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

Yasmin Comoti Vita Bantim

TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DE IMPLANTES OSSEOINTEGRÁVEIS PELO MÉTODO BIOMIMÉTICO COM DIFERENTES COMPOSTOS À BASE DE CÁLCIO

Estudo experimental histomorfométrico, topográfico e biomecânico

Araçatuba
2023

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

Yasmin Comoti Vita Bantim

TRATAMENTO DE SUPERFÍCIE DE IMPLANTES OSSEOINTEGRÁVEIS PELO MÉTODO BIOMIMÉTICO COM DIFERENTES COMPOSTOS À BASE DE CÁLCIO

Estudo experimental histomorfométrico, topográfico e biomecânico

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

Orientador:
Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior

Araçatuba
2023

Catalogação na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Bantim, Yasmin Comoti Vita.
B219t Tratamento de superfície de implantes osseointegráveis pelo método biomimético com diferentes compostos à base de cálcio : estudo experimental histomorfométrico, topográfico e biomecânico / Yasmin Comoti Vita Bantim. - Araçatuba, 2023
56 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior

1. Cirurgia bucal 2. Implantes dentários 3. Biomimética I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

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 minha filha Isabella,

Minha filha, você é o combustível que me dá forças para continuar. É o motivo de eu acordar todos os dias e não pensar em desistir. Dizem que sentimento é algo intangível, mas quando você nasceu, pude carregar em meus braços o amor puro e verdadeiro. Você é bênção em minha vida. Eu te amo.

Aos meus pais, Mylene e Herbson,

Minha base. Sou grata e abençoada por tê-los em minha vida, obrigada por nunca medirem esforços para lutar por minha educação. Agradeço por todo apoio, carinho e por sempre vibrar com as minhas vitórias. Amo vocês.

Aos professores Sérgio Kussaba e Gilberto Carvalho,

Minha fonte de inspiração, acompanharam de perto minha jornada desde a graduação. Agradeço pelos ensinamentos, conselhos e motivação depositada em mim. Vocês são um exemplo de competência e profissionalismo.

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.

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, por confiar em mim e no meu trabalho 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!

Aos Professores **Francisley Ávila Souza**, **André Luis da Silva Fabris, Osvaldo Magro Filho**, **Roberta Okamoto, Alessandra Marcondes Aranega**, **Daniela Ponzoni**, **Ana Paula Farnezi Bassi**, **Leonardo Perez Faverani** por serem os grandes docentes, sempre dispostos a ensinar e ajudar, nos fazendo sentir em casa. Um grande abraço!

A todos os **colegas de pós-graduação**, que em algum momento se dedicaram em me ajudar durante essa trajetória, minha gratidão! Obrigada pelos momentos agradáveis que passamos juntos.

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 **Fran, Day, Camila e Hélide**, 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.

A vida é feita de momentos, momentos pelos quais temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso aprendizado. Nada é por acaso. Precisamos fazer a nossa parte, desempenhar o nosso papel no palco da vida, lembrando de que a vida nem sempre segue o nosso querer, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.

(Chico Xavier)

Bantim YCV. Tratamento de superfície de implantes osseointegráveis pelo método biomimético com diferentes compostos à base de cálcio: estudo experimental histomorfométrico, topográfico e biomecânico [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2023.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a interface osso/implante após tratamento de superfície de implantes pelo método biomimético com diferentes compostos à base de cálcio através de análises histológica, histométrica, biomecânica e topográfica. Para tanto, 20 ratos machos adultos foram divididos em dois grupos: grupo Fosfato de Cálcio CaP Biomimético (FCB) para a tíbia direita e grupo Hidróxido de Cálcio Ca(OH)2 Biomimético (HCB) destinado a tíbia esquerda. Vinte implantes tiveram suas superfícies tratadas à base de CaP e vinte implantes tratados com Ca(OH)2. A eutanásia foi realizada aos 40 dias. Os resultados mostraram que houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p<0,05$) na análise biomecânica. Os resultados histomorfométricos apresentaram maior atividade celular no grupo FCB em relação ao grupo HCB. Os dados sobre a área óssea neoformada (AON) demonstraram uma maior formação óssea no grupo FCB em relação ao grupo HCB, entretanto sem diferença estatística significativa ($p>0,05$). A análise topográfica demonstrou que as superfícies dos implantes de ambos os grupos foram tornadas ásperas e com rugosidades semelhantes, sendo a superfície com maior rugosidade a dos implantes do grupo HCB. O tratamento das superfícies dos implantes com hidróxido de cálcio mostrou-se mais eficaz na resposta de estabilidade do implante, sendo superior ao fosfato de cálcio. Ambos os grupos apresentaram resultados satisfatórios na neoformação óssea e contato osso-implante.

Relevância Clínica: modificações topográficas e físico-químicas da superfície dos implantes têm sido propostas para aumentar a porcentagem de contato osso-implante, melhorar a resposta biológica e favorecer o sucesso a longo prazo.

Palavras-chave: Biomimética. Implantes dentários. Cirurgia bucal.

Bantim YCV. Surface treatment of osseointegrable implants by the biomimetic method with different calcium-based compounds: histomorphometric, topographic and biomechanical experimental study [thesis]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2023.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the bone/implant interface after surface treatment of implants using the biomimetic method with different calcium-based compounds through histological, histometric, biomechanical and topographic analyses. For this purpose, twenty adult male rats were divided into two groups: Biomimetic CaP Calcium Phosphate (FCB) group for the right tibia and Biomimetic Ca(OH)2 Calcium Hydroxide (HCB) group for the left tibia. Twenty implants had their surfaces treated with CaP and twenty implants treated with Ca(OH)2. Euthanasia was performed within 40 days. The results showed that there was a statistically significant difference between the groups ($p<0.05$) in the biomechanical analysis. The histomorphometric results showed greater cellular activity in the FCB group compared to the HCB group. Data on newly formed bone area (AON) showed greater bone formation in the FCB group compared to the HCB group, however without statistically significant difference ($p>0.05$). The topographic analysis showed that the surfaces of the implants in both groups were roughened and with similar roughness, with the surface with greater roughness being that of the implants in the HCB group. The treatment of implant surfaces with calcium hydroxide proved to be more effective in terms of implant stability, being superior to calcium phosphate. Both groups showed satisfactory results in new bone formation and bone-implant contact.

Clinical Relevance: Topographic and physicochemical surface modifications of implants have been proposed to increase the percentage of bone-implant contact, improve biological response, and favor long-term success.

Keywords: Biomimetic. Dental implants. Buccal surgery.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1 (A) Preparo da superfície de teste grupo FCB; 100ml de SFC com 20g de CaP; (B) aspecto dos implantes do grupo FCB 20

Fig. 2 (A) Preparo da superfície de teste grupo HCB; 100ml de SFC com 20g de Ca(OH)2; (B) aspecto dos implantes do grupo HCB 20

Fig. 3 Procedimento cirúrgico: (A) incisão com lâmina nº15 (B) região de metáfise tibial externa; (C) tecido mole foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo; (D) fresagem (E) preparo para instalação do implante | diâmetro de 1,6 mm e altura de 3,0 mm; (F) instalação do implante tratado com fosfato de cálcio, grupo FCB, tíbia direita; (G) instalação do implante tratado com hidróxido de cálcio, grupo HCB, tíbia esquerda; (H) tecidos suturados em posição 22

Fig. 4 Grupos FCB e HCB no período de 40 dias. Torque (N.cm), média e desvio padrão 27

Fig. 5 Prancha com as imagens histológicas apresentando aspecto dos grupos FCB (A) e HCB (B) no período de 40 dias. Presença de tecido ósseo remodelado, corticalizado e com osso lamelar em contato com as superfícies dos implantes. HE | aumento de 20X 28

Fig. 6 Prancha com as imagens histológicas apresentando aspecto dos grupos FCB (A) e HCB (B) no período de 40 dias. HE | aumento de 40X 29

Fig. 7 MEV grupo FCB, implantes tratados com CaP: (A) aumento 2000x; (B) aumento 5000x; (C) aumento 10000x; (D) EDS. 30

Fig. 8 MEV grupo HCB, implantes tratados com Ca(OH)2: (A) aumento 2000x; (B) aumento 5000x; (C) aumento 10000x; (D) EDS 31

Fig. 9 Gráfico das médias obtidas a partir da mensuração da Extensão Linear de Contato Osso-implante (ELCOI) em µm no período de 40 dias 33

