



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Gustavo Da Col dos Santos Pinto

**Avaliação da osseointegração de uma superfície hidrofílica em osso do tipo IV: estudo
pré-clínico em ilíacos de coelhos**

Araraquara

2019



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Gustavo Da Col dos Santos Pinto

Avaliação da osseointegração de uma superfície hidrofílica em osso do tipo IV: estudo pré-clínico em ilíacos de coelhos

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Implantodontia

Orientador: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior

Araraquara

2019

Pinto, Gustavo Da Col dos Santos

Avaliação da osseointegração de uma superfície hidrofílica em osso do tipo IV: estudo pré-clínico em ilíacos de coelhos / Gustavo Da Col dos Santos Pinto. -- Araraquara: [s.n.], 2019 39 f. ; 30 cm.

Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior

1. Interface osso-implante 2. Osseointegração
3. Implantes dentários I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Jorge, CRB-8/5036
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Gustavo Da Col dos Santos Pinto

Avaliação da osseointegração de uma superfície hidrofílica em osso do tipo IV: estudo pré-clínico em ilíacos de coelhos

Comissão Julgadora

Tese para a obtenção do grau de Doutor em Odontologia

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior

2º Examinador : Prof. Dr. Roberto Henrique Barbeiro

3º Examinador: Prof. Dr. Francisco de Assis Mollo Junior

4º Examinador: Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira

5º Examinador: Prof. Dr. Rafael Silveira Faeda

Araraquara, 28 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES

Gustavo Da Col dos Santos Pinto

NASCIMENTO: 23 de fevereiro de 1988, Ribeirão Preto, São Paulo

FILIAÇÃO: Francisco Carlos dos Santos Pinto / Rosi Helena Bestetti Da Col dos Santos Pinto

2009 - Graduação em Odontologia pela Universidade de São Paulo

2013 – Estágio na University of Illinois at Chicago (UIC)

2014 - Mestrado em Reabilitação Oral pela Universidade de São Paulo

2019 – Doutorado em Implantodontia – Universidade Estadual Paulista Julho de Mesquita Filho – UNESP - Araraquara.

....Ao meu eterno professor,

Dr. Elcio Marcantonio...

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que com seu amor incondicional sempre acreditaram em meus sonhos e estiveram ao meu lado para lutar por eles.

À minha esposa, por estar sempre ao meu lado, dando o apoio e o amor necessários para que eu realizasse meus sonhos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, pelas inúmeras oportunidades concedidas, entre elas, realizar o sonho de fazer o doutorado e a especialização sob sua orientação.

À família Marcantonio, que me acolheu com todo carinho e me ensinou muito sobre a profissão e a vida.

Ao Prof. Dr. Guilherme Oliveira, por todos os ensinamentos durante o doutorado e pela sua amizade.

Ao Prof. Rafael Faeda, por sua amizade, auxílio intelectual e ajuda durante os experimentos com os coelhos.

Aos demais pós-graduandos envolvidos neste projeto, **Amanda e Matusalém**, que foram essenciais para que a concretização deste estudo.

À Claudinha, por toda ajuda durante a confecção das amostras analisadas.

À FOAR-UNESP e ao Programa de Pós-graduação, pela oportunidade de realizar meu Doutorado nesta instituição que tanto admiro e respeito.

À empresa Neodent, pelo apoio e auxílio com os materiais utilizados no projeto.

À CAPES:

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Pinto GDCS. Avaliação da osseointegração de uma superfície hidrofílica em osso do tipo IV: estudo pré-clínico em ilíacos de coelhos [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a osseointegração de uma superfície hidrofílica (Jateamento + ataque ácido + imersão em solução isotônica) em comparação a uma superfície hidrofóbica (Jateamento + ataque ácido), utilizando um modelo experimental de osso tipo IV, obtido através da instalação de implantes de titânio no osso ilíaco de coelhos. Para realização do estudo, 24 animais foram submetidos a instalação de 4 implantes no osso ilíaco bilateralmente, sendo 2 implantes com superfície hidrofóbica e dois implantes com superfície hidrofílica. Os coelhos foram submetidos à eutanásia nos períodos de 2, 4 e 8 semanas após a instalação dos implantes. Após a eutanásia, um implante de cada superfície foi utilizado para execução da análise de torque de remoção. Enquanto isso, o outro implante foi utilizado para execução de cortes histológicos não-descalcificados e para avaliação do contato direto entre o osso e a superfície do implante (%BIC) e da fração de área de tecido ósseo entre as roscas dos implantes (%BBT). Os implantes com superfície hidrofílica apresentaram maiores valores de torque de remoção no período de 8 semanas (76.13 ± 16.00 Ncm² vs. 52.77 ± 13.49 Ncm²) e maiores valores de %BIC (42.92 ± 2.85 % vs. 29.49 ± 10.27 %) e de %BBT (34.32 ± 8.52 % vs. 23.20 ± 6.75 %) do que os implantes com superfície hidrofóbica no período experimental de 2 semanas. Implantes com superfície hidrofílica apresentaram aceleração no processo de osseointegração, que culmina em uma maior estabilidade secundária em osso do tipo IV em comparação aos implantes com superfície hidrofóbica.

Palavras-Chave: Interface osso-implante. Osseointegração. Implantes dentários.

Pinto GDCS. Evaluation of hydrophilic surface osseointegration in type IV bone: preclinical study in rabbits iliac bone [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the osseointegration of a hydrophilic surface (blasting + acid etching + immersion in isotonic solution) in comparison with that of a hydrophobic surface (blasting + etching) using an experimental model of type IV bone obtained through the installation of titanium implants in a rabbit's iliac bone. To perform the study, 24 animals were submitted to the installation of 4 implants in the iliac bone bilaterally: 2 implants with a hydrophobic surface and 2 implants with a hydrophilic surface. The rabbits were euthanized at 2, 4 and 8 weeks after implant installation. After euthanasia, one implant from each surface was used to perform the removal torque analysis, whereas the other implant was used for the execution of nondecalcified histological sections and evaluation of the bone implant contact (% BIC) as well as the fraction of bone tissue area between the implant threads (% BBT). The implants with a hydrophilic surface presented higher values of removal torque in the 8-week period (76.13 ± 16.00 Ncm² vs. 52.77 ± 13.49 Ncm²) and higher % BIC values ($42.92 \pm 2.85\%$ vs. $29.49 \pm 10.27\%$) and % BBT ($34.32 \pm 8.52\%$ vs. $23.20 \pm 6.75\%$) than implants with a hydrophobic surface in the experimental period of 2 weeks. Implants with a hydrophilic surface exhibited acceleration in the process of osseointegration that culminates in a greater secondary stability in type IV bone than in implants with a hydrophobic surface.

Key words: Bone-implant interface. Osseointegration. Dental implants.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	10
2.1 Objetivo Geral	10
2.2 Objetivos Específicos	10
2.3 Hipóteses	10
3 REVISÃO DA LITERATURA	11
4 MATERIAL E MÉTODO	24
4.1 Modelo Experimental	24
4.2 Delineamento Experimental.....	24
4.3 Procedimento Cirúrgico	25
4.4 Avaliação Biomecânica	26
4.5 Análise Histométrica	26
4.6 Análise Estatística.....	27
5 RESULTADO	29
5.1 Avaliação Biomecânica	29
5.2 Análise Histométrica	29
6 DISCUSSÃO	31
7 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXO	39

1 INTRODUÇÃO

A utilização de implantes dentais osseointegráveis no tratamento do edentulismo parcial ou total tem sido amplamente utilizado nos últimos anos^{1,2} e a exigência por resultados rápidos, mesmo em condições desfavoráveis, tem motivado uma série de pesquisas^{3,4}. Alterações no desenho do implante, diferentes superfícies e novas técnicas cirúrgicas têm sido introduzidas para melhorar e acelerar o contato osso-implante, além de para obtenção da estabilidade secundária e distribuição da carga mastigatória⁵⁻⁸, especialmente em áreas onde o osso é constituído de grande parte medular.

Modificações estruturais podem ser executadas ao nível da macro e microestrutura dos implantes⁹. Elas atuam em estágios distintos, sendo que as alterações da macroestrutura estão relacionadas com a obtenção da estabilidade primária, enquanto que as alterações de microestrutura estão envolvidas na estabilidade secundária dos implantes⁹⁻¹¹. As alterações nas superfícies dos implantes visam a melhorar suas propriedades físico-químicas, tais como: rugosidade superficial, molhabilidade e composição química, com intuito de obter maior deposição óssea sobre a superfície do implante e diminuir o período de reparo do sítio cirúrgico. Estas modificações contribuem para o menor tempo e a melhor qualidade da osseointegração^{8,12}.

Diversos estudos testaram as superfícies hidrofílicas em comparação às superfícies convencionais e foi possível notar que, quando a superfície do titânio foi modificada, o processo de osseointegração ocorreu de maneira precoce. Estes resultados estão relacionados às vantagens proporcionadas pelas superfícies hidrofílicas no processo inicial de osseointegração, que favorecem a deposição óssea ao redor dos implantes^{8,12-14}. Entretanto, boa parte desses estudos têm sido executados em modelos pré-clínicos e em ossos longos, como tibia e fêmur, que apresentam como características mimetizarem osso do tipo I ou II⁶.

