

LEONARDO FRANCHINI PAN MARTINEZ

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA
OSSEOINTEGRAÇÃO EM SUPERFÍCIE DE
IMPLANTE BIOATIVA DE TITÂNIO
REVESTIDA COM FOSFATO DE CÁLCIO**

Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2018

Leonardo Franchini Pan Martinez

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA
OSSEOINTEGRAÇÃO EM SUPERFÍCIE DE
IMPLANTE BIOATIVA DE TITÂNIO
REVESTIDA COM FOSFATO DE CÁLCIO**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal De Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração em Clínica Odontológica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Allyson Nogueira Moreira
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Walison Arthuso Vasconcellos

BELO HORIZONTE
2018

Ficha Catalográfica

P187a Pan Martinez, Leonardo Franchini .
2018 Avaliação histomorfométrica da osseointegração em
T superfície de implante bioativa de titânio revestida com
fosfato de cálcio / Leonardo Franchini Pan Martinez. --
2018.

115 f. : il.

Orientador: Allyson Nogueira Moreira.
Coorientador: Walison Arthuso Vasconcellos.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Osseointegração. 2. Implantes dentários. 3. Materiais
revestidos biocompatíveis. I. Moreira, Allyson Nogueira. II.
Vasconcellos, Walison Arthuso. III. Universidade Federal de
Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO ALUNO LEONARDO FRANCHINI PAN MARTINEZ

Aos 04 dias de julho de 2018, às 14:00 horas, na sala 3403 da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, reuniu-se a Comissão Examinadora composta pelos professores Allyson Nogueira Moreira (Orientador) – FO/UFMG, Walison Arthuso Vasconcellos (Coorientador) – FO/UFMG, Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira - UFU e Soraia Macari – FO/UFMG, para julgamento da dissertação de Mestrado, área de concentração em Clínica Odontológica, intitulada: **Avaliação histomorfométrica da osseointegração em superfície de implante bioativa de titânio revestida com fosfato de cálcio.** O Presidente da Banca, abriu os trabalhos e apresentou a Comissão Examinadora. Após a exposição oral do trabalho pelo aluno e arguição pelos membros da banca, a Comissão Examinadora considerou a dissertação:

Aprovado

Reprovado

Finalizados os trabalhos, lavrou-se a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão. Belo Horizonte, 04 de julho de 2018.

Prof(a). Allyson Nogueira Moreira

Prof(a). Walison Arthuso Vasconcellos

Prof(a). Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira

Prof(a). Soraia Macari

DEDICATÓRIA

Dedico essa minha conquista a **DEUS** que sempre me guia, ilumina e protege, por todos os caminhos da vida.

Eu dedico esta conquista as pessoas que amo e estão ao meu lado em todos os momentos, são meus alicerces como pessoa e homem. Aquelas que motivam e fundamentam a minha história: **A minha Família.**

Aos meus pais, **Sônia** e **Leider**, que me ensinaram o verdadeiro valor do conhecimento e do sentimento, sempre me apoiando e orientando em todas as minhas escolhas. Tudo que vivo hoje e sou devo a educação e os valores que recebi de vocês. Por isso, aos dois, o meu maior respeito e amor incondicional.

À minha noiva **Vitória**, por compartilhar cada momento do meu trabalho e da minha vida com amor, paciência e compreensão. Sempre entendendo meus anseios e momentos mais difíceis. Por me incentivar diariamente de forma plena e absoluta, comprovando o sentimento que nos une.

À minha irmã **Letícia** por incentivar e estar presente, sempre da sua forma em todos os meus caminhos, nas conquistas e nas derrotas. Procurando me dar motivação na busca dos meus objetivos ao decorrer da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradecer nesse momento para mim é poder reconhecer e reverenciar a todos dos quais precisei do apoio e incentivo durante a concretização dessa minha fase profissional que visa a construção de um sonho pessoal.

Assim, agradeço primeiramente a **DEUS**, pelo dom do amor, da existência, pela coragem, saúde e proteção constantes. Sem Ele nada nessa vida vale a pena!

Ao professor **Allyson Nogueira Moreira** pela confiança, pelos ensinamentos, orientações, pela ajuda nos momentos mais difíceis dessa caminhada, por ter confiado a mim o desafio de dar continuidade no desenvolvimento desse trabalho e me incentivado cada dia mais a seguir na carreira acadêmica e científica.

Ao professor e amigo **Walison Arthuso Vasconcellos**, pelos conselhos, por me proporcionar a oportunidade da pesquisa na Odontologia aliada à experiência clínica. Por ter mais uma vez contribuído para o meu crescimento profissional e pessoal, sempre me orientando em todos os momentos, pelo apoio, exemplo e estímulo como profissional.

Ao professor **Vinícius Magalhães Barros** pela amizade, por me conceder a oportunidade de dar sequência a esse estudo. Pela disposição a auxiliar, acompanhar e orientar sendo o grande responsável para que este trabalho fosse possível.

As professoras **Cláudia Silami de Magalhães, Mônica Yamauti, Raquel Conceição Ferreira, Soraia Macari, Tarcília Aparecida da Silva** e professores do colegiado de Pós-Graduação da FO-UFMG pelos auxílios e contribuições durante o mestrado.

Ao professor **Maurício Augusto Aquino de Castro** por me auxiliar na análise das imagens histológicas.

Aos amigos professores Herbert Haueisen Sander e Ricardo Rodrigues Vaz pela amizade e oportunidade de convivência durante essa fase da vida acadêmica que se estende desde o tempo de graduação.

Ao **Programa de Pós-Graduação da FO-UFMG**, coordenação e secretaria, pela organização e desenvolvimento de suas funções de uma maneira exemplar.

A amiga **Weridiana Mageswki** por não hesitar em auxiliar e promover a ajuda necessária na busca dos materiais utilizados nessa pesquisa.

Ao Departamento de Periodontia e equipe técnica dos laboratórios da Faculdade de Odontologia de Araraquara, em especial a **Ana Cláudia** por me receber de braços abertos nos laboratórios da FOAR-UNESP.

A todos os meus colegas do Curso de pós-graduação e em especial aos amigos **Daniel Braga, Lígia Cristelli e Luiz Novy** por todos os momentos divididos durante essa nossa etapa acadêmica.

Aos pacientes que tive o privilégio de atender e exercer a profissão que tanto me dedico durante as clínicas de pós-graduação, pelo voto de confiança e pela esperança que depositam em mim. Muito obrigado!

Aos animais do experimento usados nessa pesquisa, o meu profundo respeito!

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (Capes)** e **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)** pelo apoio financeiro.

Que a Fé e a coragem permaneçam sempre presentes nas conquistas e superações dos desafios em nossas vidas.

“Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor lembre-se: se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor com ele você conquistará o mundo”

(Albert Einstein)

RESUMO

O estudo realizou a avaliação e comparação histomorfométrica da osseointegração em superfícies de implantes compostas por titânio grau 4 (Ti_6Al_4V) submetidos ao tratamento de jateamento com alumina, erosão ácida e revestimento com fosfato de cálcio (BGTi37) em comparação com uma superfície controle microtexturizada sem o revestimento (Ticp) a partir de um estudo *in vivo* realizado em ratos Wistar machos. A amostra era composta por 24 tíbias com parafusos, medindo 1,5mm X 3mm instalados de forma aleatória nas tíbias de doze animais, onde cada animal recebeu um implante com o tratamento e outro implante sem revestimento para possibilitar a comparação. A avaliação histomorfométrica da osseointegração foi realizada por meio de análise da interação do contato osso-implante (BIC) e a fração da área óssea ocupada (BAFO), nos tempos de 14 e 28 dias, por um microscópio de luz e um software de análise de imagem. A partir da análise, foram calculadas porcentagens para BIC e BAFO apresentando valores de média e desvio padrão nos tempos propostos. Os resultados obtidos foram submetidos a teste estatístico, Shapiro-Wilk para confirmação dos padrões de normalidade e homocedasticidade. Foram aplicados os Testes-t de Student de amostras dependentes e independentes, para avaliação e comparação das diferentes superfícies nos tempos distintos. O estudo demonstrou um aumento significativo em BIC de $0,42 \pm 0,08$ em 14 dias para $0,57 \pm 0,13$ em 28 dias na superfície BGTi37 entre os tempos propostos. A porção medular demonstrou ser a região onde a diferença se demonstrou significativa ($0,28 \pm 0,21$ – 14 dias para $0,67 \pm 0,14$ – 28 dias). Não foram observadas diferenças significativas nos valores de BAFO. A osseointegração foi observada em ambas as superfícies e em todas as condições testadas com um aumento da formação óssea entre o período de 14 e 28 dias da superfície experimental na região medular por meio de BIC.

Palavras-chave: Osseointegração. Implante Dentário. Materiais revestidos.

ABSTRACT

The study performed the evaluation and histomorphometric comparison of osseointegration on surfaces of implants composed of grade 4 titanium (Ti6Al4V) submitted to the treatment of sandblasting, acid erosion and calcium phosphate coating (BGTi37) in comparison to a microtexturized control surface without the (Ticp) from an in vivo study performed on male Wistar rats. The sample consisted of 24 tibiae with screws, measuring 1.5mm X 3mm randomly installed in the tibiae of twelve animals, where each animal received an implant with the treatment and another implant without coating to allow the comparison. The histomorphometric evaluation of osseointegration was performed by means of bone-implant contact (BIC) and bone surface fraction (BAFO) analysis, at 14 and 28 days, by a light microscope and analysis software of image. From the analysis, percentages were calculated for BIC and BAFO presenting mean values and standard deviation at the proposed times. The results were submitted to statistical test, Shapiro-Wilk to confirm normality and homoscedasticity. Student's t-tests of independent and dependent samples were used to evaluate and compare the different surfaces at different times. The study demonstrated a significant increase in BIC from 0.42 ± 0.08 at 14 days to 0.57 ± 0.13 at 28 days on the BGTi37 surface between the proposed times. The medullary portion was shown to be the region where the difference was significant (0.28 ± 0.21 - 14 days to 0.67 ± 0.14 - 28 days). There were no significant differences in BAFO values. Osseointegration was observed on both surfaces and in all conditions tested with an increase in bone formation between the 14 and 28 days period of the experimental surface in the spinal region by means of BIC.

Key words: Osseointegration. Dental Implant. Coated Materials.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1:** Imagens ilustrativas do procedimento cirúrgico para instalação dos parafusos controle e experimental nas tíbias dos ratos. A - Perfuração sob irrigação com solução salina resfriada; B - perfuração finalizada; C - parafuso acoplado a chave manual de inserção; D - instalação do parafuso até alcançar estabilidade primária; E - reposicionamento da musculatura; F - retalho suturado após nova assepsia com solução de iodo.....44
- FIGURA 2:** Imagens ilustrativas demonstrando o diâmetro de comprimento (A) e largura (B) das tíbias dissecadas.....46
- FIGURA 3:** Imagem ilustrativa demonstrando os cortes para armazenamento de forma conveniente das áreas de interesse da amostra.....48
- FIGURA 4:** Imagem ilustrativa da remoção da amostra da caixa plástica após atingir uma concentração absoluta de infiltração do glicol metacrilato sendo posicionada de forma conveniente sob uma placa de vidro anteriormente à inclusão.....49
- FIGURA 5:** Imagem ilustrativa da fotopolimerização das amostras tempo aproximado de quatro horas na luz amarela (A) e seis horas em luz azul (B).....50
- FIGURA 6:** Imagem ilustrativa imediatamente após fotopolimerização de parte das amostras.....50
- FIGURA 7:** Imagem ilustrativa demonstrando o primeiro corte na porção medial na transversal do parafuso no aparelho de corte para exposição da área de interesse microscópico.....51
- FIGURA 8:** Imagem ilustrativa demonstrando o primeiro corte na porção medial na transversal do parafuso no aparelho de corte para exposição da área de interesse microscópico.....51
- FIGURA 9:** Imagem ilustrativa demonstrando a polimerização da segunda lâmina após o primeiro corte realizado. Avaliação da medida com paquímetro digital no intuito de garantir uma a espessura ideal da resina aplicada em μm na confecção da lâmina.....52
- FIGURA 10:** Imagem ilustrativa no momento do segundo estágio de corte através da serra de desgaste precisos sob movimento de oscilação do suporte e irrigação constante com água na serra de corte.....53
- FIGURA 11:** Imagem ilustrativa do momento de desgaste da lâmina até uma espessura de aproximadamente 30 μm através de lixas de desgastes e polimento.....54

FIGURA 12: Imagem ilustrativa retirada do site do fabricante de todo o sistema Exakt (Exakt®, Apparatebau, Norderstedt, Alemanha); demonstrando todos os estágios de confecção da lâmina histológica não descalcificada desde o procedimento de polimerização, corte, desgaste e polimento por meio dos aparelhos do experimento (<https://www.exakt.de/de/produkte/trenn-duennschliff-technik/allgemein.html>).....54

FIGURA 13: Imagem ilustrativa das imagens obtidas após coloração com Azul de Stevenel's e Fucsina Ácida nos aumentos de 25X (A) e 50X (B e C) com escala de 100 µm.....56

FIGURA 14: Desenho esquemático demonstrando de forma ilustrativa as regiões de aferição de BIC e BAFO nas regiões cortical e medular. Em azul podemos observar as regiões de aferição de BIC (ROI-1, ROI-2, ROI-3) e em vermelho a região de aferição de BAFO (ROI-4).....58

FIGURA 15: Imagem ilustrativa das imagens obtidas após coloração com Azul de Stevenel's e Fucsina Ácida nos aumentos de 50X (A) e (B) com escala de 100 µm.....59

FIGURA 16: Imagem ilustrativa das imagens obtidas após coloração com Azul de Stevenel's e Fucsina Ácida da superfície controle no tempo de 14 dias. É possível observar nos aumentos de 25X mostrando todo o parafuso instalado na tíbia do animal (A); 50X mostrando a parte superior do parafuso (B); 50X mostrando a parte inferior do parafuso (C); 100X mostrando com maiores detalhes a superfície do parafuso em contato com o tecido ósseo mineralizado (D).....61

FIGURA 17: Imagem ilustrativa das imagens obtidas após coloração com Azul de Stevenel's e Fucsina Ácida da superfície experimental no tempo de 28 dias. É possível observar nos aumentos de 25X mostrando todo o parafuso instalado na tíbia do animal (A); 50X mostrando a parte superior do parafuso (B); 50X mostrando a parte inferior do parafuso (C); 100X mostrando com maiores detalhes a superfície do parafuso em contato com o tecido ósseo mineralizado (D).....62

FIGURA 18: Imagem ilustrativa das imagens obtidas após coloração com Azul de Stevenel's e Fucsina Ácida da superfície controle no tempo de 28 dias. É possível observar nos aumentos de 25X mostrando todo o parafuso instalado na tíbia do animal (A); 50X mostrando a parte superior do parafuso (B); 50X mostrando a parte inferior do parafuso (C); 100X mostrando com maiores detalhes a superfície do parafuso em contato com o tecido ósseo mineralizado (D).....62

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Valores de Média e Desvio Padrão para amostras dependentes nos tempos de 14 e 28 dias.....	63
Tabela 2: <i>Teste t de Student para amostras dependentes para BIC cortical, BIC medular e BAFO</i>	64
Tabela 3: Valores de Média e Desvio Padrão para amostras dependentes no tempo de 14 dias.....	64
Tabela 4: <i>Teste t de Student para amostras dependentes no tempo de 14 dias</i>	65
Tabela 5: Valores de Média e Desvio Padrão para amostras dependentes no tempo de 28 dias.....	65
Tabela 6: <i>Teste t de Student para amostras dependentes no tempo de 28 dias</i>	66
Tabela 7: Valores de Média e Desvio Padrão obtida pelo <i>Teste t de Student para amostras independentes</i> nos tempos de 14 e 28 dias para <i>BIC total</i> e <i>BAFO</i>	67
Tabela 8: <i>Teste t de Student para amostras independentes para as amostras controle e experimental em BIC total e BAFO</i> nos tempos de 14 e 28 dias.....	68
Tabela 9: Valores de Média e Desvio Padrão para amostras independentes em <i>BIC</i> nos tempos de 14 e 28 dias nas regiões cortical e medular.....	69
Tabela 10: <i>Teste t de Student para amostras independentes para as amostras controle e experimental em BIC medular e BIC cortical</i> nos tempos de 14 e 28 dias.....	70

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Avaliação das diferenças médias e desvio padrão de BIC *total* nos tempos de 14 e 28 dias.....68

Gráfico 2: Avaliação das diferenças médias e desvio padrão de BIC *medular* nos tempos de 14 e 28 dias.....70

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIC: Interação do contato o Osso-Implante
BAFO: Fração da Área Óssea Ocupada
BA: Densidade Óssea na Área Da Rosca
BD: Densidade Óssea
µm: Micrômetros
SLA: Superfície jateada com granulação grande e ataque ácido (Sandblasted, Large-grit, Acid-etched), nome comercial de uma superfície de implante.
Al₂O₃: Óxido de Alumínio
NaCl: Cloreto de Sódio
CaCl₂: Cloreto de Cálcio
vs.: Versus
mm: milímetros
TiO₂: Óxido de Titânio
EDX: Raios X de Dispersão de Energia
MS: Superfície usinada
LS: Superfície modificada por irradiação de feixe a laser
Ncm: Torque
ASU: Abacate e soja insaponificável
BMP-2: Proteína morfogenética óssea 2
TGF-β1: Fator de crescimento transformador beta 1
mm²: Milímetros quadrados
CTL: grupo controle
ALD: grupo alendronato
ATZ: zircônia endurecida com alumina
µCT: microtomografia computadorizada
OVX: ovariectomia bilateral
ROI: Região observada de interesse
HA: Hidroxiapatita
Ti₆Al₄V: Liga de titânio grau 4
HF: Ácido Fluorídrico
HNO₃: Ácido Nítrico
CaP: Fosfato de Cálcio
OCP: Fosfato Octacálcico
BCP: Fosfato de Cálcio Bifásico
MMA: Metil Metacrilato
HCl: Ácido Clorídrico
Ticp: Superfície de Titânio grau 4
BGTi37: Superfície de titânio experimental resfriada a 37°C
FAPEMIG: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FO-UFMG: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais
LaMPaC: Laboratório de materiais e pilhas a combustível
CEUA: Comissão de ética no uso de animais
ICB: Instituto de Ciências Biológicas
rpm: rotação por minuto
ASTM: American Society for Testing and Materials
ASBMR: Sociedade Americana de Pesquisa em Osso Mineralizado

LISTAS DE SÍMBOLOS

°C: Graus Célsius

%: Por cento

=: Igual

®: Marca Registrada

Ca: Cálcio

P: Fósforo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 - Estudos experimentais in vivo com superfícies de implantes por meio de histomorfometria	20
2.2 - Estudos experimentais in vivo com análises histológicas e microtomografia computadorizada.....	33
2.3 - Estudos experimentais in vivo com análise de superfícies compostas por fosfato de cálcio por meio de histomorfometria.....	36
3 OBJETIVOS	40
3.1 - Geral	40
3.2 - Específicos.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 - Desenho do estudo	41
4.2 - Cálculo amostral.....	41
4.3 - Preparação dos espécimes	42
4.4 - Procedimento Cirúrgico.....	42
4.4.1 – Eutanásia	45
4.5 - Composição da amostra para histomorfometria.....	46
4.6 - Confeção das lâminas histológicas pelo Aparelho Exakt	47
4.6.1 - Protocolo de uso do aparelho Exakt	47
4.6.2 – Coloração das lâminas com Azul de Stevenel’s Blue e Fucsina Ácida	54
4.7 – Avaliação Histomorfométrica	55
4.7.1 – Protocolo de avaliação por meio do software ImageJ 1.50 ^a	56
4.8 - Análise Estatística.....	60
5 RESULTADOS	61

6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÃO	79
8 REFERÊNCIAS.....	80
9 ANEXOS E APÊNDICES.....	86
9.1. Aprovação da comissão de ética no uso de animais.....	86
9.2 – Quadro descritivo do experimento <i>in vivo</i>.....	87
9.3 - Tabela adquirida pelo software SPSS 20.0 de resultado do teste Estatístico Shapiro-Wilk comprovando a distribuição Normal da amostra... 88	88
9.4 - Banco de Dados produzido pelo software ImageJ 1.50^a	89
9.5 – Quadro descritivo das medidas de porcentagem mensuradas pelo software ImageJ 1.50^a	113
9.6 - Produção intelectual durante o curso	114

1 INTRODUÇÃO

A osseointegração é essencialmente importante e fundamental para o sucesso do tratamento reabilitador oral com implantes (Albrektsson *et al.*, 1981; Branemark *et al.* 1983). A observação de um contato direto entre a superfície do implante e o osso (BIC), à um nível microscópico, por um material biologicamente inerte e estável, após um período de cicatrização definido, sem a interposição de tecido fibroso é descrito como osseointegração (Albrektsson, *et al.*, 1987; Berglundh, *et al.*, 2003; Kuroda, *et al.*, 2004; Abrahamsoson *et al.*, 2004; Guastaldi & Aparecida, 2010).

Os tratamentos com implantes dentários são aplicados de forma ampla na restauração da função mastigatória e estética. O desenvolvimento da superfície dos implantes vem evoluindo de forma concreta nas ultimas décadas aprimorando e acelerando o processo da osseointegração dos implantes dentários (Branemark *et al.* 1969; Albrektsson *et al.*, 1981; Abrahamsson *et al.*, 2004; Aparicio *et al.*, 2011; Bernhardt *et al.*, 2012). Pesquisas recentes e esforços de desenvolvimento têm sido direcionados na criação de superfícies mais bioativas e adequadas para o sucesso da osseointegração. Diversas técnicas de modificação dessa superfície foram desenvolvidas para estimular a formação óssea ao redor dos implantes dentários (Butz *et al.*, 2006, Le Guéhenec *et al.*, 2007; Wennerberg *et al.*, 2009; Kämmerer *et al.*, 2012; Rupp, *et al.*, 2018).

