



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

Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial
Linha de Pesquisa: Bases da Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial

RODRIGO CAPALBO DA SILVA

**Osseointegração de implantes com superfícies modificadas por
LASER com e sem recobrimento de hidroxiapatita.
Caracterização topográfica, análises biomecânica e histológica**

Orientador: Prof. Dr. Francisley Ávila Souza

Araçatuba – SP

2020

RODRIGO CAPALBO DA SILVA

Osseointegração de implantes com superfícies modificadas por LASER com e sem recobrimento de hidroxiapatita. Caracterização topográfica, análises biomecânica e histológica

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do Título de MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial)

Orientador: Prof. Dr. Francisley Ávila Souza

Araçatuba – SP

2020

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Silva, Rodrigo Capalbo da.

S586o Osseointegração de implantes com superfícies modificadas por laser com e sem recobrimento de hidroxiapatita caracterização topográfica, análises biomecânica e histológica / Rodrigo Capalbo da Silva. – Araçatuba, 2020
64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Francisley Ávila Souza

1. Implantes dentários 2. Osseointegração 3. Propriedades de superfície I T.

Black D7

CDD 617.6

Dedicatória

Dedico este trabalho com muito amor e carinho, a minha família, meu alicerce em tudo o que faço. O apoio de todos foi essencial para que eu chegasse até aqui. A vocês, minha eterna gratidão.

Agradecimentos

Especiais

A **Deus**, meu Pai amado, que com todo seu amor e cuidado me capacitou e me proporcionou momentos incríveis durante esta trajetória. Me deu força nos momentos mais difíceis, me guiou dando discernimento durante as minhas escolhas, abriu portas e sempre esteve ao meu lado. Agradeço a oportunidade que o senhor me dá todos os dias de cuidar de pessoas.

Aos **meus pais Jorge e Érica**, que mais do que eu, batalharam por essa conquista e fizeram de tudo para permitir que eu corresse atrás dos meus sonhos. Obrigado por todo o suporte, por nos momentos mais difíceis não me deixarem cair e ajudar na minha formação com o mestrado e o curso de especialização. Vocês são a maior referência e exemplo que tenho como pessoas, tudo o que fiz e faço é por vocês. Amo vocês mais que tudo!

Ao **meu irmão Rafael**, meu companheiro e amigo que sempre esteve ao meu lado torcendo pela minha felicidade. Obrigado por todos os momentos que vivemos juntos, por me fazer crescer e acompanhar o seu crescimento. Sempre estarei ao seu lado batalhando para que você seja muito feliz.

Aos **meus familiares**, por todo apoio que sempre deram a mim e minha família. Sou muito feliz por saber que tenho uma família tão unida, que está presente em todos os momentos. Quero que isso seja mantido pela nossa e as futuras gerações. Família sempre foi tudo para mim, e vocês tornam essa escolha ser muito mais fácil.

A minha namorada **Hiskell Fernandes**, minha melhor amiga, companheira, meu porto seguro. Esse momento não seria possível sem você, que me deu forças nas situações mais difíceis e sempre me apoiou nas minhas escolhas. Nesta data, a distância estará nos separando fisicamente, mas saiba que tenho você em pensamento todos os momentos do meu dia. Sempre estarei ao seu lado, lutando pela sua felicidade e te apoiando nos seus sonhos. Agradeço a Deus em todas as minhas orações por ter feito a minha amiga se tornar a mulher da minha vida. Eu te amo muito.

A **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP**, no nome do diretor Glauco Issamu Miyahara, que tanto faz pela população e alunos de graduação e pós-graduação que passam por esta instituição. Me orgulho muito de ter realizado o sonho de fazer a graduação nesta casa e estar vivendo outro de fazer a pós-graduação aqui. Aqui vivi momentos nos quais sempre carregarei comigo, momentos difíceis, alegres, mas que fizeram de mim uma pessoa e um profissional melhor.

Ao meu professor e orientador **Professor Doutor Francisley Ávila Souza**, que foi fundamental para a minha formação. O senhor é uma referência de profissional e pessoa para mim. Sou muito grato por todo conhecimento compartilhado, por sempre se mostrar

disponível e principalmente por toda ajuda que o senhor me deu para que eu me fortalecesse para buscar o meu sonho. Obrigado por ter aberto as portas há mais de 5 anos, me aceitado como seu orientado e ter confiado em meu trabalho. Agradeço aos anos de amizade e trabalho que tivemos juntos.

Ao **Professor Doutor Idelmo Rangel Garcia Júnior**, pelo exemplo de serenidade e amor a camisa que veste. É perceptível o carinho e amor que tem pela história da Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial da FOA/UNESP, e com certeza o senhor já está eternizado nela. Agradeço a disponibilidade por compor a banca deste momento tão importante.

A **Professora Doutora Thallita Pereira Queiroz**, referência da área na qual me dediquei nesses dois últimos anos. É uma honra ter um profissional que foi motivo de inspiração por seus atigos neste momento tão especial. Agradeço a disponibilidade em compor a banca da minha defesa de dissertação.

A **Professora Doutora Ana Paula Farnezi Bassi** por ser um grande exemplo de docente e ao mesmo tempo, ser tão humana. Obrigado pelo amor e dedicação ao ensino e às pessoas que a senhora demonstra, inspirando todos os alunos.

Aos **Professores do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, que contribuíram de forma tão gentil e única para a minha formação, vocês me inspiram como profissionais e pessoas.

Aos meus amigos da pós-graduação, **Henrique Hadad, João Pedro Limirio, Bruno Coelho, Lais Kawamata, Ana Flávia Piquera, Vinicius Bizelli, Ana Daniela Spinola, Yasmin Bantim, Luara Colombo**, por se mostrarem presentes em todos os momentos. A amizade de cada um de vocês foi muito importante para que esse período se tornasse mais leve e prazeroso. Vocês me ajudaram muito na pós-graduação no crescimento profissional e pessoal, cada um com sua forma de individual de ser. Muito obrigado por me fazer ter a certeza de que Deus tem cuidado de mim também através de vocês.

Ao meu amigo **Henrique Hadad**, falar que você foi importante para a minha pós-graduação é pouco. Hoje o considero meu irmão. Obrigado por me fazer aprender diariamente com você e toda sua dedicação. Obrigado por ter sido o meu parceiro do mestrado em tudo o que fizemos. E muito mais do que isso, obrigado por ter sido o meu amigo todos os dias desde que nos conhecemos. O futuro que te espera é grande, tenho certeza. Que você seja muito feliz em todas as suas escolhas e alcance seus objetivos. Saiba que pode contar comigo sempre.

Aos **Pós-Graduandos de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e**

Implantodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pelo muito bom convívio durante esses anos, por compartilharem conhecimento, companheirismo, e dias que ficarão para sempre em minha memória.

Aos funcionários do departamento de Cirurgia e Clínica Integrada **Marco Ianner, Renato de Oliveira e Paulo Graton**, sempre muito solícitos e grandes companheiros no dia-a-dia. Talvez não saibam a real importância que têm na vida de todos pós-graduandos que passam pelo departamento, não apenas com o seu trabalho, mas com a amizade e carisma que transmitem a todos.

As minhas queridas amigas **Mariana Menezes, Isadora Victorino, Marcela Ito** e amigo **Luis Otávio Maruno**, por confiarem em meu trabalho. Vocês me ajudaram em um momento muito difícil, o apoio de vocês permitiu que eu chegasse até o final do curso. Muito obrigado pela amizade e parceria.

A **todos os professores que passaram pela minha vida**, ajudando a construir a minha história e grande parte de quem sou. Obrigado por acreditarem na educação, por cada palavra compartilhada dentro da sala de aula carregada de sentimentos e experiência, por mudarem a vida de um eterno aprendiz.

Agradecimientos

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” com o atual Coordenador **Prof. Adj. André Luiz Fraga Briso**, por permitir o meu desenvolvimento clínico e científico com a toda sua estrutura.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pela aprovação do Auxílio a Pesquisa Regular em que este projeto está inserido. Processo nº 2018/22108-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Aos **funcionários da Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP** pela disponibilidade, paciência e gentileza em todas as etapas do mestrado. Agradeço o trabalho e convivência com todos.

Aos **funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP** pela prontidão em nos atender.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Laboratório para Estudo de Tecidos Mineralizados da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa da **Profa. Dra. Roberta Okamoto**, por contribuir com este trabalho na análise imunohistoquímica.

Aos **pacientes que já atendi**, pela relação de confiança estabelecida, permitindo que de alguma forma pudesse contribuir para a sua saúde. Ao contrário do que pensam vocês me ajudaram muito mais do que pude ajudá-los. Sou muito grato por confiarem em meu trabalho e fazer de cada caso um novo aprendizado e contribuir para o aprimoramento cirúrgico.

*“Quem é rico em sonhos não envelhece nunca.
Pode até ser que morra de repente. Mas
morrerá em pleno voo...”*

Rubem Alves

Capalbo-Silva, R. Osseointegração de implantes com superfícies modificadas por LASER com e sem recobrimento de hidroxiapatita. Caracterização topográfica, análises biomecânica e histológica [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2020.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o processo de reparo ao redor de implantes com as superfícies usinada (SU), superfície disponível comercialmente modificada por jateamento de óxido de alumínio seguido do condicionamento ácido (SJA), modificada por feixe de LASER (SL) e modificada por feixe de LASER com posterior recobrimento de hidroxiapatita através do método biomimético sem tratamento térmico (SLH). **Material e Métodos:** As superfícies foram analisadas através de microscopia eletrônica de varredura acoplado a espectroscopia por energia dispersiva de raios X (MEV-EDX) previamente a cirurgia. Vinte coelhos receberam randomicamente 40 implantes em suas tíbias direita e esquerda, sendo um implante de cada superfície em cada tíbia. No procedimento cirúrgicos e nos períodos de 2 e 4 semanas foi mensurado o coeficiente de estabilidade do implante através da análise de frequência por ressonância (FR), seguida da remoção por contra-torque dos implantes nos períodos de análise. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste t de Tukey (FR) e Kruskal-Wallis (análise biomecânica). **Resultados:** MEV e EDX mostraram diferenças na topografia das superfícies. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na análise de frequência por ressonância. Foi observada diferença estatisticamente significativa no torque de remoção entre o grupo SL e SLH quando comparados ao grupo SU no período de 2 semanas. Já no período de 4 semanas, foi observada diferença estatística entre as 2 superfícies experimentais SL e SLH quando comparadas as superfícies SU e SJA. Na análise histológica os grupos SL e SLH apresentaram remodelação óssea no período de 2 semanas e osso maduro no período de 4 semanas, diferente de SU e SJA que apresentaram um atraso no reparo perante as superfícies experimentais. **Conclusão:** Os implantes com superfície SL e SLH apresentaram propriedades topográficas, e biomecânicas superiores às das superfícies SU e SJA.

Palavras-chave: Implantes dentários. Osseointegração. Propriedades de superfície.

Capalbo-Silva, R. Osseointegration of LASER modified surface implants with and without hydroxyapatite coating. Topographic characterization, biomechanical and histologic analyses [dissertation]. Aracatuba: São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry; 2020.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate the repair process around implants with the machined surfaces (SU), commercially available surface modified by aluminum oxide blasting followed by acid etching (SJA), modified by LASER beam (SL) and modified by LASER beam with subsequent coating of hydroxyapatite using the biomimetic method without thermal treatment (SLH). **Material and Methods:** The surfaces were analyzed using scanning electron microscopy coupled with dispersive energy X-ray spectroscopy (SEM-EDX) prior to surgery. Twenty rabbits randomly received 40 implants in their right and left tibiae, with one implant on each surface in each tibia. In the surgical procedure and in the periods of 2 and 4 weeks, the implant stability coefficient was measured through the resonance frequency (ISQ), followed by the removal by counter-torque of the implants in the analysis periods. The data obtained were subjected to analysis of variance and Tukey's t test (ISQ) and Kruskal-Wallis (biomechanical analysis). **Results:** SEM and EDX showed differences in surface topography. There was no statistically significant difference between the groups in the resonance frequency. There was a statistically significant difference in the removal torque between the SL and SLH group when compared to the SU group in the period of 2 weeks. In the 4-week period, a statistical difference was observed between the 2 experimental surfaces SL and SLH when comparing the SU and SJA surfaces. In the histological analysis, the SL and SLH groups presented bone remodeling in the period of 2 weeks and mature bone in the period of 4 weeks, unlike SU and SJA which presented a delay in repair before the experimental surfaces. **Conclusion:** Implants with SL and SLH surfaces showed topographic and biomechanical properties superior to those of SU and SJA surfaces.

