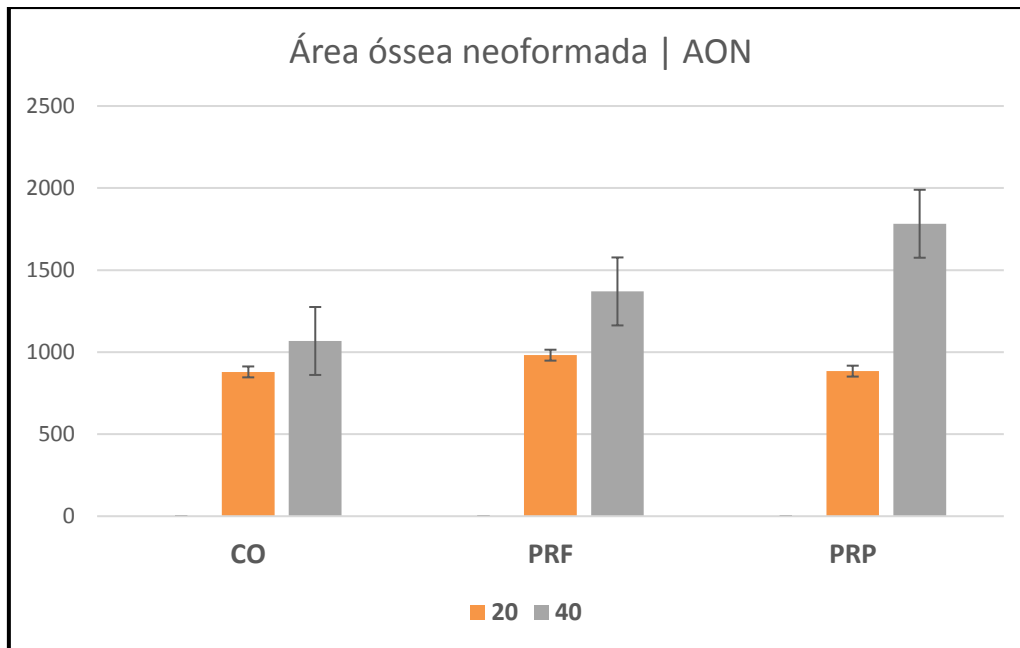


Figura 7 - Gráfico das médias obtidas a partir da mensuração de Área Óssea Neoformada (AON) em  $\mu\text{m}$  nos períodos de 20 e 40 dias.

A análise nos períodos entre 20 e 40 dias demonstra que não houve diferença estatística significativa.

# **DISCUSSÃO**

## 5 Discussão

Os valores superiores registrados pelos grupos experimentais em relação ao grupo controle demonstram que nossos resultados apresentaram a eficácia da aplicação de PRP e PRF em defeitos peri-implantares quando comparados com o grupo CO para a análise biomecânica.

Em pesquisa prévia que analisou a força de contra-torque para remoção do implante em tíbias de coelhos com defeito ósseo criado previamente, o grupo com a inserção de PRF apresentou a integração osso-implante mais rápida em relação ao grupo controle com coágulo [29]. Nossos resultados indicam que os defeitos peri-implantares tratados com PRF tem maior estabilidade biomecânica que o grupo CO.

Outro estudo verificou o comportamento do PRF nos defeitos em tíbias de coelhos e não encontrou resultados satisfatórios [30]. Por outro lado, trabalhos recentes indicam que o PRF aumenta a estabilidade do implante dentário e melhora a osseointegração [27, 35–37, 64]. Estudos em humanos constataram aumento da estabilidade do implante dentário na primeira semana pós instalação do implante [35, 36], assim como em duas, quatro e seis semanas depois do implante instalado considerando uma melhor estabilidade nesse período de cicatrização [37]. Em coelhos, os resultados demonstraram um maior contato osso-implante depois do tratamento com PRF em lesões peri-implantares [27].

Os resultados de nossa análise biomecânica em relação aos períodos são satisfatórios para o uso do PRF corroborando publicações prévias [27, 35–37, 64]. Observou-se também um resultado superior na aplicação de PRP na estabilidade dos implantes nos defeitos ósseos peri-implantares.

A análise histomorfométrica constatou que no período de 20 dias houve discreta formação de osso imatura no grupo controle, sendo mais evidente no grupo experimental. E no período de 40 dias houve osso neoformado em todos os grupos. Estes resultados comparados à literatura que avaliou o PRP adicionado no momento da instalação do implante, em 3 semanas, constatou que mais osso se formou com o grupo experimental quando comparado com o grupo controle. Trabéculas imaturas recém-formadas projetavam-se nas roscas

dos implantes. Em todas as outras áreas, os espaços esponjosos eram principalmente revestidos com tecido ósseo (sinais de remodelação óssea circunscrita) [49]

O estudo em coelhos em um período único de 16 semanas do PRP não ativado (nPRP), do PRF e o grupo controle constatou que houve osteogênese em todos os grupos. Em particular, os grupos nPRP e PRF exibiram formação de tecido ósseo caracterizado por espaços medulares, ilhas de osso lamelar maduro revestido com osteoblastos e formação óssea cortical e trabecular. Por outro lado, houve menos osteogênese no grupo controle, com ossos mais finos e estruturas ósseas indistintas [23].