Fig. 10 Gráfico das médias obtidas a partir da mensuração de Área Óssea Neoformada (AON) em µm no período de 40 dias 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Grupos FCB e HCB no período de 40 dias, torque (N.cm), média e desvio padrão 26
Tabela 2 Composição química da superfície dos implantes do Grupo FCB 31
Tabela 3 Composição química da superfície dos implantes do Grupo HCB 32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AON	Área de osso neoformada
$Ca(OH)2$ |	Hidróxido de cálcio
$CaC_2.2H_2O$	Carbonato de Cálcio Dihidratado
CaP	Fosfato de cálcio
EDS	Energia dispersiva de raios x
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELCOI	Extensão linear de contato osso-implante
FCB	Grupo fosfato de cálcio biomimético
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
HCB	Grupo hidróxido de cálcio biomimético
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina eosina
K_2HPO_4	Fosfato de Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
$MgCl.H_2O$	Cloreto de Magnésio Monohidratado
N.cm	Newton por centímetro
$Na_2(CH_2OH)_3$	Metóxido de Sódio
Na_2SO_4	Sulfato de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
$NaHCO_3$	Bicarbonato de Sódio
SBF	*Solution Body Fluid*
SFC	Solução de fluido corpóreo
Ti	Titânio
Ticp	Titânio comercialmente puro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12
2 PROPOSIÇÃO 16
3 MATERIAL E MÉTODO 18
3.1 Desenho Experimental 18
3.1.1 Preparo do espécime 18
3.1.2 Protocolo de preparo da superfície de teste / grupo FCB 18
3.1.2.1 Etapa 1: Preparo do SFC: 19
3.1.2.2 Etapa 2: Preparo da Superfície dos implantes 19
3.1.3 Protocolo de preparo da superfície de teste / grupo HCB 20
3.2 Procedimento cirúrgico 21
3.3 Análise Biomecânica 23
3.3.1 Torque Reverso 23
3.4 Análise Histomorfométrica 23
3.5 Análise Topográfica 24
3.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Energia Dispersiva de Raios x (EDS) 24
3.6 Análise Estatística 24
4 RESULTADO 26
4.1 Análise biomecânica 26
4.2 Análise histomorfométrica 27
4.3 Análise topográfica 30
4.4 Análise estatística 32
5 DISCUSSÃO 35
6 CONCLUSÃO 39
REFERÊNCIAS 41
ANEXOS 49

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO*

A substituição de um elemento dentário por implantes osseointegrados representa uma importante alternativa na reabilitação estética e funcional, visando restabelecer a função e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. O sucesso da osseointegração depende do controle e redução dos micromovimentos dos implantes imediatos após a instalação [1,2]. Os tratamentos com implantes dentários osseointegrados são considerados seguros, apresentam altas taxas de sucesso e mínima reabsorção óssea a longo prazo [3].

A osseointegração é definida como o processo de conexão direta estrutural e funcional entre o osso vivo e a superfície de um implante submetido a uma carga oclusal [1,4]. Sendo assim, envolve uma técnica cirúrgica específica, um material biocompatível e um ambiente de reparo adequado [5]. Nesta tríade, as superfícies dos implantes foram modificadas com a finalidade diminuir o tempo reparo para a osseointegração [6–10]. Os implantes, além do ajuste adequado ao osso, devem promover a ativação de osteoblastos no tecido comprometido, estimulando a osteogênese [11] e a formação óssea por meio da diferenciação dos osteoblastos, produção de fatores osteogênicos, citocinas e fatores de crescimento [9].

Os estudos sobre a topografia e tratamento das superfícies dos implantes dentários vem sendo desenvolvidos com o intuito de acelerar o processo de reparo para a osseointegração [6–10]. Modificações topográficas e físico-químicas da superfície dos implantes têm sido propostas para aumentar a porcentagem de contato osso-implante, principalmente em áreas de tecido ósseo de menor densidade; favorecer as respostas biológicas em um período de reparo mais curto e; consequentemente, favorecer o sucesso a longo prazo dos implantes osseointegráveis [12,13].

Modificações na superfície do implante incorporaram o uso de hidroxiapatita, compósitos, carbono, vidro, cerâmicas assim como óxido de titânio. A superfície do implante também pode ser modificada para melhorar sua performance podendo ser usinadas, oxidadas [13], receber ataque ácido, ataque alcalino, anodização ou

* Normalizado de acordo com a revista Clinical Oral Investigations - Anexo B

tratamentos a laser [14–16]. A fim de conferir capacidade de ligação óssea estável ao Ti e suas ligas, e assim por diante foram desenvolvidas com base nas estratégias que melhoram a resposta celular e mineralização, e recentemente, a resposta inflamatória [16].

Um dos métodos promissores para promover a osseointegração de implantes metálicos é o revestimento biomimético [17], que foi originalmente introduzido por Kokubo e colaboradores em 1990. Com esse método de revestimento biomimético original, os implantes metálicos podem ser revestidos com uma camada de apatita ao ser imerso em um fluido corporal simulado (SBF) [18]. Esta abordagem tem sido usada extensivamente para melhorar a osseointegração de implantes ao osso hospedeiro conforme estudos [19,20].

O fosfato de cálcio (CaP) é o principal componente inorgânico dos tecidos ósseos e, portanto, possui biocompatibilidade e propriedades de osseointegração inerentes. Como tal, ele tem sido amplamente utilizado na clínica ortopédica e odontológica. O novo surgimento de funcionalização de superfície em implantes metálicos com revestimentos de CaP mostra a promessa de uma combinação de propriedades mecânicas de metais e várias biofunções [21]. Apresenta semelhança com a fase mineral de tecido ósseo, dentes e tecidos calcificados. Possui excelente biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade, taxas de degradação variáveis e osteocondutividade [22].

Um estudo envolvendo o fosfato de cálcio biomimético, demonstrou que o material tem a capacidade de estimular a diferenciação celular em osteoblastos, a quimiotaxia celular e a deposição de nova matriz óssea [23]. Assim como outro estudo também vem sendo realizado em implantes com a superfície revestida com hidróxido de cálcio Ca(OH)2 e tem se mostrado um método promissor para fornecer ao substrato uma combinação mais desejável de redução significativa do crescimento bacteriano e boa biocompatibilidade [24].

O hidróxido de cálcio é um material de fácil acesso e bastante conhecido na odontologia, principalmente na endodontia, para capeamento ou apexificação pulpar. Apresenta propriedades antimicrobianas e por ser uma base forte com baixa solubilidade em água, forma uma suspensão em meio aquoso liberando hidroxila e íons de cálcio ao longo do tempo [25]. Sua propriedade antimicrobiana é atribuída à

liberação de íons hidroxila e fornece um ambiente altamente alcalino com um valor de pH de aproximadamente 12,5. A maioria dos microrganismos nos canais radiculares infectados não consegue sobreviver no ambiente alcalino [26].

O local de ação dos íons hidroxila do hidróxido de cálcio inclui as enzimas da membrana citoplasmática. Este medicamento tem um amplo escopo de ação e, portanto, é eficaz em uma ampla gama de microrganismos, independentemente de sua capacidade metabólica. No mundo microbiano, as membranas citoplasmáticas são semelhantes, independentemente das características morfológicas, tintoriais e respiratórias dos microrganismos, o que significa que este medicamento tem um efeito semelhante em bactérias aeróbicas, anaeróbicas, Gram-positivas e Gram-negativas [27].

Diversas técnicas vêm sendo utilizadas para caracterizar a topografia do recobrimento sobre a superfície de materiais após o processo biomimético. Entre elas, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para observação das características morfológicas produzidas pelos diversos tipos de tratamento da superfície é o método utilizado em todos os estudos encontrados [28–31]

A força de torque reverso para remoção de implantes tem sido empregada em trabalhos experimentais para avaliar a osseointegração [32,33] mesmo que de forma indireta, e tem se mostrado confiável quando confrontada com a porcentagem de tecido ósseo em contato com o implante [34]. Esta análise foi introduzida com o objetivo de mensurar a força necessária para romper a interface formada entre osso e implante [1].

Embora o efeito da topografia da superfície nas respostas celulares tenha sido extensivamente investigado, a influência da combinação da modificação química da superfície e da topografia projetada nas respostas celulares ainda permanece inexplorada. Novas pesquisas são necessárias para demonstrar as influências relativas à topografia do implante, procedimento cirúrgico e características de deposição (espessura, estrutura, topografia, porosidade, molhabilidade) em efeitos clínicos em longo prazo [35].

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve o objetivo avaliar a interface osso/implante após tratamento de superfície de implantes pelo método biomimético com diferentes compostos à base de cálcio através de análises histomorfométrica, topográfica e biomecânica.

MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Desenho Experimental

3.1.1 Preparo 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 0306/2021, seguindo as recomendações da Arrive Guidelines. Foram utilizados 20 ratos machos adultos (Rattus norvegicus albinus, Wistar), de três meses de idade, pesando aproximadamente 350g. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (quatro animais/caixa), com temperatura em 22 ± 2°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 20 ratos foram divididos aleatoriamente em 2 grupos distintos para os experimentos: grupo (1) Fosfato de Cálcio Biomimético (FCB) destinados à tíbia direita dos animais e grupo (2) Hidróxido de Cálcio Biomimético (HCB) destinados à tíbia esquerda. Para tanto, foram utilizados 40 implantes (n=40) Ticp de 1,6 x 3,0 mm com tratamento de superfície por duplo ataque ácido (Implalife® Indústria de Produtos Médico-Odontológicos, Jales, São Paulo, Brasil), dos quais 20 tiveram suas superfícies revestidas à base de CaP (grupo FCB) e 20 superfícies revestidas com Ca(OH)2 (grupo HCB). A eutanásia de todos os animais foi realizada no tempo de 40 dias para remoção de suas tíbias e início de processamento, até a realização das análises histomorfométrica, topográfica e biomecânica.

3.1.2 Protocolo de preparo da superfície de teste / grupo FCB

Os implantes do grupo Fosfato de Cálcio Biomimético (FCB) foram submetidos ao preparo do biomimético de modificação de superfície. Desta forma, 20 implantes de titânio Ticp foram preparados por meio de 2 etapas: o preparo da solução de fluido corpóreo (SFC), seguido do preparo da superfície de implantes.