Keywords: Dental implants. Osseointegration. Surface properties

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Cirurgia experimental. a: Acesso e exposição do leito cirúrgico, b: Osteotomia para criação de espaço de 3mm de diâmetro para instalação de implante, c: instalação de implante na tíbia do animal, d: análise de frequência por ressonância imediatamente a instalação do implante. Pg. 23
- Figura 2: MEV e EDX dos implantes previamente a instalação. a, b: MEV SU (1.000x e 10.000x), c: EDX SU, d, e: MEV SJA (1.000x e 10.000x), f: EDX SJA, , g, h: MEV SL (1.000x e 10.000x), i: EDX SL, , j, k: MEV SLH (1.000x e 10.000x), l: EDX SLH Pg. 28
- Figura 3: Gráfico com valores de análise de frequência por ressonância e desvio padrão nos períodos de 0, 2 e 4 semanas Pg. 29
- Figura 4: Gráfico com valores de análise biomecânica (média do torque de remoção) entre os grupos e desvio padrão nos períodos de 0, 2 e 4 semanas Pg. 30
- Figura 5: HE. Grupo SU. a: análise histológica de 2 semanas b: 25x. cortical óssea superior em fase inicial de remodelação c: 25x osso medular formado entre as espiras com forma triangular mantida d: 40x cortical inferior e: análise histológica de 4 semanas f: 25x cortical superior com atividade de remodelação mais intensa g: 25x osso medular formado entre as espiras com forma triangular mantida h: 40x cortical inferior com tecido neoformado e alta vascularização Pg. 32
- Figura 6: HE. Grupo SJA. a: análise histológica de 2 semanas b: 25x. cortical óssea superior em fase inicial de remodelação c: 25x. osso medular formado entre as espiras com forma triangular parcialmente mantida (seta preta) d: 40x. cortical inferior com áreas de remodelação (setas verdes) e: análise histológica de 4 semanas f: 25x. cortical superior com atividade de remodelação mais intensa e tecido neoformado (setas amarelas) g: 25x. osso medular formado entre as espiras h: 40x. cortical inferior em remodelação Pg. 32
- Figura 7: HE. Grupo SL. a: análise histológica de 2 semanas b: 25x. cortical óssea superior em remodelação intensa (setas verdes) e altamente vascularizada (setas azuis) c: 25x. osso medular formado entre as espiras com destruição parcial (seta preta) d: 40x cortical inferior com tecido imaturo neoformado (seta amarela) e: análise histológica de 4 semanas f: 25x cortical superior com maturação óssea (setas brancas) g: 25x. osso medular com destruição tecidual da região correspondente às câmaras h: 40x cortical inferior em fase de maturação Pg. 33
- Figura 8: HE. Grupo SLH. a: análise histológica de 2 semanas b: 25x. cortical óssea superior em remodelação intensa invadindo espaço medular (setas verdes) c: 25x. osso medular com destruição (seta preta) d: 40x cortical inferior com tecido neoformado (setas amarelas) e: análise histológica de 4 semanas f: 25x cortical superior com atividade celular (setas amarelas) g: 25x. osso medular com destruição tecidual h: 40x cortical em maturação (setas brancas) Pg. 33

SUMÁRIO

1 Introdução	16
2 Materiais e Métodos	20
3 Resultados	28
4 Discussão	35
5 Conclusão	39
Referências	41
Anexos	46

Introdução

1 INTRODUÇÃO¹

Os implantes dentários causaram uma grande revolução na Odontologia em termos de reabilitação, especialmente após o advento da osseointegração, definida como o contato direto entre osso e implante com ausência de tecido conjuntivo fibroso nessa interface, permitindo o suporte de cargas funcionais (Brånemark, Zarb, & Albrektsson, 1985). A distribuição de células, bem como sua adesão na superfície do implante são fundamentais para permitirem a integração com o tecido ósseo (Ponsonnet, Reybier, Jaffrezic, Comte, Lagneau, & Lissac, 2003). Assim, as características da superfície do implante interferem diretamente neste processo, mostrando a grande relevância para a implantodontia as modificações de superfície.

O tratamento de superfície tem como objetivo modificar a topografia e as propriedades físicas, químicas e físico-químicas de um material, mantendo suas características. No caso dos implantes usinados de titânio comercialmente puro (Ti-cp), essas modificações permitem alterações da topografia superficial, aumentando sua área de contato, e energia superficial o que proporciona um aumento de sua capacidade hidrofílica, adesão, proliferação e diferenciação celular (Rosales-Leal et al., 2010). Tais efeitos estimulam a capacidade de resposta osteogênica, conseqüentemente, acelerando o processo de osseointegração (Souza et al., 2013). A implicação clínica para isso é a possibilidade do implante receber cargas funcionais mais precocemente (Novaes, de Souza, de Barros, Pereira, Iezzi, & Piattelli, 2010).

Atualmente, distintos métodos de modificação de superfície vêm sendo estudados no intuito de proporcionar melhores resultados no processo da osseointegração. Os tratamentos para a superfície do implante podem ser através de métodos subtrativos (que removem as partículas do material do implante), aditivos (que adicionam material à superfície do implante) ou mistos (subtração seguido da adição). O condicionamento ácido da superfície do implante é um dos métodos por subtração mais comumente utilizados. Pode ser obtido por meio de banhos em ácido fluorídrico (HF), nítrico (HNO_3), sulfúrico (H_2SO_4) ou pela associação dos mesmos (Dohan Ehrenfest, Coelho, Kang, Sul, & Albrektsson, 2010; Jemat, Ghazali, Razali, & Otsuka, 2015). A concentração das soluções e o tempo de exposição constituem a diferença das superfícies obtidas e o segredo de indústria. Estudos prévios

¹ Normalizado de acordo com o guidelines da revista Clinical Oral Implants Research (Anexo B).

publicados (Cho & Park, 2003; Klokkevold, Nishimura, Adachi, & Caputo, 1997; Novaes, Papalexiou, Grisi, Souza, Taba, & Kajiwara, 2004; Rosales-Leal et al., 2010) mostraram que o tratamento de superfície por meio do condicionamento ácido aumenta a adesão celular e a neoformação óssea, acelerando o processo de osseointegração quando comparado com a superfície usinada. A associação do jateamento com abrasivos seguido do condicionamento ácido é outro método utilizado que permite a alteração superficial, criando rugosidade (Scarano, Piattelli, Quaranta, & Lorusso, 2017), e tem se mostrado eficaz quanto a proliferação de células osteoblásticas na superfície do implante (Teng et al., 2012).

Atualmente outro método por subtração que tem sido citado como um método recente, inovador e promissor é a modificação por feixe de LASER que visa alterar não somente a topografia, mas também as propriedades físico-químicas da superfície do implante. Descoberta inicialmente pela engenharia de materiais (Picraux & Pope, 1984) foi visto pela comunidade científica de forma bastante promissora, por apresentar um maior controle da modificação (Hao & Lawrence, 2007) . O seu mecanismo de ação está baseado na criação de uma população de elétrons estimulados a saírem de seu estado natural para um estado de maior energia, e que ao retornarem ao seu estado natural, emitem fótons com uma energia correspondente à energia de transição de elétron, levando a uma modificação físico-química da superfície (Rosales-Leal et al., 2010). Devido estas características, o tamanho dos poros pode ser realizado de forma homogênea e padronizada. Estudos prévios publicados (Hao & Lawrence, 2007; Queiroz, Souza, Guastaldi, Margonar, Garcia-Júnior, & Hochuli-Vieira, 2012) mostraram que esta superfície apresenta boa molhabilidade, constituindo assim uma superfície muito hidrofílica, permitindo maiores torques de remoção dos implantes (Cho & Park, 2003; Rosales-Leal et al., 2010), formação e maturação de tecido ósseo sobre a superfície mais rápida (Queiroz, Souza, Guastaldi, Margonar, Garcia-Júnior, & Hochuli-Vieira, 2012; Souza et al., 2014), acelerando as fases iniciais do processo de osseointegração (Queiroz et al., 2017; Rosales-Leal et al., 2010).

Nos dias atuais o recobrimento de uma superfície modificada por subtração tem se tornado uma tendência. Alguns biomateriais tem se destacado como tricálcio fosfato (Faeda, Tavares, Sartori, Guastaldi, & Marcantonio, 2009), Silicato de Sódio (Rosales-Leal et al., 2010; Souza et al., 2014), íons de flúor (Hong, Kim, Han, & Yeo, 2014) e hidroxiapatita (Queiroz, Souza, Guastaldi, Margonar, Garcia-Júnior, & Hochuli-Vieira, 2012; Queiroz et al., 2017). A técnica do plasma spray de hidroxiapatita gerou grandes expectativas por se tratar de um material altamente biocompatível (Wang, Liu, Fan, Tan, Zhou, & He, 2017). No entanto, este método apresenta desvantagens como necessidade de altas temperaturas para a realização

do recobrimento, o que acarreta alterações estruturais da hidroxiapatita, como o aumento porosidade do material que leva a uma maior solubilização da mesma. Esta maior solubilização acarreta a uma pobre adesão da hidroxiapatita à superfície do implante, que pode acarretar em trincas e fraturas do recobrimento (Singh, Singh, & Chawla, 2017). Para isso novos métodos de deposição têm sido estudados, e entre eles destaca-se o método biomimético que consiste na imersão do substrato a ser recoberto em uma solução sintética denominada solução de fluido corpóreo (SFC ou SBF- *Simulated Body Fluid*). Esta solução apresenta composição química e pH semelhantes ao plasma sanguíneo e temperatura similar à do corpo humano (Oyane, Onuma, Ito, Kim, Kokubo, & Nakamura, 2003; Pálka, Poštrková, & Koerten, 1998). Este método permite o recobrimento da superfície dos implantes com biomateriais, sem submetê-los a altas temperaturas e consequente alteração estrutural (Almeida Filho, Fraga, Bini, & Guastaldi, 2013; Lin, Yen, 2004).

Estudos prévios publicados (Hao, Lawrence, 2007; Queiroz et al., 2012; Sisti, Piattelli, Guastaldi, Queiroz, & De Rossi, 2013; Souza et al., 2013) confirmaram que a modificação da superfície do implante por ablação com o LASER com ou sem deposição de biomaterial pelo método biomimético acelera o processo de osseointegração. No entanto, estes estudos prévios avaliaram estas superfícies experimentais no processo de osseointegração em implantes instalados em tíbia de coelhos em períodos mínimos de 30 dias. Logo estas superfícies experimentais não foram avaliadas durante o início da formação e maturação óssea. Por se tratar de superfícies que aceleram as fases iniciais do processo de reparo ao redor dos implantes entende-se relevante avaliar o comportamento biológico e mecânico do tecido ósseo ao redor de implantes diante destas superfícies experimentais nos períodos mais precoces da osseointegração.

Diante do exposto, objetivo deste trabalho será avaliar o processo de reparo ao redor de implantes com as superfícies usinada (SU), superfície disponível comercialmente modificada por jateamento seguido do condicionamento ácido (SJA), modificada por feixe de LASER (SL) e modificada por feixe de laser com posterior recobrimento de hidroxiapatita através do método biomimético sem tratamento térmico (SLH), instalados em tíbia de coelhos nos períodos de 2 e 4 semanas.

Materiais e Métodos

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Preparação das superfícies experimentais

A preparação das superfícies experimentais foi realizada no Laboratório do Departamento de Físico Química do Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

Superfície modificada por feixe de LASER (SL)

Os implantes de *Ti-cp* com superfície usinada foram fixados em um torno rotativo, sob o equipamento de LASER Yb: 20W pulsado (Pulsed itérbio Fiber LASER, Sistema OmniMark 20F, Ominitek Tecnologia Ltda, São Paulo, Brasil), com os parâmetros de 140mJ nominal de alimentação e frequência de pulso de 20 KHz. O feixe de LASER foi projetado sobre toda a superfície dos implantes espirais em temperatura ambiente, objetivando a modificação superficial de forma homogênea e por toda a superfície, segundo metodologia descrita por Braga, Marques, Almeida-Filho, & Guastaldi (2007).