A maioria dos metais não reage de forma adequada como biomaterial na implantodontia, pois a corrosão e liberação contínua de íons metálicos nos tecidos adjacentes, promovem respostas inflamatórias, que em geral resultam no encapsulamento do implante por um tecido conjuntivo fibroso (Davies 1998; Berglundh, *et al.*, 2003; Abrahamsoson *et al.*, 2004; Guastaldi & Aparecida, 2010). Quando se pensa em biocompatibilidade com o tecido vivo, os materiais usados na reabilitação oral utilizando implantes confeccionados por meio da liga de titânio e de zircônia, sendo que essa possui como vantagem quando comparada ao titânio a sua estética em algumas situações clínicas onde a demanda estética é um fator preponderante na solução do caso (Zeynep *et al.*, 2011). Mesmo com o desenvolvimento de novos materiais, como a polieterecetonona (PEEK) (Al Qahtani *et al.*, 2015) e o crescente interesse

pelos implantes de zircônia, a liga de titânio ainda é o material de escolha. Esses materiais apresentam resistência a corrosão e propriedades biomecânicas favoráveis à sua instalação no organismo (Rupp *et al.*, 2018).

Ao analisar especificamente as ligas de titânio, observa-se uma utilização maior nas últimas décadas em dispositivos médicos, ortopédicos e implantes dentários. Essa grande diversidade de uso do titânio ocorre devido às suas propriedades e qualidades biocompatíveis (Steinberg *et al.*, 1992; Shim *et al.*, 2005; Kohal *et al.*, 2016). O aprimoramento e desenvolvimento de sua superfície torna-se de fundamental importância na implantodontia quando tratamos algumas situações clínicas desafiadoras, muitas vezes associadas a problemas sistêmicos como a diabetes e a osteoporose além situações locais desfavoráveis como áreas enxertadas ou com baixa densidade óssea, onde os implantes são mais propensos a falhas (Chrcanovic *et al.*, 2016). Essas condições podem de alguma forma atrasar, atrapalhar ou até impedir que a osseointegração ocorra (Chrcanovic *et al.*, 2014; Chrcanovic *et al.* 2015), por isso a importância do aprimoramento das superfícies para osseointegração dos implantes.

O fosfato de cálcio é uma alternativa proposta no tratamento da superfície de implantes por possuir propriedades bioativas que podem favorecer a osseointegração, promovendo a aceleração e regeneração da estrutura óssea por meio da proliferação e diferenciação de osteoblastos e células endoteliais, inibindo a resposta inflamatória de macrófagos e permitindo uma osteoimunomodulação favorável para facilitar a osteogênese e a angiogênese. (Busser *et al.* 1991; Albrektsson *et al.*, 2001; Kuroda *et al.*, 2004; Habibovic *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2009; Junker, *et al.*, 2010; Palarie *et al.*, 2012; Surmenev *et al.*, 2014; Bai *et al.*, 2018).

Ao recorrer a literatura pertinente e avaliando os implantes comercializados atualmente, podemos considerar o processo de osseointegração satisfatório (Barglundh *et al.*, 2003; Mertens *et al.*, 2011; Buser *et al.*, 2012). Ainda assim, observa-se a importância do desenvolvimento de métodos mais simples de aprimoramento da superfície que melhorem a formação óssea peri-implantar e a estabilidade do implante a curto e longo prazo (Abrahamsson *et al.*, 2004; Bernhardt *et al.*, 2004; Ajami *et al.*, 2016; Rupp *et al.*, 2018). São necessários biomateriais que apresentem um conjunto

de propriedades físicas, químicas e biológicas que permitam desempenhar a função desejada de favorecer a osseointegração, estimulando uma resposta adequada dos tecidos vivos por meio da osteoindução e osteocondução (Bernhardt *et al.*, 2005, Habibovic *et al.*, 2005; Stadlinger *et al.*, 2009; Al Subaie *et al.*, 2016).

A imagem histológica ainda é considerada o padrão ouro para analisar a formação óssea em torno de implantes metálicos. Dessa forma é possível avaliar o contato de interação celular entre o osso-implante (BIC) e a fração da área óssea ocupada (BAFO).

Sendo assim, a avaliação histomorfométrica do contato osso-implante e a fração da área óssea ocupada ao redor de implantes foi estabelecida neste estudo para avaliar a osseointegração de uma superfície tratada com fosfato de cálcio (Donath e Breuner, 1982; Albrektsson e Jacobsson, 1987, Lin, *et al.*, 2009, Oliveira, *et. al.*, 2013).

Este estudo teve como objetivo avaliar por meio da histomorfometria a osseointegração na superfície de implantes compostos por titânio grau 4 (Ti_6Al_4V) revestidos com fosfato de cálcio e comparar com o comportamento da superfície de titânio microtexturizada (Ticp).

2 REVISÃO DE LITERATURA

No estudo da osseointegração e de superfícies de implantes, diferentes modelos animais, como o cão, o coelho, o carneiro, o mini porco e o rato têm sido utilizados (Berglundh et al., 2003; Kim et al., 2003; Buser et al., 2004; Oliveira et al., 2013; Pimentel et al., 2014; Surmenev et al., 2014). Diversas técnicas de estudo em animais foram criadas e aprimoradas durante o desenvolvimento das superfícies dos implantes. Nessa revisão de literatura, são contemplados estudos experimentais *in vivo* com análise de superfícies de implantes por meio de histomorfometria e microtomografia computadorizada onde parâmetros da osseointegração e o estudo da superfície de implantes são avaliados.

Em 1982, Donath e Breuner, desenvolveram uma técnica para permitir o estudo histológico de ossos não descalcificada na mandíbula e maxila com dentes ou implantes de materiais metálicos ou cerâmicos. O objetivo era reter informações sobre o esmalte com cálculo e preservar o tecido adjacente a implantes ou dentes. Também era importante que o equipamento fosse o mais econômico e simples possível, de modo que um número razoável de espécimes pudesse ser confeccionado e examinado. Para isso, ossos da mandíbula provenientes de biópsia ou autópsia eram preparados de forma conveniente para o estudo das amostras. A partir do preparo, as amostras passavam por um processo de desidratação e incorporação de resina em diferentes concentrações de forma gradativa com álcool e metil metacrilato. Um equipamento de corte preciso por meio de uma serra de corte era utilizado para confecção da lâmina histológica. Após esse corte a amostra era submetida a polimento e desgaste até uma espessura mínima de 5 – 10 μm onde era então submetida a coloração conforme conveniência.

2.1 - Estudos experimentais *in vivo* com superfícies de implantes por meio de histomorfometria

Em 2003 Berglundh *et al.*, com o objetivo de descrever um modelo no processo de osseointegração, instalaram cento e sessenta implantes em vinte cães labradores. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Regional para

Pesquisa Animal, Gotemburgo, Suécia. Após a exodontia de todos os pré-molares presentes na mandíbula e a espera de um período de cicatrização de três meses, um procedimento de instalação de implantes em um período de duas a doze semanas foi iniciado. Os implantes utilizados para o estudo da osseointegração tinham uma geometria que correspondia a um implante de parafuso com configuração de superfície SLA (Sandblasted, Large-grit, Acid-etched, Straumann, Tissue Level). No estudo, as mandíbulas foram removidas e os cortes histológicos de todos os animais preparados pela forma descalcificada com cortes realizados por um aparelho preciso (Exakt[®], Apparatebau, Norderstedt, Alemanha). Para a análise histológica os cortes foram corados em azul de toluidina. Esse fato permitiu um estudo mais detalhado dos eventos de remodelação e cicatrização do tecido ósseo. Após 2 horas era possível observar a primeira porção do processo ocupada com um coágulo e um tecido de granulação. O processo de formação óssea, podia ser observado com seu início na primeira semana. Após quatro dias os tecidos moles e duros que estavam presentes em uma biópsia obtida, demonstraram por meio das lâminas histológicas um coágulo com células mesenquimais e algumas células inflamatórias, cercado por uma grande quantidade de células semelhantes a fibroblastos em um estroma de estruturas parecidas com fibrina. Em porções mais centrais, era possível observar várias células inflamatórias no tecido mole recentemente formado. A presença de osteoclastos também foi observada na superfície óssea do corte. Em biópsias obtidas depois de uma semana, as câmaras do tecido em formação pareciam ser ocupadas com áreas de tecido ósseo recém-formado rico em fibrilas de colágeno e com a neoformação de estruturas vasculares rodeadas por células inflamatórias dispersas demonstrando padrões de angiogênese. Porções do osso recém formado pareciam estar em contato direto com a superfície do implante SLA. As trabéculas de tecido ósseo foram revestidas com osteoblastos e osteócitos foram encontrados dentro do tecido ósseo neoformado. Após duas semanas de cicatrização das feridas, houve uma nova formação óssea em todos os compartimentos ao redor do implante. Em algumas delas eram observados sinais de remodelação óssea, reabsorção e aposição contínuas. Após quatro semanas a cicatrização continuou a ser caracterizada pela formação de um osso novo. Após seis semanas de

cicatrização, a maioria das câmaras experimentais parecia estar completa de osso. Com oito e doze semanas as estruturas exibiam sinais de remodelação óssea em um tecido cercado por uma medula que continha adipócitos, vasos sanguíneos, fibras de colágeno e alguns leucócitos mononucleares. O estudo permitiu concluir que a osseointegração apresentava-se como um processo dinâmico durante seu estabelecimento e manutenção. Na fase de estabelecimento, havia uma interação delicada entre a reabsorção óssea em regiões de contato entre a superfície de titânio e o osso mineralizado sendo observada a formação óssea em áreas livres de contato. Durante a fase de manutenção, a osseointegração era assegurada através de remodelação contínua e adaptação à função.

Por meio de estudo experimental *in vivo* Kim *et al.*, em 2003, analisaram as características superficiais dos implantes após o jateamento e a oxidação térmica. Foram avaliados 48 implantes de titânio grau 2 por meio de análise histomorfométrica. Ambas as superfícies das amostras nos grupos 1 e 2 receberam jateamento com partículas de óxido de alumínio de 50 μm (Al_2O_3). As amostras do grupo 2 além do jateamento, receberam oxidação em uma atmosfera pura de oxigênio à uma temperatura de 800°C durante 120 minutos. Após o tratamento das superfícies, a topografia foi mensurada com um perfilômetro óptico, a sua composição superficial e espessura de óxido analisadas por meio da espectrometria e retrodifusão de Rutherford. Foram observadas superfícies com composição química similares, mas com diferentes espessuras e rugosidades de óxido. Os implantes foram instalados cirurgicamente em doze coelhos e eutanásias foram realizadas nos períodos de quatro e doze semanas. A avaliação histomorfométrica da formação óssea revelou que a porcentagem BIC dos implantes jateados e oxidados após quatro semanas foi maior quando comparada ao grupo apenas jateado. Não foram observadas diferenças significativas entre as superfícies em doze semanas. O estudo demonstrou a possibilidade de que diferentes tratamentos de superfície, como o jateamento e a oxidação, tenham um efeito sobre a neoformação óssea na superfície tratada.

Ainda no intuito de desenvolver um modelo para avaliar a taxa e o grau de osseointegração nas superfícies dos implantes, Abrahamsoson *et al.*, em

2004, avaliaram a superfície (SLA) composta por jateamento com óxidos seguida de condicionamento ácido durante as fases iniciais de osseointegração. No estudo *in vivo* foram usados métodos semelhantes de análise histológica como Berglundh *et al.* em 2003. Vinte cães labradores receberam 160 implantes experimentais para avaliar a osseointegração entre duas e doze semanas. Análises histomorfométricas dos cortes compostos por tecidos em cortes descalcificados foram realizadas. Vários pontos de referência foram identificados: a plataforma do implante, a crista óssea e a posição mais coronal do contato osso-implante. As distâncias verticais entre os pontos de referência foram determinadas e a proporção de osso mineralizado entre os picos e vales em uma área determinada de uma superfície no implante foram mensuradas. As medidas lineares relativas nos cortes histológicos foram realizadas com uma ampliação de 50 vezes. Áreas do tecido ósseo mineralizadas e estruturas não mineralizadas (tecido residual) foram observadas. Um procedimento de contagem de pontos histomorfométricos foi realizado sendo possível observar osteoblastos, células mesenquimais semelhantes a fibroblastos, adipócitos, eritrócitos, leucócitos (incluindo células polimorfonucleares, linfócitos e células de plasma, monócitos/macrófagos, estruturas vasculares e componentes do tecido mineralizado. O procedimento de contagem de pontos histomorfométricos foi realizado com uma ampliação de 1000 vezes. Os resultados da histomorfometria nos diferentes tempos exibiu semelhança aos estudos realizados anteriormente por Berglundh *et al.* em 2003. No presente estudo foi possível observar que a superfície SLA apresentava um grau de osseointegração superior quando comparado a superfície de titânio usinada; demonstrando que a osseointegração representa um processo dinâmico durante seu estabelecimento e manutenção, consolidando um método de avaliação histológica.

Avaliando as modificações de superfícies nos implantes dentários, Buser *et al.*, em 2004 compararam pela histomorfometria a deposição de matriz óssea em uma superfície de titânio modificada por jateamento SLA com uma superfície SLA padrão, durante os estágios iniciais da osseointegração. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa Animal do estado de Berna, Suíça. Duas intervenções cirúrgicas foram realizadas em seis porcos em

miniatura com idade adulta. Num primeiro momento os dentes anteriores da maxila foram removidos sob anestesia geral e após seis meses os implantes foram colocados com boa estabilidade primária, em ambos os lados da maxila, em um planejamento de boca dividida. Os implantes do grupo teste e controle apresentavam a mesma topografia, mas eram distintos no tratamento da superfície. Os implantes do grupo teste eram submetidos a uma submersão da superfície do implante em uma solução isotônica de NaCl após condicionamento ácido para evitar a contaminação com moléculas da atmosfera. Para a preparação histológica e análise histomorfométrica, dois porcos em miniatura foram sacrificados após duas, quatro e oito semanas de cicatrização. Os blocos dissecados com espécimes que receberam os implantes foram imersos em uma solução de formaldeído na concentração de 4% combinado com CaCl_2 a concentração de 1%, desidratados e incorporados em metil metacrilato. Posteriormente, foram obtidos cortes histológicos em uma espessura final de aproximadamente 80 μm que receberam coloração com azul de toluidina seguido por fucsina básica. Três espécimes de cada implante foram analisados por um examinador experiente e a partir disso, determinadas as porcentagens de contato direto entre osso mineralizado e a superfície de titânio (BIC) usando um microscópio ótico com uma ampliação de 100 vezes. A avaliação da interface osso-implante foi restrita à câmara peri-implantar, definido pelas 3 roscas iniciais do implante e a superfície óssea em contato íntimo. Analisando os resultados histológicos após duas semanas de cicatrização em ambos os tipos de implantes, foi possível observar um crescimento ósseo e um contato direto entre o osso e o implante (BIC). Diferenças significativas de BIC entre implantes do grupo teste e controle foram observados durante os estágios iniciais da osseointegração em duas e quatro semanas. Os implantes de teste demonstraram uma porcentagem média significativamente maior de contato osso e implante em comparação com os controles em duas (49,30 vs. 29,42%; $p = 0,017$) e quatro semanas (81,91 vs. 66,57%; $p = 0,011$) de osseointegração. Com quatro semanas observou-se uma densidade óssea aumentada e após oito semanas resultados semelhantes eram observados. Em oito semanas, havia um aumento na densidade óssea, e sinais de remodelação óssea. Assim foi

possível concluir que superfície SLA modificada promoveu uma aceleração na osseointegração durante os estágios iniciais da regeneração óssea.

Em estudo experimental *in vivo*, Grassi *et al.*, em 2006 avaliaram a influência de duas superfícies de implantes distintas por meio de cortes histológicos observando e analisando o contato osso-implante (BIC), densidade óssea na área da rosca (BA) e a densidade óssea (BD) após um período de cicatrização de 2 meses em maxilas e mandíbulas de humanos. Quatorze indivíduos receberam dois micro implantes cada (2,5 mm de diâmetro por 6 mm de comprimento), um teste (superfície tratada com ácido e jateada) e um controle (superfície usinada), na mandíbula ou na maxila. Após um período de cicatrização de 2 meses, os micro implantes e os tecidos circundantes foram removidos com uma broca trefina e preparados para análise histológica. As amostras foram processadas e preparadas em lâminas por meio de desidratação em uma série de álcoois em diferentes concentrações com incorporação de resina e polimerização da amostra. Após incorporação da resina na amostra, os espécimes foram seccionados longitudinalmente ao longo do eixo principal do implante com um disco de diamante de alta precisão. As lâminas foram coradas com fucsina e azul de toluidina. O contato osso/implante (BIC%) foi medido em torno de todas as superfícies do implante. A densidade óssea na área da rosca (BA%) e a densidade óssea (BD%) em uma zona de 500 mm de largura lateral à superfície do implante foram medidas bilateralmente. Essas avaliações foram realizadas usando um microscópio de luz (Laborlux S, Leitz, Wetzlar, Germany), conectado a uma câmera de vídeo de alta resolução (3CCD, JVC KY-F55B, Milan, Italy) e conectado a um monitor e computador. Este sistema óptico foi associado a um bloco de digitalização e um pacote de software de histomorfometria com capacidades de captura de imagem (Image-Pro Plus 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, MD and Immagini & Computer Snc, Milan, Italy). A avaliação histomorfométrica indicou que o BIC% médio foi de 23,08% - 11,95% para as superfícies usinadas e de 42,83% - 9,80% para as superfícies tratadas. A área óssea neoformada também foi maior para implantes de superfície tratadas. A porcentagem média de densidade óssea não diferiu entre os dois grupos. Os resultados histomorfométricos da investigação sugeriram que o uso de implantes com tratamento ácido e uso de jateamento

com óxidos podem melhorar o processo de osseointegração. Os dados do presente estudo experimental sugerem que a topografia superficial é importante para a resposta do tecido ósseo a um implante dentário. A proliferação e diferenciação de células ósseas foi relatada como sendo melhorada pela rugosidade da superfície do implante.

Em outro estudo realizado pelos mesmos autores a influência de uma superfície tratada com jateamento de TiO_2 foi comparada com uma superfície usinada. Dez micro implantes de titânio grau 4 (Conexão Dental Implants, São Paulo, SP, Brasil) foram preparados com duas topografias superficiais: usinadas e jateadas (TiO_2). Cada micro implante tinha 2,5 mm de diâmetro e 6 mm de comprimento. Os micro implantes com superfície tratada foram condicionados com ácido e jateados com partículas de TiO_2 de 25 a 100 μm . Cinco pacientes (idade média = 42,6 anos) receberam 2 micro implantes cada durante uma cirurgia de implante convencional na maxila posterior. Os critérios de exclusão incluíram gravidez, amamentação, tabagismo e quaisquer condições sistêmicas que pudessem afetar a consolidação óssea, como osteoporose e doenças do sangue. O Comitê de Ética para Ensaio Clínicos Humanos aprovou o protocolo do estudo. Após um período de cicatrização de 2 meses, os micro implantes e o tecido circundante foram removidos e preparados para avaliação histomorfométrica. Para processar a amostra e obter cortes finos, os espécimes foram desidratados em uma série crescente de lavagens com álcool e embebidos em uma resina de metil metacrilato (Technovit 7200 VLC, Kulzer, Wehrheim, Alemanha). Após a polimerização, os espécimes foram seccionados longitudinalmente ao longo do eixo do implante, com um disco de diamante de alta precisão a cerca de 150 μm e desgastados até aproximadamente de 30 μm . As lâminas foram coradas com fucsina básica e azul de toluidina. A histomorfometria da porcentagem de contato osso/implante e a área óssea formada dentro dos limites delimitados no implante, foi realizada com um microscópio de luz (Laborlux S, Leitz, Wetzlar, Alemanha) conectado a uma câmera de vídeo de alta resolução (3CCD, JVC KY-F55B, Milão, Itália) conectada a um monitor e computador pessoal (Intel Pentium III 1200 MMX). O BIC e a quantidade de área óssea formada dentro das regiões estabelecidas foram calculados e expressos como BIC% e BD%,

respectivamente. A avaliação histomorfométrica indicou uma porcentagem de BIC médio de $20,66 \pm 14$. ($P = 0,03$). A porcentagem de BD foi de $26,33 \pm 19,92$ para a superfície usinada e $54,84 \pm 22,77$ para a superfície tratada ($P = 0,015$). O osso era lamelar e compacto, e numerosos osteócitos eram apresentados em suas lacunas, embora as áreas de tecido ósseo pudessem ser distinguidas. O osso peri-implantar exibia estágios iniciais de maturação, principalmente na superfície tratada. Os dados histomorfométricos do estudo sugeriram que as superfícies de micro implantes com tratamento apresentaram maiores valores de percentual de BIC em comparação com as superfícies usinadas em tecido ósseo (Grassi *et al.*, 2007).

Na busca da avaliação por histomorfometria de novas superfícies, Schwarz *et al.*, em 2007 investigaram as reações teciduais iniciais da osseointegração, por meio da instalação de implantes de titânio modificados e convencionais com superfície SLA (Straumann Tissue Level) na maxila e mandíbula de quatro cadelas com 3 anos de idade (peso médio de $29,3 \pm 0,4$ kg). O protocolo de seleção, manejo e cirurgia dos animais foi aprovado pelo Comitê de Cuidados e Uso de Animais da Universidade Heinrich Heine e pelo Bezirksregierung Düsseldorf. O estudo foi realizado em duas fases cirúrgicas. Na primeira fase foram realizadas a extração dos segundos, terceiros, quartos pré-molares e primeiros molares na maxila e mandíbula bilateralmente. Após 4 meses de cicatrização, foram instalados os implantes com superfície modificada experimental do tipo SLA e com superfície controle convencional SLA. Ambos os implantes do grupo teste e controle foram instalados de forma aleatória para ambos os maxilares de acordo com um desenho de boca dividida, incluindo cinco implantes por grupo na mandíbula e três implantes por grupo na maxila. Os animais foram sacrificados após um período de cicatrização de 1, 4, 7 e 14 dias, respectivamente. Os espécimes foram desidratados usando graus crescentes de álcool e xileno, infiltrados e embebidos em metil metacrilato (MMA, Technovit 9100 NEU, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Alemanha). Após 20 horas, os espécimes foram completamente polimerizados. Cada local de implante foi cortado na direção vestibulo-lingual e juntamente com o longo eixo do implante utilizando uma serra de corte diamantada (Exakt[®], Apparatebau, Norderstedt, Alemanha), resultando em quatro cortes com aproximadamente 500 μm de espessura.