De fato, o uso de superfícies hidrofílicas acelerara a osseointegração em ossos longos, quando comparados aos implantes de superfície hidrofóbica¹⁴; entretanto, o comportamento dessas superfícies em osso do tipo IV carecem de maiores investigações. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi o de comparar o processo de osseointegração em implantes com superfície hidrofílica e hidrofóbica instalados em osso ilíaco de coelhos.

2 PROPOSIÇÃO

Apresentamos, a seguir, os objetivos que motivaram este estudo.

2.1 Objetivo Geral

O objetivo desse estudo foi avaliar o processo de osseointegração em implantes com superfície hidrofílica e hidrofóbica que foram instalados em osso ilíaco de coelhos.

2.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar o efeito de uma superfície hidrofílica sobre o contato osso-implante e na formação óssea na região das roscas de implantes instalados em osso ilíaco de coelhos, em comparação a uma superfície hidrofóbica.

b) Avaliar o efeito de uma superfície hidrofílica sobre o torque de inserção e remoção de implantes instalados em osso ilíaco de coelhos, em comparação a uma superfície hidrofóbica.

2.3 Hipóteses

H0-Implantes com superfície hidrofílica e hidrofóbica não apresentam diferenças com relação à osseointegração dos implantes

H1- Implantes com superfície hidrofílica e hidrofóbica apresentam diferenças com relação à osseointegração dos implantes

3 REVISÃO DA LITERATURA

Buser et al.¹³ (1991) avaliaram a aposição óssea em uma superfície de implante modificada por jateamento de partículas de óxido e ataque ácido, em comparação a uma superfície que foi modificada pelo mesmo processo e, em seguida, armazenada em solução isotônica de NaCl. Para este estudo, os autores utilizaram 6 mini-pigs, em um modelo experimental de boca dividida. Os dentes anteriores da maxila foram removidos, cuidadosamente, e, após 6 meses de cicatrização, foram instalados de 3 a 4 implantes na maxila de cada animal. Os implantes com a superfície modificada pelo processo de jateamento de partículas, ataque ácido e armazenados em uma solução isotônica NaCl apresentaram maior porcentagem de contato osso-implante, quando comparados ao grupo controle (superfície de implante modificada por jateamento de partículas e ataque ácido) nos períodos de 2 (49,30 vs 29,42%; $p=0,017$) e 4 semanas (81,91 vs. 66,57%; $p=0,011$). No período de 8 semanas os resultados foram similares entre os grupos de implantes. Os autores concluíram que os implantes com superfície modificada e armazenados em solução isotônica NaCl promovem uma maior aposição óssea nos primeiros estágios da regeneração óssea.

Ferguson et al.¹⁴ (2006) compararam a superfície SLA com a SLA quimicamente modificada (modSLA), e o aumento da molhabilidade da superfície modSLA foi verificado através da análise do ângulo de contato dinâmico. Neste estudo, foi utilizado um modelo animal em porcos, com desenho experimental boca dividida, no qual testes de torque de remoção foram realizados para determinar as propriedades biomecânicas da interface osso-implante. Todos os implantes tinham um forma cilíndrica com configuração de roscas padrões. Os testes de torque de remoção foram realizados após 2, 4 e 8 semanas de cicatrização óssea ($n = 9$ animais por período de cicatrização, três implantes por tipo de superfície por animal) para avaliar a resistência ao cisalhamento de cada tipo de superfície. Os resultados revelaram que a superfície modSLA foi mais eficaz quanto à resistência ao cisalhamento em comparação à superfície SLA convencional, durante os estágios iniciais de cicatrização. Os valores de torque de remoção dos implantes com superfície modSLA foram de 8 a 21% mais elevados do que os implantes de SLA ($p < 0,003$). Os valores médios do torque de remoção para os implantes de modSLA foram 1,485 Nm em 2 semanas, 1,709 Nm em 4 semanas e 1,345 Nm em 8

semanas; para os implantes SLA os valores correspondentes foram, 1,231 Nm, 1,585 Nm e 1,143 Nm. A rigidez da interface osso-implante calculada a partir do torque de remoção dos implantes, e ela foi em média 9-14% maior para o implantes modSLA quando comparados com os implantes SLA ($p < 0,038$). Sendo assim, os autores concluíram que a superfície modSLA alcança melhor ancoragem óssea durante os estágios iniciais da osseointegração. Esse fato pode estar relacionado à modificação química realizada na superfície SLA padrão, o que possivelmente promoveu o aumento de aposição óssea sobre o implante e alterou a resistência ao cisalhamento da interface osso-implante.

Schwarz et al.¹⁵ (2007) avaliaram a regeneração óssea dos implantes (3,3mm por 8mm) com tratamentos de superfície SLActive e SLA padrão, instalados em regiões de deiscência óssea vestibular, em um modelo experimental em cães. Quatro cães do tipo beagle foram utilizados neste estudo. Em cada animal foi realizada uma cirurgia para confecção de 4 defeitos ósseos de 3 mm de comprimento por 3mm de largura, sendo 2 defeitos executados na mandíbula e 2 na maxila, onde foram instalados 1 implante de cada grupo por arcada. Análises do comprimento do defeito, da altura óssea ao redor do implante, da porcentagem de preenchimento linear, do contato osso-implante e da área de preenchimento de osso novo foram realizadas. Como resultado, os autores observaram que, nos implantes SLA padrão, a cicatrização foi predominantemente caracterizada pela formação de tecido conjuntivo denso tanto no período de 2 semanas como também no período de 12 semanas. Já nos implantes do tipo SLActive, os autores observaram que, no período de 12 semanas, já havia um total preenchimento do defeito por tecido ósseo. Os resultados das análises histomorfométricas revelaram os seguintes valores médios em 12 semanas para os implantes SLActive: altura óssea ao redor do implante ($3.2 \pm 0.3\text{mm}$); porcentagem de preenchimento linear (98%); contato osso implante (82%) e área de osso neoformado ($2.3 \pm 0.4\text{mm}$). Os autores concluíram que implantes com superfície SLActive podem promover a regeneração óssea em implantes instalados em áreas de deiscência óssea.

Schwarz et al.¹⁶ (2007) avaliaram a regeneração óssea de implantes dos tipos SLA e SLActive instalados em regiões de deiscência óssea, que foram mantidos submersos ou expostos a cavidade oral. Doze cães da raça beagle foram submetidos à cirurgia, nas quais foram realizados, em cada animal, 16 defeitos ósseos de 3 mm de comprimento por 3mm de largura, sendo 8 na mandíbula e 8 na

maxila. Quatro meses após a realização do defeito, foram instalados implantes no mesmo local aonde foram realizados os defeitos, seguindo um modelo experimental de boca dividida, no qual cada animal recebeu 8 implantes do tipo SLA padrão e 8 implantes do tipo SLActive. Dos implantes instalados, cada grupo teve 4 implantes submersos ao tecido para cicatrização, e os outros 4 foram mantidos não submersos. Os cães foram divididos aleatoriamente em 4 grupos com 3 cães em cada. Sendo assim, os animais foram sacrificados nos períodos de 1, 2, 4 e 8 semanas, após a instalação dos implantes. As análises realizadas foram: altura do osso novo (NBH), porcentagem de preenchimento ósseo do defeito vestibular (PLF), contato osso implante (BIC%) área de formação de osso novo (BAFO) e análise imunohistoquímica. Houve diferença estatisticamente significava apenas no período de 8 semanas onde os implantes SLA não submersos e submersos revelaram significativamente menor valor médio de NBH (1.1 ± 0.8 - 1.9 ± 1.2 mm), PLF (27.7 ± 20.3 - $46.0 \pm 28.5\%$), BIC-D (26.8 ± 10.4 - $46.2 \pm 16.2\%$) e BF (1.3 ± 0.9 - 3.4 ± 2.8 mm²) do que os implantes SLActive [NBH (2.6 ± 0.8 - 4.3 ± 0.1 mm), PLF (64.2 ± 19.4 - $107.2 \pm 4.7\%$), BIC-D (67.5 ± 18.8 - $82.1 \pm 14.8\%$), BF (2.9 ± 1.0 - 6.7 ± 1.1 mm²)]. Dentro dos grupos SLActive, os valores de BAFO foram mais elevados para os implantes submersos. Os autores concluíram que os implantes SLActive promoveram uma melhora na regeneração óssea guiada quando comparados aos implantes SLA. Assim como os implantes SLActive mantidos submersos apresentaram também melhores resultados do que esse mesmo tipo de implante que não foram mantidos submersos.

Bornstein et al.¹⁷ (2008) avaliaram a aposição óssea ao redor de implantes de titânio com superfície modificada por jateamento e condicionamento ácido (modSLA) em comparação com a superfície SLA padrão. Neste estudo experimental realizado em cães, os animais foram submetidos à exodontia de todos os pré-molares e molares da arcada inferior (n= 5). Após um período de cicatrização de 6 meses, cada lado da mandíbula recebeu seis implantes dentários distribuídos aleatoriamente alternando entre a superfície modSLA e SLA padrão. Os cães foram sacrificados em 2 (n = 2) ou 4 semanas (n = 3) após a instalação dos implantes. Análises histológicas e histomorfométricas foram então realizados para cada implante. Os padrões de cicatrização microscópica para os dois períodos e superfícies testadas, apresentaram resultados qualitativos semelhantes. Os autores notaram que, em 2 semanas, o tecido ósseo neoformado já havia estabelecido

contato direto com as superfícies dos implantes. A porcentagem média do contato osso-implante (%BIC) foi significativamente maior para modSLA ($28,2 \pm 7,9\%$) do que para SLA ($22,2 \pm 7,3\%$) ($P < 0,05$). Essa diferença deixou de ser evidente após 4 semanas. Um aumento na %BIC para ambos os tipos de superfície do implante ocorreu no período entre 2 e 4 semanas. Esse aumento foi estatisticamente significativo quando comparado SLA em 2 semanas ($P < 0,05$), mas não quando comparado com modSLA em 2 semanas. Os dados do presente estudo demonstram aposição óssea significativamente maior para a superfície modSLA do que a superfície SLA padrão após 2 semanas de cicatrização. Esta maior aposição óssea pode permitir uma redução adicional do período de cicatrização após instalação de implante para pacientes submetidos a procedimentos de carregamento precoce.

