



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

JULIANA DE MOURA

**Caracterização do tecido ósseo reparacional frente à
associação de terapia sistêmica com risedronato de sódio
associado ou não a suplementação de Cálcio e Vitamina D
e terapia local com vitamina K em ratas com deficiência de
estrógeno**

**Araçatuba- SP
2023**

JULIANA DE MOURA

**Caracterização do tecido ósseo reparacional frente à
associação de terapia sistêmica com risedronato de sódio
associado ou não a suplementação de Cálcio e Vitamina D
e terapia local com vitamina K em ratas com deficiência de
estrógeno**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Assoc. Roberta Okamoto.

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Silva Gomes Ferreira

**Araçatuba- SP
2023**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M929a Moura, Juliana de.
Avaliação do reparo ósseo peri-implantar através de implantes funcionalizados com vitamina K em ratas com deficiência de estrógeno tratadas com risedronato sódico / Juliana de Moura. - Araçatuba, 2023
55 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientadora: Profa. Roberta Okamoto
Coorientador: Prof. Pedro Henrique Silva Gomes Ferreira

1. Osteoporose 2. Ácido risedrônico 3. Implantes dentários I. T.

Black D7
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatória

A minha mãe Elizete, meu pai Silas, irmã Fernanda e namorado Alaor

Mãe e pai muito obrigado por todo esforço e carinho, sei que abdicaram de inúmeras coisas para que eu pudesse me formar em odontologia e ainda mais para que eu realizasse meu mestrado, obrigado por todo o apoio sem fim e espero um dia poder retribuir um pouco do muito que vocês já fizeram e ainda fazem por mim. Amo muito vocês.

Quero agradecer minha irmã, que sempre está ao meu lado me incentivando a avançar cada vez mais em minha vida profissional e crescimento pessoal, obrigada por tudo sempre. Amo você demais

Agradeço também ao meu namorado Alaor, que esteve comigo em todos os momentos durante o mestrado, que me incentivou e apoiou, e que não mediu esforços para que eu me tornasse uma pessoa melhor nesse tempo. Quero estar sempre junto com você. Amo-te muito.

Agradecimentos especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Dedico a Deus

Por me proporcionar todas as oportunidades da minha vida e me abençoar em cada uma delas. Agradeço a Ti Senhor pela capacidade dada a mim durante esse período tão singular em minha vida. Por tudo aquilo que tu fazes e ainda vais fazer em minha vida, Deus. Tu conheces quem eu sou e o meu caminho e por mais que às vezes eu não entenda, eu confio em teus passos. Por fim, eu te agradeço por me capacitar e trazer a tua paz, que excede todo o entendimento nos dias que mais preciso e por estar sempre ao meu lado. Amo o Senhor.

A minha querida orientadora, Prof.^a Dr.^a Roberta Okamoto

Gostaria de expressar à senhora minha eterna gratidão, por toda a paciência, cuidado e principalmente por tudo o que tive a oportunidade de aprender. A senhora, é uma das pessoas que me trazem inspiração e por quem tenho uma eterna admiração. Espero um dia chegar com tamanha capacidade, elegância e carisma aonde a senhora chegou. Obrigada professora por todo o acolhimento e por diversas vezes acreditar no meu potencial. Serei eternamente grata por toda a orientação.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Pedro Henrique Gomes Ferreira

Por ter me ajudado e ensinado durante todo o período de execução do meu projeto de mestrado. Agradeço em primeiro lugar pela amizade e boa convivência que tivemos no departamento durante o desenvolvimento de todos os trabalhos relacionados a esse projeto, que graças a você foi desenvolvido de forma excelente. Desejo que Deus abençoe sua vida e seu caminho e que te ilumine para as conquistas que virão.

Aos membros da Banca Examinadora

Professora Dra Sandra Rahal Mestreiner, admiro a senhora pelo trabalho clínico lindo que a vejo diariamente realizar e também pela pessoa que a senhora é. Gostaria de agradecer por todo o conhecimento transmitido e pela oportunidade de

estar ao seu lado aprendendo e crescendo como pessoa e profissional. É uma grande honra aprender com a senhora e ver todo o amor e cuidado transmitido em cada atendimento.

Professora Dra Juliana Zorzi, agradeço a participação como banca avaliadora deste trabalho. Sou uma admiradora do seu trabalho e agradeço por poder contar com as suas contribuições na avaliação deste estudo.

Aos meus familiares

Como é bom saber que tenho familiares tão especiais, agradeço por todo o apoio, preocupação e por acreditarem que sou capaz. Espero saber de alguma forma todo o carinho de todos vocês. Amo vocês.

Aos amigos da iniciação científica

Odir Nunes de Oliveira Filho, Daniel Leão, Isadora Castaldi, Marina Dutra, Sara Ferreira, Laura Macedo, Joyce Akazaki e Marcelly Braga. Agradeço pela amizade que fiz com todos vocês e pelo bom tempo que passamos juntos, pelas risadas, cafés, você realmente são pessoas incríveis. Foi um prazer enorme trabalhar com todos vocês no período do meu mestrado.

Aos amigos da pós-graduação

Ana Cláudia Ervolino, Leticia Pitol Palin, Naara Monteiro, Fábio Batista, Pedro Henrique Ferreira, Paula Frigério, Laura Vidoto Paludetto, Nathália Duarte e Tatiany Castro. Sou extremamente grata por toda a ajuda e ensinamentos que vocês me trouxeram. Além de tudo, sou grata pela amizade e boa convivência que tivemos.

Gostaria de fazer um agradecimento especial a **Leticia Pitol Palin, Laura Vidoto Paludetto, Nathália Duarte e Naara Monteiro** que sempre estiveram ao meu lado durante toda essa jornada no mestrado e que não mediram esforços para me ajudar sempre que fosse preciso e me aconselhar em todos os momentos, vocês se tornaram pessoas muito especiais.