Subsequentemente, todos os espécimes foram colados com cimento acrílico (Technovit 7210 VLC, Heraeus Kulzer) em lâminas de vidro (Super Frost, Menzel GmbH, Braunschweig, Alemanha) e desgastados até uma espessura final de aproximadamente 40 μm . Uma parte dos implantes foi usada para análise histomorfométrica e corada com azul de toluidina (neoformação óssea) e Masson Goldner Trichrome (qualidade e quantidade de colágeno, neoformação óssea). A outra parte dos implantes foi preparada para marcação imuno-histoquímica. Assim, a histologia convencional e a imuno-histoquímica foram realizadas em diferentes implantes em cada grupo. A porcentagem de BIC foi medida na superfície em contato com o osso de cada implante e a densidade óssea (BD) foi medida a uma distância menor que 1 mm da superfície do implante, avaliando a proporção de osso mineralizado versus medula óssea dentro das respectivas áreas. A neoformação óssea foi claramente identificável após 7 dias por meio do aumento dos valores de BD, BIC. Após 14 dias, as superfícies dos implantes SLA modificados pareciam estar rodeadas por um tecido ósseo maduro, firmemente aderido e fibras paralelas. Dentro dos limites do presente estudo, foi possível concluir que a combinação de colorações histológicas imuno-histoquímicas e convencionais em cortes teciduais não descalcificados é uma técnica valiosa para avaliar os estágios inicial e inicial da cicatrização de feridas ao redor de implantes de titânio.

No ano de 2009, em estudo experimental *in vivo*, Stadlinger *et al.*, avaliaram o comportamento da neoformação óssea em superfícies de implantes revestidas com colágeno em duas concentrações distintas, comparando-as a implantes de titânio tratados com ácido, não revestidos e jateados. O objetivo deste estudo foi avaliar se um revestimento de colágeno promoveria de forma favorável a neoformação óssea quando comparada aos implantes apenas com tratamento ácido e jateados. Os implantes foram instalados na mandíbula de 20 mini porcos e acompanhados durante 1 e 2 meses. A estabilidade do implante foi analisada imediatamente após a implantação usando um dispositivo eletromagnético (Osstell ABs, Gotemburgo, Suécia). Os revestimentos de colágeno tiveram uma influência positiva não apenas na qualidade, mas também na quantidade de osso recém formado. Enquanto os implantes do grupo controle mostraram uma formação

óssea comparativamente mais lenta, independente das concentrações de colágeno. A avaliação histomorfométrica mostrou um BIC aumentado para implantes revestidos com colágeno após 1 mês cicatrização em comparação com implantes do grupo controle que receberam ataque ácido e jateamento.

Em estudo experimental *in vivo*, Oliveira *et al.* (2013) avaliaram a resposta óssea por torque de remoção, análise histológica e histomorfométrica em uma liga biomédica, instalada na tíbia de coelhos após modificação de superfície por irradiação de feixe de laser. Espectros de Fluorescência de Raios X por Dispersão de Energia (EDXRF) e Raios X de Dispersão de Energia (EDX) foram usados para confirmar a composição da superfície antes do tratamento. As superfícies das amostras utilizadas foram preparadas com dois procedimentos distintos: usinados (MS) e modificados por irradiação de feixe a laser (LS). Foram preparados discos (10 mm x 2 mm) com superfícies MS e LS para analisar a molhabilidade da superfície através do ângulo de contato por meio de um medidor de ângulo do contato ótico (Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemanha). Cada coelho recebeu quatro implantes, dois de controle na tíbia esquerda e dois com tratamento com laser na tíbia direita, totalizando uma amostra composta por trinta e dois implantes. Após um período de cicatrização de oito semanas, os animais foram submetidos a eutanásia. Foram avaliados valores de contra torque e imagens histológicas com valores de Ncm e percentual de BIC. O valor máximo aferido de torque para quebra da interação osso/implante medido foi de 90 Ncm. Os dados histomorfométricos mostraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e teste em relação ao percentual BIC: 24,07% e 41,88%, respectivamente ($p=0,0012$). Além disso, também foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os implantes MS e LS em três espiras consecutivas das regiões cortical ($p = 0,0012$) e medular ($p = 0,0082$), confirmando a grande influência do tratamento do feixe de laser na resposta histológica e histomorfométrica da liga Ti-15Mo. Os resultados demonstraram que todos os implantes estavam osseointegrados após oito semanas e o processo de modificação superficial dos implantes com irradiação a laser além de ser um processo limpo, reproduzível e de baixo custo melhorou as propriedades de osseointegração. A modificação a laser produziu uma superfície com propriedades importantes e apropriadas para a

osseointegração, aumentando a retenção de implantes ósseos e resultando em uma integração melhor e mais rápida.

Em 2014, Pimentel *et al.*, por meio de estudo experimental *in vivo*, avaliaram a administração sistêmica de abacate e soja insaponificável (ASU) na melhora da osseointegração em implantes de titânio na tíbia de ratos. Para o estudo, trinta ratos Wistar (peso de 200 a 250 g) foram distribuídos aleatoriamente em três grupos (ASU1, ASU2 e ASU3). Um grupo começando a administração de ASU sete dias antes da colocação do implante, outro a partir do dia da implantação e um grupo controle com administração de solução salina. Em todos os animais, um implante de titânio foi colocado em cada tíbia. A osseointegração dos implantes e a maturação óssea foram avaliadas por análise biomecânica, radiográfica da densidade óssea, imunohistoquímica para proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2), fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1), osteocalcina, avaliação histomorfométrica do contato osso-implante (BIC) e fração da área óssea mineralizada (BAFO). A imagem foi importada para um software (ImageJ 1.32j, National Institutes of Health) e exibida em um monitor. Para avaliação dos dados foi utilizado o tamanho de amplificação de 300% em quatro regiões de interesse (4×4 pixels = 1 mm^2) desenhadas justapostas à crista da superfície dos implantes na cortical (no nível da plataforma do implante) e na porção medular da tíbia (em um nível imediatamente abaixo da cortical) em ambos os lados do implante. As comparações entre os grupos foram realizadas separadamente para as regiões cortical e medular. As tíbias com implantes e tecidos foram imersas em paraformaldeído a 4% por 48 horas, desidratados em uma série ascendente de etanol (60% a 100%), as amostras foram embutidas em resina fotopolimerizável (Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer). Um corte longitudinal no meio do implante com polimento foi realizado até uma espessura final de aproximadamente $45 \mu\text{m}$ (Exakt[®], Apparatebau, Norderstedt, Alemanha). Após o tratamento as lâminas foram coradas com Azul de Stevenel's em combinação com fucsina ácida. O BIC mineralizado foi expresso pela porcentagem do perímetro do implante rosqueado e as quantidades relativas de osso mineralizado dentro da área das roscas do implante foram estimadas separadamente para a parte do implante nos compartimentos ósseo cortical e esponjoso, respectivamente. Um examinador treinado, mascarado em relação

ao grupo de tratamento, realizou a análise das imagens através do mesmo software usado nas radiografias. O presente estudo mostrou que a administração sistêmica de ASU, começando pouco antes ou imediatamente após a colocação do implante na tíbia de ratos saudáveis, resultou em maiores quantidades de BIC e osso menos maduro no compartimento cortical em comparação com os implantes instalados nos animais do grupo controle que não receberam ASU. Os grupos ASU1 e ASU2 apresentaram expressão três vezes maior de BMP-2 e nove vezes maior expressão de TGF- β 1 em comparação ao grupo controle. A análise histomorfométrica, no entanto, mostrou que ambos os grupos experimentais (ASU1 e ASU2) apresentaram valores significativamente mais altos de BIC apenas no compartimento do osso cortical quando comparado ao controle. Não foram observadas diferenças entre os grupos em relação ao BIC na porção medular. Os dados sugerem que o uso do ASU pareceu exercer apenas um efeito sutil na osseointegração do implante.

Verzola *et al.*, 2015, em estudo experimental *in vivo* avaliou o efeito da administração a longo prazo do alendronato nas propriedades mecânicas do osso na osseointegração. Para isso utilizou cento e sessenta ratas (*Rattus norvegicus albinus*) que foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos. Um grupo controle (CTL), que recebeu a administração subcutânea de solução salina, e outro grupo alendronato (ALD), que recebeu a administração subcutânea de alendronato (1 mg/kg/semana). Após 120 dias dessas terapias, um implante foi colocado em cada tíbia dos animais. O estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética para o uso de animais em pesquisa da Universidade Estadual Paulista. Um preparo para implante foi realizado na epífise proximal das tíbias com uma broca helicoidal (2,0 mm) usando uma peça manual de baixa velocidade com irrigação salina estéril abundante. Um implante de titânio (4,0 × 2,2 mm, Conexão, São Paulo, Brasil) com uma superfície usinada foi inserida até que a rosca fosse completamente introduzida no osso cortical. Dez animais em cada grupo foram eutanasiados aos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 ou 60 dias após a cirurgia. As tíbias com implantes foram avaliadas quanto ao torque de remoção, contato osso-implante (BIC), ocupação da fração da área óssea (BAFO) e relação Ca/P. Os fêmures foram avaliados quanto à densidade mineral óssea (DMO) e testes mecânicos para

avaliar a força máxima de fratura, rigidez. A análise histomorfométrica foi realizada utilizando tíbias contendo os implantes e tecidos circundantes que foram imersas em paraformaldeído a 4% por 48 h, desidratados em uma série crescente de etanol (60-100%), e então embutidos em resina fotopolimerizável (Technovit 7200 VLC; Kulzer Heraus GmbH & CO., Wehrheim, Alemanha). Posteriormente, as amostras foram cortadas ao longo do centro do implante, ao longo de seu longo eixo, em duas seções de 500 µm de espessura, utilizando uma máquina de cortes precisos (Exakt Cutting System, Wehrheim, Alemanha). Os cortes foram cortados e polidos (Exakt Apparatebau, Hamburgo, Alemanha) para uma espessura final de aproximadamente 30 µm. As imagens histológicas foram capturadas com microscopia ótica a 100 × de ampliação (LEICA DMLS, Microscopia Leica e Scientific Instruments Group, Wetzlar, Alemanha) utilizando uma câmera de vídeo (DFC-300 FX 3 megapixel; Leica Microsystems Ltda., Wetzlar, Alemanha) acoplada à microscópio. O grupo ALD apresentou maior BIC do que o grupo CTL em 20 ($P < 0,001$) e 60 dias ($P < 0,05$). Nas análises intra grupo, dentro do grupo CTL, o BIC foi menor em 5 dias do que em todos os períodos ($P < 0,05$). Além disso, o grupo ALD mostrou um menor BIC aos 5 e 10 dias em comparação com todos os outros períodos ($P < 0,05$). Em relação ao BAFO, o grupo ALD apresentou maiores valores desse parâmetro que no grupo CTL aos 20 ($P < 0,001$), 30 ($P < 0,01$) e 45 dias ($P < 0,001$). Dentro do grupo CTL foi possível observar um BAFO significativamente maior em 60 dias em comparação com o período de 10 dias ($P < 0,05$), enquanto que no grupo ALD, houve um aumento no BAFO em 20, 45 e 60 dias em comparação com os períodos de 5 e 10 dias ($P < 0,05$). O uso do alendronato acelerou a osseointegração sem afetar o conteúdo mineral do tecido ósseo, porém aumentou sua densidade. Além de aumentar a força máxima de fratura e tenacidade, mas não melhorou as propriedades de deformação elástica do tecido ósseo.

Em estudo experimental *in vivo*, Kohal *et al.*, em 2016, avaliaram e compararam a osseointegração de implantes feitos de titânio comercialmente puro ou zircônia endurecida com alumina (ATZ) de 2 mm X 1 mm. A superfície dos implantes de titânio foi modificada por anodização eletroquímica (TiUnite®, Nobel Bio Care, Gothenborg, Suécia) e a superfície dos implantes ATZ tratada

por sinterização de polímeros e construção de poros com um tamanho de 50 µm na superfície. Vinte e oito ratos Sprague-Dawley machos com oito semanas de idade foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de sete cada, sendo submetidos a eutanásia nos períodos de 14 (grupos A e B) e 28 dias (grupos C e D) do período de cicatrização. Foram realizadas avaliações histológicas e testes biomecânicos em ambos os grupos e tempos de cicatrização. A análise histomorfométrica compreendeu a avaliação da fração do implante em contato com o osso cortical. O contato médio osso-implante mineralizado dentro do área de osso cortical após 14 dias de cicatrização foi de 58% para os implantes TiUnite® e de 24% para os implantes ATZ, sendo essa diferença considerada estatisticamente significativa. Após 28 dias, o contato osso-implante aumentou em todos os grupos. O valor dos implantes TiUnite® foi de 75% e o valor para os implantes ATZ foi de 41% não sendo uma diferença estatisticamente significativa. O teste biomecânico apresentou valores médios de 20 N para TiUnite® e 10 N para ATZ aos 14 dias e considerada estatisticamente significativa. Os valores aumentaram de 14 para 28 dias em ambos os grupos TiUnite®: 39 N, ATZ: 25 N. No entanto, a diferença foi estatisticamente significativa apenas dentro do grupo TiUnite®. Dentro das limitações do estudo e do modelo animal, foi possível concluir que os implantes testados eram biocompatíveis e osseocondutivos. O Contato osso-implante e a ancoragem biomecânica aumentaram da segunda para a quarta semana do período de cicatrização para TiUnite® e ATZ. Enquanto os valores histomorfométricos e do teste biomecânico foram estatisticamente mais baixos na segunda semana para a ATZ e a diferença na quarta semana não foi estatisticamente significativa.

2.2 - Estudos experimentais in vivo com análises histológicas e microtomografia computadorizada

Bernhardt *et al.* em 2005; por meio de estudo experimental *in vivo*, avaliaram o potencial osteocondutor de revestimentos para implantes de titânio utilizando diferentes componentes da matriz extracelular. Para o experimento foram utilizados implantes cilíndricos revestidos com colágeno tipo I, tipo III ou com uma molécula de adesão celular bifuncional (Cyclo(-RGDfK)-

tetraphosphonyl-lysyl-lysyl-diamido-heptaethyleneglycolyl]) constituída por uma sequência cíclica com um grupo de peptídeos bioativos denominada RGD. Os implantes foram instalados no fêmur de 16 cabras em dois tipos de defeitos ósseos (A e B) com densidades ósseas distintas, juntamente com implante de referência não revestido. O contato e o volume ósseo foram determinados após cinco e doze semanas de instalação dos implantes, utilizando-se de avaliação histomorfométrica e de microtomografia computadorizada (μ CT). Ambos os métodos revelaram tendências semelhantes na formação óssea para os implantes com superfícies distintas, com os dados de μ CT resultando em diferenças significativas. Após cinco e doze semanas, todos os três revestimentos apresentaram um aumento significativo no volume ósseo sobre o implante sem revestimento, com os maiores resultados para os implantes com revestimento de colágeno. O revestimento de RGD apresentou apenas uma ligeira melhoria em comparação com o grupo controle. Para titânio não revestido, RGD e especialmente colágeno tipo I, a resposta na cavidade A, situada em osso mais denso, foi mais forte que na cavidade B. O colágeno tipo III, por outro lado, pareceu ser o revestimento mais eficaz em áreas de menor densidade óssea representada pela cavidade B. Estes resultados sugerem que as moléculas da matriz (ou suas combinações) são capazes de gerar sinais apropriados para o microambientes específicos em torno dos implantes e podem assim acelerar o processo de formação óssea e aumentar a estabilidade dos mesmo.

Butz *et al.*, em 2006, com objetivo de validar um método de uso da microtomografia computadorizada como método quantitativo de avaliação da interface osso e implante realizaram um trabalho colocando implantes no fêmur direito 7 ratos Sprague-Dawley. Os implantes eram de titânio microtexturizados e não revestidos (Osseotite[®]) para o experimento, os mesmos foram instalados no fêmur direito de sete ratos, que se submeteram a eutanásia após 14 dias. Cortes histológicos e de μ CT correspondentes foram comparadas em relação à morfometria óssea. A fração da cortical óssea não apresentou variação na presença do implante. A fração de volume ósseo na região medular foi significativamente maior nas regiões mais próximas aos implantes do que nas regiões mais distantes. Os dados da análise por microtomografia

computadorizada em diferentes regiões do osso cortical e do osso medular apresentaram forte correlação com os dados da análise histomorfométrica. Nenhuma correlação significativa relação foi encontrada para a área de 0 a 24 μm da superfície suportando o uso da microtomografia computadorizada como método não destrutivo de avaliação óssea quantitativa na interface osso e implante. Entretanto considera que mais estudos são necessários, no entanto, para abordar as distorções provocadas pelo metal que pode confundir a avaliação óssea peri-implantar.

Já em 2013, Stadlinger *et al.*, analisaram por meio de microtomografia computadorizada e análise histomorfométrica implantes bioquimicamente modificados, inseridos na tíbia proximal de ratos Wistar com osteoporose pré-induzida. Dentre as superfícies de implantes bioquimicamente modificadas, haviam 5 superfícies tratadas de formas distintas, divididas entre grupos de animais com e sem osteoporose, induzida através de procedimento cirúrgico de ovariectomia. O objetivo do estudo foi testar se as modificações bioquímicas que foram relatadas na literatura por estudos anteriores para melhorar a osseointegração em osso saudável renderiam um efeito semelhante na osteoporose (Stadlinger et al., 2009; Stadlinger et al., 2012). Cento e sessenta ratas Wistar virgens, com seis meses de idade, foram submetidos a ovariectomia bilateral (OVX), enquanto outros 64 ratos foram submetidos à cirurgia simulada e permaneceram intactos. Quatorze semanas após a cirurgia, os animais foram divididos em cinco grupos OVX e dois não OVX (32 ratos / grupo) com uma distribuição uniforme da densidade mineral óssea proximal da tíbia, avaliada por μCT e peso corporal dentro dos grupos OVX. Cada um dos sete grupos foi aleatoriamente dividido em dois subgrupos (16 ratos/subgrupo), designados para 2 e 4 semanas de cicatrização do implante. Os animais receberam um implante na metáfise proximal esquerda da tíbia. Amostras de ossos tibiais de oito animais por subgrupo foram avaliadas por microCT e histomorfometria; as oito amostras adicionais foram utilizadas para testes biomecânicos. Foram medidas formações ósseas em duas regiões bilaterais na porção medular sendo denominadas como áreas adjacentes e distantes (ROI-1 e ROI-2). Todos os animais osteopênicos privados de estrogênio (OVX) apresentaram menor BIC (contato osso implante/área total do implante) quando comparado aos animais com estrogênio (não-OVX),

exceto os que receberam implantes revestidos com ácido zoledrônico. O mesmo ocorreu quando comparado no período entre 2 e 4 semanas. Os resultados histomorfométricos confirmaram os achados de μ CT.

Pesquisas também continuam sendo realizadas na área com o intuito de elucidar o comportamento da osseointegração mediante a ingestão de determinadas substâncias presentes na rotina clínica. Em 2016, Al Subaie *et al.*, em recente trabalho publicado por meio de estudo experimental *in vivo*, investigaram o efeito da administração sistêmica pós-operatória de omeprazol na osseointegração de implantes em tíbias de ratos. Para o experimento foram usados 24 ratos Sprague-Dawley, onde foram instalados cirurgicamente um implante de titânio na tíbia esquerda e criado um defeito ósseo na tíbia direita. Durante as 2 semanas após a cirurgia, 12 ratos foram tratados com omeprazol (5 mg/kg, diariamente) e os outros 12 com soro fisiológico. Após a eutanásia, o volume do defeito cortical e as porcentagens de osso recém formado no defeito foram avaliados por meio de μ CT. O volume ósseo peri-implantar, volume do tecido e a porcentagem de contato osso-implante foram avaliados por meio de análise histomorfométrica. Os ratos tratados com omeprazol exibiram defeitos corticais maiores e uma menor porcentagem de osso recém formado nos defeitos quando comparados com o grupo controle. Além disso, apresentaram menor volume de tecido ósseo em torno do implante e contato osso/implante reduzido. Os autores concluíram que o omeprazol administrado sistemicamente no pós operatório prejudica a cicatrização óssea e osseointegração de implantes.

2.3 - Estudos experimentais in vivo com análise de superfícies compostas por fosfato de cálcio por meio de histomorfometria

Em 1991, Busser *et al.* avaliaram a influência da superfície com diferentes características na osseointegração de implantes. Instalou-se nas tíbias e fêmur de seis mini porcos implantes cilíndricos com seis superfícies distintas. Durante o período proposto de 3 a 6 semanas, os implantes com osso circundante foram removidos e analisados em cortes histológicos para amostras não calcificadas. Os espécimes foram desidratados e embebidos em metil metacrilato. Cortes não calcificados de 500 μ m de espessura foram

obtidos usando uma serra de diamante em baixa velocidade com refrigeração e foram desgastados até uma espessura final de 80 μm , recebendo uma coloração de azul de toluidina. O exame histológico revelou contato direto com o implante ósseo para todos os implantes. No entanto, as análises histomorfométricas demonstraram diferenças significativas na porcentagem de contato osso-implante (BIC), quando medido no osso medular. As superfícies dos implantes que haviam recebido tratamento eletroquímico, jateamento com grânulos e tratamento com ácido obtiveram as menores porcentagens de contato ósseo com valores médios variando entre 20 e 25% no BIC. Os implantes jateados com partículas maiores e implantes de titânio revestidos com plasma demonstraram 30-40% de BIC. Os maiores valores em BIC foram observados nas superfícies com jateamento com partículas maiores e tratamento com ácido (alta rugosidade; $\text{HCl}/\text{H}_2\text{SO}_4$) com valores médios de 50-60% e implantes revestidos com hidroxiapatita (HA) com 60-70%. No entanto, o revestimento HA revelou consistentemente sinais de reabsorção. Pode-se concluir que a extensão da interface osso-implante estaria positivamente correlacionada com uma rugosidade crescente da superfície do implante.

Em estudo experimental *in vivo* realizado por Kuroda *et al.*, em 2004 avaliou a estabilidade mecânica, a fração de volume ósseo (volume ósseo/volume tecidual total) e a porcentagem de tecido ósseo em contato com implantes instalados no longo eixo dos fêmures direitos de 54 ratos machos prague-Dawley. Metade dos implantes de liga de titânio ($\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$) eram moderadamente rugosos e a outra metade foi revestida por fosfato de cálcio (hidroxiapatita) pelo método biomimético. Os animais foram submetidos a eutanásia com 1, 2 ou 4 semanas após a cirurgia ($n=9$ por grupo). Seis fêmures de cada grupo foram submetidos a análise por microtomografia computadorizada, para determinação da fração de volume ósseo (volume ósseo/volume total tecidual) e, em seguida, foi realizado o teste mecânico de remoção em uma máquina de ensaio universal para avaliar a estabilidade mecânica. Os outros 3 espécimes de cada grupo foram preparados para análise histomorfométrica e avaliada a porcentagem de tecido ósseo em contato com os implantes. Os implantes revestidos apresentaram estabilidade mecânica significativamente maior do que os implantes não revestidos com fosfato de cálcio, em especial nos períodos iniciais de avaliação. Não foram

observadas diferenças estatisticamente significativas da fração de volume ósseo pela microtomografia computadorizada e da porcentagem de tecido ósseo em contato com os implantes dos grupos testados pela análise histomorfométrica.