Em estudo prévio em coelhos com PRF, osso autólogo, PRF combinado com osso autólogo e grupo controle, os resultados foram analisados em 2, 8 e 12 semanas. Em duas semanas, não houve diferença relevante entre os grupos PRF e osso autólogo. Osteoblastos em abundância, tecido fibroso e trabeculado irregular foram observados no grupo PRF + osso autólogo no período de 8 semanas. No período de 12 semanas, o grupo combinado (PRF + osso autólogo) mostrou que dois terços de osso neoformado estavam conectados e os tecidos osteoides haviam se formado em torno da área do defeito [32]. O defeito peri-implantar em fêmur de coelhos apresentou entre 7 a 12 dias a formação óssea irregular nos animais tratados com PRP [65].

Em contraste com os resultados utilizando-se xenoenxerto bovino sem ou com PRP, onde constataram melhor qualidade de osso neoformado e processo de cicatrização foi observado no grupo controle [66], nossos resultados encontraram características que sugerem remodelação óssea acelerada nos grupos experimentais quando comparado com o grupo controle

Os resultados de nosso estudo diferem de outros trabalhos encontrados na literatura. A análise histomorfométrica encontrou diferença estatística significativa no estudo de defeito peri-implantar em tíbia de coelho no período de 8 semanas (56 dias) [27] e outro estudo apresentou os resultados da análise da área de neoformação óssea dos grupos controle, PRP não ativado (nPRP) e PRF em calvária de coelhos no período de 16 semanas. Nesta avaliação houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais comparados

com o grupo controle. Por outro lado, a análise intragrupos experimentais (nPRP X PRF) não apresentou diferença estatisticamente significativa [23].

As mensurações histomorfométricas em calvária de ratos comparando o uso de matriz óssea desmineralizada, PRF, gel de ácido hialurônico e grupo controle demonstraram houve aumento estatisticamente significativo no comprimento total horizontal no grupo PRF em comparação com o grupo controle [31]. Nossos resultados demonstraram que na análise nos períodos entre 20 e 40 dias não houve diferença estatística significativa. Esses resultados demonstram estabilização do processo de neoformação óssea após o período de 20 dias.

A maior formação óssea em grupos experimentais foi observada em um estudo de cicatrização óssea em crânios de coelhos comparando-se PRP, PRF, concentrado de fatores de crescimento (CGF) e grupo controle. A análise da área de neoformação óssea foi realizada em 6 e 12 semanas, sendo observada uma maior formação óssea nos grupos experimentais que no grupo controle, porém sem significância estatística. Dentre os grupos experimentais, a menor formação óssea foi no grupo PRP, também sem valor estatístico significativo [47]. Esses resultados são compatíveis com as análises do nosso estudo em relação aos valores estatísticos, assim como nos resultados de mensuração da AON que apresenta maiores valores nos grupos experimentais.

Tanto o PRP quanto o PRF demonstraram resultados satisfatórios na estabilidade do implante nos defeitos peri-implantares quando comparado ao grupo controle. O grupo PRP em 40 dias apresentou maior estabilidade biomecânica. Portanto, o PRP e o PRF podem ser indicados para terapia em defeitos peri-implantares.

A base teórica para o benefício biológico do PRP baseia-se no fato de que, com uma concentração maior que as plaquetas fisiológicas e proteínas plasmáticas, o processo de reparo pode ser acelerado [68]. A regeneração óssea é um processo complexo influenciado por vários fatores fisiológicos e o PRP contém fatores de crescimento mostrando efeitos osteogênicos [23, 41, 69, 70]. A influência do PRP na superfície de implantes em mandíbulas de porcos foi positiva nos resultados após aplicação tópica [49]. No entanto, a literatura é

inconsistente em relação aos benefícios do PRP em pacientes saudáveis. Porém, seu uso em pacientes debilitados tem resultados satisfatórios na cicatrização de feridas e regeneração óssea [67].

Da mesma forma, o PRF possui efeitos biológicos como angiogênese, mitogênese, efeitos imunoindutores, recolonização da ferida, efeito osteogênico e captura de células-tronco [71]. O PRF utilizado como aditivo cirúrgico biológico é aplicado com sucesso na odontologia. Os avanços tecnológicos no campo da PRF, como o i-PRF, abriram caminho para a versatilidade nas aplicações dos concentrados de plaquetas. Com o aumento de nossa compreensão sobre a biologia da PRF, no futuro, podemos esperar aditivos aprimorados que melhorarão ainda mais a experiência de cicatrização de feridas [71].