3.1.2.1 Etapa 1: Preparo do SFC:

A partir da modificação da solução original de Aparecida *et. al* [36], proposta inicialmente por Kokubo [20], foram adicionados 500 ml de água deionizada em um béquer e, sob agitação, foram acrescentados os seguintes compostos, respectivamente e aguardando sempre cada solubilização: [1] NaCl – 8,003g; [2] $NaHCO_3$ – 0,335g; [3] KCl – 0,224g; [4] K_2HPO_4 – 0,174g; [5] Na_2SO_4 – 0,071g; [6] HCl – 40 ml (1 Mol); [7] $CaC_2.\ 2H_2O$ – 0,368g; [8] $MgCl.H_2O$ – 0,305g e [9] $Na_2(CH_2OH)_3$ – 6,057g.

Após o preparo da solução, o pH foi verificado com pHmetro, buscando-se um valor ideal entre 7,4 e 7,5 para o uso. Posteriormente, foi adicionada água até atingir 1000 ml e a solução foi armazenada em geladeira convencional para uso posterior.

3.1.2.2 Etapa 2: Preparo da Superfície dos implantes:

Esta fase foi seguida pela deposição de CaP por meio do método biomimético de modificação de superfície, o qual foi realizado em dois ciclos. Inicialmente, os implantes foram imersos em 50 mL de solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10 volumes e condicionados em uma estufa, onde permaneceram por um período de 24 horas a 60ºC para ativação da superfície.

Após ativação, os implantes foram mantidos em estufa por um período de aproximadamente 7 horas a 60ºC para secagem da superfície. Em momento posterior o tratamento dos implantes foi realizado com imersão em 100ml de uma solução em proporção de 2g de CaP para cada 10 ml de SFC. O procedimento foi conduzido em agitador magnético em cada troca. Essa imersão foi realizada por um período de 4 dias em estufa a 37ºC, com trocas diárias da solução para manter o equilíbrio iônico. Em seguida, os implantes foram submetidos a banhos de: 1- Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 10 volumes por 4 horas, com trocas a cada hora; 2- Solução salina fisiológica 0,9% por 10 minutos e 3- banho rápido com álcool absoluto.

Os implantes foram levados à estufa por 3 horas a 60ºC para sua completa secagem, embalados em grau cirúrgico e reencaminhados à Implalife® para serem submetidos ao processo de esterilização por raios gama. Parte dos implantes foi

reservada para realização das análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Energia Dispersiva de Raios X (EDS).

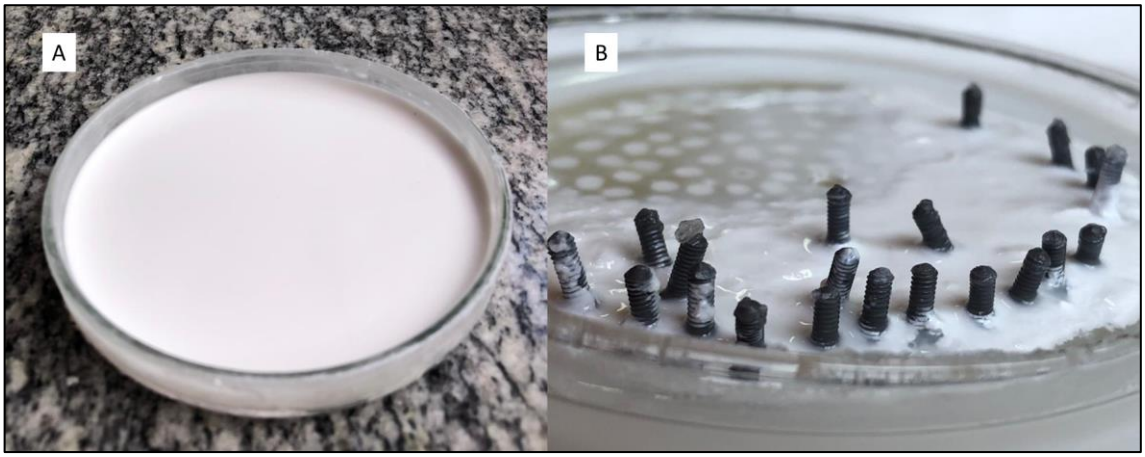


Fig. 1 (A) Preparo da superfície de teste grupo FCB; 100ml de SFC com 20g de CaP; (B) aspecto dos implantes do grupo FCB

3.1.3 Protocolo de preparo da superfície de teste / grupo HCB

Os 20 implantes destinados ao grupo Hidróxido de Cálcio Biomimético (HCB) foram preparados pelo método biomimético supracitado, substituindo apenas o CaP pelo Ca(OH)2.

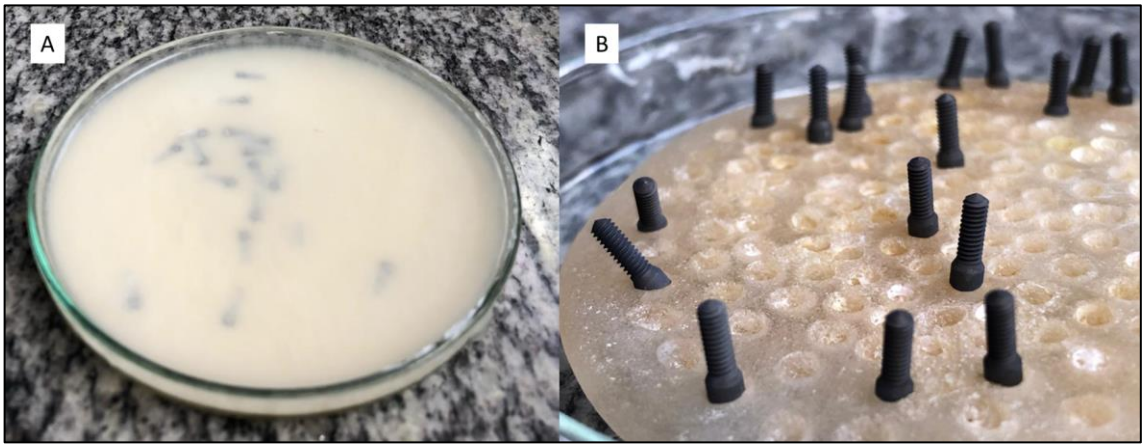


Fig. 2 (A) Preparo da superfície de teste grupo HCB; 100ml de SFC com 20g de Ca(OH)2; (B) aspecto dos implantes do grupo HCB

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 de ambas as tíbias. 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), foi realizada uma incisão de aproximadamente 2 cm de comprimento em cada 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.

Foram instalados 40 implantes de titânio que 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 dois (02) implantes, com travamento e estabilidade inicial. Os implantes foram colocados manualmente com uma chave digital quadrada e foram instalados na tíbia direita (grupo FCB) e esquerda (grupo HCB) de cada animal. Finalizada a instalação dos implantes, 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). Após 40 dias, a eutanásia dos animais foi realizada por meio de superdosagem anestésica 150mg/kg (Thiopental - Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil).