Superfície modificada por feixe de LASER seguido da deposição de hidroxiapatita pelo método biomimético sem tratamento térmico (SLH)

Após irradiação da superfície por feixe de LASER, o recobrimento das superfícies foi realizado como descrito por Aparecida, Fook, & Guastaldi (2009). As amostras foram imersas em 50 mL de solução de NaOH ($5,0 \text{ Mol.L}^{-1}$) na estufa por um período de 24 horas a 60 °C, para a ativação da superfície, formando uma camada de titanato de sódio. Após a imersão em solução alcalina, as amostras foram mantidas na estufa por 3 horas, para secagem da superfície. Posteriormente, os implantes foram imersos em solução de fluido corpóreo (SFC) modificada, que simula os fluidos corpóreos por apresentar composição iônica e pH semelhantes aos do plasma sanguíneo. Os implantes permaneceram imersos nesta solução por um período de 4 dias, em estufa a 37°C e pH 7.25, para se obter um recobrimento composto por HA. A SFC foi trocada a cada 24 horas para que fosse mantida a quantidade de íons em solução.

Animais e Grupos Experimentais

Para determinação do poder da amostra foi considerado um nível de significância de 5% (com desvio padrão de 2%), e com um poder de teste de 80%, sendo definindo alpha

como 0,05 e cinco coelhos por grupo serão necessários para a finalidade de comparar os diferentes grupos. Para a realização deste trabalho foram utilizados 20 (Vinte) coelhos machos, adultos, variação *albinus*, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, com aproximadamente 5 (cinco) meses de idade, peso em torno de 3.1 a 4.3 Kg, mantidos em gaiolas unitárias, ambiente climatizado, alimentados com ração sólida (Ração Procoelho, Primor) e água *ad libitum*, durante todo o experimento.

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP recebendo o número de processo 00554-2018. O projeto foi delineado de acordo com as diretrizes da ARRIVE guidelines (NC3Rs Reporting Guidelines Working Group, 2010).

Os animais receberam randomicamente implantes de 3,75mm de diâmetro e 10mm de comprimento em suas tibiais direita e esquerda após osteotomia para implantodontia padronizada realizada na região medial da face lateral da tibia com 3,0 mm de diâmetro e 10 de profundidade, sendo enquadrados em quatro grupos experimentais de acordo com cada superfície:

- 1- Grupo Usinado (SU) - Implantes de superfície usinada (AS Technology, TitaniumFix, São Paulo, Brasil).
- 2- Grupo Jateamento e Condicionamento Ácido (SJA) - Implantes de superfície modificada por jateamento de óxido de alumínio seguido do condicionamento ácido, superfície disponível comercialmente (AS Technology, TitaniumFix, São Paulo, Brasil).
- 3- Grupo LASER (SL) - Implantes de superfície modificada por LASER
- 4- Grupo LASER recoberto por hidroxiapatita (SLH) - Implantes de superfície modificada por LASER seguida do recobrimento com hidroxiapatita através do método biomimético sem tratamento térmico.

Os animais foram enquadrados em 2 (dois) períodos de avaliação: 2 e 4 semanas, compondo 5 (cinco) animais por período, e 5 implantes de cada superfície em cada período que usados nas análises de frequência por ressonância e remoção por contra torque (biomecânica) e histológica.

Procedimento Cirúrgico

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Núcleo de

Experimentação em Coelhos (NECO) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados conforme descrito em trabalhos prévios publicados (Queiroz et al., 2017; Souza et al., 2014).

Os animais foram mantidos em jejum oito horas antes do procedimento cirúrgico. Para todos os procedimentos cirúrgicos realizou-se anestesia geral por infiltração intramuscular de 50mg/kg de cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5 mg/kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil LTDA – Osasco, São Paulo, Brasil), além da complementação anestésica na região a ser operada com a infiltração de 0.3 ml/Kg Cloridrato de mepivacaína (Scandicaine 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França). A região anterior das tíbias direita e esquerda foram tricotomizadas e posteriormente realizada a antissepsia pré-operatória com Polivinil Pirrolidona Iodo degermante (PVP-I 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto), associado ao PVPI tópico. O acesso cirúrgico foi realizado por meio de uma incisão dermo-periosteal empregando-se uma lâmina de bisturi n. 15 (Feather, Feather Safety, Japan) montada em cabo de bisturi n. 3 (Hu-Friedy, German) na margem anterior da tíbia, iniciada a um centímetro abaixo da articulação tíbio-femural, com aproximadamente 6 (seis) centímetros de comprimento. Após incisão o retalho foi deslocado com descolador de Molt 9, com consequente exposição proximal da face medial da tíbia, local de eleição para a osteotomia (Figura 1a). Após a exposição proximal da face medial da tíbia foi realizada osteotomia de 3,0mm de diâmetro e 10mm de comprimento. O preparo do leito receptor do implante iniciou-se com a broca em forma de lança, para romper a cortical óssea. Em seguida foram utilizadas as fresas de 2.0mm, piloto de 2,0/3,0mm e fresa de 3.0mm (AS Techonology, Titaniumfix, São Paulo, Brasil), montadas em contra ângulo redutor 20:1 (Kavo do Brasil, Joinvile, Brasil), acoplado em motor elétrico (Kavo do Brasil, Joinvile, Brasil), a uma velocidade de 1200 rpm, sob irrigação constante de solução fisiológica a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) (Figura 1b). Os implantes foram instalados por meio de chave motor de torque interno para conexão de hexágono externo (AS Techonology, Titaniumfix, São Paulo, Brasil) que encaixado na plataforma do implante, montada em contra ângulo redutor 20:1 acoplado ao motor elétrico numa velocidade de 20 rpm (Figura 1c). O implante foi inserido até que a sua plataforma assentasse na cortical externa da região proximal da face lateral da tíbia. Após instalação do implante foi colocado o parafuso de cobertura para proteção da plataforma. No ato cirúrgico foi mesurado o torque de instalação do implante em N/cm por meio de torquímetro digital (Data Tork CEM 3, Tohnichi Mfg.Co.,Ltd, Tokyo, Japan), e o coeficiente de estabilidade do implante por meio de medidas de frequência por ressonância

(Ostell® Instrument, Integration Diagnostics AB, Gotemburgo, Suécia) (Figura 1d). O tecido mole foi reposicionado e suturado por planos. A sutura muscular foi realizada com fio absorvível de Poligalactina 910 (Vicryl 5.0, Ethicon, Jhonson, São José dos Campos, Brasil). No plano cutâneo a sutura foi realizada com fio de nylon 5.0 (Ethicon, Jhonson, São José dos Campos, Brasil). Após a sutura realizou-se novamente a antisepsia da área com Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico (PVP-I 10%, Riodeine Degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto).

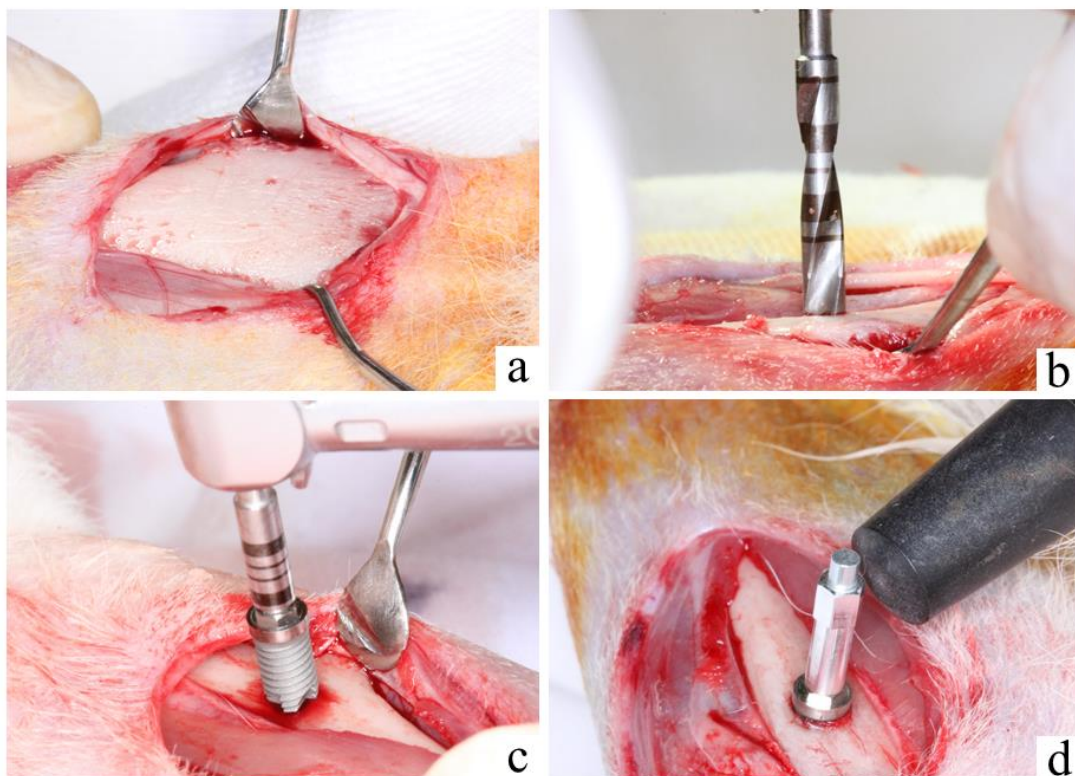


Figura 1: Cirurgia experimental. **a:** Acesso e exposição do leito cirúrgico, **b:** Osteotomia para criação de espaço de 3mm de diâmetro para instalação de implante, **c:** Instalação de implante na tíbia do animal, **d:** Análise de frequência por ressonância imediatamente a instalação do implante.

Prescrição Pós-Operatória

No pós-cirúrgico foi administrado via oral diluído em água 3mg/kg/ de Cetoprofeno (Cetoprofeno, Sanofi, São Paulo, Brasil) associado a 5mg/kg de Cloridrato de Tramadol (Cronidor, Agener União Química, São Paulo, Brasil) durante 3 (três) dias. Foi administrado também por via intramuscular 10 mg/kg de Enrofloxacina (Enrofloxacino, Venco, Londrina,

Brasil) e 5 mg/kg de cloridrato de Doxiciclina (Doxiciclina, Venco - Londrina, Brasil) durante 7 (sete) dias.

Análises Biomecânicas e Eutanásia

Nos períodos de 2 e 4 semanas os animais agrupados em número de 10 por período, 5 por grupo experimental foram mantidos em jejum por oito horas antes do procedimento de eutanásia. Para tal, realizou-se sedação por infiltração intramuscular de 50mg/kg de cloridrato de ketamina (Vetaset – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil) e 5 mg/kg de cloridrato de xilazina (Dopaser – Laboratório Calier do Brasil LTDA – Osasco, São Paulo, Brasil), além da complementação por anestesia local nas tíbias, com a infiltração de 0.3 ml/Kg de Cloridrato de Mepivacaína (Scandicaine 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França). Após o ato anestésico, realizou-se no implante a análise de frequência por ressonância seguida da análise biomecânica por meio de medidas de torque de remoção, ambas as análises *in vivo*. Após análises os animais foram submetidos à eutanásia por meio de perfusão no ventrículo esquerdo de solução salina fisiológica a 0.9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil) por 10 (dez) minutos, seguido da perfusão de paraformaldeído 4% por 40 (quarenta) minutos por meio de bomba perfusora peristáltica (Masterflex® Ls, Cole – Parmer Instrument Company). Após eutanásia, as tíbias direita e esquerda foram dissecadas e removidas, o tecido mole excedente eliminado, e após fixação foi realizada em solução de formol 10% tamponado, durante um período de 24 horas. As tíbias direita e esquerda de cada animal que continham os implantes foram descalcificadas previamente em EDTA (ácido etileno-diamino-tetracético, Merck) a 5% dissolvido em água deionizada por um período de 90 dias em temperatura ambiente. Após o término da etapa de descalcificação, o tecido ósseo ao redor do leito receptor do implante removido pela análise biomecânica (torque de remoção) foi reduzido com margens de 10mm ao redor de todo o tecido ósseo correspondente ao negativo do implante. Após a descalcificação adequada as peças passaram por desidratação através de uma sequência de álcoois (70, 80, 90 100), sendo finalizada com o processo de diafanização com xilol. Na sequência as peças foram submetidas ao processo de embebição em parafina 1, 2, 3 e por fim imersas em parafina para inclusão. Em seguida, a parafina em excesso foi removida e as peças foram instaladas no sentido cervical (póstero-anterior) nos tacos para realização de cortes sagitais de 5 µm de espessura por meio de micrótomo. O tecido ósseo ao redor dos implantes removidos por contra-torque foi descalcificado seguido do processamento laboratorial para obtenção de cortes em parafina para realização de

posterior análise qualitativa histológica.

FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Caracterização Topográfica da Superfície dos Implantes Antes da Instalação

Antes da instalação dos implantes nas tíbias dos coelhos, a topografia superficial dos implantes foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV modelo XL 30 TMP, FEG, Philips XL Series, com detector Oxford incaX-sight, Holanda, 97), acoplado ao sistema de espectrometria de energia dispersiva de raios X (EDX) para análise semi-quantitativa da composição química da superfície. Nesse sentido, cinco implantes de cada grupo foram utilizados. Os implantes foram posicionados dentro do MEV, e cinco áreas de cada amostra foram arbitrariamente escolhidas por um examinador cego.

Análise de Frequências por Ressonância

Após anestesia geral, acesso cirúrgico e exposição dos implantes removeu-se o parafuso de cobertura do implante, e foi instalado o smartpeg do aparelho de frequência por ressonância (Ostell® Instrument, Integration Diagnostics AB, Gotemburgo, Suécia), com torque de aproximadamente 4 a 6 N.cm diretamente na plataforma do implante. O coeficiente de estabilidade do implante por meio da análise de frequência de ressonância (RFA) foi medido em quatro direções (proximal, distal e laterais direita e esquerda) de cada implante no ato da instalação e nos períodos de eutanásia, 2 e 4 semanas como metodologia de estudo prévio (Souza et al., 2019). Os valores obtidos das quatro direções foram somados e feita a média aritmética gerando o valor médio de cada implante sendo enquadrado em um dos 4 grupos de acordo com o tratamento realizado, compondo cinco valores por cada superfície em cada período. Os dados foram tabulados para posterior análise estatística.

Análise Biomecânica (Remoção por Contra-torque)

Após análise de frequência de ressonância foi instalado o montador de implante acoplado à chave extensora de catraca (AS Technology, TitaniumFix, São Paulo, Brasil). Os implantes foram removidos por meio de um torquímetro digital (Data Tork CEM 3, Tohnichi Mfg.Co.Ltd, Tokyo, Japan), e mensurado em N cm o valor necessário para a remoção do implante. Os valores dos 4 grupos compondo cinco valores por cada superfície em cada período de eutanásia foram anotados e tabulados para posterior análise estatística. A

caracterização topográfica dos implantes removidos pelo torque reverso por meio do sistema MEV-EDX e posterior análise qualitativa e quantitativa pela mensuração dos elementos Ca, P e O (Souza et al., 2019).

Análise Histológica Qualitativa

Quatro lâminas de cada amostra foram separadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE). As imagens de lâminas coradas com HE foram obtidas através do microscópio óptico (Leica DM4000 B LED, Heerbruggm Switzerland) com o auxílio de lentes objetivas Carls Zeiss (2.5X0.07, 5X0.12, 10X e 40X0.65) acoplados a uma câmera de captação de imagem e conectado ao computador (Configuração: Intel Core i5[®] com sistema operacional Windows 10[®] e Software para processamento e análise de imagens (AxioVision 4.9.1[®]0, Carl Zeiss by Imaging Associates Ltd, Jena, Deutschland). A análise qualitativa da região periimplantar foi realizada avaliando tecido ósseo neoformado, região cortical e medular.

Resultados

3 RESULTADOS

Caracterização Topográfica da Superfície dos Implantes Antes da Instalação

Previamente a cirurgia para a instalação as superfícies dos implantes foram avaliadas. A microscopia eletrônica de varredura das quatro superfícies analisadas demonstrou diferenças topográficas entre elas. A superfície do grupo SU apresentou topografia de superfície lisa, com discretas ranhuras podendo ser observado restos do processo de usinagem sobre ela (Figura 2a,b). A superfície do SJA exibiu topografia com padrão morfológico de crateras circundadas por picos e vales de diferentes profundidades e tamanho (Figura 2d,e). A superfície SL apresentou rugosidade de superfícies homogêneas (Figura 2g,h) Na superfície SLH foi possível observar a formação de cristais de hidroxiapatita sobre a rugosidade homogênea promovida pela modificação pelo LASER (Figura 2j,k). A análise por EDX mostrou picos de Ti (100) para o grupo SU. No grupo SL os íons predominantes foram O (55.79), Ti (36.93) e C (6.89) (Figura 2f). Já no no grupo SLH o valores atômicos predominantes foram de O (59.47), Ti (16.89), C (11.21), e P (Figura 2i).

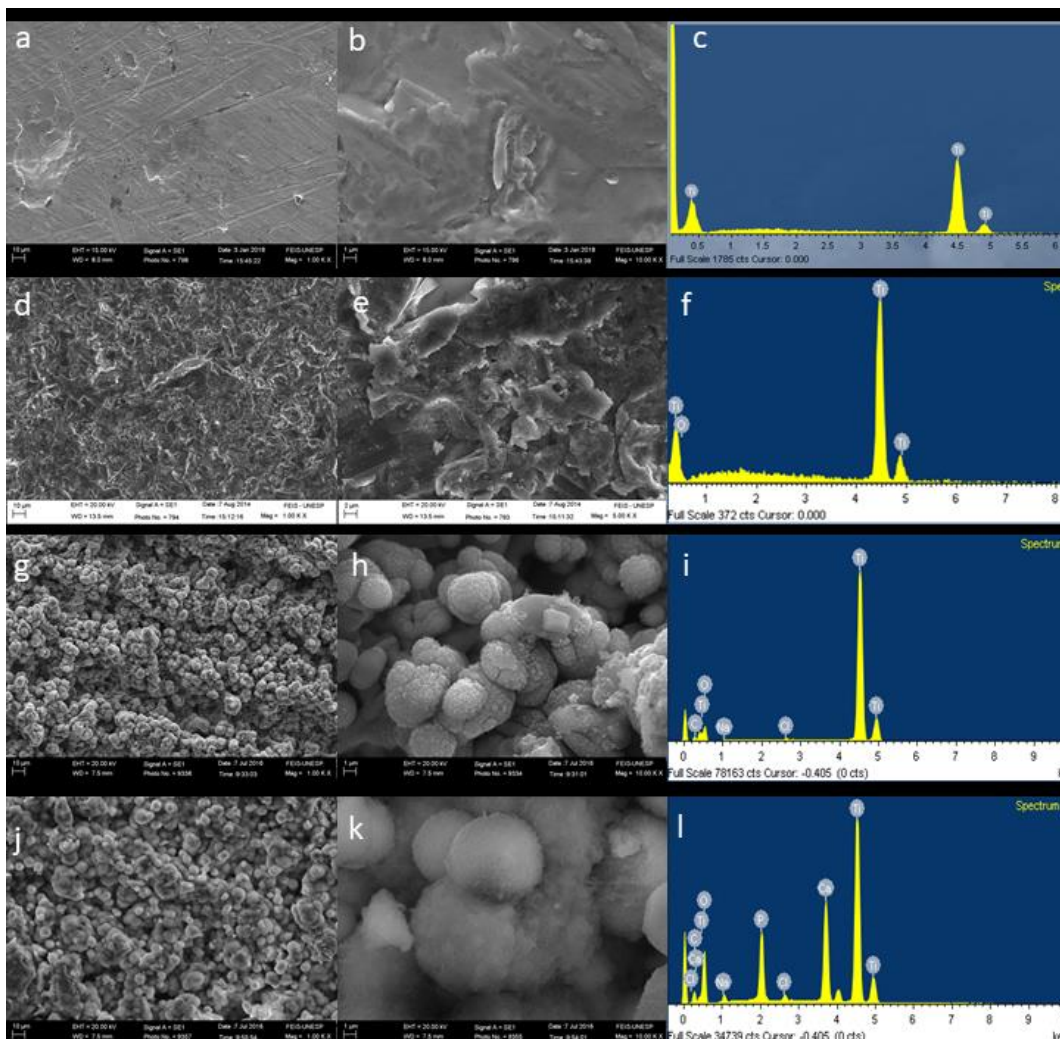


Figura 2: MEV e EDX dos implantes previamente a instalação. a, b: MEV SU (1.000x e 10.000x), c: EDX SU, d, e: MEV SJA (1.000x e 10.000x), f: EDX SJA, g, h: MEV SL (1.000x e 10.000x), i: EDX SL, j, k: MEV SLH (1.000x e 10.000x), l: EDX SLH.

Análise de Frequências por Ressonância

Os valores médios de FR foram obtidos através da média aritmética das mensurações das regiões laterais, proximal e distal de cada implante. Os valores médios e desvio padrão no grupo SU foram $31,0 \pm 4,7$, $62,0 \pm 0$, $75,0 \pm 0$ no dia da instalação e nos intervalos de tempo de 2 e 4 semanas respectivamente, enquanto que para o grupo SJA as medidas de frequência de ressonância média foi de $39,2 \pm 3,9$, $74,0 \pm 0$ e $76,8 \pm 1,1$ nos mesmos períodos, respectivamente. No grupo SL os valores médios e desvio padrão foram $37,6 \pm 3,1$, $72,5 \pm 2,5$, $75,0 \pm 0$ nos três períodos de análise. Já o grupo SLH apresentou medidas de frequência por ressonância e desvio padrão de $34,4 \pm 2,9$, $70,3 \pm 1,9$, $74,0 \pm 4,0$. No geral, valores em ISQ das quatro superfícies estiveram muito próximos dentro dos mesmos períodos, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Pode-se observar um aumento nos valores em FR ao longo dos períodos de análise. (Figura3).

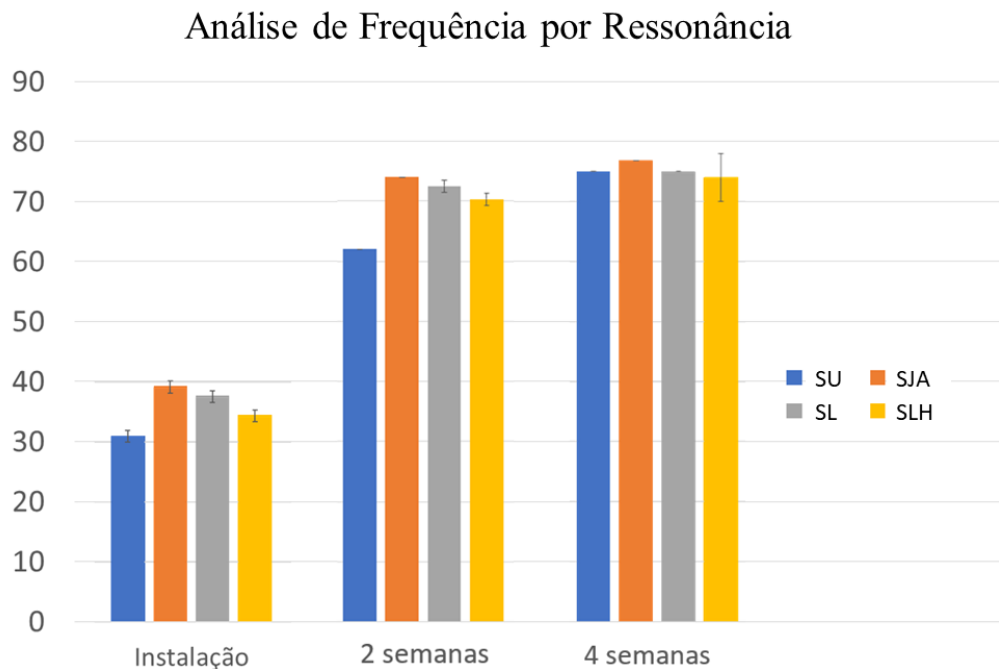


Figura 3: Gráfico com valores de análise de frequência por ressonância e desvio padrão nos períodos de 0, 2 e 4 semanas.

Análise Biomecânica (Remoção por Contra-torque)

A avaliação clínica mostrou ausência de sinais de infecção e não foi observada fratura óssea completa ou parcial da tíbia em nenhum dos animais. Nenhum implante foi perdido e todos se encontravam estáveis e sem perda óssea marginal. No grupo SU as médias dos valores de torque para remoção dos implantes foram de 15 e 19,4 N cm nos períodos de 2 e 4 semanas, respectivamente. No grupo SJA os valores foram 19,8 e 21,6 N cm respectivamente. No grupo SL as médias encontradas foram de 26,6 e 34,8 N cm nos dois períodos de análise. Na superfície SLH os valores médios de torque para a remoção foi de 30,2 e 35 N cm. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo SL e SLH quando comparados ao grupo SU no período de 2 semanas. Já no período de 4 semanas, foi observada diferença estatística entre as 2 superfícies experimentais SL e SLH quando comparadas as superfícies SU e SJA, como ilustrado na Figura 4.