Faeda et al.⁶ (2009) avaliaram, por meio de testes biomecânicos, a força necessária para remover implantes com superfícies modificadas por laser (Nd:YAG) em comparação a implantes com superfícies usinadas. Vinte e quatro coelhos receberam um implante da superfície usinada (U) e um implante com superfície modificada a laser (ML), na tíbia. Após 4, 8 e 12 semanas de cicatrização, o torque de remoção foi aferido. As superfícies estudadas foram analisadas de acordo com sua topografia, composição química e rugosidade. A média torque de remoção em cada período foi de 23.28, 24.0 e 33.85 Ncm para U e 33.0, 39.87 e 54.57 Ncm para ML, respectivamente. A diferença entre as superfícies, em todos os períodos de avaliação, foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A caracterização da superfície mostrou que uma topografia regular e profunda foi fornecida aos implantes através do condicionamento a laser, assim como maior quantidade de íons de oxigênio quando comparado com os implantes usinados. A análise micro-topográfica da superfície mostrou diferença estatística ($p < 0,01$) entre a rugosidade do grupo ML ($Ra = 1,38 \pm 0,23 \mu m$), quando comparado ao grupo U ($Ra = 0.33 \pm 0.06 \mu m$). Com base nesses resultados, foi possível concluir que as propriedades físico-químicas dos implantes ML aumentaram a interação osso-implantes quando comparado aos implantes do grupo U.

Abdel-haq et al.¹⁸ (2010) compararam as (20) características da osseointegração precoce dos implantes com superfície padrão (SLA) e modificado com jateamento e condicionamento ácido (modSLA) em um modelo experimental em ovelhas. Um total de 30 implantes SLA e modSLA foram instalados na tíbia de três ovelhas e análises do valor de torque de inserção (ITV) e de frequência de

ressonância (RFA) foram realizadas. A medição de RFA foi realizada nos períodos de 3 e 6 semanas após instalação dos implantes, momentos os quais os animais foram sacrificados para análise histomorfométrica. O contato osso-implante foi avaliado nas amostras não descalcificadas. Seis semanas após a instalação dos implantes, os mesmos foram submetidos ao teste de torque reverso (RTT). Os resultados foram analisados pelo teste de Friedman e Kruskal-Wallis e correlacionados a partir do teste de Spearman. Todos os implantes atingiram uma estabilidade primária com uma média de $36,13 \pm 2,47$ e $35,47 \pm 2,85$ N / cm . No estágio cirúrgico, os valores de RFA para os implantes SLA e modSLA foram $72,27 \pm 3,17$ e $71,6 \pm 2,87$, respectivamente. Após 3 semanas da instalação dos implantes, valores de %BIC ($80,6 \pm 13,89\%$) e RFA ($76,8 \pm 1,14$) dos implantes modSLA foram significativamente maior ($P = 0,0002$) do que os implantes de SLA ($64,39 \pm 21,2\%$ BIC e $74,2 \pm 4,76$ RFA). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os implantes SLA e modSLA após 6 semanas de cicatrização. Ambos os implantes revelaram resultados semelhantes no teste RTT ($115,2 \pm 4,14$ e $117 \pm 4,47$ N / cm para implantes SLA e modSLA, respectivamente). Dentro dos limites deste estudo piloto, os autores concluíram que os implantes modSLA alcançam um maior contato osso-implante e estabilidade, nos momentos iniciais da cicatrização, quando comparado com implantes SLA.

Mardas et al.²⁰ (2010) avaliaram a neoformação óssea sob cúpulas de titânio com revestimento de titânio com superfície padrão (SLA) e hidrofílica modificada (modSLA) instaladas na calvaria de coelhos com osteoporose e osteoporose tratadas com bisfosfonatos. Para realização deste estudo, foram utilizados 36 coelhos fêmeas da Nova Zelândia, sendo que em 24 deles a osteoporose experimental foi induzida por ovariectomia (OV) e dieta deficiente em cálcio. Doze coelhos OV foram tratados com sonda semanal de alendronato (Fosamaxs) (B) enquanto 12 coelhos OV não receberam tratamento (O). Outros 12 coelhos foram usado como controles saudáveis (C). Seis semanas após o OV, uma cúpula de titânio modSLA e uma SLA foram instaladas nas calvarias cada coelho. Os animais foram sacrificados após 30 e 120 dias da instalação das cúpulas. Após 30 dias de cicatrização, no grupo C, a área total de osso (TB) foi de 37,6% e 37,0% nas cúpulas modSLA e SLA, respectivamente. No grupo O, a TB foi de 35,7% e 24,8%. No grupo B, TB foi de 37,0% e 32,1%, respectivamente. Após 120 dias de cicatrização, no grupo C, a TB foi de 40,1% e 36,4%, respectivamente. No grupo O, a TB foi de

29,6% e 27,9%, respectivamente. No grupo B, a TB foi 49,7% e 42,5%, respectivamente. Análise hierárquica de variância mostrou que o tratamento da superfície influenciou significativamente na quantidade de osso neoformado em contato com o interior superfície da cúpula (BIC) independentemente do período de observação e do grupo ($P < 0.05$). A administração de bisfosfonatos influenciou no BIC ($P < 0,05$). Os autores concluíram que o uso da superfície modSLA pode promover a consolidação óssea e a osseointegração em coelhos osteoporóticos, enquanto a administração de bisfosfonatos pode comprometer osseointegração no período inicial de cicatrização.

Lee et al.¹⁹ (2013) avaliaram o efeito do diabetes experimental e controle metabólico na neoformação óssea seguindo o princípio GBR sob corpo de provas de titânio com superfícies hidrofóbica e hidrofílica. Três grupos com mesmo número de ratos da linhagem Wistar, selecionados aleatoriamente, foram criados: (a) diabetes não controlado, induzido por estreptozotocina (D); (b) diabetes controlado por insulina (CD); (c) saudável (H). Cada grupo foi, então, dividido em dois grupos de acordo com o período de cicatrização de 7 ou 42 dias, e os ratos foram submetidos a cirurgia para instalação de um corpo de prova com uma formato de cúpula, com superfícies internas hidrofóbica (SLA: A) ou hidrofílica (SLActive: B), na região da calvaria. No período de 42 dias de cicatrização, foi possível notar, em todos os grupos experimentais, a presença de neoformação óssea significativa. Houve uma tendência de aumento na neoformação óssea total (TB) nos grupos H e CD em comparação com o grupo D aos 42 dias de cicatrização. Além disso, a superfície de titânio SLActive mostrou uma tendência em promover uma formação óssea superior de TB no período inicial, comparada aos demais grupos experimentais; no entanto, essas diferenças não alcançaram significância estatística. Em relação ao contato osso-implante (BIC%) sob os dois tratamentos de superfície (SLA e SLActive), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos H, CD e D nos períodos de 7 e 42 dias. Apesar da presença de diabetes não controlada, os autores concluíram que a formação substancial de osso neoformado pode ser conseguida em amostras de titânio com uma superfície hidrofóbica e hidrofílica, e que a utilização da superfície de titânio SLActive pode apresentar uma tendência maior em promover a formação óssea em condições saudáveis e diabéticas aos 7 dias de cicatrização, no entanto, os dados obtidos não permitem conclusões significantes, sendo necessários estudos complementares.

Wennerberg et al.²¹ (2014) avaliaram como as nanoestruturas e molhabilidade influenciam na osseointegração além de identificar se a molhabilidade, as nanoestruturas ou ambos em combinação desempenham o papel-chave na melhoria da osseointegração. Vinte e seis coelhos adultos foram divididos em quatro grupos, de forma que cada grupo recebeu um tipo diferente de implante na tíbia (implante hidrofóbico sem nanoestrutura, hidrofóbico com nanoestrutura, hidrofílico com baixa densidade de nanoestrutura e hidrofílico com alta densidade de nanoestrutura). Foram realizadas análises da superfície dos implantes (ângulo de contato, escaneamento de superfície com microscópio eletrônico, rugosidade e topografia) e análise biomecânica após 4 e 8 semanas. As amostras hidrofóbicas mostraram níveis mais elevados de contaminação de carbono, em comparação com as amostras hidrofílicas. Após 4 e 8 semanas de cicatrização, o grupo com superfície hidrofílica e com alta densidade de nanoestrutura apresentou diferenças estatisticamente significativas tendo maiores valores de força de remoção, em comparação com os grupos com implante hidrofóbico sem nanoestrutura e hidrofóbico com nanoestrutura. Após 4 semanas, os implantes SLActive mostraram os valores mais elevados (85,3 [N]: 73,3-97,3) de força de extração do que SLA (40,4 [N], 28,5-52,4; $P = <0,0001$) e SLAnano (61,2 [N], 49,3-73,2; $P = 0,0100$). Após 8 semanas, as amostras SLActive (131,4 [N] : 114,7-125,3) demonstraram maior torque de remoção em comparação com SLAnano (96,4 [N]: 80,4-112,3; $P = 0,0036$) e SLA (93,7 [N]: 67,8-99,6; $P <0,0001$). Novamente SLActive vs. modSLA (121,4 [N]: CI: 105,6-137,4; $P = 0,7479$) demonstraram não ter diferença significativa, enquanto a modSLA apresentou maior torque de remoção em relação a SLA. Os autores desse estudo concluíram que a osseointegração foi melhor nos grupos que possuíam uma combinação de maior molhabilidade e presença de nanoestruturas.