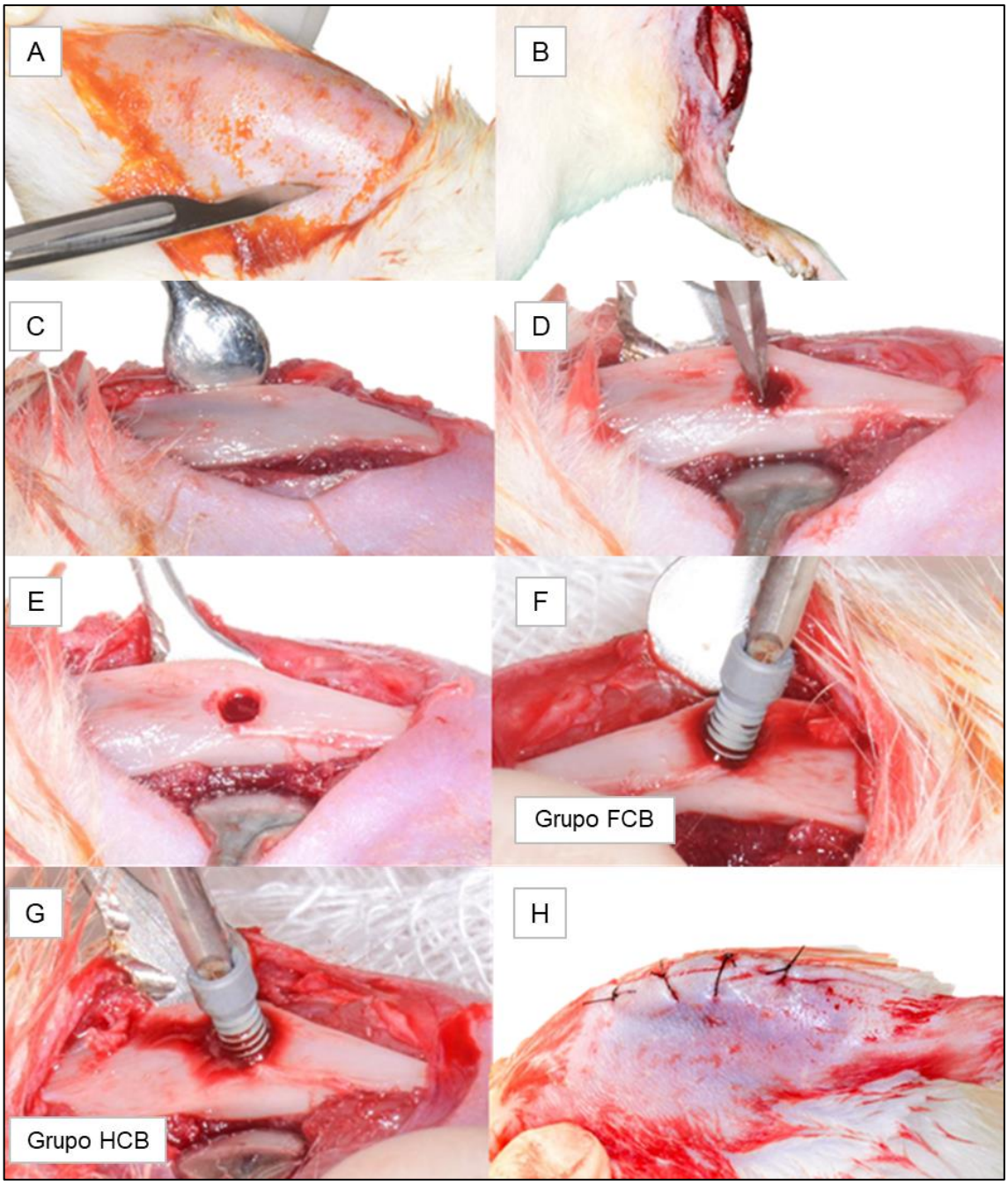


Fig. 3 Procedimento cirúrgico: (A) incisão com lâmina nº15 (B) região de metáfise tibial externa; (C) tecido mole foi divulsionado em espessura total e afastado com o auxílio de descoladores de periósteo; (D) fresagem (E) preparo para instalação do implante | diâmetro de 1,6 mm e altura de 3,0 mm; (F) instalação do implante tratado com fosfato de cálcio, grupo FCB, tíbia direita; (G) instalação do implante tratado com hidróxido de cálcio, grupo HCB, tíbia esquerda; (H) tecidos suturados em posição

3.3 Análise Biomecânica

3.3.1 Torque Reverso

No momento da eutanásia, no período de 40 dias, quatorze implantes foram expostos para a realização do torque reverso. As metáfises das tíbias foram reabertas para exposição dos implantes e o torque reverso foi aplicado por meio do torquímetro digital. 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% [37,38].

3.4 Análise Histomorfométrica

Treze tíbias de cada grupo experimental (FCB e HCB) foram removidas e fixadas em solução de formaldeído 10% durante 48 horas, lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificadas em EDTA 20% por 6 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 Insitute of Health, EUA). A extensão linear de contato osso-implante (ELCOI) foi mensurada a partir da segunda espira registrada no tecido da margem óssea em µm (micrômetro). Também foi analisada a área óssea neoformada (AON). 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 Topográfica

3.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Energia Dispersiva de Raios x (EDS)

No período pré-operatório, os implantes de cada grupo foram analisados quanto à topografia da superfície através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV modelo EVO LS15, Zeiss, Alemanha), com sistema de Espectroscopia de Raios-x por Dispersão em Energia (EDX ou EDS) acoplado, para análise da composição química e mapeamento elementar das superfícies. Essa técnica investiga a amostra através de interações entre as partículas e a matéria, e analisa os raios-x emitidos em resposta à incidência de partículas carregadas. Sua capacidade de caracterização é devida, em grande parte, ao princípio fundamental de que cada elemento tem uma estrutura atômica única, de modo que os raios-x emitidos são característicos desta estrutura, que identificam o elemento [28].

3.6 Análise Estatística

Para a análise estatística, os dados obtidos foram submetidos a um teste de normalidade e homoscedasticidade (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 animais, não havendo intercorrências. A recuperação 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 FCB e HCB (n=7), no período de 40 dias. Esses valores estão demonstrados na tabela 1, destacando as médias e desvios padrão. A figura 4 apresenta os valores médios e desvio padrão dos torques reversos aplicados nos grupos FCB e HCB.

Tabela 1 Grupos FCB e HCB no período de 40 dias, torque (N.cm), média e desvio padrão

Período – 40 DIAS		
GRUPO	FCB	HCB
TORQUE (N.cm)	11 10 8 6 6 5 4	18 14 12 9 7 7 6
MÉDIA	7,14	10,43
DESV PAD	2,42	4,10

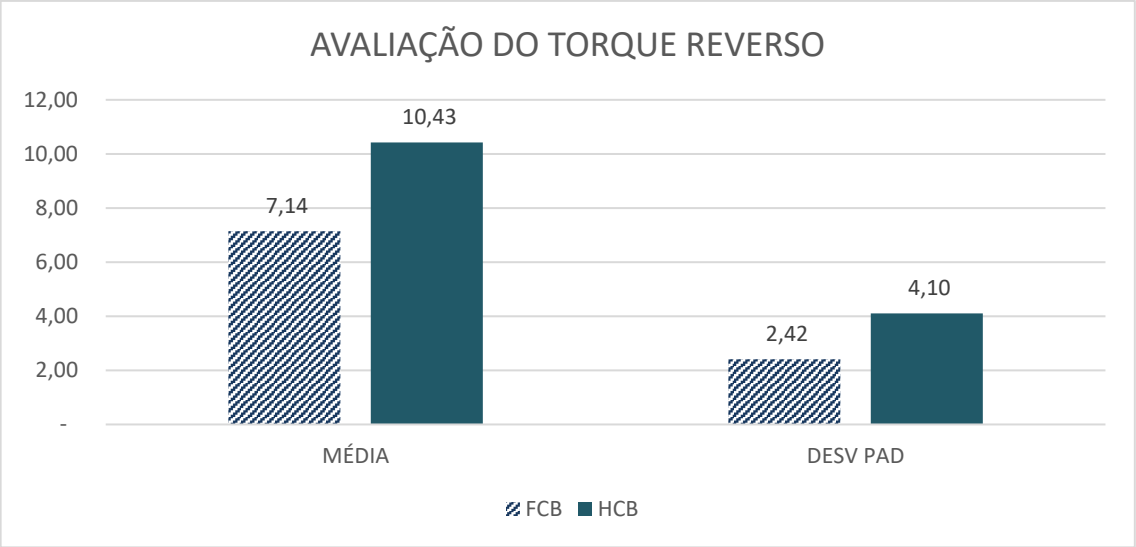


Fig. 4 Grupos FCB e HCB no período de 40 dias. Torque (N.cm), média e desvio padrão

4.2 Análise histomorfométrica

Os resultados histológicos no período de 40 dias, demonstram processo de remodelação, revelando tecido ósseo neoformado, corticalizado com osso lamelar em contato com a superfície dos implantes e presença de osteócitos em ambos os grupos. O grupo HCB revela discreta formação de osso imaturo, fato mais evidente quando comparado ao grupo FCB.

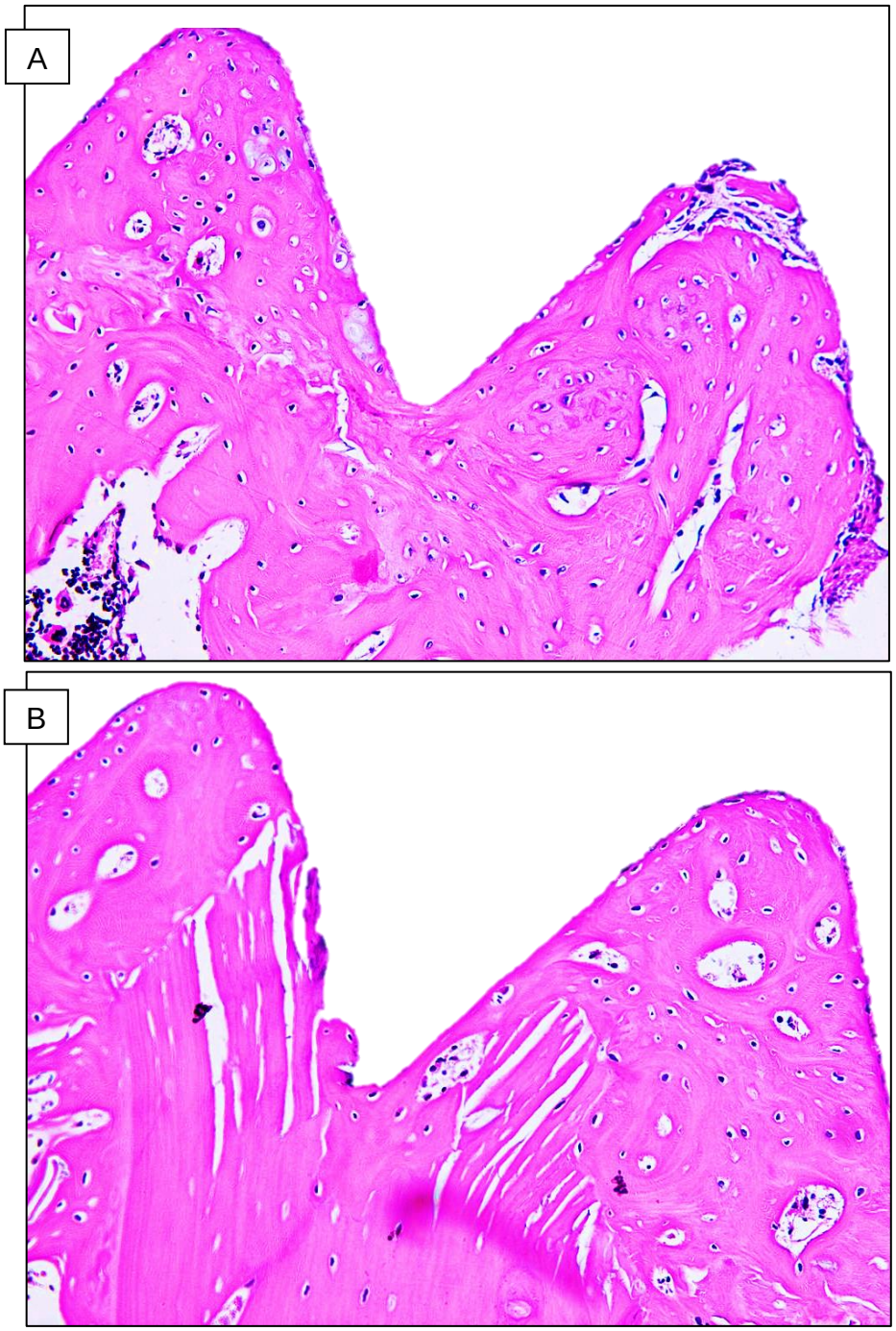


Fig. 5 Prancha com as imagens histológicas apresentando aspecto dos grupos FCB (A) e HCB (B) no período de 40 dias. Presença de tecido ósseo remodelado, corticalizado e com osso lamelar em contato com as superfícies dos implantes. HE | aumento de 20X