Os resultados biomecânicos indicaram que o PRP apresentou uma melhor interação entre osso e implante em relação ao grupo PRF e controle. Os resultados histomorfométricos demonstraram uma maior AON no grupo PRP, porém sem valor estatístico significativo. Mesmo com os limites do presente estudo, o PRP e o PRF demonstraram melhores resultados biomecânicos na estabilidade dos implantes, sendo o PRP superior ao PRF e ao grupo coágulo. Entretanto, outras investigações necessitam ser realizadas para demonstrar como os concentrados plaquetários auxiliam na estabilidade do implante em defeitos peri-implantares.



**CONCLUSÃO**

## **5 Conclusão**

A aplicação de PRP nos defeitos peri-implantares em tíbias de ratos mostrou-se mais eficaz na resposta de estabilidade do implante e na neoformação óssea, sendo superior ao plasma rico em fibrina (PRF) e ao grupo controle (coágulo).

## **REFERÊNCIAS**

## Referências

1. Palmquist A (2018) A multiscale analytical approach to evaluate osseointegration. *J Mater Sci Mater Med* 29:60
2. Fenton A (1992) The Role of Dental Implants in the Future. *J Am Dent Assoc* 123:36–42. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1992.0007>
3. Cooper LF (2000) A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. *J Prosthet Dent* 84:522–534
4. Rupp F, Gittens RA, Scheideler L, et al (2014) A review on the wettability of dental implant surfaces I: Theoretical and experimental aspects. *Acta Biomater* 10:2894–2906. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.040>
5. Sartoretto SC, Alves ATNN, Resende RFB, et al (2015) Early osseointegration driven by the surface chemistry and wettability of dental implants. *J Appl Oral Sci* 23:279–87. <https://doi.org/10.1590/1678-775720140483>
6. Romero-Gavilan F, Araújo-Gomes N, Sánchez-Pérez AM, et al (2018) Bioactive potential of silica coatings and its effect on the adhesion of proteins to titanium implants. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 162:316–325. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.11.072>
7. Carradó A, Perrin-Schmitt F, Le Q V., et al (2017) Nanoporous hydroxyapatite/sodium titanate bilayer on titanium implants for improved osteointegration. *Dent Mater* 33:321–332. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.12.013>
8. Wennerberg A, Albrektsson T (2009) Effects of titanium surface topography on bone integration: A systematic review. *Clin Oral Implants Res* 20:172–184. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2009.01775.x>
9. Moraschini V, Poubel LADC, Ferreira VF, Barboza EDSP (2015) Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 44:377–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2014.10.023>
10. Şimşek S, Özeç İ, Kürkçü M, Benlidayı E (2016) Histomorphometric

- Evaluation of Bone Formation in Peri-Implant Defects Treated With Different Regeneration Techniques: An Experimental Study in a Rabbit Model. *J Oral Maxillofac Surg* 74:1757–1764. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2016.05.026>
11. Derks J, Tomasi C (2015) Peri-implant health and disease. A systematic review of current epidemiology. *J Clin Periodontol* 42:S158–S171. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12334>
  12. Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R (2017) Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent* 62:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.04.011>
  13. Mouhyi J, Dohan Ehrenfest DM, Albrektsson T (2012) The Peri-Implantitis: Implant Surfaces, Microstructure, and Physicochemical Aspects. *Clin Implant Dent Relat Res* 14:170–183. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2009.00244.x>
  14. Salvi GE, Cosgarea R, Sculean A (2017) Prevalence and Mechanisms of Peri-implant Diseases. *J Dent Res* 96:31–37. <https://doi.org/10.1177/0022034516667484>
  15. Robertson K, Shahbazian T, MacLeod S (2015) Treatment of Peri-Implantitis and the Failing Implant. *Dent Clin North Am* 59:329–343. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2014.10.007>
  16. Smeets R, Henningsen A, Jung O, et al (2014) Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis - a review. *Head Face Med* 1–13. <https://doi.org/10.1186/1746-160X-10-34>
  17. Noronha Oliveira M, Schunemann WVH, Mathew MT, et al (2018) Can degradation products released from dental implants affect peri-implant tissues? *J Periodontal Res* 53:1–11. <https://doi.org/10.1111/jre.12479>
  18. Del Corso M, Vervelle A, Simonpieri A, et al (2012) Current Knowledge and Perspectives for the Use of Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in Oral and Maxillofacial Surgery Part 1: Periodontal and Dentoalveolar Surgery. *Curr Pharm Biotechnol* 13:1207–1230. <https://doi.org/10.2174/138920112800624391>
  19. Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, et al (2012) Current Knowledge and