Vasak et al.²² (2014) avaliaram o efeito dos estágios iniciais de osseointegração em um implante com superfície hidrofílica em comparação a uma superfície hidrofóbica. Para o estudo foram utilizados 9 mini-pigs, nos quais, em um primeiro procedimento cirúrgico foram realizadas extrações de todos os pré molares e após 12 semanas de cicatrização, instalados 12 implantes por animal, sendo que em cada quadrante foram alternando 3 tipos diferentes de implantes, INICELL (hidrofílica), SLActive (hidrofílica), e uma superfície hidrofóbica modificada por jateamento e ataque ácido. Os animais foram divididos em 3 períodos experimentais, sendo sacrificados 5, 10 e 15 dias após a instalação dos implantes.

Análises histológicas e histomorfométricas foram realizadas para mensurar o contato osso implante (BIC). Os resultados da análise histológica revelaram um padrão de cicatrização semelhante entre as superfícies hidrofílicas e a superfície hidrofóbica, com formação óssea extensa ocorrendo entre os períodos de 5 e 10 dias após instalação dos implantes. Com valores de BIC superiores a 50% após 10 dias, todas as superfícies examinadas mostraram-se favoráveis a osseointegração a partir deste momento experimental. No décimo quinto dia, o contato osso implante foi novamente aferido (newBIC) e o resultado da superfície hidrofílica (INICELL: $55,8 \pm 14,4\%$) foi ligeiramente maior que da superfície do hidrofóbica ($40,6 \pm 20,2\%$). Os autores concluíram que a superfície hidrofílica pode provocar uma ligeira tendência ao aumento da aposição óssea em minipigs após 15 dias.

Sartoretto et al.⁸ (2015) avaliaram o impacto de dois tipos diferentes de superfícies de implantes sobre a osseointegração. Vinte coelhos foram divididos em 2 grupos (n=10) que foram submetidos a colocação dos implantes em ambas as tíbias. Os animais foram divididos entre os grupos de acordo com o tipo de superfície de implantes: G1 – superfície do implante tratado com jateamento e condicionamento ácido e G2- superfície do implante tratada com jateamento e condicionamento ácido, em seguida, mantido em uma solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9%. Foram realizadas análises de morfologia e rugosidade dos implantes, antes dos mesmos serem inseridos nas tíbias dos coelhos. Após os períodos de 14 e 28 dias, os coelhos foram sacrificados e foram realizadas as análises histológicas de contato osso implante e histomorfométricas. Os implantes do grupo G2 apresentaram 3 vezes menos carbono em sua superfície, além de uma maior hidrofiliabilidade em comparação ao grupo G1. A rugosidade superficial foi semelhante entre os dois grupos e os resultados de contato osso implante (BIC) e de área ocupada por osso entre as roscas (BAFO) foram semelhantes no período de 14 dias. Após 28 dias, as medições de BIC e BAFO apresentaram diferenças estatisticamente significativas, onde os implantes do grupo G2 apresentaram maior grau de osseointegração em comparação ao grupo G1 (BIC: Grupo 1, $38,6 \pm 8,76$ e Grupo 2, $59,0 \pm 7,14$; BAFO: Grupo 1, $34,3 \pm 6,26$ e Grupo 2, $53,68 \pm 10,87$). Os autores desse estudo concluíram que a menor quantidade de carbono e o aumento da molhabilidade foram responsáveis pelos melhores resultados dos implantes com superfície tratada com jateamento e condicionamento ácido que foram mantidos em uma solução isotônica.

Ou et al.²³ (2016) avaliaram a osseointegração e resposta biomecânica dos implantes SLAffinity-Ti com camadas de micro e nano poros. A interação entre sangue e os implantes testados foram examinados. No total, 144 implantes com as seguintes superfícies foram utilizados: usinagem padrão (M-Ti), superfície SLA-Ti e superfície SLAffinity-Ti. Para cada animal, quatro implantes (um M-Ti, um SLA-Ti e dois SLAffinity-Ti) foram inseridos na mandíbula de cada mini-pig, na região dos dentes pré-molares, para observações histomorfométricas e outros quatro implantes foram inseridos na superfície plana no sentido antero-medial da tíbia traseira do animal para realização do teste de Torque de Remoção. Após 2, 4 e 8 semanas de instalação, os testes histomorfométricos e de torque de remoção foram conduzidos. Os valores de torque de remoção mostraram uma melhora significativa na estabilidade dos implantes SLAffinity-Ti ($84,5 \pm 8,7$ N-cm) após 8 semanas comparado aos implantes dos grupos M-Ti ($62,95 \pm 11,5$ N-cm) e SLAffinity-Ti ($76,1 \pm 6,6$ N-cm). Durante avaliação histológica, notou-se que a integração óssea ocorreu com todos os implantes depois de 8 semanas. Sendo assim, concluíram que a oxidação eletroquímica aumentou as camadas de óxido e melhorou a interação do sangue com a superfície dos implantes SLAffinity-Ti, resultando em uma aposição óssea significativamente maior com relação aos implantes SLAffinity-Ti após 2 e 8 semanas. Um aumento da estabilidade secundária dos implantes SLAffinity-Ti ao longo do período de cicatrização de 8 semanas também foi observada, o que indica possíveis melhorias no processo de osseointegração para implantes SLAffinity-Ti .

Gil et al.²⁴ (2016) avaliaram o efeito de três tratamentos de superfície produzidos de maneira altamente padronizada, através de jateamento micro-robotizado (alta, média e baixa rugosidade) em relação a um jateamento de produzido em maior escala (controle) na osseointegração precoce em modelo canino. Quatro implantes de liga de titânio de grau 2 comercialmente puros (uma de cada superfície) foram instalados bilateralmente nos rádios de seis cães da raça beagle e permaneceram durante os períodos de 1 e 6 semanas. Após o sacrifício, as peças obtidas (implantes + osso adjacente) foram processadas para análise morfológica e histométrica (avaliação do contato osso-implante (BIC); ocupação da fração da área óssea(BAFO)). A topografia da superfície foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura e interferometria óptica. Os resultados mostraram interação inicial de tecido osteogênico no período de uma semana e osso neoformado em íntimo contato com todas as superfícies dos implantes no período

de 6 semanas. A superfície de alta rugosidade, obtida através do jateamento micro-robotizado, apresentou maiores valores de BIC e BAFO, em relação as demais superfícies.

Alayan et al.²⁵ (2017) avaliaram o impacto de uma superfície hidrofílica (SLActive) no aumento do contato osso-implante (BIC) e composição do tecido adjacente, quando comparado à uma superfície hidrofílica padrão (SLA), em casos de implantes instalados em regiões onde foi realizado levantamento do seio maxilar. Nesse estudo, foram utilizadas quatro ovelhas, as quais foram submetidas à um procedimento cirúrgico para elevação de seio maxilar bilateral, com auxílio dos biomateriais; osso mineral bovino anorgânico + osso autógeno (ABBM + AB). Dezesseis implantes foram instalados, 12 semanas após a realização do enxerto, sendo que cada seio recebeu um implante do grupo controle (SLA) e um implante do grupo teste (SLActive). Dois animais foram sacrificados em 2 semanas e outros dois animais sacrificados em 4 semanas após a implantação dos implantes. Os oito seios-maxilares e 16 implantes foram processados para histomorfometria, para avaliação do contato osso-implante (% BIC) e os elementos teciduais (tecido ósseo - WB, osso lamelar - LB, tecido mole - ST) na região de implantes e seio-maxilar enxertado. Houve um aumento estatisticamente significativo na %BIC em 4 semanas quando comparados com as amostras de 2 semanas para os dois grupos, teste ($P < 0,005$) e controle ($P < 0,005$). Houve aumento estatisticamente significativo de %BIC em torno dos implantes do grupo teste quando comparado aos implantes de controle em ambos períodos. Maior %WB ($11,17\% \pm 6,82$) e maior % LB ($11,06\% \pm 3,67$) foram identificadas para os implantes teste quando comparados aos implantes do grupo controle, independentes do tempo. No entanto, diferença estatisticamente significativa foi notada apenas para % LB ($P < 0,05$). Uma redução estatisticamente significativa de $16,78\% (\pm 6,19)$ % ST foi notado nos implantes teste quando comparado aos implantes de controle ($P < 0,05$). O tempo e o uso da superfície do implante hidrofílico tiveram um impacto positivo na % BIC em torno dos implantes instalados em regiões de seios maxilares submetidos à enxertos. As superfícies dos implantes hidrofílicos também tiveram impacto positivo na composição do tecido circundante. Ensaios maiores são necessários para melhor avaliar e detectar diferenças entre estas duas superfícies, instalados em seios maxilares submetidos à enxertos com biomateriais.