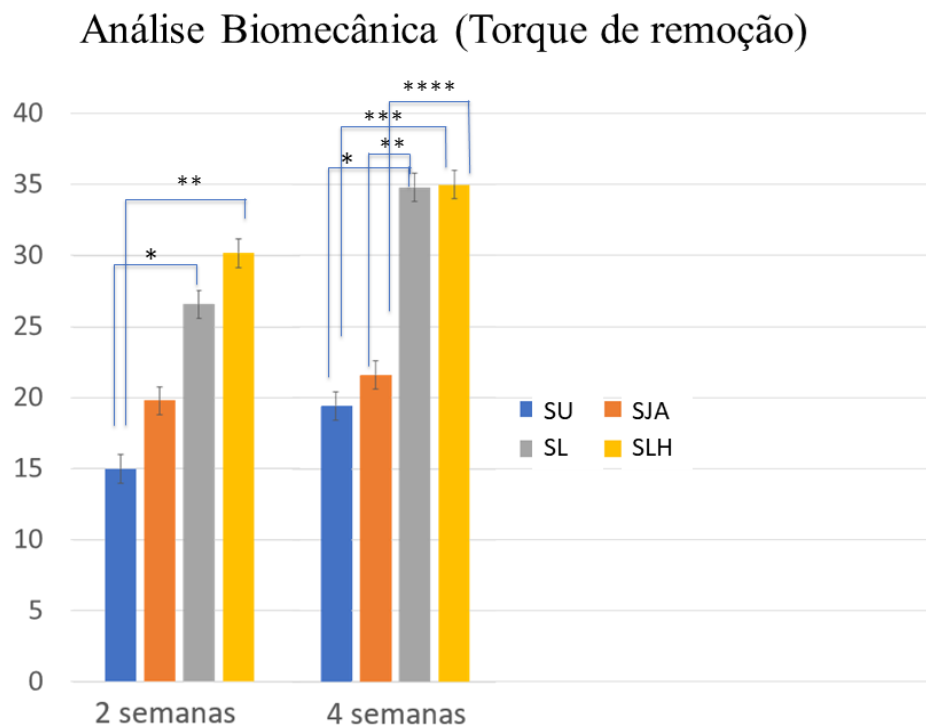


Figura 4: Gráfico com valores de análise biomecânica (média do torque de remoção) entre os grupos e desvio padrão nos períodos de 2 e 4 semanas

*, **, ***, **** indica diferença estatisticamente significativa entre os grupos

Análise histológica qualitativa

No período de 2 semanas as superfícies experimentais SL e SLH (Figuras 7 e 8) apresentaram alta atividade celular e remodelação óssea nas corticais superior e inferior da região periimplantar sendo possível observar áreas de reabsorção e neoformação óssea invadindo o espaço medular (Figuras 7b, 8b). Nessas regiões foi possível observar presença de grande vascularização e tecido neoformado em fase de diferenciação celular formando ilhas de tecido ósseo. No espaço medular a destruição tecidual na região correspondente às câmaras entre as espiras foi evidenciada com resquícios de tecido ósseo (Figuras 7c, 8c). Já nas superfícies SU e SJA pode-se observar menor atividade nas corticais ósseas com menor neoformação óssea e menor vascularização (Figuras 5b, 6b), sugerindo um atraso no processo de reparo quando comparado as superfícies experimentais. No espaço medular a presença de tecido ósseo com forma triangular que preenchia as câmaras entre as espiras fica mais evidente, sugerindo menor destruição óssea na remoção do implante através do torque reverso (Figuras 5c, 6c).

No período de 4 semanas a maturação do tecido ósseo na porção cortical é observada no grupo SL (Figura 7e) com lacunas preenchidas por osteócitos, redução da vascularização e de tecido indiferenciado (Figura 7f) e remodelação ainda presente no grupo SLH (Figura 8f). A destruição do tecido periimplantar é evidente com o desaparecimento do tecido ósseo que preenchia as câmaras entre as espiras nas duas superfícies (Figuras 7g, 8g). No mesmo período para grupo SU, uma atividade de remodelação óssea foi observada na cortical sugerindo um atraso quando comparado aos grupos experimentais (Figura 5f). A manutenção da arquitetura óssea entre as espiras foi evidente (Figura 5g), sugerindo menor contato e união entre osso e superfície. Já no grupo SJA também foi observada remodelação óssea na região cortical (Figura 6f), com maior neoformação óssea (setas amarelas) e com maior destruição do tecido pela remoção por contra-torque (Figura 6g) comparado ao grupo SU sugerindo um processo de reparo mais acelerado que a superfície usinada, entretanto mais retardado em comparação aos grupos SL e SLH.

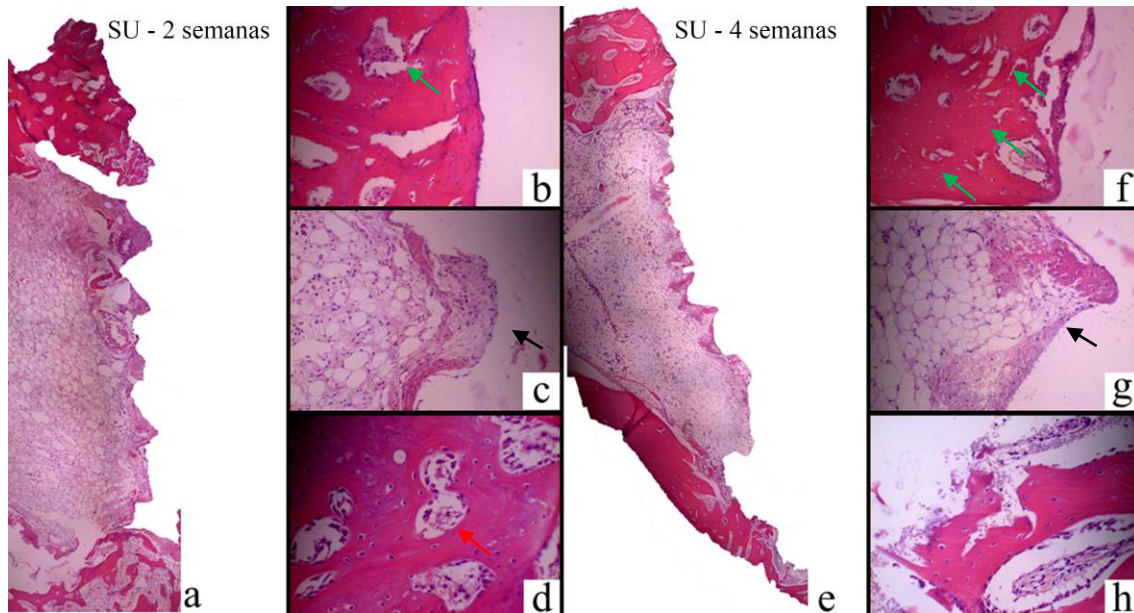


Figura 5: HE. Grupo SU. a: análise histológica de 2 semanas b: 25x. cortical óssea superior em fase inicial de remodelação c: 25x osso medular formado entre as espiras com forma triangular mantida d: 40x cortical inferior e: análise histológica de 4 semanas f: 25x cortical superior com atividade de remodelação mais intensa g: 25x osso medular formado entre as espiras com forma triangular mantida h: 40x cortical inferior com tecido neoformado e alta vascularização

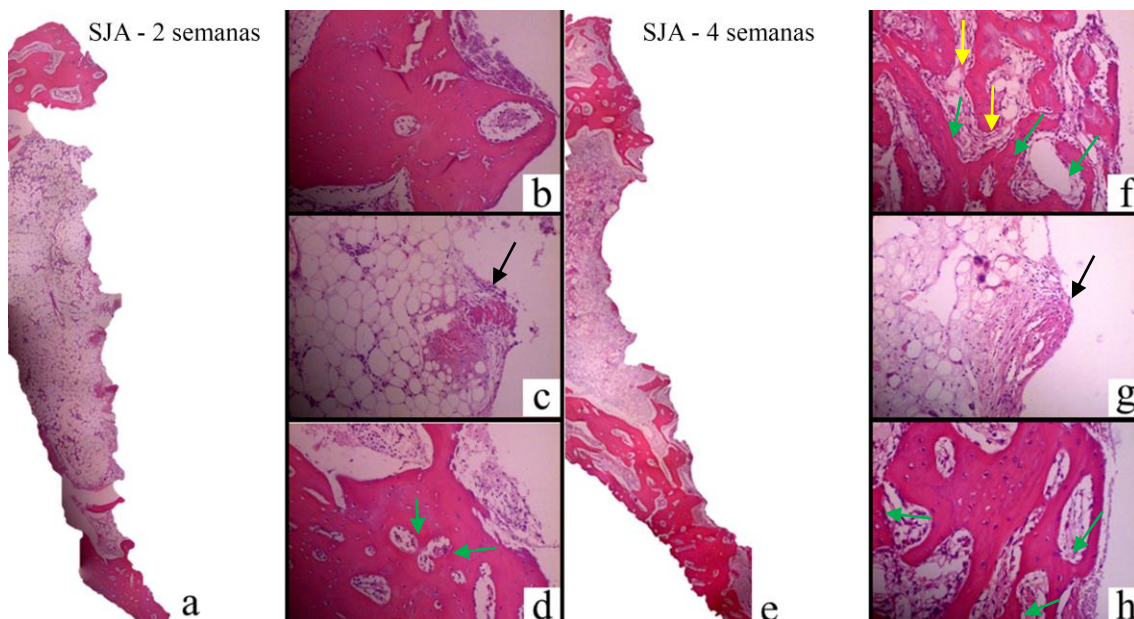


Figura 6: HE. Grupo SJA. a: análise histológica de 2 semanas b: 25x. cortical óssea superior em fase inicial de remodelação c: 25x. osso medular formado entre as espiras com forma triangular parcialmente mantida (seta preta) d: 40x. cortical inferior com áreas de remodelação (setas verdes) e: análise histológica de 4 semanas f: 25x. cortical superior com atividade de remodelação mais intensa e tecido neoformado (setas amarelas) g: 25x. osso medular formado entre as espiras h: 40x. cortical inferior em remodelação

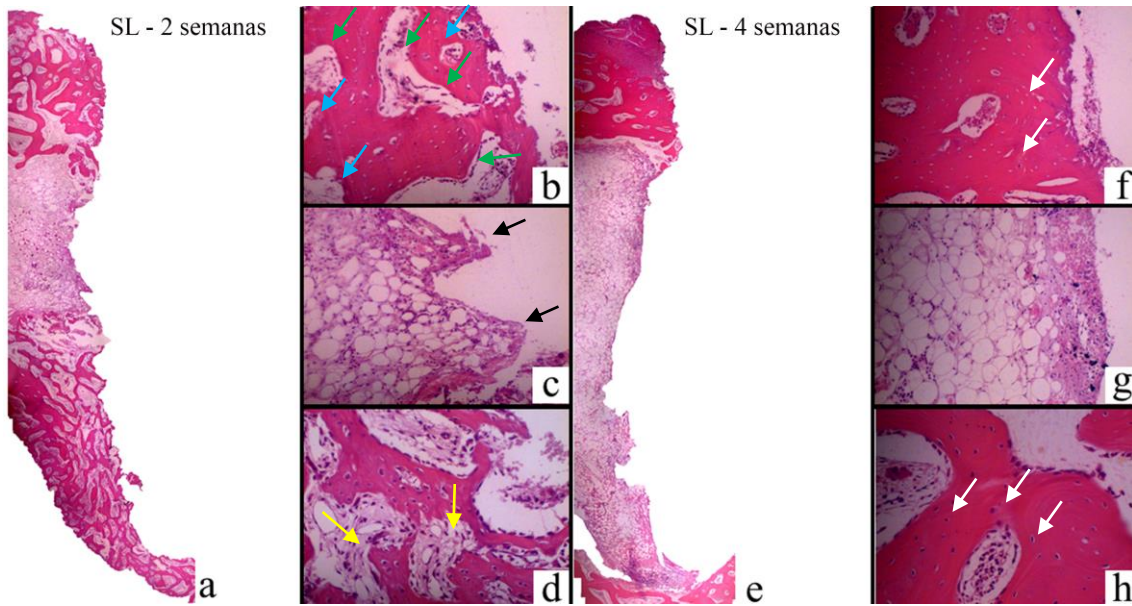


Figura 7: HE. Grupo SL. a: análise histológica de 2 semanas b: 25x. cortical óssea superior em remodelação intensa (setas verdes) e altamente vascularizada (setas azuis) c: 25x. osso medular formado entre as espiras com destruição parcial (seta preta) d: 40x cortical inferior com tecido imaturo neoformado (seta amarela) e: análise histológica de 4 semanas f: 25x cortical superior com maturação óssea (setas brancas) g: 25x. osso medular com destruição tecidual da região correspondente às câmaras h: 40x cortical inferior em fase de maturação