Aos meus amigos

Gostaria de realizar um agradecimento especial a **Julia Pantaroto de Azevedo, Renata Parpinelli e Victória Ferreira** vocês nem podem imaginar o quanto foram essenciais e singulares. Em todos os momentos vocês se mantiveram presentes e sempre prontas a me socorrer em qualquer que fosse a situação. Quero levar essa amizade para toda a vida, obrigada por serem meninas incríveis. Espero que eu possa de alguma forma retribuir todo o amor e carinho que vocês me deram. Obrigada pelas risadas, viagens, companheirismo e tempo dedicados a essa amizade. Amo vocês.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP**, e em especial à Faculdade de Odontologia de Araçatuba na pessoa do diretor **Professor Tit. Glauco Issamu Miyahara** e do vice-diretor **Professor Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

Ao Programa de **Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba** na pessoa do coordenador **Professor Assoc. Wirley Gonçalves Assunção** e do vice-coordenadora **Professora Assoc. Roberta Okamoto**.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (**CAPES**) - Código de Financiamento 001, pela concessão de bolsa de mestrado durante esses 24 meses.

À **Titaniumfix**, pelo fornecimento dos discos de titânio e implantes osseointegráveis utilizados neste projeto.

Aos meus queridos **professores** ao longo da pós-graduação, pessoas das quais admiro muito. Muito obrigada por ensinar com sabedoria e excelência.

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

Ao **Departamento de Ciências Básicas**, pelo acolhimento e por viabilizar a execução do estudo. Obrigada aos professores da Disciplina de Histologia e Embriologia (Prof. Dr. Edilson Ervolino, Prof^a Dr^a. Mariza Akemi Matsumoto, Prof^a Dr^a Alaide Gonçalves e Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti), aos professores da Disciplina de Anatomia (Prof. Dr. José Américo de Oliveira, Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin e Prof^a. Dr^a. Roberta Okamoto), aos funcionários e todos os outros estagiários. Muito obrigada por toda ajuda e pelo acolhimento durante estes anos de convívio.

Aos professores da **Disciplina de Cirurgia e Traumatologia BucoMaxiloFacial** (Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior, Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Prof. Dr. Francisley Ávila Souza, Prof^a. Dr^a. Alessandra Aranega, Prof^a Dr^a Ana Paula Bassi, Prof^a. Dr^a Daniela Ponzoni, e Prof. Dr. Leonardo Peres Faverani) pelos ensinamentos práticos e teóricos ao longo destes anos.

Aos colegas de **pós-graduação da Implantodontia**, agradeço pelos momentos em que pudemos passar junto onde pude aprender muito com cada um de vocês.

Aos **funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, pela ajuda e pelo funcionamento dos diversos setores da nossa instituição. Muito obrigada!

Epígrafe

“Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou o teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a minha destra fiel.”

Isaías 41:10

Resumo

MOURA, J. Caracterização do tecido ósseo reparacional frente à associação de terapia sistêmica com risedronato de sódio associado ou não a suplementação de Cálcio e Vitamina D e terapia local com vitamina K em ratas com deficiência de estrógeno. 2023. 52 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

O estudo tem como objetivo caracterizar o tecido ósseo em processo de reparação ao redor de implantes funcionalizados com vitamina K, associado ou não a terapia de risedronato sistêmico em ratas com deficiência de estrógeno. Materiais e métodos: 54 ratas foram divididas em seis grupos experimentais: SHAM: cirurgia fictícia, SHAM (VIT K) cirurgia fictícia com a funcionalização do implante com a vitamina K, OVX: cirurgia de ovariectomia, OVX (VIT K) ovariectomia com a funcionalização do implante com a vitamina K, OVX/RIS: ovariectomia e o tratamento com risedronato, OVX/RIS (VIT K) ovariectomia tratadas com risedronato e funcionalizadas com a vitamina K. Passados 30 dias da indução à osteoporose, as ratas foram submetidas ao tratamento medicamentoso com risedronato (0,35 Mg/kg/dia, semanalmente). Após 30 dias, os animais receberam os implantes funcionalizados com vitamina K na metáfise tibial para a avaliação biomecânica do reparo ósseo periimplantar. A eutanásia ocorreu 28 dias após a cirurgia de instalação dos implantes. No momento da eutanásia dos animais, serão submetidos à análise biomecânica (torque de remoção). Os dados quantitativos foram submetidos à curva de normalidade para a definição de um teste paramétrico ou não paramétrico, considerando o nível de significância de 5%. De acordo com os dados apresentados os grupos SHAM VIT K e OVX RIS VIT K obtiveram maiores valores, houve diferença estatística significativa entre os grupos SHAM VIT K e OVX VIT K e os grupos OVX VIT K e OVX RIS VIT K. O tratamento de superfície do implante com a vitamina K e o tratamento sistêmico com risedronato sódico melhorou a biomecânica óssea de implantes instalados em tíbia de ratas com deficiência de estrógeno.

Palavras-chave: Osteoporose. Risedronato sódico. Implantes dentários.

Abstract

MOURA, J. **Characterization of reparative bone tissue after systemic risedronate therapy associated or not with calcium and vitamin D supplementation and local vitamin K therapy in estrogen-deficient rats** 2023. 52 f. Dissertation (Master's Degree) - Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

This study aims to characterize the bone tissue repair process around implants functionalized with vitamin K, associated or not with systemic risedronate therapy in rats with estrogen deficiency. Materials and methods: 54 rats were divided into six experimental groups: SHAM: sham surgery, SHAM (VIT K) sham surgery with functionalization of the implant with vitamin K, OVX: ovariectomy surgery, OVX (VIT K) ovariectomy with functionalization of the implant with vitamin K, OVX/RIS: ovariectomy and risedronate treatment, OVX/RIS (VIT K) ovariectomy treated with risedronate and functionalized with vitamin K. After 30 days of osteoporosis induction, the rats were subjected to drug treatment with risedronate (0.35 Mg/kg/day, weekly). After 30 days, the animals received vitamin K functionalized implants in the tibial metaphysis for biomechanical evaluation of the periimplant bone repair. Euthanasia occurred 28 days after implant installation surgery. At the moment of the animals' euthanasia, they will be submitted to biomechanical analysis (removal torque). The quantitative data were submitted to the normality curve for the definition of a parametric or non-parametric test, considering the significance level of 5%. According to the data presented SHAM VIT K and OVX RIS VIT K groups obtained higher values, there was a statistically significant difference between SHAM VIT K and OVX VIT K groups and OVX VIT K and OVX RIS VIT K groups. Surface treatment of the implant with vitamin K and systemic treatment with risedronate sodium improved the bone biomechanics of implants installed in tibiae of estrogen-deficient rats.