- Perspectives for the Use of Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in Oral and Maxillofacial Surgery Part 2: Bone Graft, Implant and Reconstructive Surgery. *Curr Pharm Biotechnol* 13:1231–1256. <https://doi.org/10.2174/138920112800624472>
20. Roffi A, Filardo G, Kon E, Marcacci M (2013) Does PRP enhance bone integration with grafts, graft substitutes, or implants? A systematic review. *BMC Musculoskelet Disord* 14:. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-14-330>
  21. Rodriguez IA, Growney Kalaf EA, Bowlin GL, Sell SA (2014) Platelet-rich plasma in bone regeneration: Engineering the delivery for improved clinical efficacy. *Biomed Res Int* 2014:15 pages. <https://doi.org/10.1155/2014/392398>
  22. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, et al (2018) The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets* 29:171–184. <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1293812>
  23. Jeon YR, Kim MJ, Kim YO, et al (2018) Scaffold Free Bone Regeneration Using Platelet-Rich Fibrin in Calvarial Defect Model. *J Craniofac Surg* 29:251–254. <https://doi.org/10.1097/SCS.00000000000004210>
  24. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, et al (2017) Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Investig* 21:2619–2627. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2063-9>
  25. Padilha W, Soares A, Navarro-Junior H, et al (2018) Histologic Evaluation of Leucocyte- and Platelet-Rich Fibrin in the Inflammatory Process and Repair of Noncritical Bone Defects in the Calvaria of Rats. *Int J Oral Maxillofac Implants* 33:1206–1212. <https://doi.org/10.11607/jomi.6604>
  26. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, et al (2004) Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 34:665–671. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.12.010>
  27. Lee JW, Kim SG, Kim JY, et al (2012) Restoration of a peri-implant defect by platelet-rich fibrin. *Oral Maxillofac Surg* 113:459–463. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.03.043>

28. Ozdemir H, Ezirganli S, Isa Kara M, et al (2013) Effects of platelet rich fibrin alone used with rigid titanium barrier. *Arch Oral Biol* 58:537–544. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.09.018>
29. Cho SA, Lee BK, Park SH, Ahn JJ (2014) The bone integration effects of platelet-rich fibrin by removal torque of titanium screw in rabbit tibia. *Platelets* 25:562–566. <https://doi.org/10.3109/09537104.2013.856398>
30. Faot F, Deprez S, Vandamme K, et al (2017) The effect of L-PRF membranes on bone healing in rabbit tibiae bone defects: Micro-CT and biomarker results. *Sci Rep* 12:46452. <https://doi.org/10.1038/srep46452>
31. Sindel A, Dereci Ö, Toru HS, Tozoğlu S (2017) Histomorphometric Comparison of Bone Regeneration in Critical-Sized Bone Defects Using Demineralized Bone Matrix, Platelet-Rich Fibrin, and Hyaluronic Acid as Bone Substitutes. *J Craniofac Surg* 28:1865–1868. <https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000003588>
32. Zhou T, Yang HW, Tian ZW, et al (2017) Effect of Choukroun Platelet-Rich Fibrin Combined With Autologous Micro-Morselized Bone on the Repair of Mandibular Defects in Rabbits. *J Oral Maxillofac Surg* 76:221–228. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2017.05.031>
33. Albanese A, Licata ME, Polizzi B, Campisi G (2013) Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: From the wound healing to bone regeneration. *Immun Ageing* 10:23. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-10-23>
34. Hamzacebi B, Oduncuoglu B, Alaaddinoglu E (2015) Treatment of Peri-implant Bone Defects with Platelet-Rich Fibrin. *Int J Periodontics Restorative Dent* 35:415–422. <https://doi.org/10.11607/prd.1861>
35. Öncü E, Alaaddinoğlu E (2015) The Effect of Platelet-Rich Fibrin on Implant Stability. *Int J Oral Maxillofac Implants* 30:578–82. <https://doi.org/10.11607/jomi.3897>
36. Torkzaban P, Khoshhal M, Ghamari A, et al (2018) Efficacy of Application of Platelet-Rich Fibrin for Improvement of Implant Stability: A Clinical Trial. *J Long Term Eff Med Implants* 28:259–266. <https://doi.org/10.1615/JLongTermEffMedImplants.2018026937>

37. Tabrizi R, Arabion H, Karagah T (2018) Does platelet-rich fibrin increase the stability of implants in the posterior of the maxilla? A split-mouth randomized clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Surg* 47:672–675. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2017.07.025>
38. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, et al (1998) Platelet-rich plasma. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 85:638–646. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(98\)90029-4](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(98)90029-4)
39. Tsay RC, Vo J, Burke A, et al (2005) Differential growth factor retention by platelet-rich plasma composites. *J Oral Maxillofac Surg* 63:521–528. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2004.09.012>
40. Gandhi A, Dumas C, O'Connor JP, et al (2006) The effects of local platelet rich plasma delivery on diabetic fracture healing. *Bone* 38:540–546. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.10.019>
41. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, et al (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 101:56–60. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.011>
42. Mazor Z, Horowitz RA, Del Corso M, et al (2009) Sinus Floor Augmentation With Simultaneous Implant Placement Using Choukroun's Platelet-Rich Fibrin as the Sole Grafting Material: A Radiologic and Histologic Study at 6 Months. *J Periodontol* 80:2056–2064. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090252>
43. Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S, Phurisat K (2013) The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. *J Cranio-Maxillofacial Surg* 41:e191–e200. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2013.01.018>
44. Chatterjee A, Agarwal P, Subbaiah SK (2014) Platelet rich fibrin: an autologous bioactive membrane. *Apollo Med* 11:24–26. <https://doi.org/10.1016/j.apme.2014.01.007>
45. Kang Y, Jeon S, Park J, et al (2011) Platelet-rich fibrin is a bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue Eng Part A* 17:349–59