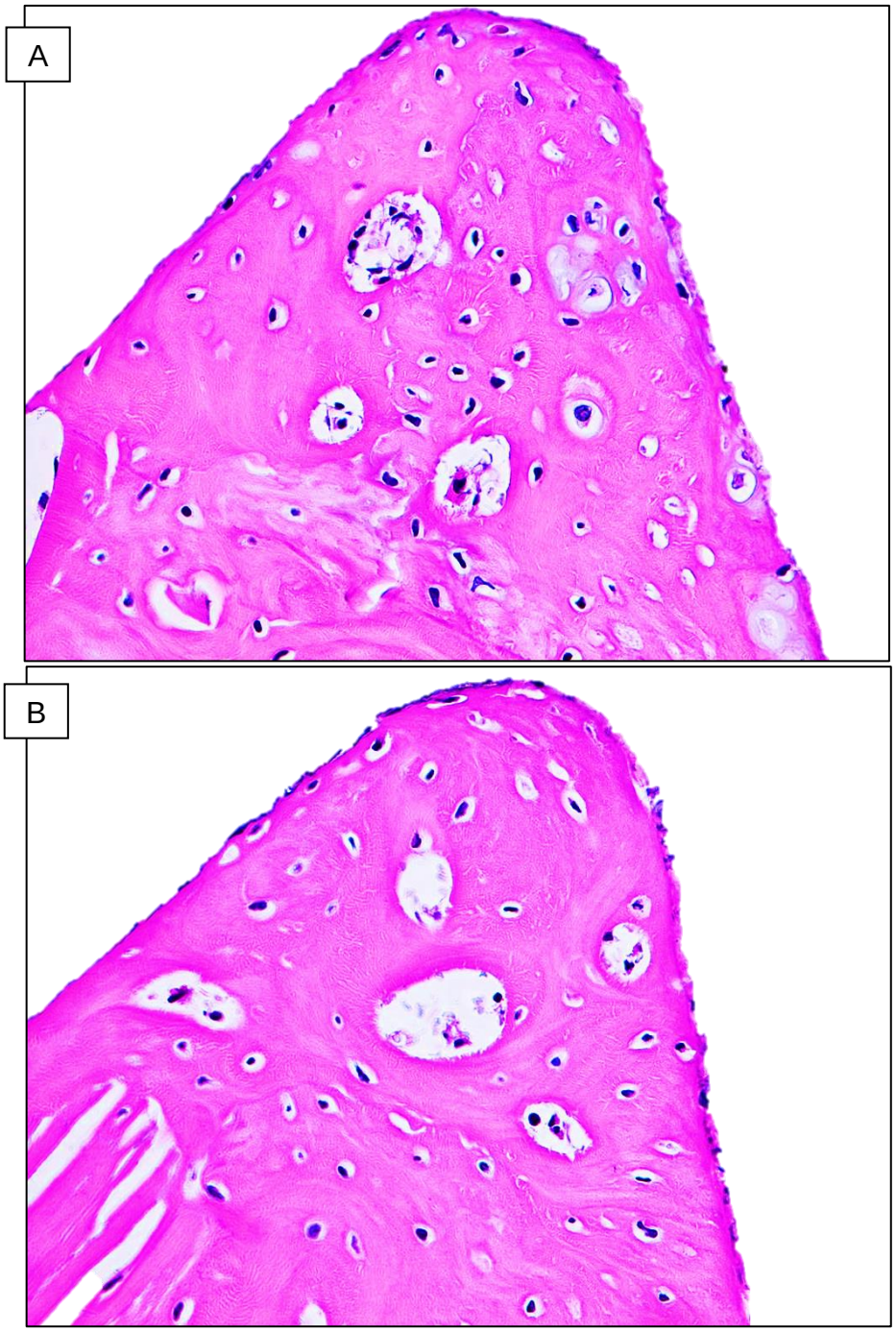


Fig 6 Prancha com as imagens histológicas apresentando aspecto dos grupos FCB (A) e HCB (B) no período de 40 dias. HE | aumento de 40X

4.3 Análise topográfica

4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) associada ao EDS

O resultado das análises por MEV das superfícies demonstrou diferenças topográficas entre elas (figura 7 e 8), sendo a superfície com maior rugosidade a dos implantes tratados com Hidróxido de Cálcio (grupo HCB) apresentado na figura 8, essa propriedade favoreceu a ancoragem óssea.

Ambas as superfícies foram tornadas ásperas e com rugosidades semelhantes na faixa micrométrica, mas diferentes em morfologias no nível nanométrico e correspondem aos critérios das topologias de superfície previamente descritos para promover a osseointegração. A análise por EDS não revelou nenhuma contaminação das superfícies dos implantes analisados e mostrou picos de Titânio (Ti) Cálcio (Ca) e Oxigênio (O) em ambos os grupos.

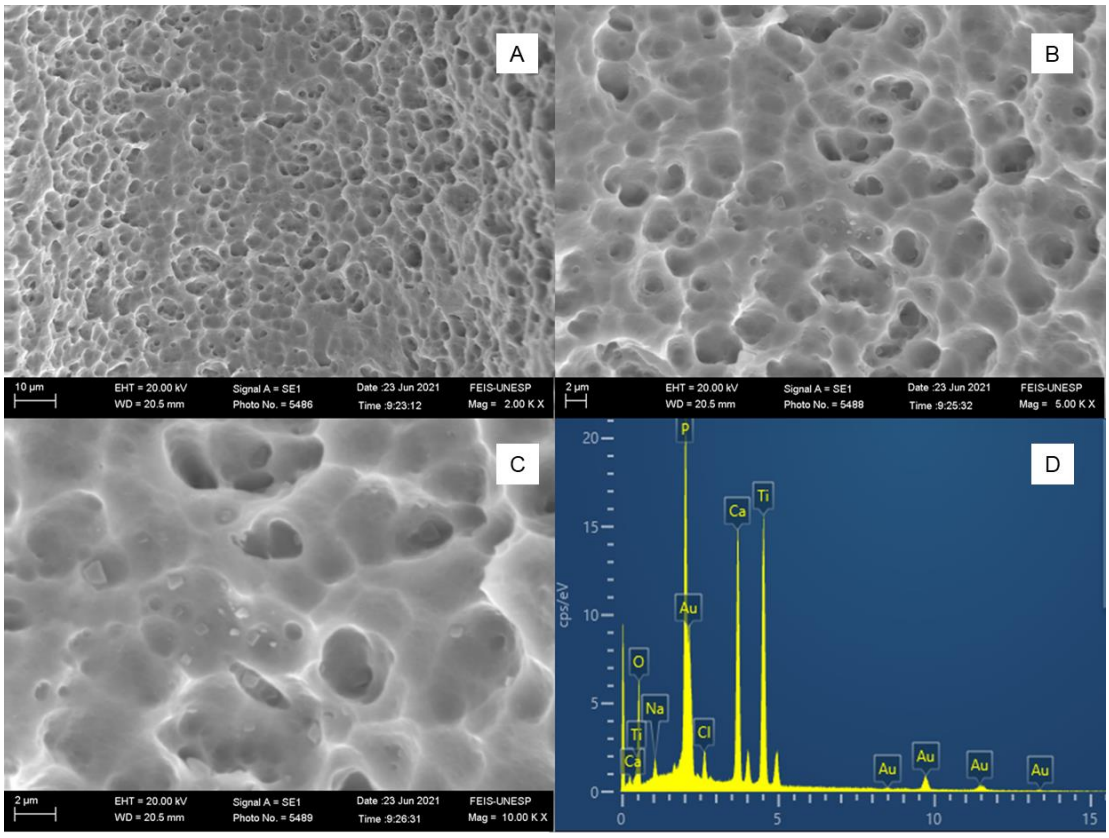


Fig. 7 MEV grupo FCB, implantes tratados com CaP: (A) aumento 2000x; (B) aumento 5000x; (C) aumento 10000x; (D) EDS

Tabela 2 Composição química da superfície dos implantes do Grupo FCB

Elemento	Peso %
O	42.85
Na	1.51
P	13.50
Cl	1.44
Ca	15.45
Ti	25.25
Total	**100.00**