Seguindo a mesma linha de pesquisa em superfícies compostas por fosfato de cálcio, Habibovic *et al.*, em 2005, num estudo experimental *in vivo*, investigaram o desempenho biológico da osseointegração e osseoindução de uma liga de titânio grau 4 (Ti_6Al_4V), com e sem revestimento de fosfato octacálcico (OCP) e com fosfato de cálcio bifásico (BCP). Para avaliar a biocompatibilidade dos três grupos de revestimento utilizados (Ti_6Al_4V , Ti_6Al_4V+OCP e Ti_6Al_4V+BCP), foram inseridos implantes no fêmur esquerdo de 10 cabras de forma aleatorizada. Após seis semanas, o mesmo procedimento foi repetido no fêmur direito de todos os animais. Os implantes foram isolados por meio de corte com uma serra de diamante e fixados em lâminas para análise histomorfométrica. Todos os implantes foram desidratados em uma série graduada de álcoois (70-100%) e transferidos para uma solução de metil metacrilato (MMA) que polimerizou a 37 °C pelo período de 1 semana. Cortes longitudinais (10-15 μm) foram feitos usando uma serra de diamante (Leica Microtome, Nussloch, Alemanha). Os cortes foram corados com 1% de azul de metileno e 0,3% de fucsina básica após mistura com HCl e etanol. Foram realizadas mensurações histomorfométricas dos implantes instalados nos fêmures dos animais em diferentes áreas do defeito formado para distinguir a formação óssea das partes do implante que estavam situadas nas áreas cortical e medular. Observou-se diferenças significativas na formação óssea entre as diferentes superfícies no período de 6 e 12 semanas na área cortical e medular. O estudo concluiu que a superfície tratada com fosfato de cálcio ($Ti_6Al_4V + BCP$) mostrou melhores propriedades osteocondutoras quando comparada as de liga de titânio não revestida ou revestida com OCP.

Em outro estudo experimental *in vivo*, parafusos de liga de Ti_6Al_4V , foram instalados nos fêmures de 48 ratos. Os implantes foram colocados em uma suspensão de nano partículas de HA a base de tolueno durante 180 minutos em uma temperatura de 100°C. Lin *et al.*, em 2009, ao analisarem as características topográficas dos grupos utilizando um interferômetro, observou

que as diferentes ligas utilizadas, liga de Ti_6Al_4V , não alteraram os parâmetros de rugosidade superficial avaliados. A estabilidade mecânica do grupo onde os parafusos foram revestidos por fosfato de cálcio foi significativamente maior do que nos grupos em que os parafusos não foram revestidos, após um período de 2 semanas. Na avaliação histomorfométrica não foram observadas diferenças significativas das superfícies em contato com o tecido ósseo. Os valores eram semelhantes para ambos os grupos revestidos ou não com fosfato de cálcio. Os dados indicaram que a osseointegração precoce pode ser mais sensivelmente regulada por características superficiais em nanômetros.

3 OBJETIVOS

3.1 - Geral

Avaliar por meio da histomorfometria a osseointegração na superfície de implantes compostos por titânio grau 4 (Ti_6Al_4V) revestidos com fosfato de cálcio.

3.2 - Específicos

Avaliar e comparar a formação óssea do grupo experimental (BGTi37) e grupo controle (TiCp) em torno da superfície do implante, por meio da histomorfometria.

Avaliar e comparar a formação óssea em torno da superfície dos implantes, analisando a interação de contato entre osso e implante (BIC) e a fração da área óssea ocupada (BAFO), por meio da histomorfometria.

Avaliar e comparar a formação óssea em torno da superfície do implante, no período de 14 e 28 dias após a instalação dos implantes, por meio da histomorfometria.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Desenho do estudo

Trata-se de uma análise histomorfométrica de um estudo experimental *in vivo* controlado de um projeto com fomento recebido pela FAPEMIG (Processo No: APQ-00542-14) realizado por uma equipe de pesquisadores da Faculdade de Odontologia (FO-UFMG) em parceria com o Laboratório de Materiais e Pilhas a Combustível (LaMPaC) do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, com o Laboratório de Biologia Cardíaca do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), ambos da Universidade Federal de Minas Gerais, juntamente com a colaboração do Departamento de Periodontia da Faculdade de Odontologia Universidade Estadual Paulista (FOAR - UNESP). O estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo 350/2013) (ANEXO 1).

4.2 - Cálculo amostral

A partir dos dados da literatura, foi realizado o cálculo amostral do número de espécimes necessários para cada grupo, utilizando a seguinte fórmula, conforme previamente descrito (Zar JH., 2010):

$$n = S^2/\delta^2 (t_{\alpha(2),v} + t_{\beta(2),v})^2$$

$$n = 1,2769/(1,8668)^2 (t_{0,05(2),5} + t_{0,10(2),5})^2$$

$$n = 1,2769/(1,8668)^2 (2,571 + 1,476)^2$$

$$n = 1,2769/3,4849 (4.047)^2$$

$$n = 0,3664 \times 16,3782$$

$$n = 6,0009$$

No intuito de compensar alguma possível perda, foram instalados quatorze parafusos para cada grupo, nos dois momentos de avaliação: 14 e 28 dias. Um grupo controle (Ticp) e outro experimental (BGTi37). Para minimizar o número de animais e garantir o número de espécimes necessários para cada grupo, foram instalados dois parafusos por animal, sendo um

parafuso do grupo experimental (BGTi37) e o outro do grupo controle (Ticp), selecionado aleatoriamente, em cada uma das tíbias, direita ou esquerda (Barros V.M., 2017).

4.3 - Preparação dos espécimes

Vinte e oito parafusos de uma liga de titânio grau 4 (Ti_6Al_4V) para enxerto ósseo da empresa PecLab, de diâmetro 1,5 mm e comprimento 3 mm, foram preparados pela própria empresa para o experimento. Esses parafusos foram submetidos ao tratamento comercialmente utilizado pela empresa para produção de uma superfície de titânio texturizada, utilizando-se jateamento com alumina e erosão ácida com ácido nítrico e fluorídrico, segundo a norma ASTM B600.

Em seguida, em parceria com o laboratório LaMPaC do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG, metade dos parafusos foram recobertos com o revestimento de fosfato de cálcio. O processo de recobrimento dos parafusos experimentais (BGTi37) foi idêntico ao realizado em experimento *in vitro* anteriormente executado pela equipe de pesquisadores (Barros V.M., 2017).

Os parafusos dos grupos controle (Ticp) e do experimental (BGTi37) foram embalados individualmente em papel grau cirúrgico e selados hermeticamente com seladora. As embalagens esterilizadas com uma dose 15 kGy no Laboratório de Irradiação Gama do CDTN.

4.4 - Procedimento Cirúrgico

Foram utilizados quatorze ratos machos da raça Wistar, com idade aproximada de 2 meses. Os parafusos experimentais e controles foram instalados nas tíbias dos animais. Estes foram sacrificados em dois momentos de avaliação: 14 e 28 dias, conforme previamente descrito (Kohal *et al.*, 2016).

Os ratos foram anestesiados com uma solução de cetamina 10% e xilazina 2% (1:1, 0,1mL/100g de peso corporal). Um volume de 0,3ml dessa solução injetado na pata direita, por via intramuscular, em cada animal. Em

seguida, realizada a tricotomia das patas traseiras dos animais. Os animais anestesiados e tricotomizados foram colocados em decúbito dorsal sobre a mesa cirúrgica e um campo cirúrgico estéril utilizado para isolar a pata a ser operada. Em seguida, realizou-se a assepsia da pata com solução de iodo. Foi realizada uma incisão na porção ântero-medial da tíbia utilizando-se lâmina de bisturi 15c (Solidor, Diadema, São Paulo, Brasil).

A musculatura foi afastada utilizando-se bisturi de Orban e mantida afastada da superfície óssea com um descolador de Molt. O preparo do leito foi realizado com uma broca helicoidal de 1,3 mm de diâmetro (Neodent, Curitiba, Paraná, Brasil), acoplada a um contra ângulo com redução de 20:1 (Kavo, Joinville, Santa Catarina, Brasil) sob rotação controlada de 1000 rpm em um motor elétrico (Driller, Carapicuíba, São Paulo, Brasil) sob constante irrigação com solução salina resfriada. Os parafusos auto-rosqueantes de titânio dos grupos experimental (BGTi37) ou controle (Ticp) foram inseridos na perfuração preparada usando uma chave manual (PecLab, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), alcançando estabilidade primária. A musculatura foi reposicionada e a sutura realizada com um fio de nylon 4.0 (Biosult, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), e a área novamente limpa com solução de iodo. Como protocolo, o primeiro parafuso foi sempre instalado na pata esquerda de forma aleatorizada. A colocação do outro parafuso realizado imediatamente após o primeiro seguindo o mesmo protocolo cirúrgico.

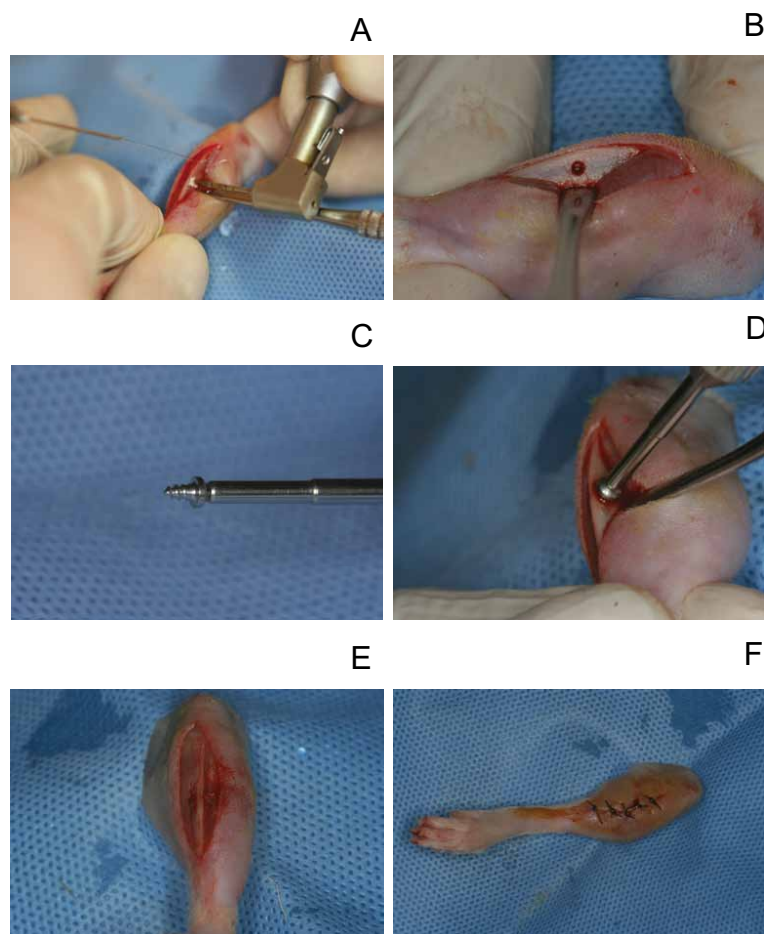


FIGURA 1: Imagens ilustrativas do procedimento cirúrgico para instalação dos parafusos controle e experimental nas tíbias dos ratos. A - perfuração sob irrigação com solução salina resfriada; B - perfuração finalizada; C - parafuso acoplado a chave manual de inserção; D - instalação do parafuso até alcançar estabilidade primária; E - reposicionamento da musculatura; F - retalho suturado após nova assepsia com solução de iodo.

Ao final do procedimento cirúrgico, os animais receberam uma dose via intramuscular de multibiótico (benzilpenicilina e estreptomicina – 1 mg/kg) (Vitalfarma, São Sebastião do Paraíso, Minas Gerais, Brasil) e uma dose de analgésico (Benamine – 1 mg/kg) (Intervet, Cruzeiro, São Paulo, Brasil), aplicada nas patas traseiras aleatoriamente. Um spray bactericida de uso veterinário (Bactrovet Prata - Sulfadiazina Prata, König Brasil, Maringue, São Paulo, Brasil) foi aplicado sobre a ferida cirúrgica para evitar qualquer contaminação. Os animais foram acondicionados em número de 3 por cada caixa em ambiente adequado, com luminosidade e temperatura controladas, e com acesso *ad libitum* à água e ração para animais de laboratório (Barros V.M., 2017).

4.4.1 – Eutanásia

Após 14 dias da cirurgia, 7 animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina após sedação anestésica, com uma dose 3 vezes maior que utilizada para o procedimento cirúrgico. Os outros 6 animais foram sacrificados após 28 dias da cirurgia.

Após a eutanásia, as tíbias de cada animal foram dissecadas e os tecidos moles totalmente removidos. As carcaças/dejetos colocados em sacos plásticos brancos devidamente identificados, mantidos congelados em freezer próprio e recolhidos por empresa especializada contratada pela UFMG. As tíbias dissecadas foram então armazenadas individualmente em tubos falcon com 30 ml de formalina neutra a 10% em pH 6,84 para fixação durante 48 horas. Após esse período, foram lavadas por 3 vezes com água e em seguida armazenadas em álcool 70% sendo acondicionados em ambientes adequados com luminosidade e temperatura controladas (Barros V.M., 2017).

O estudo foi realizado em dois momentos de avaliação: 14 e 28 dias. Após o procedimento cirúrgico um dos animais (animal nº5 do grupo de 14 dias) teve uma das tíbias fraturada na área de inserção do parafuso tendo a outra tíbia removida da amostra e outro animal (animal nº8 do grupo 28 dias) morreu antes do período de eutanásia, conforme demonstrado na tabela do ANEXO 2. Assim a amostra foi reduzida para um total de 12 animais. Mesmo com a perda de dois animais, houve a possibilidade da execução do estudo histomorfométrico, pois o universo da amostra foi composto pelo total que respeitou o número suficiente de animais (n=6) conforme descrito no cálculo amostral anteriormente.

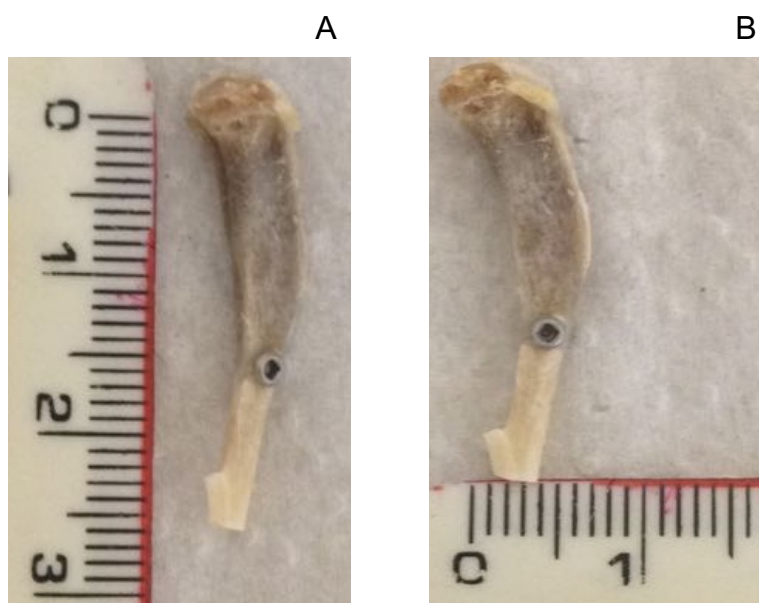


FIGURA 2: Imagens ilustrativas demonstrando o diâmetro de comprimento (A) e largura (B) das tíbias dissecadas.

4.5 - Composição da amostra para histomorfometria

A amostra desse estudo foi composta por 24 implantes instalados nas tíbias de 12 ratos Wistar, de forma aleatória, sendo que cada animal recebeu um implante com a superfície controle e um implante com superfície experimental.

Nesse processo foram confeccionadas lâminas de estudo histológico por meio de um aparelho com capacidade específica de preparar cortes de amostras calcificadas (Exakt[®], Apparatebau, Norderstedt, Alemanha). Esse sistema é empregado na pesquisa e desenvolvimento de implantes, stents, cateteres cardíacos, em patologia oral, tecnologia odontológica, ortopedia, medicina veterinária e imuno-histoquímica.

O método foi desenvolvido por Donath e Breuner em 1982. Essa técnica permite a preparação de cortes finos sem a descalcificação óssea, com isso é possível manter informações importantes sobre a morfologia celular e avaliar osseointegração por microscopia de luz. Por meio desses cortes, é possível observar a morfologia celular, identificar e quantificar de forma relativa diversas áreas de um corte histológico, avaliando a interação de contato entre osso e implante (BIC) e a fração da área óssea ocupada (BAFO).

Foram confeccionadas 24 lâminas histológicas com uma espessura de aproximadamente 30 µm. A amostra era composta por parafusos instalados nas tíbias de ratos Wistar machos. Esses parafusos de titânio apresentavam duas superfícies distintas, uma delas texturizada (Ticp - controle) e a outra composta por parafusos experimentais revestidos com fosfato de cálcio e secos nas temperaturas de 37⁰c (BGTi37). Esses parafusos foram instalados aleatoriamente nas tíbias dos animais, sendo que cada animal havia recebido um parafuso com a superfície experimental e outro com a superfície controle.

As tíbias dos animais dos 2 grupos foram reduzidas e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos® , Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 48 horas e banhadas em água corrente por 24 horas. Após a fixação, as peças passaram pela etapa de desidratação a partir da sequência crescente de álcoois 70, 90 e 100, gradativamente, com troca de solução a cada 7 dias. Ao término da desidratação, as peças foram imersas em mistura de álcool 100 e resina fotopolimerizável Techno Vit® (Alemanha, Heraeus Kulzer GmbH Division Technik Philipp-Reis-Str. 8/13 D-61273 Wehrheim) em diferentes concentrações, até a utilização apenas da resina como meio de imersão. As peças foram incluídas na resina Technovit, que foi fotopolimerizada e passaram pelo protocolo para processamento do Exakt. O corte e o desgaste das peças foram realizados no plano méso-distal utilizando um sistema de corte (Exakt® Cutting System, Apparatebau, GmbH, Hamburgo, Alemanha) até a obtenção de secção de aproximadamente 30 µm de espessura.

A amostra foi submetida a uma coloração histológica de Azul de Stevenel's e Fucsina Ácida, a partir disso realizada avaliação e mensuração de BIC e BAFO dos cortes histológicos por meio de um software de Imagem (ImageJ 1.50^a) (Schneider *et al.*, 2012).

4.6 - Confeção das lâminas histológicas pelo Aparelho Exakt

4.6.1 - Protocolo de uso do aparelho Exakt

As tíbias com os implantes fixados e que estavam armazenadas em álcool 70% foram cortadas com o cuidado de se preservar o tecido ósseo em

contato íntimo com o implante e de maneira que coubesse na caixa plástica devidamente codificadas a lápis onde as amostras seriam embutidas.



FIGURA 3: Imagem ilustrativa demonstrando os cortes para armazenamento de forma conveniente das áreas de interesse da amostra.

Após essa identificação, foi seguido um protocolo com os seguintes passos:

1. Fixação

As amostras compostas pelos materiais calcificados foram fixadas em uma solução de formaldeído a 10%, tamponada por um período de 24 horas.

2. Lavagem em água corrente

Após a fixação, as caixas plásticas com as amostras foram colocadas dentro de um recipiente plástico, sob a torneira e submetidos a lavagem em água corrente por um tempo de 08 horas.

3. Desidratação

As caixas plásticas contendo as amostras foram mergulhados em solução com álcool etílico e a desidratação do material foi realizada de maneira gradativa (Álcool 60°, 80°, 96°, Absoluto); durante um tempo de sete dias. Esse tempo variou de acordo com a espessura do material para a futura incorporação do glicol metacrilato.

4. Infiltração da resina Technovit 7200 (Technovit 7200, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Alemanha)

As caixas foram mergulhadas em recipientes de vidro, em local escuro, contendo a Resina 7200, (Álcool/Resina: 70/30, 50/50, 30/70, 100, 100) também de forma gradativa durante um tempo de 7 dias em cada solução. Ao atingir uma concentração absoluta de infiltração do glicol metacrilato as amostras foram removidas dos cassetes e posicionadas de forma conveniente sob uma placa de vidro. Para esse posicionamento foi utilizado uma resina foto no intuito de se posicionar o implante paralelamente a superfície da placa de vidro facilitando o futuro corte e confecção da lâmina.



FIGURA 4: Imagem ilustrativa da remoção da amostra da caixa plástica após atingir uma concentração absoluta de infiltração do glicol metacrilato sendo posicionada de forma conveniente sob uma placa de vidro anteriormente à inclusão.

5. Inclusão ou Polimerização – Fotopolimerizadora

A inclusão foi realizada preenchendo pequenas fôrmas com a resina Technovit 7200 (Technovit 7200, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Alemanha) contendo as amostras preparadas de acordo com a forma de conveniência. As formas escolhidas eram do tamanho necessário para a inclusão do material. Um pouco de Resina Technovit 7200 foi colocado na forma antes de posicionar a amostra, com o lado de interesse posicionado pelo suporte criado anteriormente. A partir disso, adicionava-se água na inclusora, atingindo um volume de aproximadamente 3 mm acima da amostra. Códigos escritos à lápis foram adicionados e posicionados na lateral da fôrma (mergulhado na resina)

para identificar as amostras. As amostras ficaram submetidas a um tempo aproximado de quatro horas na luz amarela e seis horas em luz azul

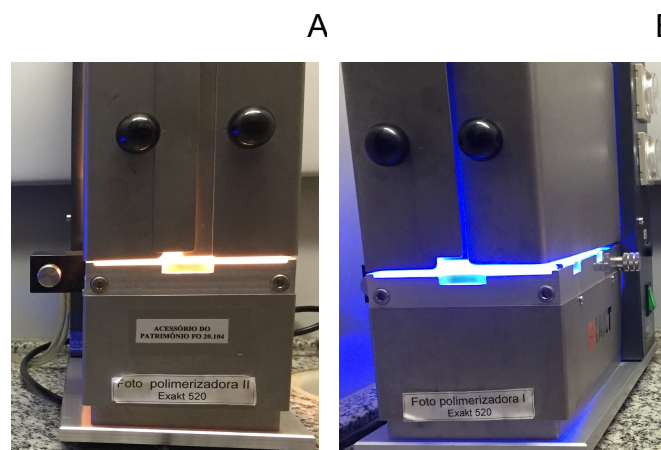


FIGURA 5: Imagem ilustrativa da fotopolimerização das amostras tempo aproximado de quatro horas na luz amarela (A) e seis horas em luz azul (B).