Keywords: Osteoporosis. Sodium risedronate. Dental implants.

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sequência de acontecimentos e caracterização do modelo experimental	36
Figura 2 - Sequência da funcionalização com a vitamina K	38
Figura 3 - Dimensões do implante instalado nas tíbias	39

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição de animais de acordo com o período de eutanásia	36
Tabela 2 - Distribuição dos grupos de acordo com o tratamento a ser realizado	39

Lista de gráficos

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Avaliação biomecânica através do torque de remoção aos 28 dias após a instalação dos implantes. Comparação entre os grupos 42

Lista de abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

% Porcentagem

> Maior

μA Microampère

μm Micrometro

Al Alumínio

CEUA- FOA Comitê de ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Cm Centímetros

Cu Cobre

DMO Densidade mineral óssea

DMSO Dimetilsulfóxido

FOA Faculdade de Odontologia de Araçatuba

g Gramas

Kg Quilograma

Kv Quilovolt

M Massa molar

mg/Kg Miligramas por quilograma

min minutos

ml Mililitros

Mm Milímetros

mm³ Milímetros cúbicos

MTT Ensaio de viabilidade celular

n Número

N.cm Newtons por centímetro

Nm Nanômetro

OVX Ovariectomia

OVX RIS Ovariectomia e risedronato sistêmico

OVX RIS VIT K Ovariectomia, risedronato sistêmico e implante com vitamina K

OVX VIT K Ovariectomia e implante com vitamina K

PBS – tampão fosfato

pH potencial hidrogeniônico

PT Proteína total

PVPI	Polivinilpirrolidona-iodo
Rpm	Rotações por minuto
SHAM	Animais submetidos à cirurgia fictícia
SHAM VIT K	Animais submetidos à cirurgia fictícia e implante com a vitamina K
Ug	Micrograma
Ul	Microlitro
µg/mL	Micrograma por mililitro
µmol	Micromol

Sumário

SUMÁRIO

<u>1 INTRODUÇÃO</u>	29
<u>2 OBJETIVO</u>	33
<u>3 MATERIAIS E MÉTODOS</u>	35
<u>3.1 Experimentos in vivo com o Modelo Experimental proposto</u>	35
<u>3.2 Animais</u>	35
<u>3.3 Delineamento Do Modelo Experimental</u>	36
<u>3.4 Ciclo estral</u>	37
<u>3.5 Ovariectomia</u>	37
<u>3.6 Funcionalização dos Implantes – Dip-coating</u>	37
<u>3.7 Cirurgia para instalação dos implantes ósseointegráveis nas tíbias</u>	38
<u>3.8 Tratamento Medicamentoso</u>	38
<u>3.9 Eutanásia</u>	39
<u>3.10 Análise Biomecânica</u>	39
<u>3.11 Análise Estatística</u>	39
<u>4 RESULTADOS</u>	42
<u>4.1 Resultado biomecânico (torque de remoção)</u>	42
<u>5 DISCUSSÃO</u>	44
<u>6 CONCLUSÃO</u>	47
<u>REFERÊNCIAS</u>	49
<u>ANEXOS</u>	51

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma doença sistêmica esquelética, em que resulta na diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, levando a um aumento do risco de fratura e da fragilidade óssea. A prevalência dessa condição aumenta de acordo com a idade, principalmente em mulheres na fase pós-menopausa, e isso é devido à perda óssea progressiva conforme os anos e também pode acometer homens idosos¹.

Dentre as doenças mais acometidas, a osteoporose ocupa o quarto lugar, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). A literatura apresenta que aproximadamente 30% de todas as mulheres pós-menopáusicas nos Estados Unidos da América e na Europa são portadoras de osteoporose. O envelhecimento das populações em todo o mundo será responsável por um grande aumento na incidência de osteoporose em mulheres pós-menopáusicas².

De acordo com a literatura, a qualidade do tecido ósseo é um fator importante para a reabilitação com implantes dentários, pois determina a estabilidade inicial, ou seja, o travamento inicial do implante, fator que beneficia o fenômeno da osseointegração, condição clínica na qual se é possível colocar uma carga funcional. Sabendo disso, alterações ósseas que interfiram na microarquitetura óssea, bem como em suas propriedades mecânicas e estruturais, como a osteoporose podem interferir na estabilidade inicial e levar ao insucesso clínico dos implantes dentários^{3,4}. Uma vez que tratamentos reabilitadores têm sido cada vez mais procurados por indivíduos que possuam essa condição sistêmica como a osteoporose.

A terapia farmacológica para o tratamento da osteoporose pode ser classificada através de agentes antireabsortivos e anabólicos. Os bifosfonatos, moduladores seletivos de receptores de estrógeno (SERMS) e denosumab constituem o grupo de anti-reabsortivos. Já o paratormônio (PTH) pertence ao grupo de agentes anabólicos, que favorecem a neoformação óssea⁵.

Os bisfosfonatos tem seu mecanismo de ação através da redução direta do número de osteoclastos ativos através da inibição de recrutamento de osteoclastos e aumento da taxa de apoptose dos mesmos^{6,7}.