Nemtoi et al.²⁶ (2017) avaliaram a osseointegração de diferentes

superfícies de implantes dentários em ratos diabéticos. Nesse estudo, foram utilizados 56 ratos Wistar machos, peso médio de 300-350 g. O diabetes foi induzido por uma única injeção intraperitoneal de estreptozotocina. Os níveis de glicose e peso de ratos foram avaliados periodicamente. Após a confirmação do diabetes mellitus, implantes dentários com superfícies (SLA) e SLActive, de 1 mm de diâmetro e 3 mm de comprimento foram inseridos na metáfise distal do fêmur esquerdo do animais. Ratos diabéticos têm naturalmente menor número de células ósseas e contato osso-implante (BIC%) do que ratos saudáveis ao usar o implante com superfície SLA, mas ao usar a superfície SLActive, os ratos diabéticos e saudáveis apresentaram os mesmos números de %BIC. Sendo assim, os autores puderam concluir que a utilização da superfície SLActive resultou em efeitos positivos em animais saudável e especialmente em ratos diabéticos, o que demonstra que poderia melhorar o progresso da osseointegração em humanos com diabetes.

Scarano et al.²⁷ (2017) avaliaram in vivo duas diferentes superfícies altamente hidrofílicas (superfície modificada por cálcio (CA) e SLActive), que foram avaliadas e um total de 18 implantes para cada tipo de superfície, posicionados na articulação do joelho femoral de coelho. As amostras foram avaliados histologicamente e histomorfometricamente aos 15, 30 e 60 dias após a instalação dos implantes. O contato osso-implante (BIC) nas superfícies dos dois grupos foi significativamente diferente em favor da superfície CA em 15 dias ($p = 0,027$), enquanto o SLActive não apresentou valores significativamente 30 ($p = 0,51$) e 60 dias ($p = 0,061$). Dentro das limitações do modelo experimental utilizado neste estudo, as avaliações de contato osso-implante indicaram que uma boa osteocondução ao longo das superfícies CA e SLActive ocorreu durante os primeiros 15 dias após a instalação dos implante, e altos valores de %BIC foram alcançado para ambas as superfícies após 60 dias. Estes resultados sugerem que ambas as superfícies dos implantes poderiam ser clinicamente vantajosas para encurtar o período de cicatrização dos implantes e favorecer carregamento precoce.

Qian et al.²⁸ (2018) avaliaram a neoformação óssea e osseointegração do implante após elevação do assoalho do seio-maxilar através da técnica transalveolar (TSFE) e instalação simultânea de implantes sem quaisquer materiais de enxerto, para investigar a influência da modificação da superfície do implante no processo de cicatrização óssea sob esta circunstância. Realizaram a elevação do assoalho do seio (TSFE) e instalação de implante simultâneo e bilateralmente em 12 cães

labradores. Nenhum material de enxerto foi utilizado durante a cirurgia. Implantes com duas superfícies diferentes (SLA e SLActive) foram instalados em um modelo experimental de boca dividida. Os animais foram sacrificados em 4, 8 e 24 semanas após a cirurgia para avaliação histológica e histomorfométrica. A porcentagem do contato osso e implante (BIC%), altura do osso alveolar (ABH) e as porcentagens de osso mineralizado (MB%) na área de interesse foram analisados. A profundidade de sondagem (PD) e sangramento sondagem (BOP) também foram avaliados para descrever condições de saúde dos tecidos envolvidos. Após avaliação dos dados, os autores observaram que houve uma neoformação óssea espontânea ao redor dos implantes, mesmo tendo sido realizado a elevação do seio maxilar sem quaisquer materiais de enxerto. Nenhuma evidência clara de formação óssea da membrana Schneideriana pode ser encontrada ao redor do implante. Mesmo que houvesse tendências para uma resposta óssea mais rápida dos implantes SLActive, este estudo não conseguiu apontar vantagem absoluta da superfície SLActive na obtenção formação óssea sob essa situação.

Pinotti et al.⁷ (2018) avaliaram a osseointegração de implantes com superfície hidrofílica em comparação a implantes com superfície lisa em diferentes áreas enxertadas. Cinquenta e seis animais foram divididos em quatro grupos distintos, de acordo com a superfície de implante e também a área enxertada, ficando com 14 animais em cada. Assim, tem-se, em DBB: Osso bovino desproteínizado (DBB) + Superfície usinada (U); HA/TCP: Cerâmica bifásica a base de β -fosfato de cálcio/Hidroxiapatita (HA/TCP) + Superfície U; em DBB-H: DBB + Superfície hidrofílica (H); HA/TCP-H: HA/TCP + Superfície H. Foram confeccionados defeitos nas tíbias de ratos que foram preenchidos com os biomateriais, e os implantes foram inseridos 60 dias após esse procedimento. Os animais foram submetidos à eutanásia nos períodos de 15 e 45 dias após a instalação dos implantes. A osseointegração foi avaliada por análises biomecânicas, histométricas, microtomográficas e imunohistoquímica. O grupo HA/TCP-H (2.71 ± 0.48 Ncm) apresentou maior contra torque para remoção de implantes e maior volume de tecidos mineralizados ao redor dos implantes que o grupo HA/TCP (1.71 ± 0.48 Ncm). Os grupos DBB-H e HA/TCP-H apresentaram maiores valores de contato osso-implante em ambos os períodos experimentais 15 ($14.08\% \pm 3.57\%$ e $15.75\% \pm 6.31\%$ respectivamente) e 45 dias ($39.6\% \pm 14.28\%$ e $44.33\% \pm 22.49\%$ respectivamente), de osso entre as roscas dos implantes no período de 45 dias ($44.79\% \pm 10.61\%$ e

47.07 $\pm$ 20.52% respectivamente), e de expressão de BMP2 (45 dias) do que os observados nos grupos DBB e HA/TCP. Os autores concluíram que implantes com superfície hidrofílica melhoram a osseointegração em áreas enxertadas em comparação com implantes com superfície usinada.

4 MATERIAL E MÉTODO

Nesta seção apresentamos os materiais utilizados na pesquisa, assim como a metodologia empregada.

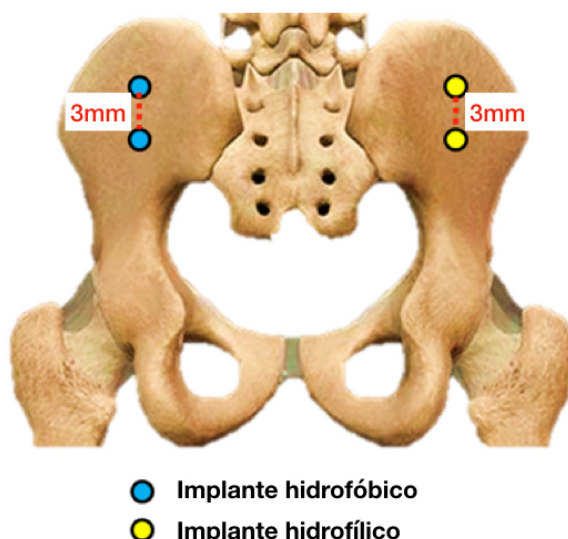
4.1 Modelo Experimental

Este projeto foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), após aprovação do Comitê de ética no uso de animais (CEUA) (ANEXO) da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP), número 11/2016. Para a presente pesquisa, foram utilizados 24 coelhos albinos da raça Nova Zelândia, machos, de aproximadamente 5 meses de idade e peso entre 4 e 5 quilogramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP, Campus de Botucatu, e mantidos no Biotério de Coelhos da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP, Campus de Araraquara, em um ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e consumo de ração sólida e água *ad libitum* durante todo o período experimental. Foi respeitado um período de 30 dias para aclimação dos animais nas instalações do biotério.

4.2 Delineamento Experimental

Para a avaliação da influência das diferentes microestruturas dos implantes de titânio no processo de osseointegração, 24 coelhos foram aleatoriamente divididos em 3 períodos experimentais (2, 4 e 8 semanas). Foram avaliados 2 tratamentos de superfície: Hidrofóbica |(NP - Jateamento + ataque ácido – Superfície NeoPoros®, Neodent, Curitiba, Brasil) e Hidrofílica (AQ - Jateamento + ataque ácido + imersão em solução isotônica de cloreto de sódio 0,9 % - Superfície Acqua®, Neodent, Curitiba, Brasil). Cada animal recebeu 4 implantes WS (Neodent Implante Osseointegrável, Neodent, Curitiba, PR, Brasil) com 4mm de diâmetro x 5mm de altura, sendo 2 com a superfície Hidrofílica (AQ) instalados no osso ilíaco do lado direito e 2 de superfície hidrofóbica (NP) instalados no lado esquerdo (Figura 1).

Figura 1- Distribuição dos implantes com diferentes tratamentos de superfície nos osso ilíaco direito e esquerdo



Fonte: Elaboração própria.