Após a polimerização, as amostras foram retiradas das fôrmas e secas com papel toalha, após processo de secagem as mesmas foram lixadas (lixa 320) do lado oposto à amostra, manualmente, para que as superfícies ficassem paralelas.



FIGURA 6: Imagem ilustrativa imediatamente após fotopolimerização de parte das amostras.

Após polimerização os blocos foram cortados ao meio utilizando motor e peça de mão Beltec Lb100 (Beltec, Araraquara, São Paulo, Brasil) acoplado com disco diamantado dupla face KG 7020 (Cotia, São Paulo, Brasil).

6. Colagem do bloco na lâmina grande

Para a preparação das lâminas, os lados do bloco em resina da amostra foram lixados no intuito de remover qualquer rebarba com uma lixa 800 na politriz (*Exakt 400CS*, Exakt®, Apparatebau, Norderstedt, Alemanha), as lâminas foram limpas com álcool 70% com um dos lados lixados manualmente para promover a retenção necessária do bloco a lâmina inicial.

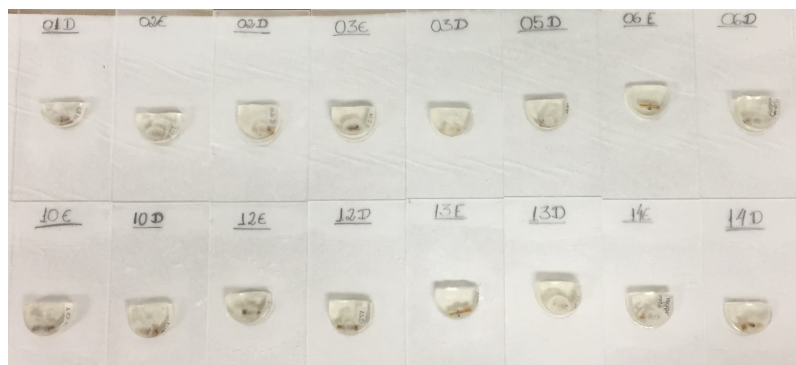


FIGURA 7: Imagem ilustrativa representando as amostras corretamente identificadas após colagem na lâmina para realização do corte inicial.

Foi utilizada cola (Locite, Henkel, Super Bonder, São Paulo, Brasil) para colar o bloco de resina na lâmina grande e escrito o código de identificação de cada amostra.

7. Exposição da área de interesse pela serra

Para exposição da área de interesse foi necessário usar a serra de corte. As serras foram montadas e posicionadas, prendendo o sanduíche de lâminas com a ajuda do vácuo, deixando a fita entre as lâminas. Posicionou-se a amostra de forma que a serra tocasse o centro do implante. A parte da amostra que caiu na base da serra foi guardada de reserva.

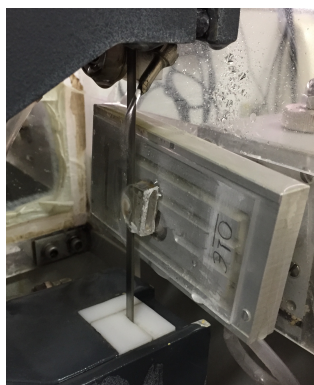


FIGURA 8: Imagem ilustrativa demonstrando o primeiro corte na porção medial na transversal do parafuso no aparelho de corte para exposição da área de interesse microscópico.

8. Colagem da lâmina pequena sobre a amostra

Para a colagem da lâmina era necessário verificar se a superfície da prensa estava limpa. Após a lavagem mediu-se a lâmina e colocou a lâmina menor com o adesivo polimerizável Technovit 7210 (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Alemanha) sobre a amostra confeccionando um sanduíche. A lâmina foi colocada na parte superior da prensa, com o vácuo ligado e aproximadamente 5 gotas de Technovit 7210 (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Alemanha) foram aplicadas no centro da amostra para que fosse espalhada até as bordas de forma conveniente. As amostras foram colocadas na parte inferior da prensa, com o peso solto bem devagar e observando se o bloco era coberto totalmente, deixando prensando com o vácuo ligado por 3 minutos. Após essas etapas o vácuo era desligado, a luz azul acessa e polimerizada por 10 minutos. Após o término do tempo de polimerização completado o “sanduíche” composto pelas duas lâminas era medido no paquímetro, obtendo a medida da cola ideal em torno de 10 a 20 μm .



FIGURA 9: Imagem ilustrativa demonstrando a polimerização da segunda lâmina após o primeiro corte realizado. Avaliação da medida com paquímetro digital no intuito de garantir uma espessura ideal da resina aplicada em μm na confecção da lâmina.

9. Corte do sanduíche pela serra

As serras foram montadas e posicionadas, prendendo o sanduíche de lâminas com a ajuda do vácuo, deixando a fita entre as lâminas. Com a serra ligada, puxou-se o sanduíche até que a fita tocasse a lâmina menor, nesse momento, o botão de controle de espessura recebeu um movimento de 4 ½ voltas no sentido horário e 1 volta no sentido anti-horário. A trava do braço do suporte do sanduíche foi colocado para apertar a mesma, apertando o parafuso que fica abaixo do suporte.



FIGURA 10: Imagem ilustrativa do momento do segundo estágio de corte através da serra de desgaste precisos sob movimento de oscilação do suporte e irrigação constante com água na serra de corte.

Nesse momento ligou-se a serra na velocidade “9”, abrindo a saída de água, soltando o suporte e deixando cortar para fazer um guia, fechando as tampas de acrílico e ligando a oscilação quando metade da largura da serra estiver dentro do material.

10. Sistema de Microdesgaste Exakt 400CS (politriz)

Para desgaste com a politriz (*Exakt 400CS*, Exakt[®], Apparatebau, Norderstedt, Alemanha) foi necessário medir a lâmina final no paquímetro. A medida deveria ter a cola da resina e a amostra em sua superfície. Para o desgaste com a politriz foi necessário colocar a lâmina em posição, com o auxílio da placa de acrílico e com o corte para baixo. Era seguido um roteiro de sequência de lixas iniciando o desgaste usando a lixa 320 ou a 800, dependendo da espessura da lâmina. Para o desgaste era ligado o vácuo e a lixadeira sob irrigação com água constante, a lixa adequada à espessura da amostra era colocada em posição e os pesos acoplados para abaixar o suporte com a lâmina, até que a mesma tocasse a lixa. Após duas voltas as lâminas eram medidas novamente no paquímetro e novo desgaste era realizado caso necessário. Os desgastes eram realizados até a espessura de 150 μm , depois somente a lixa de polimento 3200 era utilizada até a espessura de 30 μm .

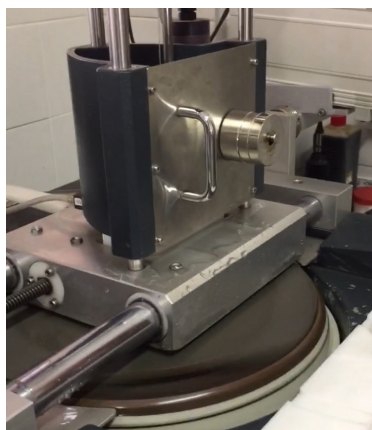


FIGURA 11: Imagem ilustrativa do momento de desgaste da lâmina até uma espessura de aproximadamente 30 µm através de lixas de desgastes e polimento.

Após completado todo o ciclo de confecção das lâminas com amostras calcificadas, as mesmas eram submetidas a coloração para posterior observação em microscópio.



FIGURA 12: Imagem ilustrativa retirada do site do fabricante de todo o sistema Exakt (Exakt[®], Apparatebau, Norderstedt, Alemanha); demonstrando todos os estágios de confecção da lâmina histológica não descalcificada desde o procedimento de polimerização, corte, desgaste e polimento por meio dos aparelhos do experimento (<https://www.exakt.de/de/produkte/trenn- duennschliff-technik/allgemein.html>).

4.6.2 – Coloração das lâminas com Stevenel's Blue e Fucsina Ácida

Para a avaliação das lâminas histológicas uma coloração de Stevenel's Blue e Fucsina Ácida foi preparada por meio de uma técnica modificada a partir de artigos previamente descritos (Cogen, *et al.*, 1980; Betoni *et al.*, 2012; Freire *et al.*, 2012).

A coloração de Stevenel's Blue é composta por duas soluções: Uma composta por 1g de azul de metileno e 75ml de água destilada e outra

composta por 1,5g de permanganato de potássio e 75ml de água destilada. No preparo da solução deve-se realizar a mistura das soluções separadas e a frio. Após esse preparo realiza-se a mistura sob ebulição, até que todo o precipitado tenha se dissolvido. Esse passo é crítico, pois se não houver total dissolução pode ocorrer precipitação durante a coloração. Após totalmente dissolvido, aguarda-se o resfriamento e realiza-se a filtragem por 3 vezes da solução.

A coloração de Fucsina Ácida é composta por 2g de fucsina, 8ml de água destilada, 1 ml de álcool absoluto e 1 ml de ácido acético. Para o preparo dilui-se a fucsina na água destilada, acrescenta-se o álcool absoluto misturando os dois. Após a mistura e no momento de utilização da coloração acrescenta-se o ácido acético.

As lâminas são mergulhadas na solução de azul de Stevenel's, dentro da estufa, e mantidas nessa solução durante 30 a 45 minutos. Após remoção das lâminas da coloração, as mesmas são submersas em um frasco contendo água destilada durante 1 minuto. Se ao observar ao microscópio a coloração azul estiver adequada passamos para a coloração com fucsina. Essa coloração é realizada por gotejamento sobre o corte, de 3 a 5 minutos. Após esse procedimento em todas as lâminas realiza-se a lavagem em água corrente e secagem com um papel macio sobre o corte.

Ao olhar no microscópio as lâminas deviam estar com uma coloração adequada para observação do contato direto pela superfície do implante e observação do tecido ósseo mineralizado. O azul observado refere-se as células do tecido conjuntivo não mineralizadas e o rosa avermelhado (fucsina) pelo tecido ósseo mineralizado.

4.7 – Avaliação Histomorfométrica

As imagens foram capturadas nos aumentos de 25X e 50X por um microscópio ótico (LEICA DMLS, Microscopia Leica e Scientific Instruments Group, Wetzlar, Alemanha) utilizando uma câmera de vídeo (DFC-300 FX 3 megapixel; Leica Microsystems Ltda., Wetzlar, Alemanha) acoplada à microscópio.

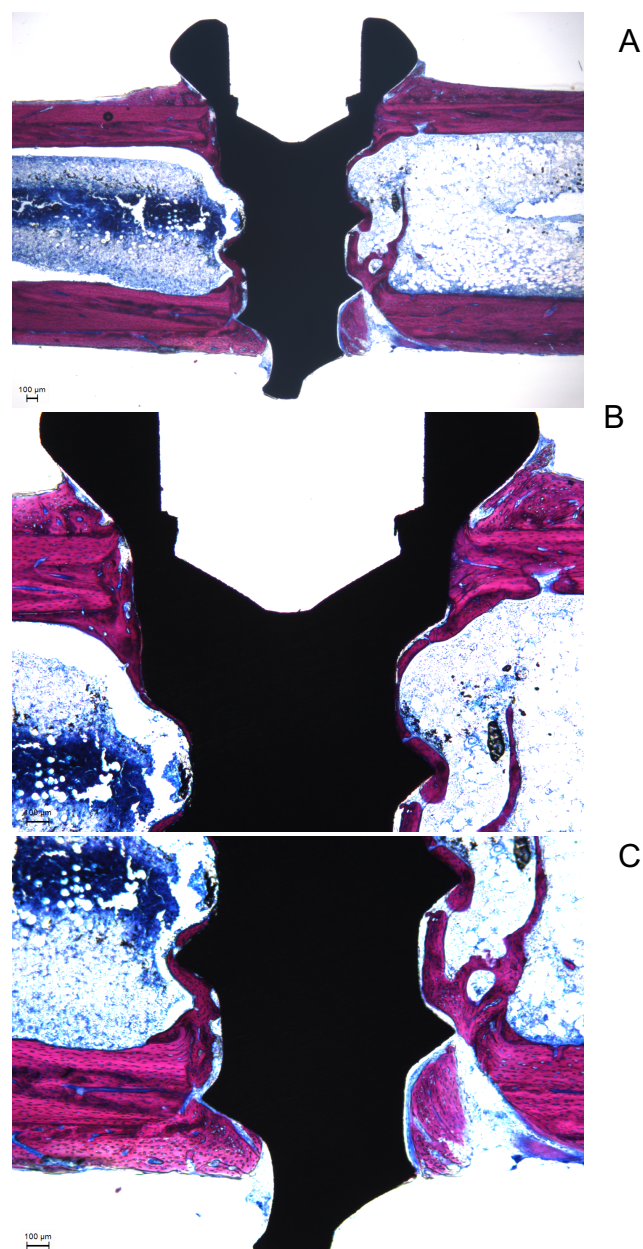


FIGURA 13: Imagem ilustrativa das imagens obtidas após coloração com Azul de Stevenel's e Fucsina Ácida nos aumentos de 25X (A) e 50X (B e C) com escala de 100 µm.

4.7.1 – Protocolo de avaliação por meio do software ImageJ 1.50^a

Os cortes obtidos através do experimento foram corados com Azul de Stevenel's e Fucsina Ácida conforme descrito anteriormente e apresentavam uma coloração específica vermelha e arroxeada. A avaliação histomorfométrica foi realizada por meio de análise da interação do contato

osso-implante (BIC) e a fração da área óssea ocupada (BAFO). Os dados histológicos foram analisados por meio de um software de análise de imagem (ImageJ, versão 1.50a, National Institutes of Health, EUA) com a captura das imagens por um microscópio de luz em um aumento de 50X conectado a um computador.

Por meio de análise da histomorfometria com o software, foram calculadas as porcentagens de BIC e BAFO conforme previamente descrito (Grassi et al., 2006; Stadlinger et al., 2013; Kohal et al., 2016). Para mensuração do contato osso-implante (BIC) foi realizada uma medida em uma área pré-determinada e de igual extensão linear do contato entre tecido conjuntivo (corado com azul de Stevenel's) com o implante e entre tecido ósseo (corado com vermelho de alizarina) com implante em 3 regiões bilateralmente correspondentes à duas regiões corticais (da cabeça e do ápice do parafuso) e uma região medular. Também foram realizadas mensurações da porcentagem de fração da área óssea ocupada (BAFO) (corado com vermelho de alizarina) ao redor de uma área pré-determinada de 2 regiões pré-selecionadas na porção medular para os dois grupos com o intuito de determinar a área de osso neoformado devido à anatomia do leito receptor (espaço medular amplo ser mais crítico ao processo de neoformação e remodelação).

Como cada implante presente na lâmina foi considerado uma unidade para a análise, as leituras foram realizadas bilateralmente na superfície do parafuso, de forma que sua média fosse considerada como um valor representativo da unidade.

A avaliação histomorfométrica foi realizada de forma padronizada. Os parâmetros histomorfométricos seguiram os padrões determinados pelas diretrizes publicadas pela Sociedade Americana de Pesquisa em Osso Mineralizado (ASBMR) (Dempster, et al., 2013).

Foram obtidas 60 imagens das 24 lâminas pelo microscópio ótico, com os aumentos de 25x e 50x. Entretanto, apenas imagens com aumentos de 50x foram utilizadas na elaboração do banco de dados da pesquisa, devido à melhor qualidade para mensuração da osseointegração e da neoformação óssea. Imagens com magnificação de 25x foram usadas no estudo apenas no intuito de observar o aspecto geral e identificar as lâminas. Dessa forma, foram

aproveitadas 48 imagens para aferição das medidas referentes lineares de BIC e de BAFO em um aumento da imagem de 200%.

A avaliação histomorfométrica da osseointegração de BIC e BAFO foi realizada em áreas pré-determinadas por meio de um gabarito definido (figura 14). Para BIC foram utilizadas medidas lineares bilaterais padronizadas de $612\mu\text{m}$ nas duas porções corticais da tíbia onde o parafuso do implante estava em contato direto com o osso somando um total de quatro regiões na medida linear. Para o cálculo de BAFO foram utilizadas medidas de área bilaterais padronizadas na porção medular de $380491\mu\text{m}^2$ (ROI1, ROI2 – BIC cortical; ROI3 – BIC medular; ROI4 e ROI5 – BAFO). Por meio da análise histológica pelo software, foram calculadas as porcentagens de BIC somando-se todas as porções de osso em contato direto com os implantes e dividindo essa soma pela área total estabelecida pelo gabarito. No cálculo de BAFO a soma das áreas de neoformação óssea foram divididas pela área total estabelecida. Todas as mensurações foram realizadas após treinamento juntamente com outro pesquisador treinado. Este método serviu como base para a avaliação do contato ósseo-implante (BIC) e da fração óssea ocupada (BAFO) (Stadlinger et. al., 2013).

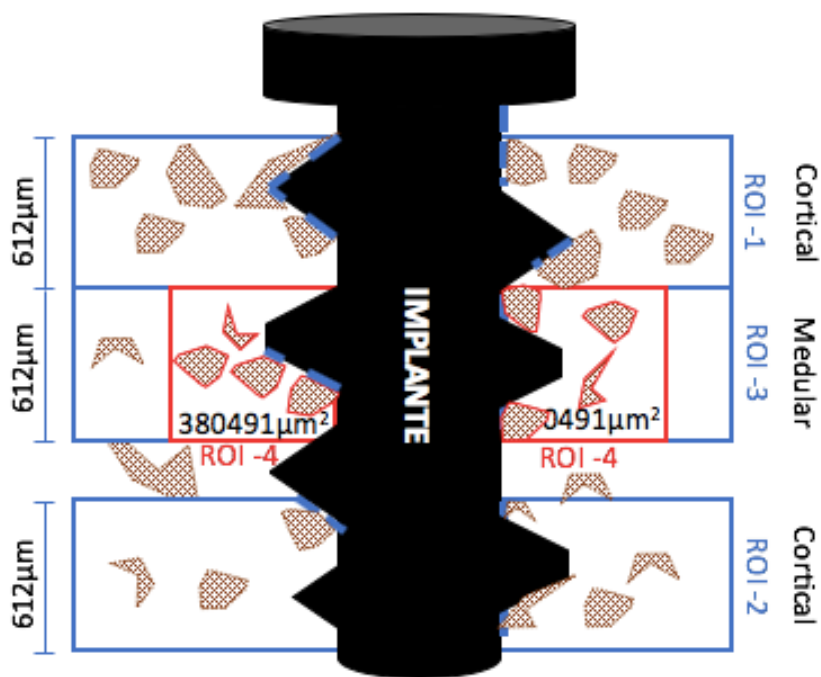


FIGURA 14: Desenho esquemático demonstrando de forma ilustrativa as regiões de aferição de BIC e BAFO nas regiões cortical e medular. Em azul podemos observar as regiões de aferição de BIC (ROI-1, ROI-2, ROI-3) e em vermelho a região de aferição de BAFO (ROI-4).

Abaixo pode-se observar um padrão da imagem histológica avaliada já com os gabaritos estabelecidos pelo software já posicionados.

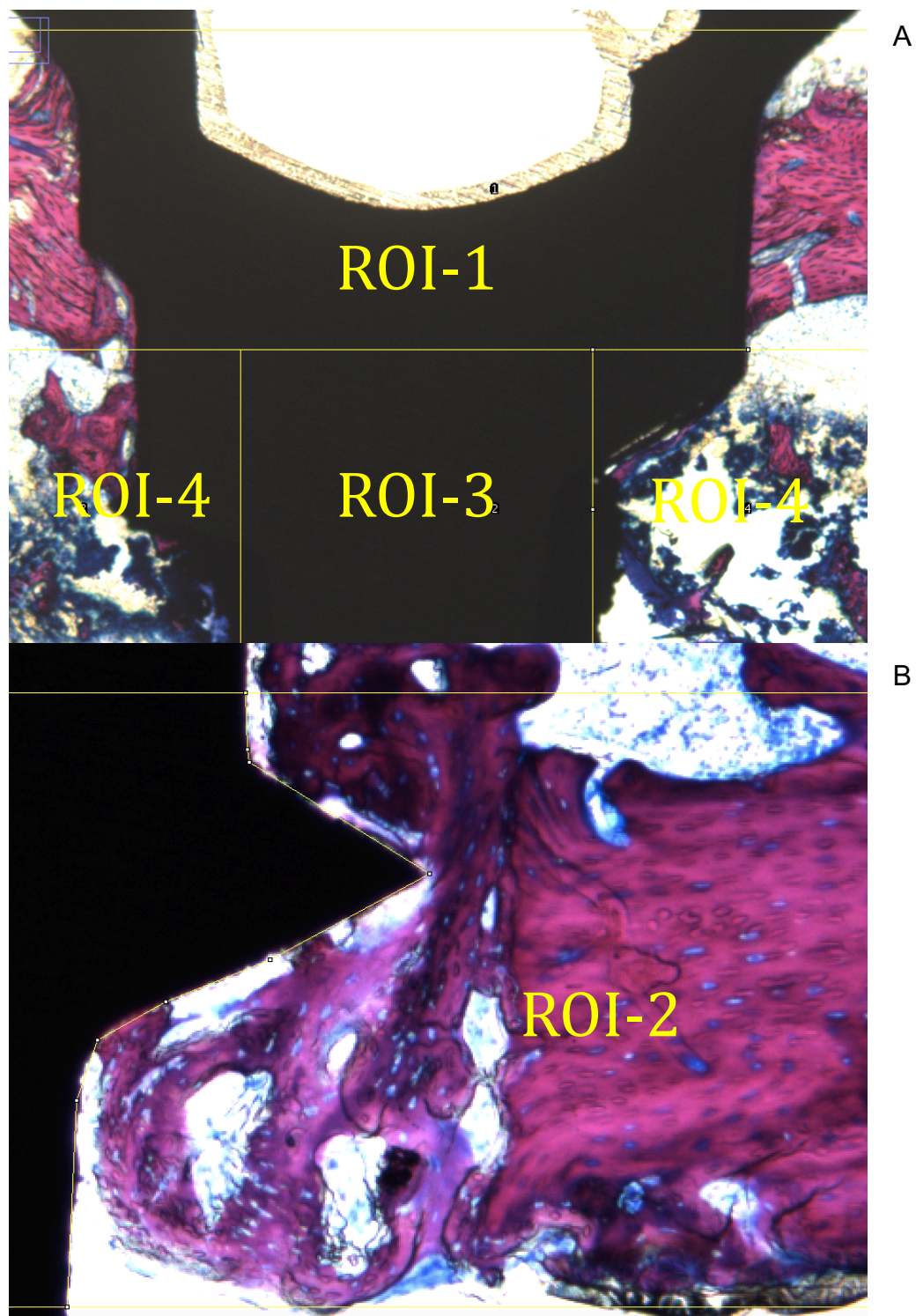


FIGURA 15: Imagem ilustrativa das imagens obtidas após coloração com Azul de Stevenel's e Fucsina Ácida nos aumentos de 50X (A) e (B) com escala de 100 μ m.