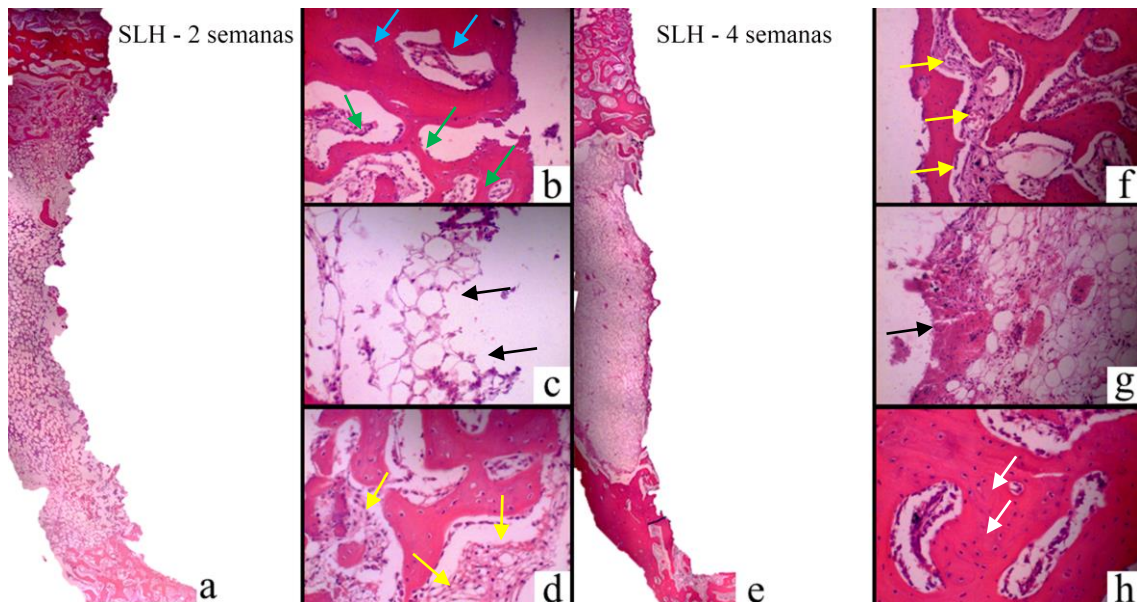


Figura 8: HE. Grupo SLH. a: análise histológica de 2 semanas b: 25x. cortical óssea superior em remodelação intensa invadindo espaço medular (setas verdes) c: 25x. osso medular com destruição (seta preta) d: 40x cortical inferior com tecido neoformado (setas amarelas) e: análise histológica de 4 semanas f: 25x cortical superior com atividade celular (setas amarelas) g: 25x. osso medular com destruição tecidual h: 40x cortical em maturação (setas brancas)

Discussão

4 DISCUSSÃO

As características estruturais e físico-químicas das superfícies dos implantes dentários influenciam diretamente na capacidade deste material acelerar ou retardar o processo de osseointegração. Isso porque a topografia superficial pode permitir uma maior interação do material com proteínas, moléculas e células que estimulam a neoformação óssea (Novaes, de Souza, de Barros, Pereira, Iezzi, & Piattelli, 2010). Por esse motivo as pesquisas na busca de tratamentos superficiais que auxiliam o processo de neoformação óssea ao redor dos implantes dentários são desenvolvidas, no intuito de fazer com que os implantes possam receber cargas mais precocemente.

Muitas estratégias para modificação da superfície de implantes são encontradas. Elas baseiam-se em técnicas subtrativas, aditivas e mistas a uma superfície, alterando sua rugosidade. A rugosidade de uma superfície pode auxiliar na retenção mecânica de moléculas e células proliferação e diferenciação celular, aumentando o contato entre osso e implante (Rosales-Leal et al., 2010). Trabalhos prévios publicados mostraram que a modificação que permite maior modulação rugosidade superficial permite maior contato entre osso e implante (Novaes, Papalexiou, Grisi, Souza, Taba, & Kajiwara, 2004; Scarano, Piattelli, Quaranta, & Lorusso, 2017). Neste presente estudo essa afirmação pode ser correlacionada com as superfícies avaliadas e os resultados da análise biomecânica, onde as superfícies que passaram por algum método de tratamento tiveram torque de remoção estatisticamente superior a superfície usinada.

Com relação ao padrão da rugosidade, atualmente busca-se um padrão mais homogêneo e em menores escalas nas alterações estruturais. A macrorugosidade está relacionada com a ancoragem mecânica e estabilidade primária dos implantes. Já a nanorugosidade tem sido utilizada para ligações bioquímicas, influenciando na adsorção de proteínas e aumentando a adesão celular em toda a extensão da superfície (Le Guéhenec, Soueidan, Layrolle, & Amouriq, 2007). Estudos indicaram que o ataque ácido tem sido empregado como técnica complementar ao jateamento, por remover partículas residuais e criar microporos na superfície dos implantes, permitindo uma maior homogeneidade dessa superfície (Rosales-Leal et al., 2010; Klokkevold, Nishimura, Adachi, & Caputo, 1997). Entretanto na análise de microscopia eletrônica por varredura deste estudo pode-se observar que a superfície tratada por jateamento seguida de ataque ácido não possui grau de homogeneidade em sua rugosidade, apresentando diferentes alturas e picos formados, diferentemente da superfície tratada com ablação a LASER que apresentou alterações mais homogêneas e em menores

escalas em toda sua extensão.

O recobrimento da superfície dos implantes desperta grande atenção das pesquisas na atualidade. Isso porque o intuito dessas técnicas é promover não apenas a ligação mecânica que a rugosidade promove, bem como uma interação entre o material de cobertura e organismo estabelecendo eventos bioquímicos que melhorem a característica da interface neoformada (Le Guéhennec, Soueidan, Layrolle, & Amouriq, 2007). Entretanto os métodos disponíveis ainda geram incertezas, como no caso da incorporação através de tratamentos térmicos que geram microfraturas no material prejudicando sua ligação na interface formada com a superfície do titânio (Singh et al. 2017). O método biomimético é baseado na precipitação do material na superfície do titânio por imersão em SBF em condições fisiológicas de pH e temperatura, atuando na formação de cristais sobre a superfície do implante (Sisti, Piattelli, Guastaldi, Queiroz, & de Rossi, 2013), o que pôde ser evidenciado no MEV deste estudo. Para isso é necessária uma superfície altamente rugosa para a estabilização desses cristais, promovida pela ablação a LASER neste estudo.

Estudo prévio (Queiroz et al., 2017) avaliou o tratamento térmico após a cobertura da superfície de implantes após o método biomimético com SFC. Foi observado que a superfície com tratamento térmico apresentou maior cristalinidade e e HÁ mais bem definidas. Entretanto o grupo não tratado termicamente apresentou melhores atividades biológicas devido a manutenção das suas propriedades primitivas precursoras da formação de HA, mantidas devido à ausência do tratamento térmico, influenciando diretamente na escolha da superfície deste estudo.

O objetivo de formar uma ligação bioquímica associada a retenção mecânica promovida pela rugosidade superficial pode ser considerado promissor, gerando grandes expectativas no processo de osseointegração. Estudos prévios em cortes calcificados mostram que o contato osso-implante em superfícies tratadas pelo método biomimético são superiores quando comparados a implantes de titânio não revestidos (Barrère, van der Valk, Meijer, Dalmeijer, de Groot, & Layrolle, 2003; Queiroz et al., 2017). No presente estudo na análise qualitativa de cortes descalcificados do tecido ósseo correspondente a região onde os implantes foram removidos por contra-torque, pode-se observar maior destruição do tecido periimplantar nas superfícies com recobrimento, reforçando a teoria de que um maior contato entre osso implante gera medidas de remoção por contra-torque, onde no grupo SLH foi observada diferença estatisticamente significativa quando comparada a SU e SJA no período de 4 semanas.

Os resultados de EDX evidenciam os picos de titânio e oxigênio para todas as

superfícies, contudo os picos são mais elevados para as superfícies experimentais SL e SLH (Figura 2). A alta afinidade entre óxido de titânio e HA é potencializada nas superfícies modificadas por LASER devido a espessura de óxidos formada, fortalecendo sua união (Kim, Koh, Li, Lee, Kim, & Kim, 2004). A troca iônica entre óxidos e titânio atraem os íons de Ca presentes na solução de SBF, o que gera uma atração pelos íons de P, tendo uma incorporação na superfície de HA formando uma camada parecida com o osso. Este processo pode ser evidenciado na Figura 21, onde observa-se a presença dos íons de Ti, Ca e P.

Sabendo que a osseointegração é tempo dependente, e que os métodos presentes no mercado atual se mostram favoráveis para este processo, pesquisas atuais com diferentes métodos devem ser encorajadas a fim de vencer obstáculos do dia-a-dia clínico, como reabilitações em osso de baixa qualidade ou pacientes que apresentam comorbidades que promovem um atraso no reparo tecidual ou apresentar osso de baixa qualidade. Além disso, a ideia do recebimento de carga mais precocemente devido a aceleração do processo de osseointegração é algo que estimula tanto os profissionais quanto os pacientes.

Conclusão

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos conclui-se que a modificação da superfície de implantes por LASER com ou sem recobrimento de HA pelo método biomimético proporcionou importantes alterações nas propriedades topográficas e físico-químicas, exibindo características biomecânicas superiores e processo de reparo mais acelerado quando comparadas às superfícies usinada ou tratada com jateamento de oxido de alumínio seguido do condicionamento ácido.

Referências

REFERÊNCIAS

- Almeida Filho, E., Fraga, A. F., Bini, R. A., & Guastaldi, A. C. (2013). Obtenção de fosfatos de cálcio pelo método biomimético sobre a superfície da liga Ti-6Al-4V modificada pelo laser Nd:YAG. *Materia*, 18(2), 1306–1312. <https://doi.org/10.1590/S1517-70762013000200006>
- Aparecida, A. H., Fook, M. V., & Guastaldi, A. C. (2009). Biomimetic apatite formation on ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) using modified biomimetic solution. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20(6), 1215–1222.
- Barrère, F., van der Valk, C. M., Meijer, G., Dalmeijer, R. A., de Groot, K., & Layrolle, P. (2003). Osteointegration of biomimetic apatite coating applied onto dense and porous metal implants in femurs of goats. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 67(1):655-665.
- Braga, F. J. C., Marques, R. F. C., Almeida-Filho, E., & Guastaldi, A. C. (2007). Surface modification of Ti dental implants by Nd:YVO4 laser irradiation. *Applied Surface Science*, 253(23), 9203–9208. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2007.05.048>
- Brånemark, P. I., Zarb, G. A., & Albrektsson T. (1985). Tissue-integrated protheses: osseointegration in clinical dentistry. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 54(4), 611–612. [https://doi.org/10.1016/0022-3913\(85\)90460-3](https://doi.org/10.1016/0022-3913(85)90460-3)
- Cho, S. A., & Park, K. T. (2003). The removal torque of titanium screw inserted in rabbit tibia treated by dual acid etching. *Biomaterials*, 24(20), 3611-3617. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00218-7](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00218-7)
- Dohan Ehrenfest, D. M., Coelho, P. G., Kang, B. S., Sul, Y. T., & Albrektsson, T. (2010). Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography. *Trends in Biotechnology*, 28(4), 198-206. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.12.003>
- Faeda, R. S., Tavares, H. S., Sartori, R., Guastaldi, A. C., & Marcantonio, E. Jr. (2009). Biological performance of chemical hydroxyapatite coating associated with implant surface modification by laser beam : biomechanical study in rabbit tibias. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 67(8), 1706–1715. <http://doi.org/10.1016/j.joms.2009.03.046>

Hao, L., & Lawrence, J. (2007). Wettability modification and the subsequent manipulation of protein adsorption on a Ti6Al4V alloy by means of CO₂ laser surface treatment. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18(5), 807–817. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0002-4>

Hong, Y. S., Kim, M. J., Han J. S., & Yeo I. S. (2014). Effects of hydrophilicity and fluoride surface modifications to titanium dental implants on early osseointegration: an in vivo study. *Implant Dentistry*, 23(5), 529-533. <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000131>

Jemat, A., Ghazali, M. J., Razali, M., & Otsuka, Y. (2015). Surface modifications and their effects on titanium dental implants. *Biomed Research International*, 2015, 791725. <https://doi.org/10.1155/2015/791725>

Kim, H. W., Koh, Y. H., Li, L. H., Lee, S., Kim, H. E., & Kim, H. W. (2004). Hydroxyapatite coatings on titanium substrate with titania buffer layer processed by sol-gel method. *Biomaterials*, 25: 2533–2538. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.041>

Klokkevold, P. R., Nishimura, R. D., Adachi, M., & Caputo, A. (1997). Osseointegration enhanced by chemical etching of the titanium surface: a torque removal study in the rabbit. *Clinical Oral Implants Research*, 8(6), 442–447. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1997.080601.x>

Le Guéhennec, L., Soueidan, A., Layrolle, P., & Amouriq, Y. (2007). Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dental Materials*, 23(7), 844-854. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2006.06.025>

Lin, C., & Yen, S. (2004). Characterization and bond strength of electrolytic HA/TiO₂ double layers for orthopedic applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15(11), 1237–1246.

NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. (2010). Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Journal of Physiology*, 588, 2519–2521. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.192278>

Novaes, A. B., de Souza, S. L. S., de Barros, R. R. M., Pereira, K. K. Y., Iezzi, G., & Piattelli, A. (2010). Influence of implant surfaces on osseointegration. *Brazilian Dental Journal*, 21(6), 471–481. <https://doi.org/10.1590/s0103-64402010000600001>

Novaes, A. B., Papalexiou, V., Grisi, M. F. M., Souza, S. S. L. S., Taba, M., & Kajiwara, J. K. (2004). Influence of implant microstructure on the osseointegration of immediate implants placed in periodontally infected sites: a histomorphometric study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*, 15(1), 34–43. <https://doi.org/10.1046/j.1600-0501.2003.00968.x>

Oyane, A., Onuma, K., Ito, A., Kim, H. M., Kokubo, T., & Nakamura, T. (2003). Formation and growth of clusters in conventional and new kinds of simulated body fluids. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 64(2), 339–348. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10426>

Pálka, V., Poštrková, E., & Koerten H. K. (1998). Some characteristics of hydroxylapatite powder particles after plasma spraying. *Biomaterials*, 19(19):1763–1772. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(98\)00087-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(98)00087-8)

Picraux, S. T., & Pope, L. E. (1984). Tailored surface modification by ion implantation and laser treatment. *Science*, 226(4675), 615–622. <https://doi.org/10.1126/science.226.4675.615>

Ponsonnet, L., Reybier, K., Jaffrezic, N., Comte, V., Lagneau, C., & Lissac, M. (2003). Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. *Materials Science and Engineering: C*, 23(4), 551–560. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(03\)00033-X](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(03)00033-X)

Queiroz, T. P., de Molon, R. S., Souza, F. Á., Margonar, R., Thomazini, A. H. A., Guastaldi A. C., et al. (2017). In vivo evaluation of cp Ti implants with modified surfaces by laser beam with and without hydroxyapatite chemical deposition and without and with thermal treatment: topographic characterization and histomorphometric analysis in rabbits. *Clinical Oral Investigations*, 21(2), 685–699. <https://doi.org/10.1007/s00784-016-1936-7>

Queiroz, T. P., Souza, F. Á., Guastaldi, A. C., Margonar, R., Garcia-Júnior, I. R., & Hochuli-Vieira, E. (2012). Commercially pure titanium implants with surfaces modified

by laser beam with and without chemical deposition of apatite: biomechanical and topographical analysis in rabbits. *Clinical Oral Implants Research*, 24(8), 896–903. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02471.x>

Rosales-Leal, J. I., Rodríguez-Valverde, M. A., Mazzaglia, G., Ramón-Torregrosa, P. J., Díaz-Rodríguez, L., García-Martínez, O., et al. (2010). Effect of roughness, wettability and morphology of engineered titanium surfaces on osteoblast-like cell adhesion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 365(1–3), 222–229. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.12.017>

Scarano, A., Piattelli, A., Quaranta, A., & Lorusso, F. (2017). Bone response to two dental implants with different sandblasted / acid-etched implant surfaces : a histological and histomorphometrical study in rabbits. *Biomed Research International*, 2017, 8724951. <https://doi.org/10.1155/2017/8724951>

Singh, A., Singh, G., & Chawla, V. (2018). Characterization and mechanical behaviour of reinforced hydroxyapatite coatings deposited by vacuum plasma spray on SS-316L alloy. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 79, 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.01.005>

Sisti, K. E., Piattelli, A., Guastaldi, A. C., Queiroz, T. P., & de Rossi, R. (2013). Nondecalfified histologic study of bone response to titanium implants topographically modified by laser with and without hydroxyapatite coating. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 33(5), 689–696. <https://doi.org/10.11607/prd.1151>

Souza, F. A., Furtado, T. S. M., Dayube, U. R. C., Melo, W. M., Nishioka, R. S., Poli, P. P., et al. (2019). Comparative in vivo study of alloy titanium implants with two different surfaces: biomechanical and SEM analysis. *Clinical Oral Investigations*, 23(12), 4383–4397. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-02872-6>

Souza, F. A., Queiroz, T. P., Guastaldi, A. C., Garcia-Júnior, I. R., Magro-Filho, O., Nishioka, R. S., et al. (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. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 101(1), 76–84. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.32818>

Souza, F. A., Queiroz, T. P., Sonoda, C. K., Okamoto, R., Margonar, R., Guastaldi, A. C., et al. (2014). Histometric analysis and topographic characterization of cp Ti implants with surfaces modified by laser with and without silica deposition. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 102(8), 1677–1688. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33139>

Teng, F., Ko, C., Kuo, H., Hu, J., Lin, J., Lou, C. W., et al. (2012). A comparison of epithelial cells, fibroblasts, and osteoblasts in dental implant titanium topographies. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2012, 687291. <https://doi.org/10.1155/2012/687291>

Wang, Y., Liu, X., Fan, T., Tan, Z., Zhou, Z., & He, D. (2017). In vitro evaluation of hydroxyapatite coatings with (002) crystallographic texture deposited by micro-plasma spraying. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Application*, 75, 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.119>

Anexos

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



**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 do processo de reparo ao redor de implantes com superfícies modificada por laser com e sem recobrimento de hidroxiapatita. Estudo biomecânico, por MEV e imunohistoquímica em coelhos", Processo FOA nº 00554-2018, sob responsabilidade de Francisley Ávila Souza apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 20 de Julho de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 10 de Janeiro de 2020.

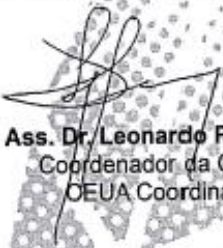
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 10 de Fevereiro de 2020.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Evaluation of the repair process around implantes with laser modified surfaces with and without deposition of HA. Biomechanical, MEV and immunohistochemistry study in rabbits", Protocol FOA nº 00554-2018, under the supervision of Francisley Ávila Souza presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on July 20, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: January 10, 2020.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: February 10, 2020.


Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

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

ANEXO B – Diretrizes para os autores (COIR)

1. SUBMISSION

Authors should kindly note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium.

Once the submission materials have been prepared in accordance with the Author Guidelines, manuscripts should be submitted online at <https://mc.manuscriptcentral.com/coir>

[Click here](#) for more details on how to use ScholarOne.

Data protection

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

Preprint policy

Please find the Wiley preprint policy here.

This journal accepts articles previously published on preprint servers.

Clinical Oral Implants Research will consider for review articles previously available as preprints. Authors may also post the submitted version of a manuscript to a preprint server at any time. Authors are requested to update any pre-publication versions with a link to the final published article.

For help with submissions, please contact: CLRoffice@wiley.com

2. AIMS AND SCOPE

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

3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

- **Original research articles** of high scientific merit in the field of surgical and prosthetic aspects of clinical oral implant dentistry including material sciences, physiology of wound healing, prevention and treatment of pathologic processes jeopardizing the longevity of implants, clinical trials on implant systems, stomatognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation.
In general, Clinical Oral Implants Research accepts in vitro studies for review only when there is an in vivo component to the study.
Clinical Oral Implants Research encourages complete reporting of all data in one manuscript as opposed to reporting data (for example clinical and radiographic data) in multiple manuscripts.
- **Review articles** by experts on new developments in basic sciences related to implant dentistry and clinically applied concepts. Reviews are by invitation only from the Editor-in-Chief.
- **Perspective articles** on topical areas related to implant dentistry and clinically applied concepts by invitation only from the Editor-in-Chief.
- **Case reports** and case series, but only if they provide or document new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician.
- **Novel developments** if they provide a technical novelty for any implant system
- **Short communications** of important research findings in a concise format and for rapid publication.
- **Proceedings of international meetings** may also be considered for publication at the discretion of the Editor-in-Chief.

4. PREPARING THE SUBMISSION

Cover Letters

Cover letters are not mandatory; however, they may be supplied at the author's discretion.

Parts of the Manuscript

The manuscript should be submitted in separate files: main text file; figures.

Main Text File

The text file should be presented in the following order:

- A short informative title containing the major key words. The title should not contain abbreviations (see Wiley's **best practice SEO tips**). Trade/product names should not be included in the title;
- A short running title of less than 60 characters;
- The full names of the authors;
- The author's institutional affiliations where the work was conducted, with a footnote for the author's present address if different from where the work was conducted;
- Acknowledgments;
- Author contributions: Please provide a statement listing the contributions made by each of the authors. Example: A.S. and K.J. conceived the ideas; K.J. and R.L.M. collected the data; R.L.M. and P.A.K. analysed the data; and A.S. and K.J. led the writing. Please refer to the journal's Authorship policy in the **Editorial Policies and Ethical Considerations section** for details on author listing eligibility;

- vii. Abstract, MeSH term keywords and word count;
- viii. Main text;
- ix. References;
- x. Tables (each table complete with title and footnotes);
- xi. Figure legends;
- xii. Appendices (if relevant).

Figures and supporting information should be supplied as separate files.

Authorship

Please refer to the journal's authorship policy the **Editorial Policies and Ethical Considerations section** for details on eligibility for author listing.

Acknowledgments

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

Conflict of Interest Statement

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. For details on what to include in this section, see the section 'Conflict of Interest' in the **Editorial Policies and Ethical Considerations section** below. Submitting authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

Abstract

Abstracts should not to exceed 250 words. This should be structured into: objectives, material and methods, results, conclusions, and no other information. Trade/product names must not be included in the abstract.

Keywords

Please provide 3-8 keywords. Keywords should be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at **www.nlm.nih.gov/mesh**.

Main Text of Original Research Articles

The main text should include Introduction, Material and Methods, Results and Discussion.

- **Introduction:** Summarise the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively. State clearly the working hypothesis.
- **Material and Methods:** Material and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.
Clinical trial registration number and name of the trial register should be included in the Materials and Methods at the submission stage.
Authors who have completed the ARRIVE guidelines, STROBE or CONSORT

checklist should include as the last sentence in the Methods section a sentence stating compliance with the appropriate guidelines/checklist.

- **Results:** Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all data in the tables and illustrations. The important observations should be emphasised.
- **Discussion:** Summarise the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

Main Text of Short Communications

Short communications are limited to two printed pages including illustrations and references and need not follow the usual division into material and methods, etc., but should have an abstract.

References

APA – American Psychological Association

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

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

Journal article

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

Book edition

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

Internet Document

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

In-text citations

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

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

Example:

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

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

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

Example:

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

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

Tables

Tables should be self-contained and complement, not duplicate, information contained in the text. They should be supplied as editable files, not pasted as images. Legends should be concise but comprehensive – the table, legend, and footnotes must be understandable without reference to the text. All abbreviations must be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical measures such as SD or SEM should be identified in the headings.

Figure Legends

Legends should be concise but comprehensive – the figure and its legend must be understandable without reference to the text. Include definitions of any symbols used and define/explain all abbreviations and units of measurement.

Figures

All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed. Each figure should have a legend.

Although authors are encouraged to send the highest-quality figures possible, for peer-review purposes, a wide variety of formats, sizes, and resolutions are accepted.

[Click here](#) for the basic figure requirements for figures submitted with manuscripts for initial peer review, as well as the more detailed post-acceptance figure requirements.

Color Figures. Figures submitted in color may be reproduced in colour online free of charge. Please note, however, that it is preferable that line figures (e.g. graphs and charts) are supplied in black and white so that they are legible if printed by a reader in black and white.

Data Citation

[Please review Wiley's data citation policy here.](#)

Reproduction of Copyright Material

If excerpts from copyrighted works owned by third parties are included, credit must be shown in the contribution. It is the author's responsibility to also obtain written permission for reproduction from the copyright owners. For more information visit Wiley's Copyright Terms & Conditions FAQ at **http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-terms--conditions_301.html**

Additional Files

Appendices

Appendices will be published after the references. For submission they should be supplied as separate files but referred to in the text.