Dentre os fármacos pertencentes à classe dos bisfosfonatos, o risedronato (RIS) é caracterizado por conter nitrogênio em sua estrutura, é amplamente utilizado como droga de primeira linha para o tratamento da osteoporose⁸. Apesar de seu efeito menos proeminente no turnover ósseo e na densidade mineral óssea do que o alendronato, o risedronato parece similar ou até mais eficaz na prevenção de fraturas de quadril e não vertebrais durante o primeiro ano de terapia⁹ e em animais experimentais, bem como em certas condições¹⁰.

De acordo com a literatura, o Risedronato (RIS) e ALN são bisfosfonatos amplamente utilizados como medicamentos para o tratamento da osteoporose de primeira linha. Contudo, mesmo que esses dois medicamentos compartilhem o mecanismo fundamental de inibir a reabsorção óssea¹¹, eles se diferenciam de um modo significativo em sua potência de inibir a farnesil pirofosfato sintase e na afinidade com os cristais de hidroxiapatita¹².

Embora não se saiba ao certo o mecanismo, já foi reconhecido o efeito potencialmente superior do RIS na qualidade óssea, em que dados clínicos sugerem que o RIS na prevenção de fraturas de quadril e não vertebral durante o primeiro ano de terapia parece ser mais eficaz que o ALN, devido a sua classificação em segunda geração. Os indivíduos tratados com RIS têm uma menor incidência de fraturas de quadril do que aqueles tratados com ALN por 12 meses (0,37 vs. 0,58%)⁹. Sabe-se que o RIS apesar de possuir menos afinidade a hidroxiapatita tem um potencial maior na inibição da farnesil pirofosfato sintase do que o ALN¹³.

Estudos que demonstram uma comparação direta entre esses dois bifosfonatos apontam que o tratamento com RIS resultou em uma arquitetura e rigidez trabecular potencialmente melhor, sugerindo efeito preferencial do RIS na qualidade óssea quando comparado ao ALN¹⁴.

Além disso, um estudo realizado por Reginster et al.¹⁵ (Estudo VERT) mostrou que a administração diária do bisfosfonato risedronato em pacientes com osteoporose pós-menopausa levou a um aumento anual de aproximadamente 3 a 5% na DMO vertebral lombar e reduziu o risco de fraturas vertebrais em 49% em 3 anos.

Estudos anteriores do nosso grupo (2019/26380-0) foram realizados o uso apenas do risedronato sistêmico e observamos alguns resultados satisfatórios,

embora esperassem resultados melhores nas análises de contra-torque e no ensaio biomecânico do fêmur, com isso levantamos a hipótese de que o tratamento local dos implantes poderia melhorar esses resultados pela associação de uma terapia local e sistêmica.

Apesar dos anti-reabsortivos serem a primeira classe de medicamento adotado para o tratamento da osteoporose, eles possuem alguns efeitos colaterais se prescrito em longo prazo, embora sejam eventos raros devem ser considerados, como a osteonecrose em mandíbula atípica e fraturas do fêmur, fibrilação atrial e câncer de esôfago¹⁶. Levando esse aspecto importante em consideração, alternativas terapêuticas locais nos implantes dentários se fazem necessárias para que a estabilidade e longevidade dos implantes sejam obtidas em um tecido ósseo que esteja comprometido. Portanto, os avanços na implantodontia para melhorar as superfícies dos implantes visando uma otimização das respostas celulares ao redor das espiras dos implantes vem possibilitando uma melhor resposta biológica no processo de remodelação óssea e osseointegração nos tecidos que se encontram comprometidos.

Sabendo disso, a vitamina K2 também desempenha um papel importante na manutenção óssea, pois ela é responsável por ativar (cofator) a carboxilação de proteínas da matriz óssea como a osteocalcina que participa no processo de mineralização óssea, proteína Gla de matriz (proteína MGP), proteína rica em Gla, proteína S e proteína 6 que vão regular e sintetizar a matriz óssea, além de estarem envolvidas dentro do processo de remodelação óssea¹⁷.

Existem na atualidade, diversos estudos que evidenciem a eficácia dos bifosfonatos orais para o tratamento da osteoporose, entretanto o que buscamos nesse estudo é analisar a relação do uso do bifosfonato sistêmico com a associação da funcionalização da vitamina K nos implantes como uma terapia local, visto que ela melhora a formação de osteocalcina, um marcador de mineralização óssea, e através dessa associação de medicamentos, avaliar o reparo ósseo ao redor dos implantes.

Objetivo

2 OBJETIVO

O presente estudo teve como proposta analisar a relação do uso do risedronato de sódio sistêmico com a associação da funcionalização da vitamina K dos implantes ósseo integráveis em ratas com deficiência de estrógeno através do reparo ósseo periimplantar.

Materiais e métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados os experimentos in vivo que foram executados no modelo experimental proposto para este estudo. Com o objetivo de avaliar a ação sinérgica entre fármacos administrados local e sistemicamente, buscam-se neste momento, caracterizar de uma forma geral, as respostas iniciais do tecido ósseo Peri-implantar quanto aos eventos de formação, reabsorção e mineralização óssea.

Vale destacar que foi utilizado o modelo de instalação de implantes nas tíbias das ratas, com o intuito de avaliar o efeito do bisfosfonato oral sobre os ossos das tíbias e qual a possível melhora deste quadro frente ao tratamento de superfície com a Vitamina K2.

3.1 Animais

Após a emissão do certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – FOA UNESP (nº0523-2021), 54 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), fêmeas, adultas, com peso corporal ao redor de 200 - 250g foram utilizadas. Durante todo o experimento, as ratas foram mantidas em ambiente com temperatura estável ($22\pm 2^{\circ}$. C) com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro) e alimentado com ração sólida triturada (ração balanceada [Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil]) e água ad libitum, exceto no período de 12 horas antecedentes a cada ato cirúrgico. Nos grupos experimentais foi avaliado o reparo peri-implantar em ratas induzidas à osteoporose.