4.8 - Análise Estatística

Os dados obtidos foram organizados e os parâmetros das análises histológicas foram analisados com auxílio do programa no software estatístico SPSS (versão 20.0 IBM SPSS Statistics 20, Estados Unidos) em valores percentuais e foram submetidos a análise por meio da curva de normalidade para determinação do teste mais adequado (paramétrico ou não paramétrico). A distribuição normal dos parâmetros analisados pela histomorfometria foi comprovada pelo teste de Shapiro-Wilk. O princípio da homecedasticidade foi confirmado e os dados foram submetidos a análise pelo *Teste t de Student para amostras dependentes* (para comparação dos grupos controle e experimental) e pelo *Teste t de Student para amostras independentes* (para comparação intragrupos nos dois diferentes tempos de eutanásia), com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

A avaliação preliminar das lâminas histológicas obtidas com a metodologia previamente descrita possibilitou a observação da presença de tecido ósseo mineralizado em contato íntimo com a superfície dos implantes, em todos os grupos. Esta neoformação óssea pode ser observada tanto na região do osso cortical quanto na região do osso medular, por meio da coloração histológica nos diferentes períodos de tempo e para os grupos experimental e controle (figuras 15, 16, 17 e 18).

Nas lâminas obtidas, as neoformações de tecido ósseo maduro e em justaposição às espiras do implante, sem a presença de processo inflamatório foi uma observação recorrente em todas as situações do estudo, conforme imagens que se seguem.

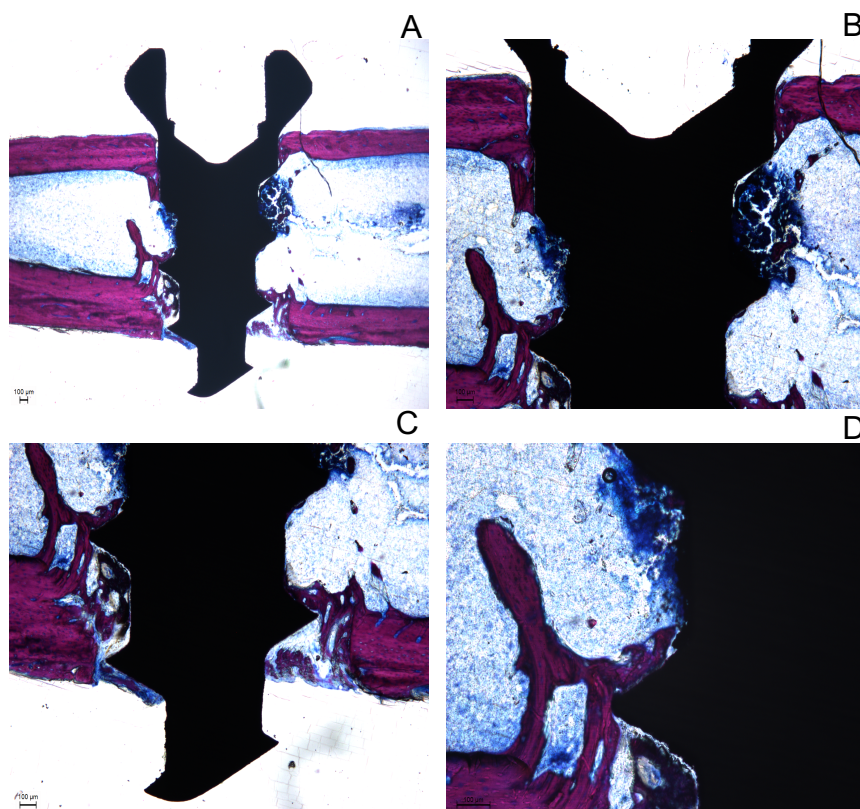


FIGURA 16: Imagem ilustrativa das imagens obtidas após coloração com Azul de Stevenel's e Fucsina Ácida da superfície controle no tempo de 14 dias. É possível observar nos aumentos de 25X mostrando todo o parafuso instalado na tíbia do animal (A); 50X mostrando a parte superior do parafuso (B); 50X mostrando a parte inferior do parafuso (C); 100X mostrando com maiores detalhes a superfície do parafuso em contato com o tecido ósseo mineralizado (D).

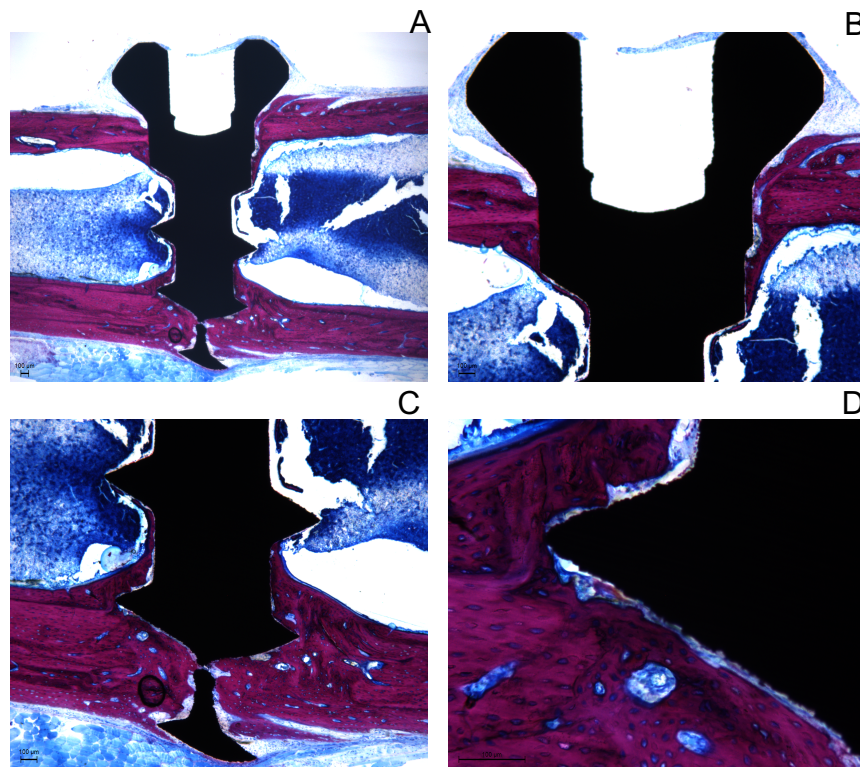


FIGURA 17: Imagem ilustrativa das imagens obtidas após coloração com Azul de Stevenel's e Fucsina Ácida da superfície experimental no tempo de 28 dias. É possível observar nos aumentos de 25X mostrando todo o parafuso instalado na tíbia do animal (A); 50X mostrando a parte superior do parafuso (B); 50X mostrando a parte inferior do parafuso (C); 100X mostrando com maiores detalhes a superfície do parafuso em contato com o tecido ósseo mineralizado (D).

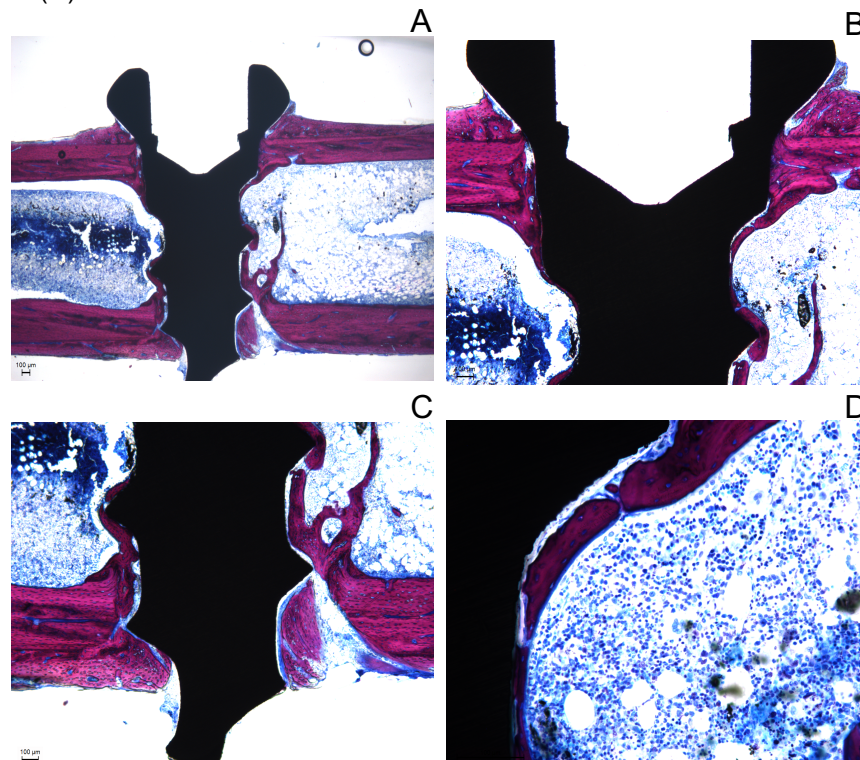


FIGURA 18: Imagem ilustrativa das imagens obtidas após coloração com Azul de Stevenel's e Fucsina Ácida da superfície controle no tempo de 28 dias. É possível observar nos aumentos de 25X mostrando todo o parafuso instalado na tíbia do animal (A); 50X mostrando a parte superior do parafuso (B); 50X mostrando a parte inferior do parafuso (C); 100X mostrando com maiores detalhes a superfície do parafuso em contato com o tecido ósseo mineralizado (D).

Para a análise do BIC e do BAFO, os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk ($P > 0,05$) o que confirmou a normalidade dos resultados, possibilitando a utilizando de um teste paramétrico. Para a comparação do grupo controle com o grupo experimental foi utilizado o Teste de t de Student para amostras dependentes, uma vez que o mesmo animal recebeu um implante controle e um implante experimental em cada tíbia. Os valores da média e desvio padrão para cada condição teste são apresentados na Tabela 1.

Análise estatística descritiva para amostras dependentes			
	n	Média	Desvio padrão
BIC <i>cortical</i> Controle	12	0,541	0,142
BIC <i>cortical</i> Experimental	12	0,505	0,137
BIC <i>medular</i> Controle	12	0,509	0,237
BIC <i>medular</i> Experimental	12	0,473	0,266
BAFO Controle	12	0,158	0,098
BAFO Experimental	12	0,142	0,072

Tabela 1: Valores de Média e Desvio Padrão para amostras dependentes nos tempos de 14 e 28 dias

Na tabela 1 é possível observar a média e desvio padrão de BIC *cortical*, BIC *medular* e BAFO nas superfícies controle e experimental dos animais de toda a amostra, sem considerar a influência do tempo até o sacrifício dos animais.

Para a obtenção do valor de BIC *cortical* foi calculada a média dos valores de BIC mensurado na região do terço da cabeça e do ápice do parafuso. Pode ser verificado que os maiores valores nominais de BIC foram observados no grupo da superfície controle na região cortical ($0,541 \pm 0,142$) e medular ($0,509 \pm 0,237$), maiores valores nominais de BAFO também foram encontrados na superfície controle ($0,158 \pm 0,098$) porém essas diferenças não apresentaram valores estatisticamente significativos conforme Teste *t de Student para amostras dependentes* realizado demonstrado na tabela 2.

Teste t para amostras dependentes (95% significância)		
	t	p
BIC <i>cortical</i> Controle – BIC <i>cortical</i> Experimental	0,780	0,452
BIC <i>medular</i> Controle – BIC <i>medular</i> Experimental	0,478	0,642
BAFO Controle - BAFO Experimental	0,410	0,690

Tabela 2: Teste t de Student para amostras dependentes para BIC *cortical*, BIC *medular* e BAFO

Na tabela 2 é possível observar o resultado do *Teste t* para amostras dependentes demonstrando não haver diferenças significativas entre as superfícies controle e experimental quando avaliadas nos períodos de 14 e 28 dias respectivamente. Na tabela é possível observar que a probabilidade de igualdade é superior a 0,05 em todas as condições consideradas.

Ao se comparar os grupos controle e experimental exclusivamente no período de tempo de 14 dias, foram obtidos os resultados de média e desvio padrão apresentados na Tabela 3.

Estatística descritiva para amostras dependentes no tempo de 14 dias			
	n	Média	Desvio Padrão
BIC <i>cortical</i> Controle	6	0,527	0,156
BIC <i>cortical</i> Experimental	6	0,489	0,115
BIC <i>medular</i> controle	6	0,405	0,083
BIC <i>medular</i> experimental	6	0,276	0,207
BAFO Controle	6	0,139	0,087
BAFO Experimental	6	0,120	0,068

Tabela 3: Valores de Média e Desvio Padrão para amostras dependentes no tempo de 14 dias

Na tabela 3 é possível observar a média e desvio padrão de BIC *cortical*, BIC *medular* e BAFO nas superfícies controle e experimental dos animais que sofreram eutanásia com 14 dias. Pode ser verificado que os maiores valores nominais de BIC foram observados no grupo da superfície controle na região cortical ($0,527 \pm 0,156$) e medular ($0,405 \pm 0,083$), maiores valores nominais de BAFO também foram encontrados na superfície controle ($0,139 \pm 0,087$). As

maiores diferenças puderam ser observadas entre as superfícies na região medular, porém essas diferenças não apresentaram valores estatisticamente significativos conforme teste realizado demonstrado na tabela 4.

Teste t para amostras dependentes no tempo de 14 dias (95% significância)		
	<i>t</i>	<i>p</i>
BIC <i>cortical</i> Controle – BIC <i>cortical</i> Experimental	0,732	0,497
BIC <i>medular</i> Controle – BIC <i>medular</i> Experimental	1,199	0,284
BAFO Controle - BAFO Experimental	0,427	0,687

Tabela 4: Teste *t* de Student para amostras dependentes no tempo de 14 dias

Na tabela 4 é possível observar o resultado do *Teste t para amostras dependentes* demonstrando não haver diferenças significativas entre as superfícies controle e experimental quando avaliadas no mesmo animal no tempo de 14 dias. Na tabela é possível observar que a probabilidade de igualdade é superior a 0,05 em todas as condições consideradas.

Considerando exclusivamente o tempo de 28 dias, ao se comparar os grupos controle e experimental foram obtidos os resultados de média e desvio padrão apresentados na Tabela 5.

Estatística descritiva para amostras dependentes no tempo de 28 dias			
	n	Média	Desvio Padrão
BIC <i>cortical</i> Controle	6	0,554	0,139
BIC <i>cortical</i> Experimental	6	0,521	0,167
BIC <i>medular</i> controle	6	0,613	0,301
BIC <i>medular</i> experimental	6	0,670	0,141
BAFO Controle	6	0,177	0,119
BAFO Experimental	6	0,163	0,075

Tabela 5: Valores de Média e Desvio Padrão para amostras dependentes no tempo de 28 dias

Na tabela 5 é possível observar a média e desvio padrão de BIC *cortical*, BIC *medular* e BAFO nas superfícies controle e experimental dos animais que sofreram eutanásia com 28 dias. Pode ser verificado que os maiores valores nominais de BIC foram observados no grupo da superfície controle apenas na

região cortical ($0,554 \pm 0,139$) sendo observado um melhor desempenho de BIC pelo grupo experimental na região medular ($0,670 \pm 0,141$), os maiores valores nominais de BAFO foram encontrados na superfície controle ($0,177 \pm 0,119$) porém essas diferenças não apresentaram valores estatisticamente significativos conforme teste realizado demonstrado na tabela 6.

Teste t para amostras dependentes no tempo de 28 dias (95% significância)		
	<i>t</i>	<i>p</i>
BIC <i>cortical</i> Controle – BIC <i>cortical</i> Experimental	0,415	0,695
BIC <i>medular</i> Controle – BIC <i>medular</i> Experimental	-0,584	0,585
BAFO Controle - BAFO Experimental	0,191	0,856

Tabela 6: Teste t de Student para amostras dependentes no tempo de 28 dias

Na tabela 6 é possível observar o resultado do *Teste t para amostras dependentes* demonstrando não haver diferenças significativas entre as superfícies controle e experimental quando avaliadas no mesmo animal no tempo de 28 dias. Na tabela é possível observar que a probabilidade de igualdade é superior a 0,05 em todas as condições consideradas.

A influencia do fator de variação tempo (14 ou 28 dias) foi avaliada de forma independente, diferentemente do fator de variação tratamento de superfície, sendo seus resultados apresentados na Tabela 7.

Análise estatística descritiva para amostras independentes				
	n	Tempo	Média	Desvio Padrão
BIC total Controle	6	14 dias	0,505	0,146
	6	28 dias	0,574	0,177
BIC total Experimental	6	14 dias	0,419*	0,081
	6	28 dias	0,570*	0,127
BAFO Controle	6	14 dias	0,139	0,087
	6	28 dias	0,177	0,119
BAFO Experimental	6	14 dias	0,120	0,068
	6	28 dias	0,163	0,075

Tabela 7: Valores de Média e Desvio Padrão obtida pelo *Teste t de Student para amostras independentes* nos tempos de 14 e 28 dias para *BIC total* e *BAFO*

Na tabela 7 é possível observar a média e desvio padrão de *BIC total* (soma das medidas lineares relativas cervical e apical divididas por 2 de *BIC cortical* e a soma das medidas lineares relativas de *BIC medular*) e *BAFO* nas superfícies controle e experimental separada pelos tempos de 14 e 28 dias dos animais que sofreram eutanásia. Não foram observadas diferenças significativas nos valores nominais de *BAFO* entre as superfícies controle e experimental apesar dos dados demonstrarem valores maiores para a superfície controle.

As maiores diferenças nos valores nominais de *BIC total* entre os tempos de 14 e 28 dias foram observados no grupo experimental ($0,419 \pm 0,081$ no tempo 14 dias e $0,570 \pm 0,127$ no tempo de 28 dias). Essas diferenças apresentaram-se estatisticamente significativas conforme demonstrado no teste realizado na tabela 8.

Tabela 8: Teste *t* de Student para amostras independentes para as amostras controle e experimental em BIC *total* e BAFO nos tempos de 14 e 28 dias.

Teste t para amostras independentes (95% significância)			
		<i>t</i>	<i>p</i> *
BIC <i>total</i> Controle	Variações iguais assumidas	0,730	0,482
	Variações iguais não assumidas	0,730	0,482
BIC <i>total</i> Experimental	Variações iguais assumidas	2,472	0,033*
	Variações iguais não assumidas	2,472	0,037*
BAFO Controle	Variações iguais assumidas	0,649	0,531
	Variações iguais não assumidas	0,649	0,532
BAFO Experimental	Variações iguais assumidas	1,048	0,319
	Variações iguais não assumidas	1,048	0,320

Na tabela 8 é possível observar que a probabilidade de igualdade é inferior a 0,05 ($p < 0,05$) na avaliação de BIC *total* da superfície experimental. O resultado do *Teste t para amostras independentes* demonstra diferenças significativas na superfície experimental quando comparada entre os tempos de 14 e 28 dias.

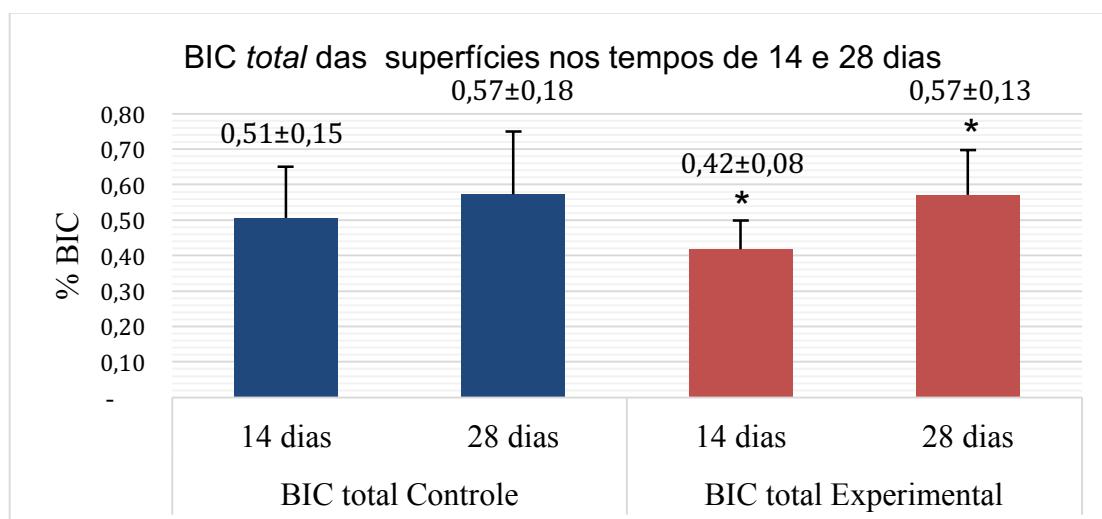


Gráfico 1: Avaliação das diferenças médias e desvio padrão de BIC *total* nos tempos de 14 e 28 dias, (*) $P < 0,05$.

No gráfico 1 é possível observar a média dos valores de BIC *total* controle e experimental demonstrando as diferenças significativas na superfície experimental quando comparada entre os tempos de 14 e 28 dias (* $p < 0,05$).

Uma vez observada diferença significativa no BIC total experimental nos períodos de 14 e 28 dias, decidimos por avaliar o BIC cortical e medular de forma separada visando elucidar qual das regiões foram determinantes para a diferença significativa previamente detectada. Os valores da média e desvio padrão para tais condições encontra-se apresentadas na Tabela 9.