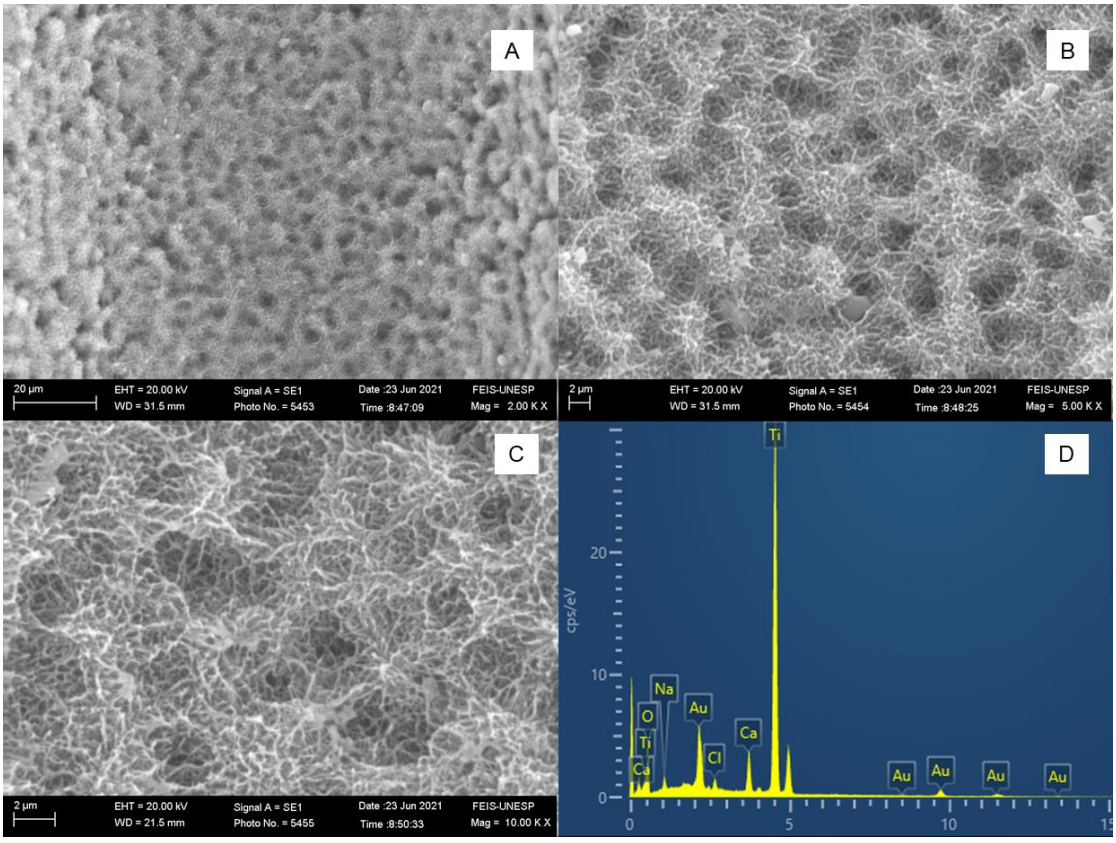


Fig. 8 MEV grupo HCB, implantes tratados com Ca(OH)2: (A) aumento 2000x; (B) aumento 5000x; (C) aumento 10000x; (D) EDS

Tabela 3 Composição química da superfície dos implantes do Grupo HCB

Elemento	Peso %
O	41.86
Na	1.81
Cl	0.82
Ca	3.45
Ti	52.06
Total	**100.00**

4.4 Análise estatística

O estudo da biomecânica demonstrou valores médios e desvio padrão dos torques reversos aplicados nos grupos FCB e HCB presentes na figura 4. Esses resultados permitem observar que no período de 40 dias o grupo HCB apresentou valor superior em relação ao grupo FCB. A análise estatística dos dados demonstra houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p<0,001$), o grupo HCB apresentou maior estabilidade e resistência biomecânica.

A análise dos dados demonstrou que não houve diferença estatística significante entre os valores obtidos a partir das mensurações da ELCOI ($P= 0,394$) na comparação entre ambos os grupos no período de 40 dias. Os dados sobre a AON demonstraram uma maior formação óssea nos grupos FCB, entretanto, não houve diferença estatística significativa ($P=0,073$) quando comparado ao grupo HCB.

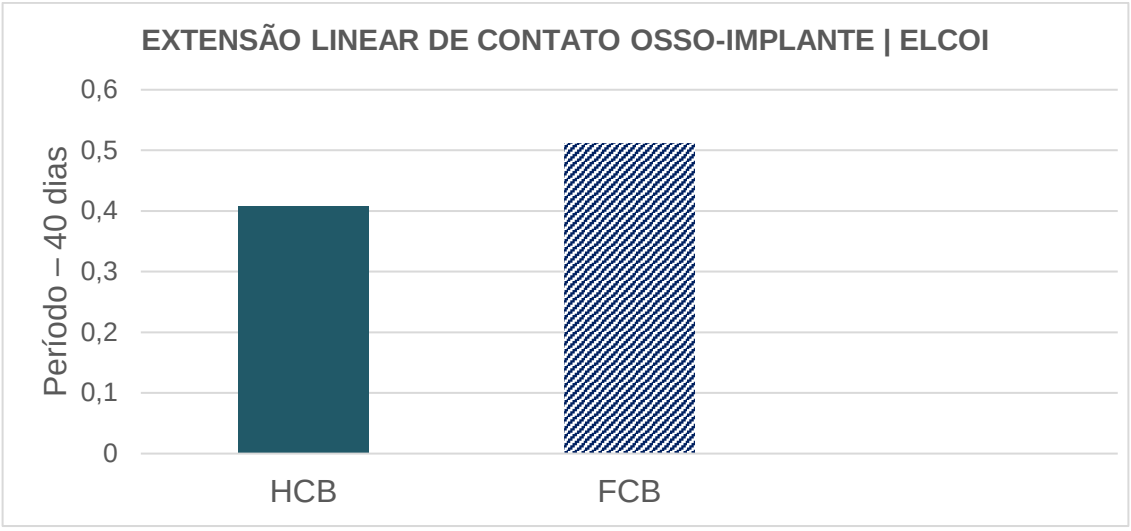


Fig. 9 Gráfico das médias obtidas a partir da mensuração da Extensão Linear de Contato Osso-implante (ELCOI) em µm no período de 40 dias

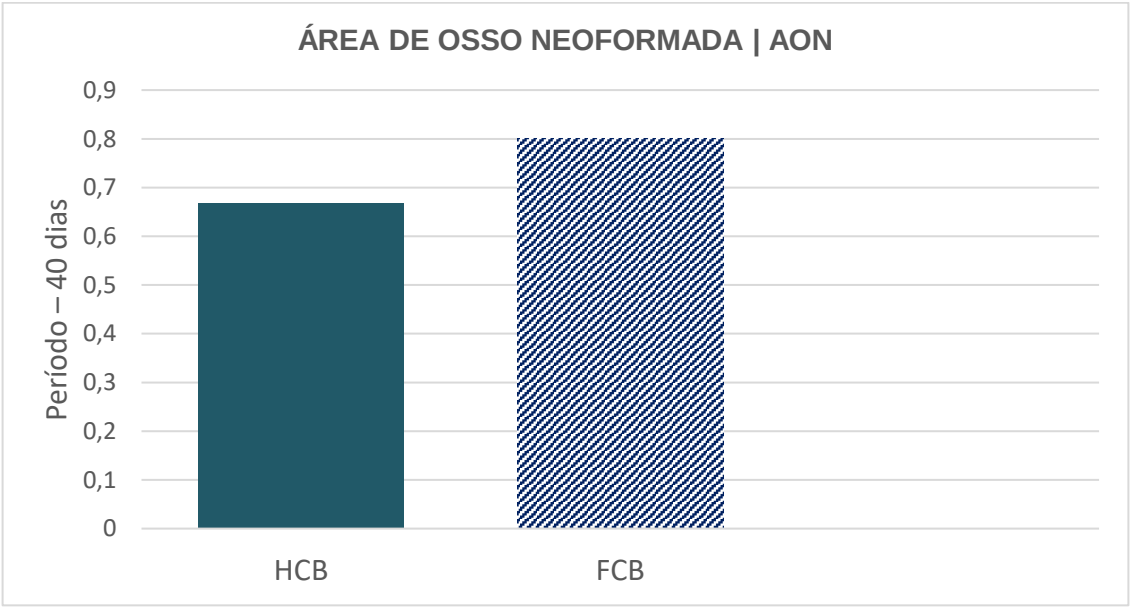


Fig. 10 Gráfico das médias obtidas a partir da mensuração de Área Óssea Neoformada (AON) em µm no período de 40 dias

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A literatura sugere que a combinação de uma boa rugosidade da superfície e as propriedades mecânicas do titânio podem levar para o sucesso do implante dentário [13]. As mudanças na topografia da superfície alteram o crescimento, o metabolismo e a migração, bem como a produção de citocinas e fatores de crescimento das células osteogênicas [39]. Nossos resultados por meio da análise histomorfométrica, demonstraram que as propriedades físico-químicas e morfológicas da superfície do implante tiveram uma função direta na osteogênese, favorecendo os estágios do processo de reparo na interface formada entre o osso e o implante. Os valores registrados pela ELCOI (P=0,394) e AON (P=0,073) demonstraram uma maior formação óssea no grupo FCB, porém sem diferença estatística significativa entre os grupos experimentais.