Sendo assim, foram distribuídas em SHAM, as ratas submetidas à cirurgia fictícia, SHAM (VIT K) as ratas submetidas à cirurgia fictícia com a funcionalização dos implantes de tíbia com a vitamina K, OVX as ratas em que foi realizada a ovariectomia para indução à osteoporose, OVX (VIT K) as ratas em que foi realizado a ovariectomia com a funcionalização dos implantes de tíbia com a vitamina K, o grupo submetido à ovariectomia tratadas com risedronato (OVX/RIS) e o grupo OVX/RIS (VIT K) submetido à ovariectomia tratadas com risedronato e funcionalizadas com a vitamina K. Totalizando em um N=54 ratas.

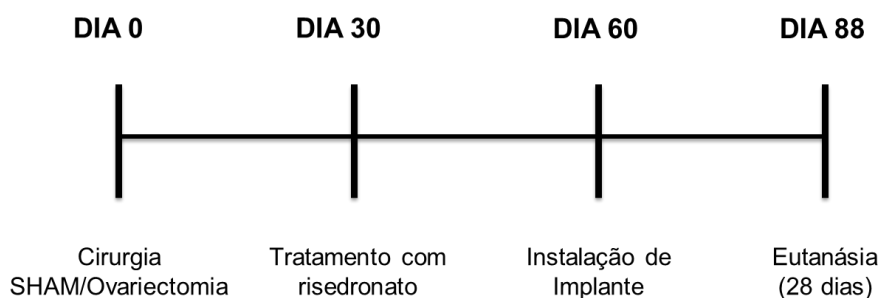
Todos os animais foram submetidos à eutanásia nos períodos de 28 dias após a instalação dos implantes.

Tabela 1 - Distribuição de animais de acordo com o período de eutanásia

Grupos Experimentais	Período de Eutanásia (28 dias)
SHAM	9
SHAM VIT K	9
OVX	9
OVX VIT K	9
OVX RIS	9
OVX RIS VIT K	9

Fonte: Autor, 2023

3.2 Delineamento Do Modelo Experimental

FIGURA 1 - Sequência de eventos e caracterização do modelo experimental

Delineamento do modelo experimental de acordo com os dias

Fonte: Autor, 2023

3.3 Ciclo estral

Para garantir que as ratas utilizadas nos experimentos estejam ciclando normalmente, elas foram colocadas em gaiolas individuais e diariamente foram introduzidas no interior da vagina 1-2 gotas de soro fisiológico que, em seguida, foram aspiradas e colocadas em lâmina de histologia para leitura microscópica imediata (técnica de Long & Evans, 1922) para reconhecimento das fases do ciclo estral. As ratas foram utilizadas após a obtenção de 2 a 3 ciclos estrais regulares¹⁸.

3.4 Ovariectomia

A remoção cirúrgica dos dois ovários foi realizada nas ratas anestesiadas com solução de Cloridrato de Cetamina 10% (Ketamina Agener, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil; 75mg/kg) associada à Xilazina (dopaser, Laboratórios Calier S/A, Barcelona, Espanha; 10mg/kg), administrada por via intraperitoneal¹⁹. Logo após a realização da anestesia, foi realizada a tricotomia da região abdominal direita e antissepsia com PVPI. O acesso foi realizado com o auxílio de uma tesoura das camadas de derme e epiderme, subcutânea e muscular. Foi realizada a exploração da região para a identificação das trompas e ovários direito e esquerdo, o laqueamento das tubas e a retirada dos ovários. Os tecidos foram adequadamente reposicionados e realizados a sutura em planos empregandose fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4-0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio multifilamentar (Nylon 4-0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo. No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

3.5 Funcionalização dos Implantes – Dip-coating

Os implantes foram funcionalizados através da técnica de incorporação: Dip-coating que consiste imersão dos implantes em uma solução com a finalidade de formar camadas ao redor dos implantes. Foram realizadas 5 camadas ao redor dos implantes de acordo com a necessidade observada através dos testes preliminares, dessa forma o maior número de camadas garante que durante a inserção dos implantes no leito cirúrgico a funcionalização da superfície não seria perdida, por meio de testes preliminares pela Universidade de São Paulo de Bauru pelo grupo de pesquisa do professor parceiro Paulo Noronha Lisboa Filho. A funcionalização dos implantes foi realizada com as seguintes concentrações: 0.5g de Vitamina K2 diluída em 10 ml de etanol em 100 ml de DMSO para serem instalados nos grupos SHAM VIT K, OVX VIT K e OVX RIS VIT K. Com a solução adequadamente preparada, a

solução de vitamina K2 foi colocada sobre os implantes através da técnica de pipetagem, a próxima camada só poderia ser adicionada quando a anterior estivesse totalmente seca pelo dessecador, em que era garantida a secagem do implante e a proteção do meio externo ao implante. Após a formação das 5 camadas e secagem adequada dos implantes os mesmos foram instalados nos animais de forma imediata.

FIGURA 2 - Sequência da funcionalização com a vitamina K



Sequência da funcionalização com a vitamina K – A: Preparo da solução de vitamina K; B: Preparo dos implantes em Luz ultravioleta UV; C: Implantes posicionados dentro da câmara UV; D: Realização da primeira camada com a medicação.

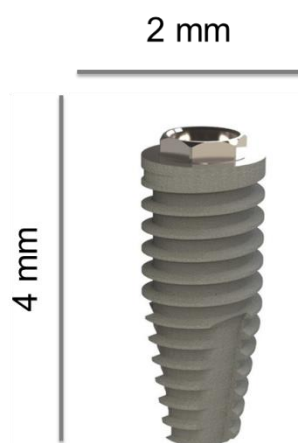
Fonte: Autor, 2023

3.6 Cirurgia para instalação dos implantes ósseointegráveis nas tíbias

Após 30 dias do tratamento medicamentoso, as ratas foram submetidas à instalação dos implantes nas tíbias. Foram instalados 54 implantes de titânio comercialmente puro grau IV com superfície tratada por duplo ataque ácido (ácidos nítrico, fluorídrico e sulfúrico) e 54 implantes funcionalizados pela técnica de dipcoating com vitamina K, com diâmetro de 2 mm e altura de 4 mm, esterilizados por raios gama. Para tanto, a fresagem foi realizada com fresa espiral de 1,3 mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de

sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), e contra-ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany) e profundidade de 3,0 mm, com travamento e estabilidade inicial.