46. Jeong K-I, Kim S-G, Oh J-S (2012) Use of Platelet-Rich Fibrin in Oral and Maxillofacial Surgery. *J Korean Assoc Maxillofac Plast Reconstr Surg* 34:155–161
47. Kim TH, Kim SH, Sádor GK, Kim YD (2014) Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Arch Oral Biol* 59:550–558. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.02.004>
48. Georgakopoulos I, Tsantis S, Georgakopoulos P, et al (2014) The impact of Platelet Rich Plasma (PRP) in osseointegration of oral implants in dental panoramic radiography: Texture based evaluation. *Clin Cases Miner Bone Metab* 11:59–66. <https://doi.org/10.11138/ccmbm/2014.11.1.059>
49. Zechner W, Tangl S, Tepper G, et al (2003) Influence of Platelet-rich Plasma on Osseous Healing of Dental Implants: A Histologic and Histomorphometric Study in Minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18:15–22
50. Raheja A, Mehta V (2015) Platelet rich plasma- a breakthrough in implant dentistry: a review article. *Univ J Dent Scie* 1:35–37
51. Simonpieri A, Corso M Del, Vervelle A, et al (2012) Current Knowledge and Perspectives for the Use of Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in Oral and Maxillofacial Surgery Part 2: Bone Graft, Implant and Reconstructive Surgery. *Curr Pharm Biotechnol* 13:1231–1256
52. Kobayashi M, Kawase T, Okuda K, et al (2015) In vitro immunological and biological evaluations of the angiogenic potential of platelet-rich fibrin preparations: a standardized comparison with PRP preparations. *Int J Implant Dent* 1:31. <https://doi.org/10.1186/s40729-015-0032-0>
53. Cömert Kılıç S, Güngörmüş M, Parlak SN (2017) Histologic and histomorphometric assessment of sinus-floor augmentation with beta-tricalcium phosphate alone or in combination with pure-platelet-rich plasma or platelet-rich fibrin: A randomized clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res* 19:959–967. <https://doi.org/10.1111/cid.12522>
54. Wang X, Zhang Y, Choukroun J, et al (2017) Behavior of gingival fibroblasts on titanium implant surfaces in combination with either injectable-PRF or

- PRP. *Int J Mol Sci* 18:E331. <https://doi.org/10.3390/ijms18020331>
55. Pal U, Singh R, Singh N, et al (2012) Platelet-rich growth factor in oral and maxillofacial surgery. *Natl J Maxillofac Surg* 3:118. <https://doi.org/10.4103/0975-5950.111340>
  56. Knighton DR, Hunt TK, Thakral KK, Goodson WH (1982) Role of platelets and fibrin in the healing sequence. An in vivo study of angiogenesis and collagen synthesis. *Ann Surg* 196:379–388. <https://doi.org/10.1097/00000658-198210000-00001>
  57. Kundu R, Rathee M (2014) Effect of platelet-rich-plasma (PRP) implant surface topography on implant stability and bone revisited. *J Clin Diagnostic Res* 8:ZC26-ZC30. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/11282.5547>
  58. Öncü E, Erbeyoğlu A (2017) Enhancement of Immediate Implant Stability and Recovery Using Platelet-Rich Fibrin. *Int J Periodontics Restorative Dent* 39:e58–e63. <https://doi.org/10.11607/prd.2505>
  59. Nagae M, Ikeda T, Mikami Y, et al (2007) Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres. *Tissue Eng* 13:147–58
  60. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, et al (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 101:. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.008>
  61. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, et al (2010) Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 25:1468–1486. <https://doi.org/10.1002/jbmr.141>
  62. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, et al (2013) Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 28:2–17. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1805>
  63. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Prado FB, et al (2015) Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. *Int J Oral*

- Maxillofac Surg 44:798–805. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2015.02.018>
64. He L, Lin Y, Hu X, et al (2009) A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108:707–713. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.06.044>
65. Ortolani E, Guerriero M, Coli A, et al (2014) Effect of PDGF, IGF-1 and PRP on the implant osseointegration. An histological and immunohistochemical study in rabbits. *Ann Stomatol (Roma)* V:66–68. <https://doi.org/10.11138/ads/2014.5.2.066>
66. Peng W, Kim I, Cho H, et al (2016) The healing effect of platelet-rich plasma on xenograft in peri-implant bone defects in rabbits. *Maxillofac Plast Reconstr Surg* 38:. <https://doi.org/10.1186/s40902-016-0061-5>
67. Stähli A, Strauss FJ, Gruber R (2018) The use of platelet-rich plasma to enhance the outcomes of implant therapy: A systematic review. *Clin Oral Implants Res* 29:20–36. <https://doi.org/10.1111/clr.13296>
68. Wroblewski AP, Mejia HA, Wright VJ (2010) Application of platelet-rich plasma to enhance tissue repair. *Oper Tech Orthop* 20:98–105. <https://doi.org/10.1053/j.oto.2009.10.006>
69. Chen T Lou, Lu HJ, Liu GQ, et al (2014) Effect of autologous platelet-rich plasma in combination with bovine porous bone mineral and bio-guide membrane on bone regeneration in mandible bicortical bony defects. *J Craniofac Surg* 25:215–223. <https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000000420>
70. Messoria MR, Nagata MJH, Mariano RC, et al (2008) Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodont Res* 2008; 43:217–223. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2007.01017.x>
71. Shah R, MG T, Thomas R, MEHTA DS (2017) An Update on the Protocols and Biologic Actions of Platelet Rich Fibrin in Dentistry. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 25:64–72. [https://doi.org/10.1922/EJPRD\\_01690Shah09](https://doi.org/10.1922/EJPRD_01690Shah09)