O tratamento das perdas dentárias por implantes incentivou a investigação sobre as características topográficas [40,41]. Superfícies de titânio topograficamente modificadas, como implantes com jato de areia, granulação grande e ataque ácido, já estão implementadas clinicamente, apresentando desempenhos bem-sucedidos [42]. Atualmente, o uso de SBF em estudos de imersão é considerado como uma abordagem padrão para avaliar a bioatividade de materiais [20,43,44].

Revestimentos biomiméticos de fosfato de cálcio e hidroxiapatita em implantes dentários foram investigados para melhorar a osseointegração e alcançar benefícios terapêuticos [45–47]. Os CaPs têm a capacidade de osteocondução, permitindo que os osteoblastos se fixem, proliferem e se diferenciem [48]. Em várias ocasiões, os CaPs também têm efeitos osteoindutores [49]. Isso justifica o valor superior de osso neoformado no grupo FCB quando comparado ao grupo HCB, conforme demonstrou nossos resultados.

Um estudo realizado anteriormente, constatou que o revestimento biomimético com fosfato de cálcio levou a um aumento significativo da resistência biomecânica e resistência às forças de cisalhamento [50]. Os fosfatos de cálcio são liberados da superfície do implante após a sua instalação, que satura o fluido corporal e uma camada de apatita biológica é precipitada na superfície do implante. Esta camada promove a ligação celular osteogênica, crescimento e reparo ósseo [35].

Fosfatos de cálcio (CaPs) como a hidroxiapatita, beta-fosfato tricálcico e misturas têm sido considerados materiais de jateamento atrativos, sendo reabsorvíveis, biocompatíveis, osteocondutores e bioativos [48,51]. Entretanto, as propriedades físico-químicas do CaP e seu processo de degradação, a quantidade de osso neoformado e respectiva estabilidade a longo prazo da interface biomaterial-osso estão em investigação com resultados controversos [15].

Estudos compararam a reparação óssea de implantes metálicos de diversos formatos e com superfície modificada quimicamente. Através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), demonstrou-se que os implantes com superfície porosa e irregular são mais efetivos para a fixação ao osso [29–31], fato este que corrobora com nossos resultados. A análise da topografia dos implantes do grupo HCB revelou maior rugosidade, o que favoreceu a ancoragem ao osso. A análise estatística dos dados demonstra que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p<0,001$) e o grupo HCB apresentou maior estabilidade e resistência biomecânica quando comparado ao grupo FCB.

Um trabalho realizado utilizando a imersão sequencial de espécimes de zircônia, respectivamente, em NaOH, Ca(OH)2 e Na3PO4 mostrou produzir um revestimento de superfície ideal para a osseointegração [52]. A literatura evidenciou com sucesso que eletroquimicamente revestimentos de Ca(OH)2 depositados com prata incorporada e íons de cobre são uma superfície antibacteriana mais promissora na funcionalização do titânio [24,53]. Assim como, vários estudos em animais que avaliaram os efeitos Ca(OH)2 no reparo ósseo em vários tipos de defeitos produziram resultados diferentes [54–58].

Em um modelo de regeneração óssea guiada usando calvária de minipig, o Ca(OH)2 não exerceu propriedades osteoindutoras e prejudicou o reparo ósseo quando usado em conjunto com a regeneração óssea guiada [59]. Além disso, a osseointegração de implantes endósseos não foi melhorada quando estes foram inseridos em conjunto com Ca(OH)2 [57]. Em outro estudo, a aplicação de Ca(OH)2 durante a fase de osteotomia da distração osteogênica melhorou a formação de osso novo [55], enquanto em defeitos periodontais intraósseos criados experimentalmente, a aplicação de Ca(OH)2 em conjunto com a cirurgia de retalho de acesso promoveu a regeneração periodontal [56].

A utilização do Ca(OH)2 mostrou que o material promove a fixação, proliferação e mineralização de osteoblastos de maneira dependente da concentração [60]. Assim como, foi claramente demonstrado em artigos científicos que o revestimento de CaP acelera a formação óssea ao redor do implante e promove a consolidação e aposição óssea, levando à rápida fixação biológica dos implantes [35,61].

Os grupos experimentais apresentaram resultados satisfatórios no tratamento das superfícies dos implantes utilizando fosfato de cálcio e hidróxido de cálcio. Entretanto, outras investigações necessitam ser realizadas para demonstrar como o Hidróxido de Cálcio auxilia na osseointegração e estabilidade do implante.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O tratamento das superfícies dos implantes com hidróxido de cálcio mostrou-se mais eficaz na resposta de estabilidade do implante, sendo superior ao fosfato de cálcio. Ambos os grupos apresentaram resultados satisfatórios na neoformação óssea e contato osso-implante.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Carlsson L, Röstlund T, Albrektsson B, Albrektsson T, Brånemark PI (1986) Osseointegration of titanium implants. Acta Orthop Scand 57:285–289

2. Tarnow D, Emtiaz S, Classi A (1997) Immediate loading of threaded implants at stage 1 surgery in edentulous arches: ten consecutive case reports with 1- to 5-year data. Int J Oral Maxillofac Implant 12:319–324

3. 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 44:377–388. https://doi.org/10.1016/j.ijom.2014.10.023

4. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A (1969) Intra-osseous anchorage of dental prostheses. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 4:19–34

5. Fenton A (1992) The role of dental implants in the future. J Am Dent Assoc 123:36–42.

6. Cooper LF (2000) A role for surface topography in creating and maintaining bone at titanium endosseous implants. J Prosthet Dent 84:522–534

7. Rupp F, Gittens RA, Scheideler L, Marmur A, Boyan BD, Schwartz Z, Geis-Gerstorfer J (2014) A review on the wettability of dental implant surfaces I: theoretical and experimental aspects. Acta Biomater 10:2894–2906

8. 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

9. Romero-Gavilan F, Araújo-Gomes N, Sánchez-Pérez AM, García-Arnáez I, Elortza F, Azkargorta M, de Llano JJM, Carda C, Gurruchaga M, Suay J, Goñi I (2018) Bioactive potential of silica coatings and its effect on the adhesion of proteins to titanium implants. Colloids Surf B Biointerfaces 162:316–325.

10. Carradò A, Perrin-Schmitt F, Le QV, Giraudel M, Fischer C, Koenig G, Jacomine L, Behr L, Chalom A, Fiette L, Morlet A, Pourroy G (2017)

Nanoporous hydroxyapatite/sodium titanate bilayer on titanium implants for improved osteointegration. Dent Mater 33:321–332

11. Fenton A (1992) The role of dental implants in the future. J Am Dent Assoc 123:36–42

12. Brånemark PI, Adell R, Albrektsson T, Lekholm U, Lundkvist S, Rockler B (1983) Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. Biomaterials 4:25–28.

13. Abraham CM (2014) A brief historical perspective on dental implants, their surface coatings and treatments. Open Dent J 8:50–55.

14. Novaes AB Jr, de Souza SL, de Barros RR, Pereira KK, Iezzi G, Piattelli A (2010) Influence of implant surfaces on osseointegration. Braz Dent J 21:471–481

15. Singh G (2018) Surface treatment of dental implants: a review. IOSR J Dent Med Sci 17:49–53

16. Spriano S, Yamaguchi S, Baino F, Ferraris S (2018) A critical review of multifunctional titanium surfaces: new frontiers for improving osseointegration and host response, avoiding bacteria contamination. Acta Biomater 79:1–22.

17. Kokubo T, Ito S, Huang ZT, Hayashi T, Sakka S, Kitsugi T, Yamamuro T (1990) Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W. J Biomed Mater Res 24:331–343

18. Li M, Wu G, Wang M, Hunziker EB, Liu Y (2022) Crystalline biomimetic calcium phosphate coating on mini-pin implants to accelerate osseointegration and extend drug release duration for an orthodontic application. Nanomaterials 12:2439

19. Habibovic P, van der Valk CM, van Blitterswijk CA, De Groot K, Meijer G (2004) Influence of octacalcium phosphate coating on osteoinductive properties of biomaterials. J Mater Sci Mater Med 15:373–380

20. Kokubo T, Takadama H (2006) How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? Biomaterials 27:2907–2915

21. Su Y, Cockerill I, Zheng Y, Tang L, Qin YX, Zhu D (2019) Biofunctionalization of metallic implants by calcium phosphate coatings. Bioact Mater 4:196–206

22. Kurtz SM, Kocagöz S, Arnholt C, Huet R, Ueno M, Walter WL (2015) Advances in zirconia toughened alumina biomaterials for total joint replacement. J Mech Behav Biomed Mater 31:107–116

23. Pupilli F, Ruffini A, Dapporto M, Tavoni M, Tampieri A, Sprio S (2022) Design strategies and biomimetic approaches for calcium phosphate scaffolds in bone tissue regeneration. Biomimetics 7:112

24. Meininger M, Meininger S, Groll J, Gbureck U, Moseke C (2018) Silver and copper addition enhances the antimicrobial activity of calcium hydroxide coatings on titanium. J Mater Sci Mater Med 29:1–9

25. Mohammadi Z, Dummer PMH (2011) Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. Int Endod J 44:697–730

26. Saatchi M, Shokraneh A, Navaei H, Maracy MR, Shojaei H (2014) Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on Enterococcus faecalis: A systematic review and meta-analysis. J Appl Oral Sci 22:356–365

27. Estrela C, Holland R (2003) Calcium hydroxide: study based on scientific evidences - Hidróxido de cálcio: estudo baseado em evidências científicas. J Appl Oral Sci 11:269–282