FIGURA 3 - Dimensões do implante instalado nas tíbias



Fonte: Autor, 2023

Cada animal recebeu um implante na metáfise tibial. Os tecidos foram suturados em planos empregando-se fio absorvível (Poligalactina 910 – Vycril 4-0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos contínuos no plano profundo e com fio multifilamentar (Nylon 4-0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano mais externo. No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

3.7 Tratamento Medicamentoso

Passados 30 dias das cirurgias fictícias ou ovariectomia, os animais do grupo OVX/RIS e OVX/RIS (VIT K) foram submetidos ao tratamento medicamentoso através de gavagem com risedronato (0,35 Mg/kg/dia) uma vez por semana²⁰.

Tabela 2 - Distribuição dos grupos de acordo com o tratamento a ser realizado

Grupos Experimentais	Tratamento
SHAM	Sem tratamento
SHAM VIT K	Implante funcionalizado com vitamina K
OVX	Sem tratamento
OVX VIT K	Implante funcionalizado com vitamina K
OVX RIS	Risedronato sistêmico
OVX RIS VIT K	Risedronato sistêmico e implante funcionalizado com vitamina K

Fonte: Autor, 2023

3.8 Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 28 dias após a instalação dos implantes. As tíbias foram coletadas e fixadas em formol tamponado 10% por 48 horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água corrente por 24 horas e na sequência serão armazenadas em álcool 70 (processamento de tecido calcificado).

3.9 Análise Biomecânica

Para a realização da análise Biomecânica, foram utilizadas as tíbias das 54 ratas fêmeas, que receberam instalação de um implante em cada tíbia: grupos: SHAM=9, SHAM (VIT K)=9, OVX=9, OVX (VIT K)=9, OVX RIS=9 e OVX RIS (VIT K)=9. Os implantes expostos nas peças foram conectados a partir do hexágono do implante à chave do torquímetro digital. Foi aplicado um movimento anti-horário, aumentando-se o torque de remoção, até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, a fim de romper-se completamente o contato osso-implante. O dispositivo registrou o pico máximo de torque para esse rompimento, em Newton por centímetro (N.cm). Os valores obtidos foram agrupados e submetidos à análise estatística.

3.10 Análise Estatística

Para a comparação entre os resultados encontrados nos diversos grupos experimentais da análises de biomecânica (contra-torque), foram submetidos à

análise estatística pelo software GraphPad Prisma 7.01. Os valores foram tabulados, em seguida submetidos ao teste de homoscedasticidade. Foi confirmada a distribuição normal dos dados obtidos e na sequência, estes foram submetidos ao teste Análise de Variância (ANOVA) 2 fatores (condição sistêmica e superfícies dos implantes) e com pós teste de Tukey, estabelecendo nível de significância ($p < 0,05$).

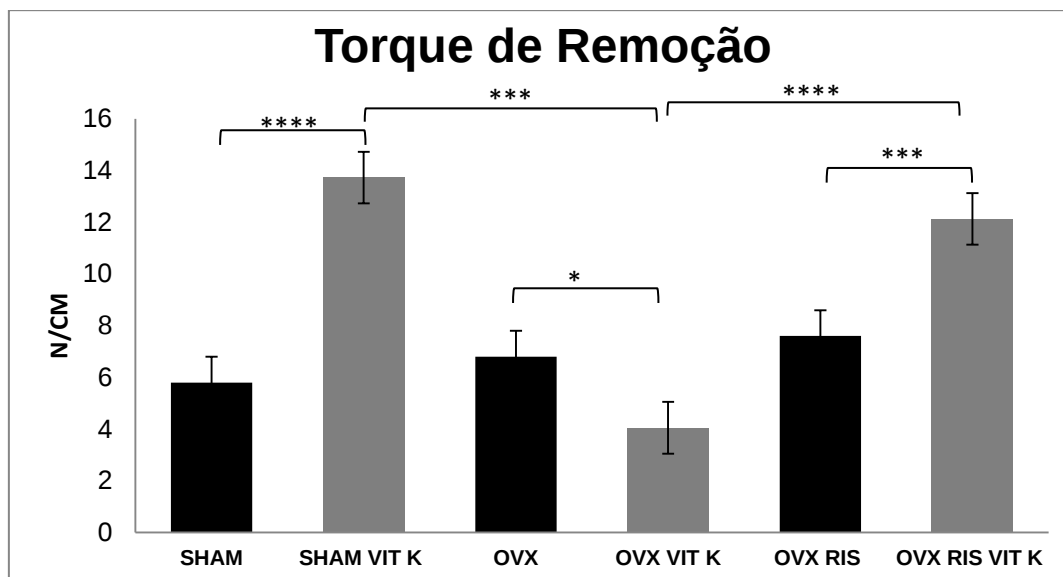
Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Resultado biomecânico (torque de remoção)

Aos 28 dias após a instalação de implantes foi realizado a eutanásia dos animais e no momento da eutanásia foi realizado a análise de torque de remoção, desse modo é possível observar os seguintes valores para os grupos: SHAM 5,8 N/cm, para o grupo SHAM VIT K de 13,73 N/cm, o grupo OVX 6,8 N/cm, OVX VIT K 4,05 N/cm, e por fim os grupos que receberam o risedronato sistêmico que foi de OVX RIS 7,6 N/cm e OVX RIS VIT K 12,13 N/cm. Os grupos SHAM VIT K e OVX RIS VIT K obtiveram valores superiores quando em comparação aos demais grupos. Houve diferença estatística significativa entre os grupos SHAM vs. SHAM VIT K, SHAM VIT K vs. OVX VIT K, OVX vs OVX VIT K, OVX VIT K vs. OVX RIS VIT K e OVX RIS vs OVX RIS VIT K. **(Gráfico 1)**