4.3 Procedimento Cirúrgico

Inicialmente, os animais foram pesados e anestesiados por via intramuscular, com uma combinação de quetamina (Quetamina Agener®; Agener União S.A. - 0,35 mg/kg) e xilazina (Dopaser® Laboratórios Calier S.A. Barcelona, Espanha - 0,5 mg/kg). Posteriormente, foi realizada tricotomia na região dorsal direita e esquerda referente ao osso ilíaco do coelho e antisepsia com iodo-povidine. Anestesia local (Cloridrato de Mepivacaína 2% + Adrenalina 1:100.000 - Scandicaïne® 2% - Spécialités Sptodont, Sain - Maur, França) também foi aplicada na região, para permitir uma vasoconstrição periférica diminuindo o sangramento local e otimizando o procedimento cirúrgico. Em seguida, com uma lâmina de bisturi nº 15 foi realizada uma incisão dermoperiosteal de aproximadamente 5 cm de comprimento, a qual permitiu o descolamento e exposição da superfície óssea do osso ilíaco. O preparo para instalação dos implantes foi realizado do lado direito e esquerdo, de modo que o osso foi fresado com brocas de metal sob refrigeração abundante com soro fisiológico. Foi respeitada sequência brocas recomendada pelo fabricante para instalação de implantes com 4,0 mm de diâmetro e 5,0 mm de altura. As perfurações iniciaram com a broca lança 2.0, seguidas das brocas 2.0, 2/3, 2.8, 3.15 e 3.3. Os implantes foram instalados inicialmente com contra-ângulo em baixa velocidade e finalizado manualmente, com auxílio da catrata-torquímetro, até a

obtenção da estabilidade primária e então, realizada a instalação dos parafusos de cobertura.

Foram instalados 2 implantes no íliaco direito com superfície hidrofóbica e 2 implantes no íliaco com superfície hidrofílica, com uma distância entre os implantes de 3 mm. Os mesmos foram distribuídos de maneira que, na região anterior de ambos os lados, tivesse 1 implante de cada superfície e na região posterior da mesma forma. Isto permitiu que, dos implantes instalados em cada região, um fosse submetido ao teste de torque de remoção, enquanto o outro, submetido à testes quantitativos do tecido ósseo formado ao redor dos implantes por meio de cortes histológicos não descalcificados.

Após a cirurgia, todos os animais receberam uma dose única de antibiótico (Pentabiótico®, Wyeth-Whitehall Ltda, São Paulo, Brasil - 0,1 ml/kg), Tramadol (dose: 5 mg/Kg IM). Os animais foram submetidos à eutanásia através de sobredose anestésica – 2, 4 e 8 semanas pós-operatórias – de acordo com os períodos experimentais de cada grupo. Os implantes situados na região anterior do osso íliaco foram submetidos imediatamente ao teste de remoção de torque reverso. Enquanto os implantes situados na região posterior, juntamente com o osso íliaco, foram armazenados em formol tamponado para avaliação histométrica.

4.4 Avaliação Biomecânica

No momento da instalação de todos os implantes, o torque inicial foi aferido, sendo este considerado torque de inserção. Após a eutanásia, em cada período de análise (2, 4 e 8 semanas), os implantes anteriores foram removidos. As amostras foram estabilizadas, uma chave hexagonal conectada tanto no implante como no torquímetro (Tohnichi, modelo ATG24CN-S - com escala graduada de 0.05 N/cm, medindo a força de 3 a 24 N/cm) e realizado um movimento anti-horário para remoção dos implantes, aumentando-se o torque até que ocorresse a rotação do implante no interior do tecido ósseo e rompimento completo da interface osso-implante. Este torque máximo necessário para movimentar o implante foi considerado o valor do torque de remoção.

4.5 Análise Histométrica

Os fragmentos do osso íliaco com os implantes foram submetidas ao processo de fixação com paraformaldeído a 4% por 48 horas e lavagem com água e,

posteriormente desidratados em solução de álcool em séries de concentração crescente. A infiltração plástica foi realizada com misturas de glicolmetacrilato (Technovit 7200 VLC) e álcool etílico, seguindo variações gradativas, finalizando com duas infiltrações de glicolmetacrilato puro. Após a infiltração plástica, os espécimes foram incluídos em resina e polimerizados. Posteriormente, os espécimes foram seccionados longitudinalmente, ao longo do eixo principal do implante, por meio de um disco de diamante de alta precisão. Os blocos foram montados em lâmina acrílica com o auxílio da resina Tecnovit 4000 (Kulzer, Wehrheim, Alemanha). Utilizando um sistema de corte e microdesgaste (Exact-Cutting, System, Apparatebau Gmbh, Hamburgo, Alemanha) as lâminas foram processadas para que tivessem uma secção de aproximadamente 50 a 70 μm de espessura. As peças foram coradas com Stevenel's Blue para a análise histomorfométrica³⁰. A histometria avaliou a quantidade de osso mineralizado em contato direto com a superfície do implante (%BIC – bone to implant contact) bem como a fração de área de tecido ósseo entre as roscas do implante (%BBT - bone between threads). As mensurações foram realizadas utilizando-se um microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Alemanha), com objetiva para aumento de 2.5 e 10 vezes, através do qual as imagens foram captadas e enviadas para um microcomputador, com o auxílio de uma câmera de vídeo (Leica Reichert & Jung products, Alemanha). A determinação dos valores foi feita utilizando um software analisador de imagens (Image J, Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA), por um examinador cego, calibrado e treinado para essa análise.

4.6 Análise Estatística

O cálculo amostral foi realizado através do teste de t-pareado com base nos dados histométricos do contato osso-implante do estudo de Faeda et al.⁶ 2009, o qual avaliou o efeito de diferentes superfícies de implantes sobre a osseointegração em coelhos. Foi verificado que a diferença entre as médias do BIC entre diferentes superfícies de implantes para promover uma diferença estatisticamente significativa foi de 25.95% com desvio padrão de 8.34. Portanto, a utilização de 8 coelhos por grupo em cada período seria suficiente para obtenção de um poder β do estudo maior que 0.9 e α de 0.05.

Para a análise dos resultados, foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, que demonstrou que os dados das análises biomecânicas e

histométricas se distribuíram de acordo com o teorema da distribuição central dos dados. Dessa forma, o teste paramétrico t-pareado foi utilizado para análise inferencial dos dados comparando-se dos diferentes grupos em cada período experimental. O teste de One-way Anova foi aplicado para comparação entre os diferentes períodos de avaliação dentro de cada grupo. O software GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para utilização dos testes estatísticos que foram aplicados ao nível de significância de 5%.

5 RESULTADO

5.1 Avaliação Biomecânica

Não houve diferenças nos torques de inserção dos implantes com diferentes microestruturas (Hidrofóbica vs. Hidrofílica). Existiu um aumento progressivo nos torques de remoção dos implantes em todos os grupos. Além disso, foi verificado que os implantes com superfície hidrofílica apresentaram maiores valores de torque de remoção do que os implantes com superfície hidrofóbica no período de 8 semanas. A Tabela 1 expõe os dados da análise biomecânica em ambos os grupos e nos períodos de avaliação

Tabela 1- Dados de média e desvio padrão dos valores de torque de inserção e remoção em ambos os grupos

Tipo de implante/Período	Torque de inserção		Torque de remoção	
	Imediato	2 semanas	4 semanas	8 semanas
Hidrofóbico	30.69 ± 8.94	27.58 ± 11.93 ^c	40.39 ± 25.31 ^{a,b}	52.77 ± 13.49 ^a
Hidrofílico	30.74 ± 9.44	25.23 ± 13.62 ^c	45.39 ± 14.86 ^b	76.13 ± 16.00 ^{*a}

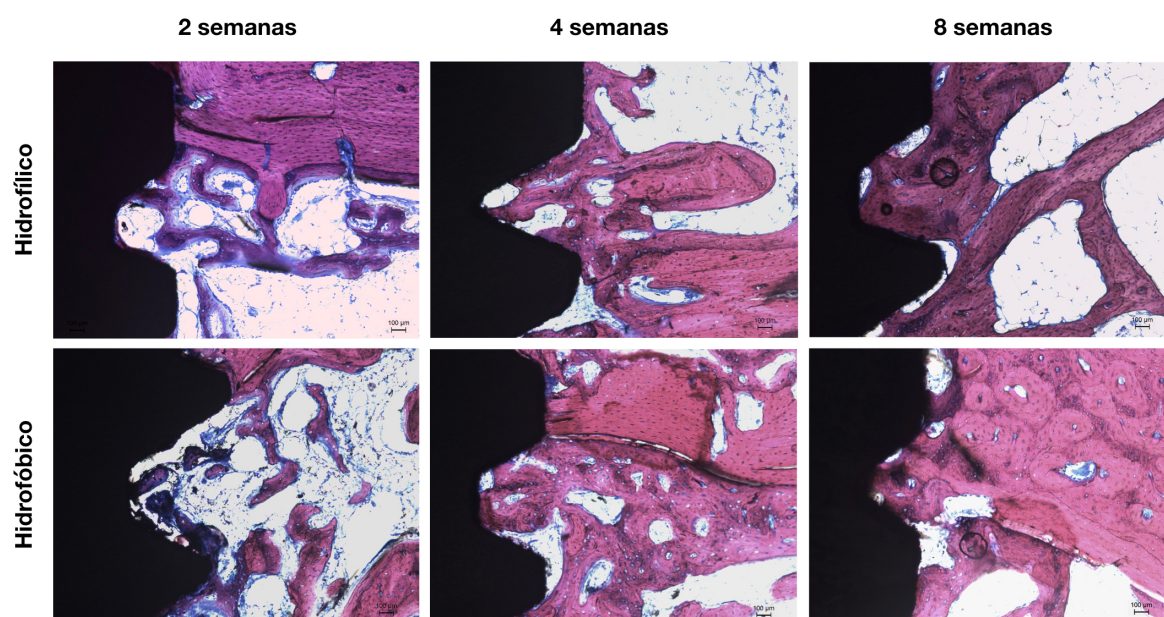
*p<0.05-Maior torque de remoção do que o grupo hidrofóbico– Teste t-pareado. Letras diferentes representam diferentes níveis de diferenças estatisticamente significativas dentro de cada grupo – Teste de One-way Anova complementado pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaboração própria.