**ANEXOS**

## Anexos

**Anexo I**  
**Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais**



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 experimental do processo de reparo peri-implantar com uso de plasma rico em plaquetas e fibrina rica em plaquetas: análises biomecânica, imunoistoquímica, histomorfométrica", Processo FOA nº 00555-2018, sob responsabilidade de Idelmo Rangel Garcia Júnior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 12 de Novembro de 2019.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 12 de Maio de 2021.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 12 de Junho de 2021.

**CERTIFICATE**

We certify that the study entitled "Experimental study of the peri-implant repair process with the use of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin: biomechanical, immunohistochemical and histomorphometric analysis", Protocol FOA nº 00555-2018, under the supervision of Idelmo Rangel Garcia Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on November 12, 2019.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** May 12, 2021.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** June 12, 2021.

**Profa. Associada Maria Cristina Rosifini Alves Rezende**  
 Coordenador da CEUA  
 CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
 Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
 Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
 Rua José Bonifácio, 1100 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP  
 Fone (16) 3638-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

## Anexo II

### Periódico de interesse para submissão | Clinical Oral Investigations



#### Instructions for Authors

##### Types of papers

Papers may be submitted for the following sections:

Original articles

Invited reviews

Short communications – with up to 2000 words and up to two figures and/or tables

Discussion paper

Letters to the editor

It is the general policy of this journal not to accept case reports and pilot studies.

[Back to top](#)

#### Editorial Procedure

If you have any questions please contact:

Professor Dr. M. Hannig

University Hospital of Saarland

Department of Parodontology and Conservative Dentistry

Building 73

66421 Homburg/Saar

Germany

Email: eic.hannig@uks.eu

[Back to top](#)

#### Manuscript Submission

##### Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

##### Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

##### Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

##### Further Useful Information

please follow the link below

[Further Useful Information](#)

The Springer Author Academy is a set of comprehensive online training pages mainly geared towards first-time authors. At this point, more than 50 pages offer advice to authors on how to write and publish a journal article.

[Springer Author Academy](#)

[Back to top](#)

#### Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

##### Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

Objectives (stating the main purposes and research question)

Materials and Methods

Results

Conclusions

Clinical Relevance

These headings must appear in the abstract.

##### Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

[Back to top](#)

#### Text

##### Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

[LaTeX macro package \(Download zip, 188 kB\)](#)

##### Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

##### Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

##### Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other

statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

##### Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

[Back to top](#)

#### References

##### Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines [3].

This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].

This effect has been widely studied [1-3, 7].

##### Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

##### Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325-329

##### Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

##### Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

##### Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

##### Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

##### Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

[ISSN.org LTWA](#)

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

[EndNote style \(Download zip, 4 kB\)](#)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

[Back to top](#)

#### Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table. Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

[Back to top](#)

#### Artwork and Illustrations Guidelines

##### Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

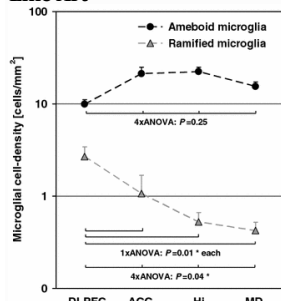
For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format.

MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

##### Line Art



Definition: Black and white graphic with no shading.

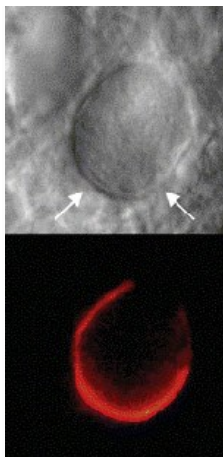
Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

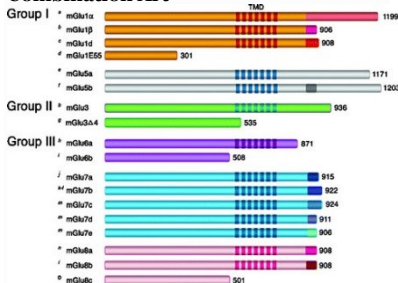
Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

##### Halftone Art



Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc. If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves. Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

##### Combination Art



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc. Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

##### Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

##### Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label. Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

##### Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

##### Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

##### Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.