Gráfico 1 - Avaliação biomecânica através do torque de remoção aos 28 dias após a instalação dos implantes. Comparação entre os grupos



Discussão

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, procuramos avaliar a eficácia do tratamento com risedronato sistêmico, em que a deficiência de estrógeno pode ser observada, especialmente durante a reparação óssea perimplantar. A osteoporose é uma condição sistêmica capaz de diminuir a densidade e massa óssea em indivíduos afetados por esta doença, levando a um risco aumentado de fraturas. O que leva ao aparecimento dessa doença (osteoporose) é, entre outros fatores, o estilo de vida^{21, 22}.

Atualmente, existe uma crescente procura por tratamentos reabilitadores com implantes dentários, e este tratamento tem sido cada vez mais procurado por pessoas que têm várias patologias como a osteoporose. Substâncias medicamentosas como o risedronato de sódio, na classe dos bisfosfonatos, estão bem descritos na literatura, o seu mecanismo de ação é feito pela ligação à hidroxiapatita óssea e a inibição da reabsorção óssea que é mediada pelos osteoclastos, aumentando assim a massa óssea e a força biomecânica^{14, 23} este medicamento é considerado como uma terapia no tratamento da osteoporose.

Além do tratamento sistêmico que é bem consolidado na literatura atual, o tratamento local tem alcançado sua relevância devido à ausência de alterações sistêmicas adversas que em muitos casos o tratamento com medicamentos pode causar no organismo^{24, 25}. O tratamento de superfície de implantes tem sido cada vez mais estudado e realizado. A vitamina K2 desempenha um papel importante no tecido ósseo e tem sido amplamente discutida devido a sua interferência na manutenção do osso²⁶⁻³⁰. De acordo com estudos, ela é responsável por ativar (cofator) a carboxilação de proteínas da matriz óssea como a osteocalcina que participa no processo de mineralização óssea, proteína Gla de matriz (proteína MGP), proteína rica em Gla, proteína S e proteína 6 que vão regular e sintetizar a matriz óssea, além de estarem envolvidas dentro do processo de remodelação óssea¹⁷.

De acordo com os resultados apresentados, é possível observar na análise de torque de remoção que visa avaliar a força necessária para remover o implante instalado na tíbia, que houve diferenças estatísticas entre os grupos convencionais (SHAM, OVX e OVX RIS) e os grupos funcionalizados com a vitamina K2. É possível

observar valores superiores para o grupo SHAM VIT K, demonstrando assim que o tratamento da superfície do implante com a vitamina K melhorou o processo de reparação periimplantar, superando os valores do grupo controle (SHAM), ou seja, que o tratamento local do implante com a vitamina K superou a qualidade do implante convencional. O grupo tratado com o risedronato sistêmico OVX RIS teve o seu desempenho melhorado quando associado ao tratamento local com a vitamina K2. O uso sistêmico do risedronato de sódio observado pelo grupo OVX RIS nesse estudo melhora parcialmente a biomecânica do osso reparacional, em contrapartida participa da manutenção óssea, uma vez que os resultados não melhoram, porém se mantêm. Esse mecanismo do risedronato se dá pela inibição da atividade osteoclástica no tecido ósseo.

Houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos SHAM VIT K e OVX VIT K, demonstrando que o tratamento local tem uma maior efetividade no grupo SHAM (controle) do que no grupo OVX que possui a deficiência de estrógeno, quando receberam o tratamento local. Entretanto também houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos OVX VIT K e OVX RIS VIT K, demonstrando que a associação do tratamento sistêmico do risedronato de sódio com o tratamento local (vitamina K) é capaz de melhorar a osseointegração e o desempenho do grupo com a deficiência de estrógeno, fazendo com que os valores de SHAM VIT K sejam semelhantes ao grupo OVX RIS VIT K.

Analisando os resultados deste estudo, é interessante salientar a necessidade de mais estudos com o risedronato de sódio quando analisamos um tecido em processo de reparação com implantes dentários como o realizado neste estudo, associando também outras substâncias medicamentosas suplementares. O tratamento local na superfície do implante com a vitamina K realizado nesse estudo houve resultados positivos e que devem se consolidar através da realização de novos estudos, a fim de alcançar o padrão ouro nas reabilitações com implantes dentários, a osseointegração.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados nesse estudo, é possível concluir que a funcionalização dos implantes com vitamina K2 apresenta resultados promissores e tanto nos animais saudáveis, assim como nos animais ovariectomizados e tratados com risedronato sistêmico, possui um desempenho superior aos implantes convencionais. Mais estudos são necessários para que as vias de sinalização envolvidas nestas respostas sejam mais bem analisadas.