Supporting Information

Supporting information is information that is not essential to the article, but provides greater depth and background. It is hosted online and appears without editing or typesetting. It may include tables, figures, videos, datasets, etc.

Click here for Wiley's FAQs on supporting information.

Note: if data, scripts, or other artefacts used to generate the analyses presented in the paper are available via a publicly available data repository, authors should include a reference to the location of the material within their paper.

General Style Points

The following points provide general advice on formatting and style.

- **Abbreviations:** In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader. Initially, use the word in full, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter use the abbreviation only. Use only standard abbreviations. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of Webster's third new international dictionary will be adhered to. Avoid abbreviations in the title.
- **Symbols:** The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro*, *in vivo*, *in situ* and other Latin expressions are to be italicised.
- **Units of measurement:** Measurements should be given in SI or SI-derived units. Visit the Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) website for more information about SI units.
- **Numbers:** numbers under 10 are spelt out, except for: measurements with a unit (8mmol/l); age (6 weeks old), or lists with other numbers (11 dogs, 9 cats, 4 gerbils). Use no roman numerals in the text.
- **Decimals:** In decimals, a decimal point and not a comma will be used.
- **Scientific Names:** Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined on the typescript. The full proper name (e.g., *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e.g., *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e.g., streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalised and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e.g., *Ps.* for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity.
- **Trade Names:** Chemical substances should be referred to by the generic name only. Trade names should not be used. Drugs should be referred to by their generic names. If proprietary drugs have been used in the study, refer to these by their generic name, mentioning the proprietary name and the name and location of the manufacturer in parentheses.
- **P values** should be written in full and should be in italics (e.g. $p = 0.04$) - 3 decimal places

Submission of Revised Manuscripts

When submitting revised manuscripts, authors are requested to highlight revisions in yellow rather than using track changes features. In addition, an author response letter should be provided including a detailed response to each point from each reviewer.

Wiley Author Resources

Manuscript Preparation Tips: Wiley has a range of resources for authors preparing manuscripts for submission available [here](#). In particular, authors may benefit from referring to Wiley's best practice tips on [Writing for Search Engine Optimization](#).

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

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

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

5. EDITORIAL POLICIES AND ETHICAL CONSIDERATIONS

Peer Review and Acceptance

The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to journal readership. Manuscripts are single-blind peer reviewed. Papers will only be sent to review if the Editor-in-Chief determines that the paper meets the appropriate quality and relevance requirements.

Wiley's policy on the confidentiality of the review process is [available here](#).

Appeal of Decision

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

Human Studies and Subjects

For manuscripts reporting medical studies that involve human participants (even if the study is retro-spective), a statement identifying the ethics committee that approved the study and confirmation that the study conforms to recognized standards is required, for example: [Declaration of Helsinki](#); [US Federal Policy for the Protection of Human Subjects](#); or [European Medicines Agency Guidelines for Good Clinical Practice](#). It should also state clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. A pdf of the ethics approval must be uploaded at the time of submission. The ethics approval number should be included in the Materials and Methods section.

Patient anonymity should be preserved. When detailed descriptions, photographs, or videos of faces or identifiable body parts are used that may allow identification, authors should obtain the individual's free prior informed consent. Authors do not need to provide a copy of the consent form to the publisher; however, in signing the author license to publish, authors are required to confirm that consent has been obtained. Wiley has a **standard patient consent form** available for use. Where photographs are used they need to be cropped sufficiently to prevent human subjects being recognized; black eye bars should not be used as they do not sufficiently protect an individual's identity).

Animal Studies

A statement indicating that the protocol and procedures employed were ethically reviewed and approved, as well as the name of the body giving approval, must be included in the Methods section of the manuscript. Authors must adhere to the **ARRIVE guidelines** for reporting study design and statistical analysis; experimental procedures; experimental animals and housing and husbandry. Authors should also state whether experiments were performed in accordance with relevant institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals:

- US authors should cite compliance with the US National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, the US Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, and Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.
- UK authors should conform to UK legislation under the Animals (Scientific Procedures) Act 1986 Amendment Regulations (SI 2012/3039).
- European authors outside the UK should conform to Directive 2010/63/EU.

Clinical Trial Registration

The journal requires that all clinical trials which have a commencement date after 31st January 2017 are prospectively registered in a publicly accessible database and clinical trial registration numbers should be included in all papers that report their results. Authors are asked to include the name of the trial register and the clinical trial registration number at the end of the abstract. If the trial is not registered, or was registered retrospectively, the reasons for this should be explained.

Research Reporting Guidelines

Accurate and complete reporting enables readers to fully appraise research, replicate it, and use it. Authors are required to adhere to recognised research reporting standards. The EQUATOR Network collects more than 370 reporting guidelines for many study types, including for:

- Randomised trials : CONSORT
Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines. A CONSORT checklist should also be included in the submission material under "Supplementary Files for Review".
If your study is a randomized clinical trial, you will need to fill in all sections of the CONSORT Checklist. If your study is not a randomized trial, not all sections of the checklist might apply to your manuscript, in which case you simply fill in N/A.

- All prospective clinical trials which have a commencement date after the 31st January 2017 must be registered with a public trials registry.
- Observational studies : STROBE
Clinical Oral Implants Research requires authors of human observational studies in epidemiology to review and submit a STROBE statement. Authors who have completed the STROBE checklist should include as the last sentence in the Methods section a sentence stating compliance with the appropriate guidelines/checklist. Checklists should be included in the submission material under “Supplementary Files for Review”. Please indicate on the STROBE checklist the page number where the corresponding item can be located within the manuscript e.g. Page 4.
- Systematic reviews : PRISMA
- Case reports : CARE
- Qualitative research : SRQR
- Diagnostic / prognostic studies : STARD
- Quality improvement studies : SQUIRE
- Economic evaluations : CHEERS
- Animal pre-clinical studies : ARRIVE
Clinical Oral Implants Research requires authors of pre-clinical animal studies submit with their manuscript the Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines checklist. Authors who have completed the ARRIVE guidelines checklist should include as the last sentence in the Methods section a sentence stating compliance with the appropriate guidelines/checklist. Checklists should be included in the submission material under “Supplementary Files for Review”.
- Study protocols : SPIRIT
- Clinical practice guidelines : AGREE

We also encourage authors to refer to and follow guidelines from:

- Future of Research Communications and e-Scholarship (FORCE11)
- National Research Council's Institute for Laboratory Animal Research guidelines
- The Gold Standard Publication Checklist from Hooijmans and colleagues
- Minimum Information Guidelines from Diverse Bioscience Communities (MIBBI) website
- FAIRsharing website

Species Names

Upon its first use in the title, abstract, and text, the common name of a species should be followed by the scientific name (genus, species, and authority) in parentheses. For well-known species, however, scientific names may be omitted from article titles. If no common name exists in English, only the scientific name should be used.

Genetic Nomenclature

Sequence variants should be described in the text and tables using both DNA and protein designations whenever appropriate. Sequence variant nomenclature must follow the current HGVS guidelines; see varnomen.hgvs.org, where examples of acceptable nomenclature are provided.

Sequence Data

Nucleotide sequence data can be submitted in electronic form to any of the three major collaborative databases: DDBJ, EMBL, or GenBank. It is only necessary to submit to one database as data are exchanged between DDBJ, EMBL, and GenBank on a daily basis. The suggested wording for referring to accession-number information is: 'These sequence data have been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank databases under accession number U12345'. Addresses are as follows:

- DNA Data Bank of Japan (DDBJ): www.ddbj.nig.ac.jp
- EMBL Nucleotide Archive: ebi.ac.uk/ena
- GenBank: www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank

Proteins sequence data should be submitted to either of the following repositories:

- Protein Information Resource (PIR): pir.georgetown.edu
- SWISS-PROT: expasy.ch/sprot/sprot-top

Conflict of Interest

The journal requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or directly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include, but are not limited to: patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication. If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and collectively to disclose with the submission ALL pertinent commercial and other relationships.

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

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

Conflict of Interest Disclosure Form

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

Funding

Authors should list all funding sources in the Acknowledgments section. Authors are responsible for the accuracy of their funder designation. If in doubt, please check the Open

Funder Registry for the correct nomenclature: <https://www.crossref.org/services/funder-registry/>

Authorship

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

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

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

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

Data Sharing and Data Accessibility

Please review Wiley’s policy here. This journal encourages and peer review data sharing.

The journal encourages authors to share the data and other artefacts supporting the results in the paper by archiving it in an appropriate public repository. Authors should include a data accessibility statement, including a link to the repository they have used, in order that this statement can be published alongside their paper.

All accepted manuscripts may elect to publish a data availability statement to confirm the presence or absence of shared data. If you have shared data, this statement will describe how the data can be accessed, and include a persistent identifier (e.g., a DOI for the data, or an accession number) from the repository where you shared the data. **Sample statements are available here.** If published, statements will be placed in the heading of your manuscript.

Publication Ethics

This journal is a member of the **Committee on Publication Ethics (COPE)**. Note this journal uses iThenticate’s CrossCheck software to detect instances of overlapping and similar text in submitted manuscripts. Read Wiley’s Top 10 Publishing Ethics Tips for Authors **here**. Wiley’s Publication Ethics Guidelines can be found **here**.

ORCID

As part of the journal's commitment to supporting authors at every step of the publishing process, the journal requires the submitting author (only) to provide an ORCID iD when submitting a manuscript. This takes around 2 minutes to complete. **[Find more information here.](#)**

6. AUTHOR LICENSING

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

Authors may choose to publish under the terms of the journal's standard copyright agreement, or **OnlineOpen** under the terms of a Creative Commons License.

General information regarding licensing and copyright is available **here**. To review the Creative Commons License options offered under OnlineOpen, please **click here**. (Note that certain funders mandate that a particular type of CC license has to be used; to check this please click **here**.)

Self-Archiving definitions and policies. Note that the journal's standard copyright agreement allows for self-archiving of different versions of the article under specific conditions. Please **click here** for more detailed information about self-archiving definitions and policies.

Open Access fees: If you choose to publish using OnlineOpen you will be charged a fee. A list of Article Publication Charges for Wiley journals is available **here**.

Funder Open Access: Please click **here** for more information on Wiley's compliance with specific Funder Open Access Policies.

7. PUBLICATION PROCESS AFTER ACCEPTANCE

Accepted article received in production

When an accepted article is received by Wiley's production team, the corresponding author will receive an email asking them to login or register with **Wiley Author Services**. The author will be asked to sign a publication license at this point.

Accepted Articles

The journal offers Wiley's Accepted Articles service for all manuscripts. This service ensures that accepted 'in press' manuscripts are published online shortly after acceptance, prior to copy-editing or typesetting. Accepted Articles are published online a few days after final acceptance and appear in PDF format only. They are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows them to be cited and tracked and are indexed by PubMed. After the final version article is published (the article of record), the DOI remains valid and can still be used to cite and access the article.

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

Proofs

Once the paper is typeset, the author will receive an email notification with full instructions on how to provide proof corrections.

Please note that the author is responsible for all statements made in their work, including changes made during the editorial process – authors should check proofs carefully. Note that proofs should be returned within 48 hours from receipt of first proof.

Publication Charges

Page Charges. Articles exceeding 10 published pages, including illustrations and references, are subject to a charge of USD 160 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters (excluding figures and tables). The author will be notified of the cost of page charges when they receive the proofs, along with instructions on how to pay for the charges.

Early View

The journal offers rapid speed to publication via Wiley's Early View service. **Early View** (Online Version of Record) articles are published on Wiley Online Library before inclusion in an issue. Note there may be a delay after corrections are received before the article appears online, as Editors also need to review proofs. Once the article is published on Early View, no further changes to the article are possible. The Early View article is fully citable and carries an online publication date and DOI for citations.

8. POST PUBLICATION

Access and sharing

When the article is published online:

- The author receives an email alert (if requested).
- The link to the published article can be shared through social media.
- The author will have free access to the paper (after accepting the Terms & Conditions of use, they can view the article).
- The corresponding author and co-authors can nominate up to ten colleagues to receive a publication alert and free online access to the article.

Promoting the Article

To find out how to best promote an article, [click here](#).

Article Promotion Support

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

Measuring the Impact of an Article

Wiley also helps authors measure the impact of their research through specialist partnerships with **Kudos** and **Altmetric**.

9. EDITORIAL OFFICE CONTACT DETAILS

For queries about submissions, please contact **CLRoffice@wiley.com**

Author Guidelines Updated 21 November 2019