5.2 Análise Histométrica

Foi verificado em ambas superfícies um aumento progressivo no grau de osseointegração que foi representado pelo aumento nas %BIC e de %BBT com o aumento do período experimental. Os implantes com superfície hidrofílica apresentaram maiores valores de %BIC e de %BBT do que os implantes com superfície hidrofóbica no período experimental de 2 semanas (Figura 2). A Tabela 2 expõe os dados de média e desvio padrão dos valores de %BIC e %BBT em ambos os grupos.

Figura 2- Cortes histológicos de implantes de titânico com superfície hidrofílica e hidrofóbica, instalados em osso ílfaco de coelhos. Períodos de 2, 4 e 8 semanas



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Tabela 2 - Dados de média e desvio padrão dos valores de %BIC e %BBT em ambos os grupos

Análise	Superfície	2 semanas	4 semanas	8 semanas
BIC	Hidrofóbico	29.49 ± 10.27 ^b	41.77 ± 11.91 ^{a,b}	54.80 ± 9.30 ^a
	Hidrofílico	42.92 ± 2.85 ^{**b}	53.74 ± 7.54 ^a	55.56 ± 4.69 ^a
BBT	Hidrofóbico	23.20 ± 6.75 ^b	41.77 ± 6.28 ^a	52.36 ± 6.83 ^a
	Hidrofílico	34.32 ± 8.52 ^{**b}	47.73 ± 16.16 ^{a,b}	53.22 ± 7.81 ^a

*p<0.05-Maior BIC e BBT do que o grupo hidrofóbico – Teste t-pareado. Letras diferentes representam diferentes níveis de diferenças estatisticamente significativas dentro de cada grupo – Teste de One-way Anova complementado pelo teste de Tukey.

Fonte : Elaboração própria.

6 DISCUSSÃO

De uma forma geral, pudemos observar que os implantes com superfícies hidrofílicas aceleraram o processo de osseointegração no período experimental de 2 semanas. O comportamento desta superfície parece ter refletido em uma melhor estabilidade secundária, observada no período de 8 semanas, quando foi comparado o torque de remoção dos implantes hidrofílicos e hidrofóbicos, instalados no osso ilíaco de coelhos, região que mimetiza o osso de tipo IV .

Um dado importante desse estudo é que a estabilidade primária dos implantes não foi influenciada por sua superfície. Esse achado corrobora os dados de outros estudos que demonstram que a obtenção da estabilidade primária está mais relacionada ao desenho da macroestrutura dos implantes^{31,32}. Como os implantes desse estudo apresentavam o mesmo design, era esperado que a estabilidade primária entre os grupos, fosse semelhante. Dessa forma, a evolução da estabilidade secundária não foi influenciada por diferenças na estabilidade inicial dos implantes e sim devido às diferenças microestruturais.

Uma vez obtida a estabilidade primária durante a instalação dos implantes, inicia-se um período de remodelação óssea, no qual ocorre uma cascata de reações celulares que levam a diferenciação de osteoblastos, produção de fatores osteogênicos, assim como citocinas e fatores de crescimento, que fazem parte do processo de neoformação de osso na região³. Com isso, ocorre uma redução na estabilidade primária e o início da estabilidade secundária³². Essa transição é considerada um momento crítico para o processo de osseointegração.

Foi possível verificar, que os implantes com superfície hidrofílica apresentaram maior %BIC e de %BBT em um período precoce de 2 semanas, em comparação aos implantes de superfície hidrofóbica. Esse fato tem sido corroborado por outros estudos que demonstraram ocorrer uma maior atração celular proporcionada pela superfícies hidrofílicas quando comparada às superfícies hidrofóbicas^{13,14,17}. Buser et al.¹³ obtiveram resultados semelhantes ao avaliarem %BIC de implantes com diferentes tratamentos de superfície, instalados em mini porcos. Os implantes com a superfície modificada (jateamento de partículas, ataque ácido e armazenamento em solução isotônica) favoreceram a neoformação óssea, quando comparado ao grupo controle (superfície de implante modificada por jateamento de partículas e ataque ácido) no período de 2 semanas (%BIC 49.30 vs

29.42; $p=0,017$). Bornstein et al.¹⁷ também obtiveram resultados semelhantes ao analisar %BIC de implantes instalados em cães. Os autores notaram que, em 2 semanas, a porcentagem média do contato osso-implante foi significativamente maior para implantes com a superfície hidrofílica (modSLA $28,2 \pm 7,9\%$ vs SLA $22,2 \pm 7,3\%$, $P<0,05$). Assim como demonstramos nesse estudo, Bornstein et al.¹⁷ verificaram que essa diferença deixou de ser evidente após 4 semanas. Pinotti et al.⁷, realizaram um estudo comparativo em tibiais de ratos, no qual testaram o comportamento de implantes, hidrofílicos e hidrofóbicos, em área enxertada e concluíram, que a superfície hidrofílica teve maiores valores de %BIC e %BBT, do que a superfície hidrofóbica após 15 dias da instalação dos implantes. Em estudo similar, realizado em tíbias de coelhos, Sartoretto et al.⁸, constataram que os valores de %BIC e %BBT obtidos pela superfície hidrofílica testada, após 28 dias, eram aproximadamente, 1.5 vezes maiores do que os valores referentes à superfície hidrofóbica.

Neste estudo, foi possível notar que mesmo com maiores valores de %BIC e %BBT no período de 2 semanas, os valores de torque de remoção dos implantes com superfície hidrofílica só foram estatisticamente superior no período de 8 semanas, quando comparados aos implantes com superfície hidrofóbica. Isso poderia ser justificado pelo fato de que, mesmo com a maior deposição óssea sobre a superfície dos implantes hidrofílicos, a condição de mineralização do osso neoformado ainda não tenha sido suficiente para obtenção de uma boa estabilidade primária até a 8ª semana de período experimental. Provavelmente, a aceleração do processo de formação de tecido ósseo promovido pelas superfícies hidrofílicas também causaram uma repercussão na aceleração da obtenção da estabilidade secundária dos implantes devido ao mais avançado estágio de maturação óssea em relação ao que ocorre nos implantes com superfície hidrofóbica, o que justificaria essa diferença no torque de remoção com 8 semanas, mesmo com ausência de diferenças nos padrões de %BIC e de %BBT nesse período. Esta teoria teria que ser comprovada com outros testes que não foram possíveis neste estudo. Ferguson et al.¹⁴ realizaram um estudo de boca dividida em porcos, no qual avaliaram os valores de torque de remoção de implantes com diferentes superfícies e constaram que a força necessária para remoção dos implantes modSLA foi em média 9-14% maior do que para a remoção dos implantes SLA ($p < 0,038$), nos períodos de 2, 4 e 8 semanas.

Um ponto forte a se ressaltar nesse estudo é que os implantes com diferentes superfícies foram testados em um modelo experimental no qual os mesmos foram instalados no osso ilíaco de coelhos. Esta metodologia foi sugerida por ser um modelo experimental que se aproxime mais à realidade encontrada nos ossos gnáticos tipo III e IV de seres humanos, o que, de fato, é uma condição mais desafiadora para obtenção de um bom processo de osseointegração. Estudos prévios foram realizados, em sua maioria, em ossos longos de coelhos (tíbia), que apresentam características ósseas distintas daquelas encontradas em seres humanos tais como presença de canal medular extenso, instalação bicortical dos implantes e osso do tipo I⁶.

Esse estudo apresenta algumas limitações que devem ser levadas em consideração a se interpretar os resultados. O modelo experimental utilizado, não refletirá, necessariamente, o que ocorrerá em ossos gnáticos do tipo IV em seres humanos, apesar de considerarmos melhor que o modelo que usa ossos longos. A desconsideração em relação a outros protocolos que podem acelerar o processo de osseointegração, tais como a aplicação do carregamento imediato desses implantes também não é possível de se mimetizar nesse tipo de modelo, e é possível que esse tipo de protocolo acelere também a osseointegração de implantes com superfície hidrofóbica, tal como já foi demonstrado em estudos anteriores^{31,33,34}.

7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que os implantes com superfície hidrofílica apresentam um processo de osseointegração mais rápido do aqueles com superfície hidrofóbica, o que culmina em uma maior estabilidade secundária em osso do tipo IV. Sendo assim, acredita-se que implantes com superfícies hidrofílicas sejam mais indicados para região de ossos tipo III e IV.