Referências

REFERÊNCIAS

1. ENSRUD, K. E.; CRANDALL, C. J. Osteoporosis. **Annals of Internal Medicine**, v. 167, n. 3, p. ITC17–ITC32, 2017.
2. BUCK, D. W.; DUMANIAN, G. A. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 129, n. 6, p. 1314–1320, jun. 2012.
3. REGINSTER, J. Y.; BURLET, N. Osteoporosis: a still increasing prevalence. **Bone**, v. 38, n. 2 Suppl 1, p. S4-9, fev. 2006.
4. MARCO, F. *et al.* Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. **Micron**, v. 36, n. 7–8, p. 630–644, 2005.
5. SHIBATA, Y. *et al.* A review of improved fixation methods for dental implants. Part II: biomechanical integrity at bone-implant interface. **Journal of Prosthodontic Research**, v. 59, n. 2, p. 84–95, abr. 2015.
6. TELLA, S. H.; GALLAGHER, J. C. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 142, p. 155–170, jul. 2014.
7. RESZKA, A. A.; RODAN, G. A. Mechanism of action of bisphosphonates. **Current Osteoporosis Reports**, v. 1, n. 2, p. 45–52, set. 2003.
8. MILLER, P. D. Optimizing the management of postmenopausal osteoporosis with bisphosphonates: the emerging role of intermittent therapy. **Clinical Therapeutics**, v. 27, n. 4, p. 361–376, abr. 2005.
9. TANG, B. M. P. *et al.* Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older: a meta-analysis. **Lancet**, v. 370, n. 9588, p. 657–666, ago. 2007.
10. EBETINO, F. H. *et al.* The relationship between the chemistry and biological activity of the bisphosphonates. **Bone**, v. 49, n. 1, p. 20–33, jul. 2011.
11. SILVERMAN, S. L. *et al.* Effectiveness of bisphosphonates on nonvertebral and hip fractures in the first year of therapy: the risedronate and alendronate (REAL) cohort study. **Osteoporosis International**, v. 18, n. 1, p. 25–34, jan. 2007.
12. YANO, T. *et al.* Risedronate improves bone architecture and strength faster than alendronate in ovariectomized rats on a low-calcium diet. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 32, n. 6, p. 653–659, nov. 2014.
13. ROELOFS, A. J. *et al.* Influence of bone affinity on the skeletal distribution of fluorescently labeled bisphosphonates in vivo. **Journal of Bone and Mineral**

Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research, v. 27, n. 4, p. 835–847, abr. 2012.

14. YANO, T.; YAMADA, M.; INOUE, D. Effect of sequential treatment with bisphosphonates after teriparatide in ovariectomized rats: a direct comparison between risedronate and alendronate. **Calcified Tissue International**, v. 101, n. 1, p. 102–110, jul. 2017.
15. REGINSTER, J. et al. Randomized trial of the effects of risedronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. Vertebral Efficacy with Risedronate Therapy (VERT) Study Group. **Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, v. 11, n. 1, p. 83–91, 2000.
16. BROWN, J. P. et al. Bisphosphonates for treatment of osteoporosis: expected benefits, potential harms, and drug holidays. **Canadian Family Physician Medecin de Famille Canadien**, v. 60, n. 4, p. 324–333, abr. 2014.
17. PALERMO, A. et al. Vitamin K and osteoporosis: myth or reality? **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 70, p. 57–71, maio 2017.
18. EVANS, H. M.; LONG, J. A. Characteristic effects upon growth, oestrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 8, n. 3, p. 38–39, mar. 1922.
19. RAMALHO-FERREIRA, G. et al. Alveolar bone dynamics in osteoporotic rats treated with raloxifene or alendronate: confocal microscopy analysis. **Journal of Biomedical Optics**, v. 20, n. 3, p. 038003, mar. 2015.
20. ITOH, A. et al. Interaction between Bisphosphonates and Mineral Water: Study of Oral Risedronate Absorption in Rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 3, p. 323–328, 2016.
21. HIPPISELEY-COX, J.; COUPLAND, C. Predicting risk of osteoporotic fracture in men and women in England and Wales: prospective derivation and validation of QFractureScores. **BMJ**, v. 339, p. b4229, 19 nov. 2009.
22. ASPRAY, T. J.; HILL, T. R. Osteoporosis and the Ageing Skeleton. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 91, p. 453–476, 2019.
23. NANCOLLAS, G. H. et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: differences in interactions with hydroxyapatite. **Bone**, v. 38, n. 5, p. 617–627, maio 2006.
24. SOKMEN, N. et al. Effect of Primary Stabilisation on Osseointegration of Implants With Local and Systemic Zoledronic Acid Application. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 33, n. 5, p. 1276–1281, 1 ago. 2022.

25. ABTAHI, J. et al. Effect of local vs. systemic bisphosphonate delivery on dental implant fixation in a model of osteonecrosis of the jaw. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 3, p. 279–283, mar. 2013.
26. IWAMOTO, J.; TAKEDA, T.; SATO, Y. Retracted Note: Effects of Vitamin K2 on Osteoporosis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 27, n. 19, p. 2325, 2021.
27. MYNENI, V. D.; MEZEY, E. Regulation of bone remodeling by vitamin K2. **Oral Diseases**, v. 23, n. 8, p. 1021–1028, nov. 2017.
28. MERRA, G. et al. Role of vitamin K2 in bone-vascular crosstalk. International Journal for Vitamin and Nutrition Research. Internationale Zeitschrift Fur Vitamin- Und Ernährungsforschung. **Journal International De Vitaminologie Et De Nutrition**, 30 ago. 2022.
29. WEN, L. et al. Vitamin K-dependent proteins involved in bone and cardiovascular health (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 18, n. 1, p. 3–15, jul. 2018.
30. AKBARI, S.; RASOULI-GHAHROUDI, A. A. Vitamin K and Bone Metabolism: A Review of the Latest Evidence in Preclinical Studies. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 4629383, 2018.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – FOA UNESP (nº0523-2021)



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



ceua
araçatuba

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Funcionalização da superfície de implantes com Vitamina K associada à terapia sistêmica com risedronato de sódio, vitamina D e Cálcio: qual o impacto sobre o reparo ósseo peri-implantar em ratas com deficiência de estrógeno?"**, Processo FOA nº 0523-2021, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Fevereiro de 2022.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 24 de Setembro de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 24 de Outubro de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Implant surface functionalization with Vitamin K associated with systemic therapy with risedronate sodium, vitamin D and calcium: what is the impact on peri-implant bone repair in estrogen-deficient rats?"**, Protocol FOA nº 0523-2021, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on February 24, 2022.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: September 24, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: October 24, 2023.



Prof. Dr. João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

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

ANEXO B

Os dados apresentados na dissertação serão submetidos na revista *Biology* (Qualis A1 e fator de impacto 5.168 no ano de 2021)