For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

##### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

##### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware) Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

[Back to top](#)

##### Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be

printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as electronic supplementary material, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

#### Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

#### Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

#### Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

#### Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

#### Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

#### Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

#### Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

Name the files consecutively, e.g. "ESM\_3.mpg", "ESM\_4.pdf".

#### Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

#### Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

#### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material  
Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

[Back to top](#)

Clinical Trial Registration

Clinical trials must be registered prior to submission of manuscripts. The registration site must be publicly available in English.

Recommended sites are: <https://www.isrctn.com> ; <https://www.clinicaltrialsregister.eu>; <https://clinicaltrials.gov> or similar.

The registration number is required for the submission and must appear on the title page.

[Back to top](#)

#### English Language Editing

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Asking a colleague who is a native English speaker to review your manuscript for clarity.  
Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.

[English language tutorial](#)

[Nature Research Editing Service](#)

[American Journal Experts](#)

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.

If your manuscript is accepted it will be checked by our copyeditors for spelling and formal style before publication.

.

为便于编辑和评审专家准确评估您稿件中陈述的研究工作·您需要确保您的英语语言质量足以令人理解·如果您需要英文写作方面的帮助·您可以考虑：

- 请一位以英语为母语的同事审核您的稿件是否表意清晰。

- 查看一些有关英语写作中常见语言错误的教程。

- 使用专业语言编辑服务·编辑人员会对英语进行润色·以确保您的意思表达清晰·并识别需要您复核的问题·我们的附属机构 Nature Research Editing Service 和合作伙伴 American Journal Experts 即可提供此类服务。

#### 教程

[Nature Research Editing Service](#)

[American Journal Experts](#)

请注意·使用语言编辑服务并非在期刊上发表文章的必要条件·同时也并不意味或保证文章将被选中进行同行评议或被接受。

如果您的稿件被接受, 在发表之前·我们的文字编辑会检查您的文稿拼写是否规范以及文体是否正式。

.

エディターと査読者があなたの論文を正しく評価するには、使用されている英語の質が十分に高いことが必要とされます。英語での論文執筆に際してサポートが必要な場合には、次のオプションがあります：

- ・英語を母国語とする同僚に、原稿で使用されている英語が明確であるかをチェックしてもらおう。

- ・英語で執筆する際によくある間違いに関する英語のチュートリアルを参照する。

- ・プロの英文校正サービスを利用する。校正者が原稿の意味を明確にしたり、問題点を指摘し、英語の質を向上させます。Nature Research Editing Service と American Journal Experts の2つは弊社と提携しているサービスです。Springer の著者は、いずれのサービスも初めて利用する際には10%の割引を受けることができます。以下のリンクを参照ください。

#### 英語のチュートリアル

[Nature Research Editing Service](#)

[American Journal Experts](#)

英文校正サービスの利用は、投稿先のジャーナルに掲載されるための条件ではないこと、また論文審査や受理を保証するものではないことに留意してください。

原稿が受理されると、出版前に弊社のコピーエディターがスペルと体裁のチェックを行います。

.

- 영어 원고의 경우, 에디터 및 리뷰어들이 귀하의 원고에 실린 결과물을 정확하게 평가할 수 있도록, 그들이 충분히 이해할 수 있을 만한 수준으로 작성되어야 합니다. 만약 영작문과 관련하여 도움을 받기를 원하신다면 다음의 사항들을 고려하여 주십시오:

- 귀하의 원고의 표현을 명확히 해줄 영어 원어민 동료를 찾아서 리뷰를 의뢰합니다.

- 영어 튜토리얼 페이지에 방문하여 영어로 글을 쓸 때 자주는 실수들을 확인합니다.

- 리뷰에 대비하여, 원고의 의미를 명확하게 해주고 리뷰에서 요구하는 문제점들을 식별해서 영문 수준을 향상시켜주는 전문 영문 교정 서비스를 이용합니다. Nature Research Editing Service와 American Journal Experts에서 저희와 협약을 통해 서비스를 제공하고 있습니다. Springer 저자들이 본 교정 서비스를 첫 논문 투고를 위해 사용하시는 경우 10%의 할인이 적용되며, 아래의 링크를 통하여 확인이 가능합니다.

[영어 튜토리얼 페이지](#)

[Nature Research Editing Service](#)

[American Journal Experts](#)

영문 교정 서비스는 게재를 위한 요구사항은 아니며, 해당 서비스의 이용이 피어 리뷰에 논문이 선택되거나 게재가 수락되는 것을 의미하거나 보장하지 않습니다.

원고가 수락될 경우, 출판 전 저희측 편집자에 의해 원고의 철자 및 문체를 검사하는 과정을 거치게 됩니다.

[Back to top](#)

#### Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE)



the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct. Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include\*:

The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism').

A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').

Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.

Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

**Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.**

Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).

Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.

Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).

Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted, but in some cases may be

warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

\*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights. Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded. If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author. If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:

an erratum/correction may be placed with the article

an expression of concern may be placed with the article

or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author's institution may be informed. A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

**Fundamental errors**

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

**Suggesting / excluding reviewers**

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a

personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

Back to top

**Authorship principles**

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

**Authorship clarified**

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines\*:

All authors whose names appear on the submission

made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;

drafted the work or revised it critically for important intellectual content;

approved the version to be published; and agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Based on/adapted from:

[ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors.](#)

[Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt at all, PNAS February 27, 2018](#)

**Disclosures and declarations**

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

**Data transparency**

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and

expectations. Please check the Instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions.

#### **Role of the Corresponding Author**

**One author** is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;

managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;\*  
providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;

making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).  
The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

**Author contributions**  
Please check the Instructions for Authors of the Journal that you are submitting to for specific instructions regarding contribution statements.

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

**Examples of such statement(s) are shown below:**  
Free text:  
All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

**Example: CRediT taxonomy:**

Conceptualization: [full name], ...;  
Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name], ...; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For **review articles** where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the **student's dissertation or thesis**, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

[A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006](#)

#### **Affiliation**

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

#### **Changes to authorship**

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are **not accepted after acceptance** of a manuscript.

**Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!**

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

#### **Author identification**

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

#### **Deceased or incapacitated authors**

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

#### **Authorship issues or disputes**

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

#### **Confidentiality**

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

[Back to top](#)

#### **Compliance with Ethical Standards**

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-

financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

Disclosure of potential conflicts of interest  
Research involving Human Participants  
and/or Animals

Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

[Back to top](#)

#### **Disclosure of potential conflicts of interest**

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

Research grants from funding agencies  
(please give the research funder and the grant number)

Honoraria for speaking at symposia

Financial support for attending symposia

Financial support for educational programs

Employment or consultation

Support from a project sponsor

Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships

Multiple affiliations

Financial relationships, for example equity ownership or investment interest

Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)

Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or

personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found [here](#):

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

Please make sure to submit all Conflict of Interest disclosure forms together with the manuscript.

See below examples of disclosures:

**Funding:** This study was funded by X (grant number X).

**Conflict of Interest:** Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state: Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

[Back to top](#)

Research involving human participants and/or animals

#### **Statement of human rights**

When reporting studies that involve human participants, authors should include a statement that the studies have been approved by the appropriate institutional and/or national research ethics committee and have been performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that the independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study.

If a study was granted exemption from requiring ethics approval, this should also be detailed in the manuscript (including the name of the ethics committee that granted the exemption and the reasons for the exemption).

Authors must - in all situations as described above - include the name of the ethics committee and the reference number where appropriate.

The following statements should be included in the text before the References section:

**Ethical approval:** "All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee (include name of committee + reference number) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards."

#### **Ethical approval retrospective studies**

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethical approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

#### **Statement on the welfare of animals**

The welfare of animals used for research must be respected. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals have been followed, and that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted (where such a committee exists). Please provide the name of ethics committee and relevant permit number.

For studies with animals, the following statement should be included in the text before the References section:

**Ethical approval:** "All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed."

If applicable (where such a committee exists): "All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.(include name of committee + permit number)"

If articles do not contain studies with human participants or animals by any of the authors, please select one of the following statements: "This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors."

"This article does not contain any studies with animals performed by any of the authors."

"This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors."

[Back to top](#)

#### **Informed consent**

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. Hence it is important that all participants gave their informed consent in writing prior to inclusion in the study. Identifying details (names, dates of birth, identity numbers and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scientific purposes and the participant (or parent or guardian if the participant is incapable) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors

should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning.

The following statement should be included:

**Informed consent:** "Informed consent was obtained from all individual participants included in the study."

If identifying information about participants is available in the article, the following statement should be included:

"Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article."

[Back to top](#)

#### **Research Data Policy**

The journal encourages authors, where possible and applicable, to deposit data that support the findings of their research in a public repository. Authors and editors who do not have a preferred repository should consult Springer Nature's list of repositories and research data policy.

#### [List of Repositories](#)

#### [Research Data Policy](#)

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may also be used.

Datasets that are assigned digital object identifiers (DOIs) by a data repository may be cited in the reference list. Data citations should include the minimum information recommended by DataCite: authors, title, publisher (repository name), identifier.

#### [DataCite](#)

Springer Nature provides a research data policy support service for authors and editors, which can be contacted at [researchdata@springernature.com](mailto:researchdata@springernature.com).

This service provides advice on research data policy compliance and on finding research data repositories. It is independent of journal, book and conference proceedings editorial offices and does not advise on specific manuscripts.

#### [Helpdesk](#)

[Back to top](#)

#### **After Acceptance**

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice and offprints.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

#### **Copyright transfer**

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

#### **Offprints**

Offprints can be ordered by the corresponding author.

#### **Color illustrations**

Publication of color illustrations is free of charge.

#### **Proof reading**

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the

completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

#### **Online First**

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

[Back to top](#)

#### **Open Choice**

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – [view the full list](#)

Benefits:

Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.

Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average\*.

Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

\*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

[Open Choice](#)

[Funding and Support pages](#)

#### **Copyright and license term – CC BY**

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

[Find more about the license agreement](#)