REFERÊNCIAS*

1. Papaspyridakos P, Mokti M, Chen C-J, Benic GI, Gallucci GO, Chronopoulos V. Implant and prosthodontic survival rates with implant fixed complete dental prostheses in the edentulous mandible after at least 5 Years: a systematic review. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2013; 16(5): 705–17.
2. Astrand P, Ahlqvist J, Gunne J, Nilson H. Implant treatment of patients with edentulous jaws: a 20-year follow-up. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2008; 10(4): 207-17.
3. Wennerberg A, Albrektsson T. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Impl Res*. 2009; 20: 172–84.
4. Coelho PG, Giro G, Teixeira HS, Marin C, Witek L, Thompson VP, et al. Argon-based atmospheric pressure plasma enhances early bone response to rough titanium surfaces. *J Biomed Mater Res*. 2012; 100A(7): 1901–6.
5. Junker R, Dimakis A, Thoneick M, Jansen JA. Effects of implant surface coatings and composition on bone integration: a systematic review. *Clin Oral Impl Res*. 2009; 20(s4): 185–206.
6. Faeda RS, Tavares HS, Sartori R, Guastaldi AC, Marcantonio E. Biological performance of chemical hydroxyapatite coating associated with implant surface modification by laser beam: biomechanical study in rabbit tibias. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 67(8): 1706–15.
7. Pinotti FE, de Oliveira GJPL, Aroni MAT, Marcantonio RAC, Marcantonio E Jr. Analysis of osseointegration of implants with hydrophilic surfaces in grafted areas: a preclinical study. *Clin Oral Impl Res*. 2018; 29(10): 963–72.
8. Sartoretto SC, Alves AT, Resende RF, Calasans-Maia J, Granjeiro JM, Calasans-Maia MD. Early osseointegration driven by the surface chemistry and wettability of dental implants. *J Appl Oral Sci*. 2015; 23(3): 279-87.

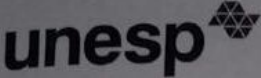
* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

9. Javed F, Romanos GE. The role of primary stability for successful immediate loading of dental implants. A literature review. *J Dent.* 2010; 38(8): 612-20.
10. Meredith N, Book K, Friberg B, Jemt T, Sennerby L. Resonance frequency measurements of implant stability in vivo. A cross-sectional and longitudinal study of resonance frequency measurements on implants in the edentulous and partially dentate maxilla. *Clin Oral Implants Res.* 1997; 8(3): 226-33.
11. Romanos GE, Testori T, Degidi M, Piattelli A. Histologic and histomorphometric findings from retrieved, immediately occlusally loaded implants in humans. *J Periodontol.* 2005; 76(11): 1823-32. Erratum in: *J Periodontol.* 2006; 77(2): 326-7.
12. Lang NP, Salvi GE, Huynh-Ba G, Ivanovski S, Donos N, Bosshardt DD. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans. *Clin Oral Impl Res.* 2011; 22(4): 349–56.
13. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res.* 1991; 25(7): 889-902.
14. Ferguson SJ, Broggini N, Wieland M, de Wild M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, et al. Biomechanical evaluation of the interfacial strength of a chemically modified sandblasted and acid-etched titanium surface. *J Biomed Mater Res.* 2006; 78A(2): 291–7.
15. Schwarz F, Herten M, Sager M, Wieland M, Dard M, Becker J. Bone regeneration in dehiscence-type defects at chemically modified (SLActive) and conventional SLA titanium implants: a pilot study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2007; 34(1): 78-86.
16. Schwarz F, Sager M, Ferrari D, Herten M, Wieland M, Becker J. Bone regeneration in dehiscence-type defects at non-submerged and submerged chemically modified (SLActive®) and conventional SLA titanium implants: an immunohistochemical study in dogs. *J Clin Periodontol* 2007. 2008; 35(1): 64-75.
17. Bornstein MM, Valderrama P, Jones AA, Wilson TG, Seibl R, Cochran DL. Bone apposition around two different sandblasted and acid-etched titanium implant surfaces: a histomorphometric study in canine mandibles. *Clin Oral Impl Res.* 2008; 19(3): 233–41.
18. Abdel-Haq J, Karabuda CZ, Arisan V, Mutlu Z, Kürkçü M. Osseointegration and stability of a modified sand-blasted acid-etched implant: an experimental pilot study in sheep. *Clin Oral Impl Res.* 2010; 22(3): 265–74.

19. Lee S-B, Retzepi M, Petrie A, Hakimi A-R, Schwarz F, Donos N. The effect of diabetes on bone formation following application of the GBR principle with the use of titanium domes. *Clin Oral Impl Res.* 2012; 24(1): 28–35.
20. Mardas N, Chadha V, Donos N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. *Clin Oral Impl Res.* 2010; 21(7): 688–98.
21. Wennerberg A, Jimbo R, Stübinger S, Obrecht M, Dard M, Berner S. Nanostructures and hydrophilicity influence osseointegration: a biomechanical study in the rabbit tibia. *Clin Oral Impl Res.* 2013; 25(9): 1041–50.
22. Vasak C, Busenlechner D, Schwarze UY, Leitner HF, Munoz Guzon F, Hefti T, et al. Early bone apposition to hydrophilic and hydrophobic titanium implant surfaces: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Clin Oral Impl Res.* 2013; 25(12): 1378–85.
23. Ou K-L, Hsu H-J, Yang T-S, Lin Y-H, Chen C-S, Peng P-W. Osseointegration of titanium implants with SLAffinity treatment: a histological and biomechanical study in miniature pigs. *Clin Oral Invest.* 2016; 20(7):1515–24.
24. Gil LF, Marin C, teixeira H, Marão HF, Tovar N, Khan R, et al. The effect of controlled microrobotized blasting on implant surface texturing and early osseointegration. *J Biomater Appl.* 2016; 30(7): 900–7.
25. Alayan J, Vaquette C, Saifzadeh S, Hutmacher D, Ivanovski S. Comparison of early osseointegration of SLA ®and SLActive ®implants in maxillary sinus augmentation: a pilot study. *Clin Oral Impl Res.* 2016; 28(11): 1325–33.
26. NemȚoi A, Trandafir V, Pașca AS, Șindilar EV, Drăgan E, Odri GA, et al. Osseointegration of chemically modified sandblasted and acid-etched titanium implant surface in diabetic rats: a histological and scanning electron microscopy study. *Rom J Morphol Embryol.* 2017; 58(3): 881–6.
27. Scarano A, Piattelli A, Quaranta A, Lorusso F. Bone response to two dental implants with different sandblasted/acid-etched implant surfaces: a histological and histomorphometrical study in rabbits. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 8724951.
28. Qian SJ, Mo JJ, Shi JY, Gu YX, Si MS, Lai HC. Endo-sinus bone formation after transalveolar sinus floor elevation without grafting with simultaneous implant placement: histological and histomorphometric assessment in a dog model. *J Clin Periodontol.* 2018; 45(9): 1118-27.

29. Donath K, G B. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol.* 1982; 11(4): 318–26.
30. Coelho PG, Granjeiro JM, Romanos GE, Suzuki M, Silva NR, Cardaropoli G, et al. Basic research methods and current trends of dental implant surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 88(2): 579-96.
31. Ganeles J, Zöllner A, Jackowski J, Bruggenkate ten C, Beagle J, Guerra F. Immediate and early loading of Straumann implants with a chemically modified surface (SLActive) in the posterior mandible and maxilla: 1-year results from a prospective multicenter study. *Clin Oral Impl Res.* 2008; 19(11): 1119–28.
32. Beer A, Gahleitner A, Holm A, Tschabitscher M, Homolka P. Correlation of insertion torques with bone mineral density from dental quantitative CT in the mandible. *Clin Oral Implants Res.* 2003; 14(5): 616-20.
33. Morton D, Bornstein MM, Wittneben JG, Martin WC, Ruskin JD, Hart CN, et al. Early loading after 21 days of healing of nonsubmerged titanium implants with a chemically modified sandblasted and acid-etched surface: two-year results of a prospective two-center study. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2010; 12(1): 9-17.
34. Bornstein MM, Wittneben JG, Brägger U, Buser D. Early loading at 21 days of non-submerged titanium implants with a chemically modified sandblasted and acid-etched surface: 3-year results of a prospective study in the posterior mandible. *J Periodontol.* 2010; 81(6): 809-18.

ANEXO – CERTIFICADO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



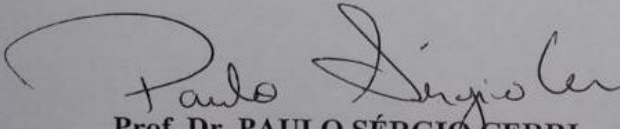
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada ***"OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DE TITÂNIO COM DIFERENTES MICRO E MACROESTRUTURAS - ESTUDO BIOMECÂNICO, HISTOMORFOMÉTRICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO EM OSSO MEDULAR (ILÍACO) E CORTICAL (TÍBIA) DE COELHOS"***, registrada com o nº 11/2016, sob a responsabilidade do(a) **Prof(a). Dr(a). Élcio Marcantonio Júnior** – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA** em reunião de 18/08/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Dezembro/2017
Espécie/linhagem	Coelho/ Nova Zelândia
Nº de animais	24
Peso/Idade	3-4 Kg – 5 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério da UNESP - Botucatu



Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Rua Humaitá nº 1.680 – Centro – CEP 14801-903 – Caixa Postal nº 331 - ARARAQUARA – SP
5º andar – fone (16) 3301-6459 / fax (16) 3301-6433 / e-mail: ceua@foar.unesp.br - home page: <http://www.foar.unesp.br>

Autorizo a publicação dos dados deste trabalho

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara , 28 de fevereiro de 2018.

Gustavo Da Col dos Santos Pinto