Análise estatística descritiva para amostras independentes				
	n	Tempo	Média	Desvio Padrão
BIC cortical Controle	6	14 dias	0,527	0,156
	6	28 dias	0,554	0,140
BIC cortical Experimental	6	14 dias	0,489	0,115
	6	28 dias	0,521	0,167
BIC medular Controle	6	14 dias	0,405	0,083
	6	28 dias	0,613	0,301
BIC medular Experimental	6	14 dias	0,276*	0,207
	6	28 dias	0,670*	0,141

Tabela 9: Valores de Média e Desvio Padrão para amostras independentes em BIC nos tempos de 14 e 28 dias nas regiões cortical e medular

Na tabela 9 é possível observar a média e desvio padrão de BIC *medular*, BIC *cortical* superfícies controle e experimental separada pelos tempos de 14 e 28 dias dos animais que sofreram eutanásia. Não foram observadas diferenças significativas nos valores de BIC *cortical*. As maiores diferenças nos valores nominais de BIC *medular* entre os tempos de 14 e 28 dias foram observados no grupo experimental ($0,276 \pm 0,207$ no tempo 14 dias e $0,670 \pm 0,141$ no tempo de 28 dias). Essas diferenças apresentaram-se estatisticamente significativas conforme demonstrado no teste na tabela 10.

Teste t para amostras independentes (95% significância)			
		t	p*
BIC cortical controle	Variações iguais assumidas	0,319	0,757
	Variações iguais não assumidas	0,319	0,757
BIC cortical experimental	Variações iguais assumidas	0,378	0,713
	Variações iguais não assumidas	0,378	0,714
BIC medular controle	Variações iguais assumidas	1,634	0,133
	Variações iguais não assumidas	1,634	0,155
BIC medular experimental	Variações iguais assumidas	3,855	0,003*
	Variações iguais não assumidas	3,855	0,004*

Tabela 10: Teste t de Student para amostras independentes para as amostras controle e experimental em BIC medular e BIC cortical nos tempos de 14 e 28 dias.

Na tabela 10 é possível observar que a probabilidade de igualdade é inferior a 0,05 na avaliação de BIC medular da superfície experimental ($p < 0,05^*$). O resultado do Teste t para amostras independentes demonstra diferenças significativas na superfície experimental na região medular quando comparada entre os tempos de 14 e 28 dias.

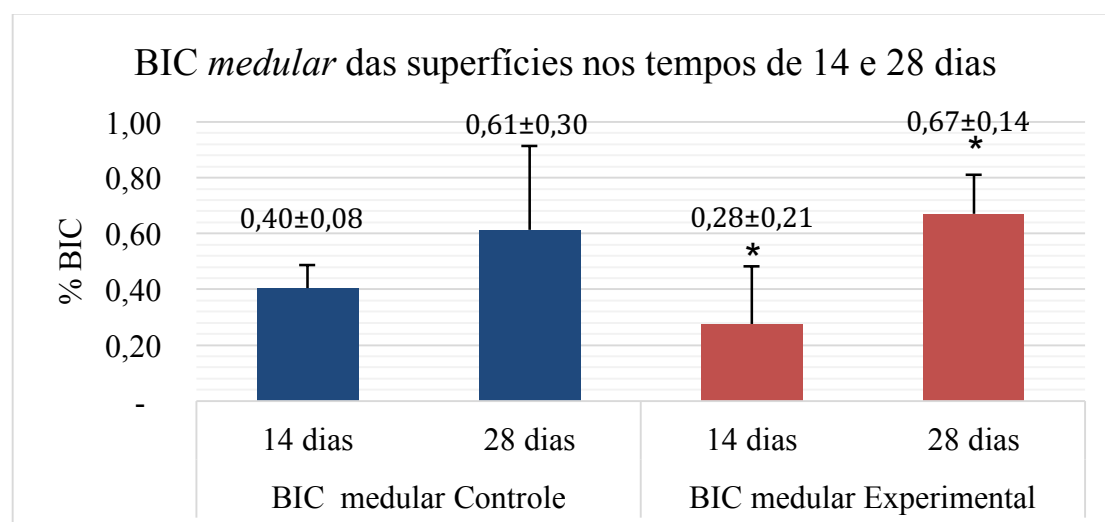


Gráfico 2: Avaliação das diferenças médias e desvio padrão de BIC medular nos tempos de 14 e 28 dias, (*) $P < 0,05$.

No gráfico 2 é possível observar a média dos valores de BIC medular controle e experimental demonstrando diferenças significativas na superfície experimental quando comparada entre os tempos de 14 e 28 dias ($p < 0,05^*$).

6 DISCUSSÃO

O processo biológico da osseointegração sobre a superfície de um material biocompatível, constitui-se em uma das descobertas mais importantes da Odontologia moderna. A osseointegração consiste na ligação direta por meio de um íntimo contato da matriz óssea mineralizada do osso com o implante e advém de uma sucessão de eventos biológicos. As primeiras reações químicas entre a superfície do implante e os tecidos orgânicos são reguladas por ações coordenadas de diferentes tipos de células por meio de moléculas sinalizadoras (Albrektsson T. e Johansson C. *et al.*, 2001). Após este contato, é formada na superfície do implante uma camada de macromoléculas glicoproteicas e água, que é determinante como parte do substrato necessário para adesão, proliferação, diferenciação e síntese proteica de osteoblastos. Uma série de eventos bioquímicos regulados pela interação das células com a superfície são desencadeados, começando com alteração do pH tecidual na região, em um primeiro momento, e culminando com a liberação de proteínas da matriz celular, citocinas e fatores de crescimento. Essas enzimas reguladoras do processo de divisão e diferenciação celular, são fundamentais para que células mesenquimais indiferenciadas e outras células que compõem o tecido conjuntivo existentes na medula óssea, diferenciem-se em osteoblastos e fibroblastos sintetizando as proteínas necessárias para a produção da matriz óssea mineralizada. (Albrektsson *et al.*, 1981; Branemark *et al.*, 1983; Davies *et al.*, 1998; Albrektsson *et al.*, 2001 e Abrahamsson *et al.*, 2004).

O principal objetivo do tratamento com implantes é o de conseguir uma rápida e estável ancoragem no osso, capaz de suportar com segurança e longevidade clínica uma prótese sobre implante. Modificações nos desenhos e na superfície dos implantes são constantemente desenvolvidas, sempre em busca de um material que estimule e acelere a osseointegração dos implantes dentários (Albrektsson *et al.*, 1981; Branemark *et al.*, 1983; Davies *et al.*, 1998; Albrektsson *et al.*, 2001 e Abrahamsson *et al.*, 2004).

A osseointegração foi e ainda continua sendo estudada em vários modelos experimentais animais e inclusive modelos humanos (Grassi *et al.*, 2006; Grassi *et al.*, 2007; Stadlinger *et al.*, 2009; Pimentel *et al.*, 2014).

Diversos autores descrevem o processo da osseointegração em modelos animais distintos, descrevendo as várias etapas envolvidas na formação óssea e osseointegração de implantes. O presente estudo utilizou ratos Wistar com parafusos instalados na tíbia dos animais, assim como Barglundh *et al.*, 2003; Abrahamsson *et al.*, 2004; Surmenev *et al.*, 2014 e Kohal *et al.*, 2016.

Uma análise histomorfométrica foi realizada de forma padronizada para a avaliação dessa superfície por meio da área de contato do tecido ósseo com o parafuso instalado nas tíbias. Os parâmetros histomorfométricos seguiram padrões determinados nas diretrizes publicadas pela Sociedade Americana de Pesquisa em Osso Mineralizado (ASBMR). Os autores definem BIC como o contato direto entre osso e uma superfície de implante, porém os resultados de BIC não são avaliados nos estudos de maneira padronizada. Estudos também definem o termo BAFO como fração da área óssea ocupada. Porém esses dados não podem ser comparados diretamente a outros trabalhos caso seja utilizada uma metodologia de mensuração diferente. Outros trabalhos empregando uma metodologia de medida distinta também utilizaram os termos BIC e BAFO com considerações e nomenclaturas diferentes. Essa situação dificulta a comparação dos resultados encontrados em outros estudos. Fato que impede uma comparação adequada de diferentes superfícies, trazendo assim uma dificuldade na comparação dos dados. (Habibovic *et al.*, em 2005; Grassi *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2013; Stadlinger *et al.*, 2013; Verzola *et al.*, 2015; Al Subaie *et al.*, 2016 e Bai *et al.*, 2018). (Barglundh *et al.*, 2003; Grassi *et al.*, 2007 e Pimentel *et al.*, 2014).

Esse fato impede uma comparação adequada de diferentes superfícies, trazendo assim uma dificuldade na comparação dos dados. Deve-se levar em conta que o BIC é uma medida linear relativa, que impossibilita uma conclusão exata e representa a medida de apenas um corte histológico. Não estamos avaliando o implante de forma volumétrica, a avaliação é histológica, sendo essa mensuração realizada apenas de forma linear. Quando se observa os valores de BAFO, pode-se ressaltar o mesmo fenômeno, em uma determinada área realiza-se uma mensuração de forma relativa, pois esta avaliando apenas a ocupação óssea em um determinado ponto que não determina toda a área óssea ocupada pelo volume total do espécime sendo ela também outra medida relativa. (Butz *et al.*, 2006 e Dempster, *et al.*, 2013). Para se observar com mais

clareza os resultados histológicos, a sua avaliação com dados de microCT torna-se de fundamental importância quando o assunto é osseointegração. (Bernhardt *et al.*, 2005; Butz *et al.*, 2006; Stadlinger *et al.*, 2013 e Al Subaie *et al.*, 2016).

Uma grande evolução da implantodontia ocorreu devido a descoberta do uso das ligas de titânio por Branemark, que por muitos anos trabalhou na reabilitação oral com implantes usinados, isto é, sem tratamento de superfície na reabilitação oral. Porém, um novo salto evolutivo na implantodontia aconteceu com os tratamentos de superfície dessas ligas de titânio. Dentre os tratamentos de superfície pode-se citar: A composição química da superfície de implantes dentários, a rugosidade superficial por meio do plasma-spray de titânio, jateamento com óxidos, jateamento com óxidos seguido de tratamento térmico, condicionamento ácido, anodização eletroquímica, irradiação por feixes de laser, tratamento com raios ultra violeta, a sinterização com polímeros e a cobertura com determinadas substâncias como a insulina, o colágeno, o alendronato, o fosfato de cálcio e derivados. (Meraw *et al.*, 1999; Schmidmaier *et al.*, 2001; Berglundh *et al.*, 2003; Busser *et al.*, 2004; Kuroda *et al.*, 2004; Grassi *et al.*, 2007; Le Guéhennec *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2007; Stadlinger *et al.*, 2009 e Oliveira *et al.*, 2013).

Um dos tratamentos de superfície das ligas de titânio consiste no recobrimento por fosfato de cálcio, o principal componente inorgânico do osso, e foi desenvolvido no intuito de aperfeiçoar ainda mais essas superfícies visando acelerar o processo de osseointegração. Algumas tendências sobre os tratamentos de superfície futuras apontam o uso de uma rugosidade em escala nanométrica, com o uso de revestimentos biomiméticos de fosfato de cálcio em implantes dentários de titânio com a incorporação de drogas biologicamente ativas em implantes dentários (Le Guéhennec *et al.*, 2007; Surmenev *et al.*, 2014 e Bai *et al.*, 2018). O presente trabalho realizou a disposição nanométrica de um vidro bioativo contendo fosfato de cálcio, pelo método biomimético e em temperatura ambiente, o que possibilita inúmeras possibilidades de incorporação de fármacos ou proteínas que, constantemente com esse revestimento, possam potencializar a resposta do tecido ósseo. Pensando no aprimoramento das ligas de titânio, novas superfícies de implantes de TiO₂ compostas por fosfato de cálcio, foram desenvolvidas no

intuito de aperfeiçoar ainda mais essas superfícies de implantes, acelerando o processo de osseointegração (Busser *et al.*, 1991; Kuroda *et al.*, 2004; Butz *et al.*, em 2006; Le Guéhennec *et al.*, 2007 e Surmenev *et al.*, 2014).

O desenvolvimento dessas superfícies acontece na busca de gerar uma estável interação da interface entre o osso e o implante. O TiO_2 é estável e biologicamente inerte, capaz de viabilizar a deposição de matriz óssea mineralizada na sua superfície (López *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2013, Bai *et al.*, 2018 e Rupp *et al.*, 2018). Atualmente, essa liga $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ microtexturizada foi muito aprimorada sendo considerada como padrão ouro. A superfície é produzida por jateamento seguido de erosão ácida, demonstrando ser capaz de promover um excelente papel de resistência à corrosão e mecânica, apresentando biocompatibilidade, com elevados percentuais de sucesso, acima de 95% em estudos longitudinais presentes na literatura (Kim *et al.*, 2005; Mertens *et al.*, 2011 e Buser *et al.*, 2012).

O presente estudo avaliou a formação da matriz extracelular produzida pelos osteoblastos em contato com a superfície revestida por fosfato de cálcio e comparou com uma superfície do titânio microtexturizada, já utilizada e com elevado índice de sucesso clínico. Acreditou-se que o fosfato de cálcio seria capaz de interferir nas respostas celulares estimulando a osseointegração. Essa cobertura poderia resultar em uma maior área de contato do tecido ósseo com o implante, reduzindo o período de osseointegração.

A neoformação óssea, foi e ainda continua sendo estudada em vários modelos experimentais em animais. Dentre os diversos estudos, Barglundh *et al.*, 2003 e Abrahamsson *et al.*, 2004 descreveram várias etapas envolvidas na formação óssea e osseointegração de implantes instalados na mandíbula de cães. O presente estudo utilizou ratos Wistar com parafusos instalados na tíbia dos animais conforme descrito por Kohal *et al.*, 2016. A partir das amostras foram confeccionadas lâminas histológicas por um meio de descalcificação e embutimento em resina. Ambos os métodos utilizados são semelhantes ao realizado no presente estudo, mudando o modelo animal, o desenho geométrico e o sítio de instalação do implante.

No estudo experimental proposto, foi realizada a observação das porções periféricas das roscas de implantes em íntimo contato com o tecido ósseo. Esses parafusos foram submetidos ao tratamento comercialmente

utilizado pela empresa para produção de uma superfície de titânio texturizada, utilizando-se jateamento com alumina e erosão ácida com ácido nítrico e fluorídrico, segundo a norma ASTM B600.

Uma análise histomorfométrica foi realizada de forma padronizada para a avaliação dessa superfície por meio da área de contato do tecido ósseo com o parafuso instalado nas tíbias dos animais. Os parâmetros histométricos seguiram padrões determinados pelas diretrizes publicadas pela Sociedade Americana de Pesquisa em Osso Mineralizado (ASBMR) (DEMPSTER, et al., 2013).

Por meio da avaliação histológica, foi possível observar a presença de tecido ósseo mineralizado em contato direto com a superfície dos implantes. Esta formação óssea pode ser observada tanto na região do osso cortical quanto na região do osso medular, nos diferentes períodos de tempo e para os grupos experimental e controle. Histologicamente, notou-se um padrão de neoformação óssea na região da superfície do parafuso semelhante nos tempos de 14 e 28 dias nas regiões cortical e medular conforme demonstrado nas figuras 15, 16 e 17. Foi possível verificar a presença de um osso mineralizado em contato direto com o implante, em todas as lâminas histológicas avaliadas.

Nas *tabelas 1 e 2* podemos observar que os implantes com a superfície controle e experimental não obtiveram diferenças significativas quando comparamos os valores quantitativos de BIC nas regiões cortical e medular. Isso pode ser observado como um resultado favorável, uma vez que a superfície experimental se comportou de maneira semelhante à superfície controle que já possui um tratamento consolidado e comercializado pela indústria.

A hipótese de que a análise histomorfométrica da formação óssea na interface dos implantes seria influenciada pelo recobrimento de fosfato de cálcio na superfície experimental (BGTi37) não foi comprovada. Porém quando analisamos a interação de contato entre osso e implante (BIC) observamos uma alteração significativa nos valores de BIC *total* quando analisadas entre os tempos de 14 e 28 dias no grupo experimental (BGTi37) conforme demonstrado no gráfico 1. Ao investigar o local específico de influência dessa alteração observamos uma diferença significativa nos valores de BIC na

porção medular entre os tempos de 14 e 28 dias do grupo experimental (gráfico 2). Os demais parâmetros foram similares entre os grupos. As diferenças nos valores medianos entre os grupos de implantes que receberam ou não o tratamento não é grande o suficiente para excluir a possibilidade de que a diferença é devido à variabilidade de amostragem aleatória, ou seja, não houve diferença estatisticamente significativa. Desta forma, podemos afirmar que a superfície experimental apresentou resultados semelhantes ao de uma superfície microtexturizada, utilizada clinicamente e com elevado índice de sucesso.

A partir das amostras foram confeccionadas lâminas histológicas por um meio de descalcificação e polimerização em resina para posterior corte e análise histomorfométrica com coloração de Azul de Stevenel's e Fuccina ácida. Ambos os métodos utilizados são semelhantes ao realizado, mudando o modelo animal, o desenho geométrico e o sítio de instalação do implante (Barglundh et al. 2003, Abrahamsson et al. 2004; Pimentel *et al.*, 2014 e Kohal *et al.*, 2016). No modelo experimental sugerido, este processo valida a condição de instalação do implante de forma aceitável e a ausência de fibrointegração ou reabsorção, que culminaria em falha do implante (Albrektsson et al., 2001; Kuroda, *et al.*, 2004; Guastaldi & Aparecida, 2010).

Nas áreas pré-determinadas, foi possível observar a presença de tecido ósseo em ambas as regiões cortical e medular, do grupo experimental e controle. Contudo, a região medular se mostrou uma região crítica à formação de osso na interface osso e implante; pois demonstrou alterações significativas nos valores de BIC da superfície experimental entre os tempos de 14 e 28 dias. Nesses locais foi possível observar formações de tecido ósseo em justaposição a superfície dos parafusos. No entanto, foi possível notar que a região medular se tornou crítica à neoformação óssea dos implantes, sendo comprometida nos animais do grupo experimental no primeiro momento de eutanásia com 14 dias, não sendo esse fato considerado uma diferença significativa num primeiro momento de avaliação. O grupo experimental apresentou resultados histológicos mais desfavoráveis quando comparados com os animais do grupo controle, porém estes valores não foram considerados diferenças significativas nesse primeiro momento como pode-se observar nas tabelas 3 e 4.

Quando se analisa o grupo dos animais que sofreram eutanásia com 14 e 28 dias, demonstrando neoformação óssea ao longo das superfícies dos implantes, é possível observar um tecido ósseo neoformado junto à essas espiras no tempo de 14 dias, esse tecido apresenta menor porcentagem de BIC quando comparado ao dos animais que se submeteram a eutanásia com 28 dias, essas diferenças são consideradas significativas quando observamos apenas o grupo experimental (tabelas 7 e 8). Não se pode afirmar qual o motivo desse acontecimento, mas pode observar uma aceleração no processo de osseointegração entre os períodos de 14 e 28 dias. Demonstrando valores de BIC semelhantes a superfície controle, o que pode ser considerado uma vantagem da superfície experimental (gráfico 1 e 2). Esses dados corroboram com achados semelhantes encontrados por outros autores na influência observada por superfícies tratadas com fosfato de cálcio (Kuroda et al., 2004; Lin et al., 2009) não sendo o mesmo observado por outros autores que mostraram melhores propriedades osteocondutoras quando comparada superfícies não revestidas (Habibovic *et al.*, em 2005).

A avaliação histomorfométrica proposta no presente estudo demonstrou uma diferença significativa na região medular entre o momento de 14 e 28 dias nos valores de BIC. Tal fato sugere uma alteração ou aceleração na deposição do tecido ósseo sobre a superfície no período proposto. Porém esses dados não comprovaram a hipótese de que o revestimento pudesse acelerar ou alterar a deposição de tecido ósseo, uma vez que o fato possa ter ocorrido devido a um atraso no processo de deposição da matriz mineralizada provocado pela camada de fosfato de cálcio sobre a superfície do implante.

Os valores de BAFO não demonstraram diferenças nos valores de média entre os grupos de implantes que receberam ou não o tratamento e não são grandes o suficiente para excluir a possibilidade de que a diferença é devido à variabilidade de amostragem aleatória. Isso nos leva a questionar a ação da superfície à distância no experimento e demonstra que o metabolismo ósseo medular dos animais foi semelhante na região medular em ambos os tempos. Apesar disso observa-se nos estudos de Verzola et al., 2015 com diferenças significativas de BAFO entre diferentes tempos com o uso do alendronato de forma sistêmica. Esse fato pode indicar que alterações no

padrão de densidade e formação óssea possa estar ligada principalmente ao uso de substâncias por via sistêmica ao invés de locais.

A avaliação histomorfométrica de alguns estudos corroboraram aos resultados do presente trabalho, demonstrando uma formação óssea por porcentagem de BIC dos implantes maior após períodos de vinte oito dias, muitas vezes associadas ou não a tratamentos de superfícies bioquímicas, sendo ou não significativos. Isso demonstra que existe a possibilidade de que diferentes tratamentos de superfície, possam provocar diferentes efeitos sobre a neoformação óssea (Kim *et al.*, 2003; Buser *et al.*, 2004; Grassi, *et al.*, 2007; Oliveira *et al.* 2013; Oliveira *et al.* 2014).

Pode-se observar em outros trabalhos a semelhança com a metodologia aplicada no estudo. As medidas lineares relativas nos cortes histológicos foram realizadas com uma ampliação de 50 vezes. Alguns autores optaram por uma ampliação maior para a avaliação de BIC de até 100 vezes que pode gerar vieses de aferição entre os estudos (Buser *et al.*, 2004 e Verzola *et al.*, 2015). Áreas do tecido ósseo mineralizadas e estruturas não mineralizadas (tecido residual) foram observadas da mesma forma por alguns autores, sendo também um achado no estudo (Berglundh *et al.*, em 2003 e Abrahamsoson *et al.*, em 2004). O uso de uma coloração de Azul de Stevel's em combinação com fucsina ácida foi também realizada por outros estudos publicados (Oliveira *et al.*, em 2014 e assemelham-se a coloração histológica desenvolvida no trabalho para avaliação de BIC e BAFO. Em contra partida, foram usadas outras colorações distintas para análise histológica em outros estudos com tipos de coloração como com azul de toluidina seguido por fucsina básica (Buser *et al.*, em 2004) não indicando que este seja um problema para aferição de BIC.

Diversos dados histomorfométricos mostraram diferença estatisticamente significativa de BIC entre os grupos controle e teste em relação ao percentual (Buser *et al.*, 2004, Grassi, *et al.*, 2007 Oliveira *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014; Kohal *et al.*, 2016). Em contrapartida não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na porcentagem de tecido ósseo em contato com os implantes dos grupos testados pela análise histomorfométrica em outros estudos (Kuroda *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2009).