28. Corbari L, Cambon-Bonavita MA, Long GJ, Grandjean F, Zbinden M, Gaill F, Compère P (2008) Iron oxide deposits associated with the ectosymbiotic bacteria in the hydrothermal vent shrimp Rimicaris exoculata. Biogeosciences 5:1295–1310

29. Faverani LP, Ramalho-ferreira G, Gaetti-jardim EC, Okamoto R (2011) Osseointegrated implants: evolution and success. Salusvita 30:47–58

30. Shalabi MM, Gortemaker A, Van't Hof MA, Jansen JA, Creugers NH (2006) Implant surface roughness and bone healing: a systematic review. J Dent Res 85:496–500

31. Hong JY, Ko SY, Lee W, Chang YY, Kim SH, Yun JH (2020) Enhancement of bone ingrowth into a porous titanium structure to improve osseointegration of

dental implants: a pilot study in the canine model. Materials 13:1–13

32. Queiroz TP, Souza FÁ, Guastaldi AC, Margonar R, Garcia IR Jr, Hochuli-Vieira E (2013) Commercially pure titanium implants with surfaces modified by laser beam with and without chemical deposition of apatite. Biomechanical and topographical analysis in rabbits. Clin Oral Implants Res 24:896–903

33. Souza FA, Queiroz TP, Guastaldi AC, Garcia IR Jr, Magro Filho O, Nishioka RS, Sisti KE, Sonoda CK (2013) Comparative in vivo study of commercially pure Ti implants with surfaces modified by laser with and without silicate deposition: Biomechanical and scanning electron microscopy analysis. J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater 101 B:76–84

34. Sennerby L, Thomsen P, Ericson L (1992) A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. Int J Oral Maxillofac Implant 7:62–71

35. Surmenev RA, Surmeneva MA, Ivanova AA (2014) Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis: a review. Acta Biomater 10:557–579

36. Aparecida AH, Fook MVL, Guastaldi AC (2009) Biomimetic apatite formation on Ultra-High Molecular Weight Polyethylene (UHMWPE) using modified biomimetic solution. J Mater Sci Mater Med 20:1215–1222

37. Ramalho-Ferreira G, Faverani LP, Prado FB, Garcia IR Jr, Okamoto R (2015) Raloxifene enhances peri-implant bone healing in osteoporotic rats. Int J Oral Maxillofac Surg 44:798–805

38. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM (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

39. Jemat A, Ghazali MJ, Razali M, Otsuka Y (2015) Surface modifications and their effects on titanium dental implants. Biomed Res Int 2015:1–11

40. Cooper LF (2000) A role for surface topography in creating and maintaining

bone at titanium endosseous implants. J Am Dent Assoc 132:1452

41. Wennerberg A, Albrektsson T (2009) Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. Clin Oral Implants Res 20:172–184

42. Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Boyan BD (2005) High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. J Biomed Mater Res - Part A 74:49–58

43. Baino F, Yamaguchi S (2020) The use of simulated body fluid (SBF) for assessing materials bioactivity in the context of tissue engineering: review and challenges. Biomimetics 5:1–19

44. Zamparini F, Prati C, Generali L, Spinelli A, Taddei P, Gandolfi MG (2021) Micro-nano surface characterization and bioactivity of a calcium phosphate-incorporated titanium implant surface. J Funct Biomater 12:3

45. Barrère F, van der Valk CM, Meijer G, Dalmeijer RA, de Groot K, Layrolle P (2003) Osteointegration of biomimetic apatite coating applied onto dense and porous metal implants in femurs of goats. J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater 67:655–665

46. Yu X, Wei M (2011) Preparation and evaluation of parathyroid hormone incorporated CaP coating via a biomimetic method. J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater 97 B:345–354

47. Zafar MS, Amin F, Fareed MA, Ghabbani H, Riaz S, Khurshid Z, Kumar N (2020) Biomimetic aspects of restorative dentistry biomaterials. Biomimetics 5:1–42

48. LeGeros RZ (2002) Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. Clin Orthop Relat Res 81–98

49. Miron RJ, Sculean A, Shuang Y, Bosshardt DD, Gruber R, Buser D, Chandad F, Zhang Y (2016) Osteoinductive potential of a novel biphasic calcium phosphate bone graft in comparison with autographs, xenografts, and DFDBA. Clin Oral Implants Res 27:668–675

50. Hägi TT, Enggist L, Michel D, Ferguson SJ, Liu Y, Hunziker EB (2010) Mechanical insertion properties of calcium-phosphate implant coatings. Clin

Oral Implants Res 21:1214–1222

51. Yip I, Ma L, Mattheos N, Dard M, Lang NP (2015) Defect healing with various bone substitutes. Clin Oral Implants Res 26:606–614

52. Cheng MS, Salamanca E, Lin JC, Pan YH, Wu YF, Teng NC, Watanabe I, Sun YS, Chang WJ (2022) Preparation of calcium phosphate compounds on zirconia surfaces for dental implant applications. Int J Mol Sci 23:6675

53. Roy M, Bandyopadhyay A, Bose S (2011) Induction plasma sprayed nano hydroxyapatite coatings on titanium for orthopaedic and dental implants. Surf Coatings Technol 205:2785–2792

54. Stavropoulos A, Geenen C, Nyengaard JR, Karring T, Sculean A (2007) Oily calcium hydroxide suspension (Osteoinductal) used as an adjunct to guided bone regeneration: an experimental study in rats. Clin Oral Implants Res 18:761–767

55. Polat HB, Yeler H, Gumus C, Bulut HE, Kucuk D (2009) Effect of oil-based calcium hydroxide (Osteoinductal) on distraction osteogenesis in rabbit mandible. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontol 107:e30–e36

56. Schwarz F, Stratul SI, Herten M, Beck B, Becker J, Sculean A (2006) Effect of an oily calcium hydroxide suspension (Osteoinductal) on healing of intrabony periodontal defects. A pilot study in dogs. Clin Oral Investig 10:29–34

57. Kohal RJ, Hürzeler MB, Schneider SR, Riede UN, Caffesse RG (1997) The effect of a calcium hydroxide paste on wound healing and osseointegration of dental implants: a pilot study in beasle dogs. Clin. Oral Implants Res. 8:375–385

58. Hasturk H, Kantarci A, Ghattas M, Dangaria SJ, Abdallah R, Morgan EF, Diekwisch TG, Ashman A, Van Dyke T (2011) The use of light/chemically hardened polymethylmethacrylate, polyhydroxylethylmethacrylate, and calcium hydroxide graft material in combination with polyanhydride around implants and extraction sockets in minipigs: part ii: histologic and Micro- CT Evalua. Physiol Behav 85:139–148

59. Busenlechner D, Tangl S, Mair B, Fugger G, Gruber R, Redl H, Watzek G (2008) Simultaneous in vivo comparison of bone substitutes in a guided bone regeneration model. Biomaterials 29:3195–3200

60. Eick S, Strugar T, Miron RJ, Sculean A (2014) In vitro-activity of oily calcium hydroxide suspension on microorganisms as well as on human alveolar osteoblasts and periodontal ligament fibroblasts. BMC Oral Health 14:1–10

61. Apostu D, Lucaciu O, Berce C, Lucaciu D, Cosma D (2018) Current methods of preventing aseptic loosening and improving osseointegration of titanium implants in cementless total hip arthroplasty: a review. J Int Med Res 46:2104–2119

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Avaliação da microarquitetura óssea na comparação de implantes revestidos com fosfato de cálcio e hidróxido de cálcio pelo método biomimético. Análises histológica, histométrica, biomecânica e topográfica"**, Processo FOA nº 0306-2021, 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 30 de Julho de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Dezembro de 2022.
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Janeiro de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Evaluation of bone microarchitecture in the comparison of implants coated with calcium phosphate and calcium hydroxide by the biomimetic method. Histological, histometric, biomechanical and topographic analysis"**, Protocol FOA nº 0306-2021, 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 July 30, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 01, 2022.
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 01, 2023.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br

Anexo B - 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 965:325–329

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.

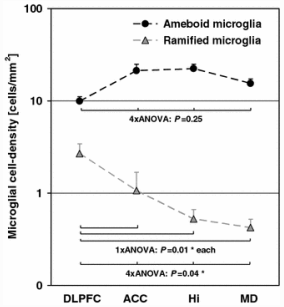
Back to top

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

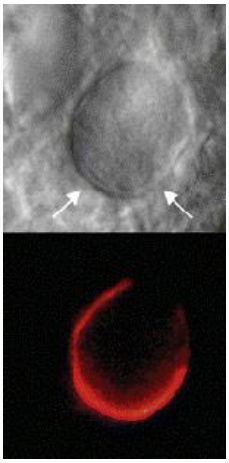
Supply all figures electronically.
Indicate what graphics program was used to create the artwork.
For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



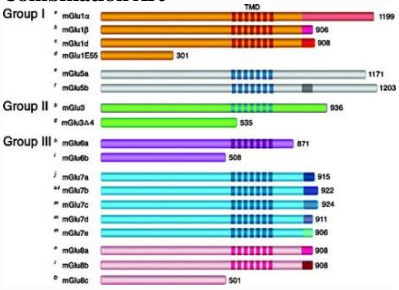
Definition: Black and white graphic with no shading.
Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum 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), .wrl (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う。
・英語で執筆する際の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 자주하는 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 검수하는 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**.
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