7 CONCLUSÃO

Considerando a metodologia executada e os resultados obtidos, concluiu-se que:

- A osseointegração foi observada em ambas as superfícies e em todas as condições testadas.
- Não houve diferença significativa na formação óssea em ambas as superfícies experimental e controle.
- Não houve diferença significativa na formação óssea em ambos os grupos por meio das medidas de BIC e BAFO.
- Houve um aumento da formação óssea entre o período de 14 e 28 dias da superfície experimental na região medular por meio de BIC.

8 REFERÊNCIAS

AJAMI, Elnaz et al. Early bone anchorage to micro-and nano-topographically complex implant surfaces in hyperglycemia. **Acta biomaterialia**, v. 39, p. 169-179, 2016.

ABRAHAMSSON, Ingemar et al. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. **Clinical oral implants research**, v. 15, n. 4, p. 381-392, 2004

ALBREKTSSON, T. et al. Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. **Acta Orthopædica Scandinavica**, v. 52, n. 2, p. 155-170, 1981.

ALBREKTSSON, Tomas; JACOBSSON, M. Bone-metal interface in osseointegration. **Journal of prosthetic dentistry**, v. 57, n. 5, p. 597-607, 1987.

ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **European spine journal**, v. 10, n. 2, p. S96-S101, 2001.

AL QAHTANI, Mohammed SA et al. UV-A and UV-C light induced hydrophilization of dental implants. **Dental Materials**, v. 31, n. 8, p. e157-e167, 2015.

AL SUBAIE, Ahmed et al. Systemic administration of omeprazole interferes with bone healing and implant osseointegration: an in vivo study on rat tibiae. **Journal of clinical periodontology**, v. 43, n. 2, p. 193-203, 2016.

APARICIO, C.; RODRIGUEZ, D.; GIL, F. J. Variation of roughness and adhesion strength of deposited apatite layers on titanium dental implants. **Materials Science and Engineering: C**, v. 31, n. 2, p. 320-324, 2011.

Bai L, Du Z, Du J, Yao W, Zhang J, Weng Z, et al. A multifaceted coating on titanium dictates osteoimmunomodulation and osteo/angio-genesis towards ameliorative osseointegration. *Biomaterials*. 2018;162:154–69. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.02.010>.

BARROS, V. M. Avaliação in vitro e in vivo de superfícies de titânio revestidas com vidro bioativo. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

BERGLUNDH, Tord et al. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. **Clinical oral implants research**, v. 14, n. 3, p. 251-262, 2003.

BERNHARDT, Ricardo et al. Osteoconductive modifications of Ti-implants in a goat defect model: characterization of bone growth with SR μ CT and histology. **Biomaterials**, v. 26, n. 16, p. 3009-3019, 2005.

BERNHARDT, Ricardo et al. Comparison of bone-implant contact and bone-implant volume between 2D-histological sections and 3D-SR μ CT slices. **Eur Cell Mater**, v. 23, p. 237-247, 2012.

BETONI JR, Walter et al. Evaluation of centrifuged bone marrow on bone regeneration around implants in rabbit tibia. **Implant dentistry**, v. 21, n. 6, p. 481-485, 2012.

BRÅNEMARK, P.-I. et al. Intra-osseous anchorage of dental prostheses: I. Experimental studies. **Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery**, v. 3, n. 2, p. 81-100, 1969.

BRANEMARK, Per-Ingvar. Osseointegration and its experimental background. **The Journal of prosthetic dentistry**, v. 50, n. 3, p. 399-410, 1983.

Burkhardt MA, Waser J, Milleret V, Gerber I, Emmert MY, Foolen J, et al. Synergistic interactions of blood-borne immune cells, fibroblasts and extracellular matrix drive repair in an in vitro peri-implant wound healing model. **Sci Rep**. 2016;6(February):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep21071>

BUSER, D. et al. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 25, n. 7, p. 889-902, 1991.

BUSER, D. et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. **Journal of dental research**, v. 83, n. 7, p. 529-533, 2004.

BUSER, Daniel et al. 10-year survival and success rates of 511 titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: A retrospective study in 303 partially edentulous patients. **Clinical implant dentistry and related research**, v. 14, n. 6, p. 839-851, 2012.

BUTZ, F. et al. Harder and stiffer bone osseointegrated to roughened titanium. **Journal of dental research**, v. 85, n. 6, p. 560-565, 2006.

BUTZ, Frank et al. Three-dimensional bone-implant integration profiling using micro-computed tomography. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 21, n. 5, 2006.

CHRCANOVIC, Bruno Ramos; ALBREKTSSON, Tomas; WENNERBERG, Ann. Reasons for failures of oral implants. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 41, n. 6, p. 443-476, 2014.

CHRCANOVIC, Bruno Ramos; ALBREKTSSON, Tomas; WENNERBERG, Ann. Smoking and dental implants: a systematic review and meta-analysis. **Journal of dentistry**, v. 43, n. 5, p. 487-498, 2015.

CHRCANOVIC, Bruno Ramos et al. Factors influencing early dental implant failures. **Journal of dental research**, v. 95, n. 9, p. 995-1002, 2016.

COGEN, J. et al. Stevenel's Blue, an excellent stain for optical microscopical study of plastic embedded tissues. **Microscopica acta**, v. 83, n. 2, p. 117-121, 1980.

DAVIES, J. E. Mechanisms of endosseous integration. **International Journal of Prosthodontics**, v. 11, n. 5, 1998.

DEMPSTER, David W. et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **Journal of bone and mineral research**, v. 28, n. 1, p. 2-17, 2013.

DONATH, K.; BREUNER, G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 11, n. 4, p. 318-326, 1982.

FREIRE, Alexandre Rodrigues et al. Histometric analysis of bone repair in bone-implant interface using a polylactic/polyglycolic acid copolymer associated with implants in rabbit tibia. **Journal of Oral Implantology**, v. 38, n. S1, p. 449-457, 2012.

GRASSI, Sauro et al. Histologic evaluation of early human bone response to different implant surfaces. **Journal of periodontology**, v. 77, n. 10, p. 1736-1743, 2006.

GRASSI, Sauro et al. Histologic evaluation of human bone integration on machined and sandblasted acid-etched titanium surfaces in type IV bone. **Journal of Oral Implantology**, v. 33, n. 1, p. 8-12, 2007.

GUASTALDI, Antonio Carlos; APARECIDA, Anahi Herrera. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química nova**, p. 1352-1358, 2010.

HABIBOVIC, Pamela et al. Biological performance of uncoated and octacalcium phosphate-coated Ti6Al4V. **Biomaterials**, v. 26, n. 1, p. 23-36, 2005.

JUNKER, R. et al. Loaded microplasma-sprayed CaP-coated implants in vivo. **Journal of dental research**, v. 89, n. 12, p. 1489-1493, 2010.

KÄMMERER, P. W. et al. Early implant healing: promotion of platelet activation and cytokine release by topographical, chemical and biomimetic

titanium surface modifications in vitro. **Clinical oral implants research**, v. 23, n. 4, p. 504-510, 2012.

KIM, Yeon-Hee et al. A histomorphometric analysis of the effects of various surface treatment methods on osseointegration. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 18, n. 3, 2003.

KOHAL, Ralf J. et al. Evaluation of alumina toughened zirconia implants with a sintered, moderately rough surface: an experiment in the rat. **Dental materials**, v. 32, n. 1, p. 65-72, 2016.

KURODA, S. et al. A low-temperature biomimetic calcium phosphate surface enhances early implant fixation in a rat model. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 70, n. 1, p. 66-73, 2004.

LE GUÉHENNEC, Laurent et al. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. **Dental materials**, v. 23, n. 7, p. 844-854, 2007.

LIN, Audrey et al. The role of titanium implant surface modification with hydroxyapatite nanoparticles in progressive early bone-implant fixation in vivo. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 24, n. 5, 2009.

MERAW, Stephen J.; REEVE, Charles M. Qualitative analysis of peripheral peri-implant bone and influence of alendronate sodium on early bone regeneration. **Journal of periodontology**, v. 70, n. 10, p. 1228-1233, 1999.

MERTENS, Christian; STEVELING, Helmut G. Implant-supported fixed prostheses in the edentulous maxilla: 8-year prospective results. **Clinical oral implants research**, v. 22, n. 5, p. 464-472, 2011.

OH, Keun-Taek; SHIM, Hyung-Min; KIM, Kyoung-Nam. Properties of titanium–silver alloys for dental application. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 74, n. 1, p. 649-658, 2005.

OLIVEIRA, Nilson TC et al. Biomedical Ti–Mo alloys with surface machined and modified by laser beam: biomechanical, histological, and histometric analysis in rabbits. **Clinical implant dentistry and related research**, v. 15, n. 3, p. 427-437, 2013.

ÖZKURT, Zeynep; KAZAZOĞLU, Ender. Zirconia dental implants: a literature review. **Journal of oral implantology**, v. 37, n. 3, p. 367-376, 2011.

PALARIE, Victor et al. Early outcome of an implant system with a resorbable adhesive calcium–phosphate coating—a prospective clinical study in partially dentate patients. **Clinical oral investigations**, v. 16, n. 4, p. 1039-1048, 2012.

PIMENTEL LOPES DE OLIVEIRA, Guilherme Jose et al. Effect of avocado/soybean unsaponifiables on osseointegration: a proof-of-principle preclinical in vivo study. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 29, n. 4, 2014.

RUPP, F. et al. Surface characteristics of dental implants: A review. **Dental Materials**, v. 34, n. 1, p. 40-57, 2018.

SCHMIDMAIER, G. et al. Local application of growth factors (insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor- β 1) from a biodegradable poly (D, L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. **Bone**, v. 28, n. 4, p. 341-350, 2001.

SCHNEIDER, Caroline A.; RASBAND, Wayne S.; ELICEIRI, Kevin W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 671, 2012.

SCHWARZ, Frank et al. Histological and immunohistochemical analysis of initial and early osseous integration at chemically modified and conventional SLA® titanium implants: Preliminary results of a pilot study in dogs. **Clinical oral implants research**, v. 18, n. 4, p. 481-488, 2007.

STADLINGER, Bernd et al. Increased bone formation around coated implants. **Journal of clinical periodontology**, v. 36, n. 8, p. 698-704, 2009.

STADLINGER, Bernd et al. Biomechanical evaluation of a titanium implant surface conditioned by a hydroxide ion solution. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 50, n. 1, p. 74-79, 2012.

STADLINGER, Bernd et al. Osseointegration of biochemically modified implants in an osteoporosis rodent model. **European cells & materials eCM**, v. 25, p. 326-340, 2013.

STEINBERG, Arnold D.; WILLEY, Ruth; DRUMMOND, James L. In-vivo comparisons of clot formation on titanium and hydroxyapatite-coated titanium. **Journal of periodontology**, v. 63, n. 12, p. 990-994, 1992.

SURMENEV, Roman A.; SURMENEVA, Maria A.; IVANOVA, Anna A. Significance of calcium phosphate coatings for the enhancement of new bone osteogenesis—A review. **Acta biomaterialia**, v. 10, n. 2, p. 557-579, 2014.

VERZOLA, Mario Henrique A. et al. Effects of the long-term administration of alendronate on the mechanical properties of the basal bone and on osseointegration. **Clinical oral implants research**, v. 26, n. 12, p. 1466-1475, 2015.

WENNERBERG, Ann; ALBREKTSSON, Tomas. Effects of titanium surface topography on bone integration: a systematic review. **Clinical oral implants research**, v. 20, n. s4, p. 172-184, 2009.

ZAR, Jerrold H. **Biostatistical Analysis: Pearson New International Edition**. Pearson Higher Ed, 2013.

9 ANEXOS E APÊNDICES

9.1. Aprovação da comissão de ética no uso de animais



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Allyson Nogueira Moreira ,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto TITÂNIO COM SUPERFÍCIE MODIFICADA POR BIOVIDRO: PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO BIOLÓGICA IN VITRO E EM MODELO ANIMAL, submetido a esta comissão pelo protocolo 350 / 2013, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 17/02/2014.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 17/02/2014.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

9.2 – Quadro descritivo do experimento *in vivo*

IDENTIFICAÇÃO	TÍBIA	CIRURGIA	PARAFUSO	EUTANÁSIA	PESO g
1	Direita	01/04/2016	Experimental	29/04/2016	170
	Esquerda	01/04/2016	Controle	29/04/2016	
2	Direita	01/04/2016	Experimental	29/04/2016	168
	Esquerda	01/04/2016	Controle	29/04/2016	
3	Direita	01/04/2016	Controle	29/04/2016	164
	Esquerda	01/04/2016	Experimental	29/04/2016	
4	Direita	01/04/2016	Controle	29/04/2016	174
	Esquerda	01/04/2016	Experimental	29/04/2016	
5*	Direita	01/04/2016	Controle	29/04/2016	172
	Esquerda*	01/04/2016	Experimental	29/04/2016	
6	Direita	01/04/2016	Experimental	29/04/2016	170
	Esquerda	01/04/2016	Controle	29/04/2016	
7	Direita	01/04/2016	Experimental	29/04/2016	166
	Esquerda	01/04/2016	Controle	29/04/2016	
8**	Direita**	15/04/2016	Experimental	29/04/2016	244
	Esquerda**	15/04/2016	Controle	29/04/2016	
9	Direita	15/04/2016	Controle	29/04/2016	236
	Esquerda	15/04/2016	Experimental	29/04/2016	
10	Direita	15/04/2016	Controle	29/04/2016	254
	Esquerda	15/04/2016	Experimental	29/04/2016	
11	Direita	15/04/2016	Experimental	29/04/2016	224
	Esquerda	15/04/2016	Controle	29/04/2016	
12	Direita	15/04/2016	Controle	29/04/2016	254
	Esquerda	15/04/2016	Experimental	29/04/2016	
13	Direita	15/04/2016	Experimental	29/04/2016	242
	Esquerda	15/04/2016	Controle	29/04/2016	
14	Direita	15/04/2016	Experimental	29/04/2016	256
	Esquerda	15/04/2016	Controle	29/04/2016	

Legenda: * Tíbia fraturada na área de inserção do parafuso
 ** Animal morreu antes do período de eutanásia

9.3 - Tabela adquirida pelo software SPSS 20.0 de resultado do teste Estatístico Shapiro-Wilk comprovando a distribuição Normal da amostra

Shapiro-Wilk				
Região	Tempo	Statistic	n	Sig.
ROI 1 C	14 dias	0,912	6	0,45
	28 dias	0,944	6	0,689
ROI 1 T	14 dias	0,883	6	0,282
	28 dias	0,876	6	0,252
ROI 2 C	14 dias	0,985	6	0,974
	28 dias	0,942	6	0,678
ROI 2 T	14 dias	0,911	6	0,445
	28 dias	0,965	6	0,857
ROI 3 C	14 dias	0,727	6	0,845
	28 dias	0,859	6	0,185
ROI 3 T	14 dias	0,913	6	0,459
	28 dias	0,953	6	0,765
BIC C	14 dias	0,904	6	0,401
	28 dias	0,914	6	0,463
BIC T	14 dias	0,800	6	0,059
	28 dias	0,983	6	0,965
BAFO C	14 dias	0,827	6	0,102
	28 dias	0,881	6	0,274
BAFO T	14 dias	0,911	6	0,441
	28 dias	0,828	6	0,104

9.4 - Banco de Dados produzido pelo software ImageJ 1.50^a

	Area	Mean	Min	Max	Length	
LÂMINA 01 E						
BIC cortical	1	687.419	30.570	5.468	155.691	376.924
	2	252.386	13.301	7.762	26.667	137.309
	3	873.387	34.214	9.824	108.203	479.584
	4	99.626	57.115	24.194	164.667	52.973
	5	933.162	18.001	5.683	45.133	511.915
	6	4.624.766.372	130.293	0.000	255.000	0.000
	7	3.579.890	28.713	6.161	173.400	1.965.194
	8	4.624.766.372	130.293	0.000	255.000	0.000
BIC cortical	Area	Mean	Min	Max	Length	
	1	816.932	24.372	6.479	92.177	446.615
	2	4.624.766.372	128.207	0.000	255.000	0.000
	3	1.414.688	51.261	6.371	213.995	774.721
	4	4.624.766.372	128.207	0.000	255.000	0.000
	5	199.252	18.839	9.667	49.000	107.517
	6	435.033	13.784	4.683	30.755	238.096
	7	4.624.766.372	128.207	0.000	255.000	0.000
	8	1.228.719	60.493	3.929	206.220	673.043
	9	4.624.766.372	128.207	0.000	255.000	0.000
	1	723.948	12.938	4.322	52.960	395.567
	2	4.624.766.372	128.207	0.000	255.000	0.000
	3	1.361.554	13.830	3.333	136.816	747.020
	4	4.624.766.372	128.207	0.000	255.000	0.000
	5	876.708	20.011	3.635	142.712	479.735
	6	4.624.766.372	128.207	0.000	255.000	0.000
	7	1.275.211	17.919	3.000	141.773	698.741
	8	4.624.766.372	128.207	0.000	255.000	0.000
BIC medular	1	723.948	12.938	4.322	52.960	395.567
	2	4.624.766.372	128.207	0.000	255.000	0.000
	3	1.361.554	13.830	3.333	136.816	747.020
	4	4.624.766.372	128.207	0.000	255.000	0.000
	5	876.708	20.011	3.635	142.712	479.735
	6	4.624.766.372	128.207	0.000	255.000	0.000
	7	1.275.211	17.919	3.000	141.773	698.741
	8	4.624.766.372	128.207	0.000	255.000	0.000
BAFO	Area	Mean	Min	Max		
	1	52.333.477	36.555	5	255	0.000
	2	380.491.176	162.941	0	255	0.000
	3	2.480.685	42.714	17	94	0.000

	4	18.437.430	37.635		4	174	0.000
	5	380.491.176	147.237		2	255	0.000
		Area	Mean	Min	Max		Length
LÂMINA 01D							
BIC cortical	1	232.460	11.276	7.333	15.000		125.740
	2	86.342	22.513	14.684	41.293		46.893
	3	478.204	23.297	12.812	44.425		262.218
	4	215.856	20.063	14.379	51.180		118.170
	5	99.626	24.341	13.651	65.155		52.973
	6	411.787	16.567	7.832	59.183		225.310
	7	345.370	14.342	8.406	30.587		187.806
	8	179.327	9.549	6.333	13.333		96.583
	9	73.059	9.450	7.860	13.667		38.657
	10	242.423	17.103	7.266	50.456		131.233
	11	4.624.766.372	72.401	0.000	255.000		0.000
	12	3.858.843	29.568	6.940	168.602		2.119.768
BIC cortical		Area	Mean	Min	Max		Length
	1	242.404	28.705	6.747	88.286		130.389
	2	444.407	11.791	6.253	20.833		241.653
	3	4.688.628.903	66.671	0.000	245.000		0.000
	4	1.316.388	17.135	5.643	69.194		716.190
	5	4.688.628.903	66.671	0.000	245.000		0.000
	6	791.179	7.399	4.213	20.070		429.984
	7	4.688.628.903	66.671	0.000	245.000		0.000
	8	1.350.055	8.864	4.513	34.814		734.833
BIC medular		Area	Mean	Min	Max		Length
	1	181.803	7.892	5.956	15.350		98.667
	2	838.313	13.508	5.121	76.589		456.734
	3	4.688.628.903	66.671	0.000	245.000		0.000
	4	1.343.321	7.630	4.770	38.213		730.950
	5	4.688.628.903	66.671	0.000	245.000		0.000
	6	218.837	19.862	5.293	58.265		117.489
	7	1.030.216	16.160	4.463	125.103		560.643
	8	4.688.628.903	66.671	0.000	245.000		0.000
	9	1.393.822	21.619	4.487	126.553		759.063
	10	4.688.628.903	66.671	0.000	245.000		0.000
BAFO		Area	Mean	Min	Max		
	1	49.989.058	16.290		4	168	
	2	385.745.308	78.083		3	213	
	3	13.029.206	16.296		5	75	
	4	29.886.373	13.207		4	131	
	5	385.745.308	64.293		3	228	

LÂMINA 02 E

BIC cortical	Area	Mean	Min	Max	Length
1	59.776	34.463	22.667	50.667	30.979
2	119.551	19.300	6.667	33.612	64.166
3	172.685	35.568	16.534	87.844	93.145
4	508.092	31.145	10.581	77.451	277.837
5	4.624.766.372	80.489	0.000	255.000	0.000
6	1.484.426	27.887	5.450	142.778	814.643
7	4.624.766.372	80.489	0.000	255.000	0.000
8	46.492	63.449	26.551	111.667	24.968
9	687.419	14.668	4.819	46.371	376.819
10	4.624.766.372	80.489	0.000	255.000	0.000
11	1.388.121	44.416	5.040	162.168	760.506
12	4.624.766.372	80.489	0.000	255.000	0.000
BIC cortical	Area	Mean	Min	Max	Length
1	664.173	16.108	5.940	54.097	364.595
2	4.624.766.372	110.132	0.000	255.000	0.000
3	1.338.308	59.582	5.333	255.000	733.724
2	4.624.766.372	110.132	0.000	255.000	0.000
4	122.872	55.363	37.265	92.518	65.831
5	86.342	60.788	37.792	88.609	46.460
6	146.118	32.896	19.794	55.479	80.200
7	59.776	24.954	8.561	39.291	31.826
8	129.514	11.556	6.333	16.000	69.248
9	4.624.766.372	110.132	0.000	255.000	0.000
10	1.318.383	29.868	6.393	99.000	723.348
11	4.624.766.372	110.132	0.000	255.000	0.000
BIC medular	Area	Mean	Min	Max	Length
1	92.984	50.699	31.930	70.517	49.236
2	119.551	47.500	12.618	105.706	64.737
3	282.273	11.253	4.396	22.595	154.083
4	4.624.766.372	110.132	0.000	255.000	0.000
5	1.334.987	24.312	2.829	113.223	731.745
6	4.624.766.372	110.132	0.000	255.000	0.000
7	385.220	15.741	5.773	87.263	209.955
8	491.488	7.069	2.996	25.913	268.705
9	4.624.766.372	110.132	0.000	255.000	0.000
10	1.255.286	30.380	3.174	219.343	688.322
11	4.624.766.372	110.132	0.000	255.000	0.000
BAFO	Area	Mean	Min	Max	Length
1	45.987.308	51.415	10	216	
2	581.151	58.903	32	140	
3	2.540.460	40.675	15	189	
4	1.936.063	24.792	11	48	

5	380.491.176	146.929	3	255
6	134.508.227	43.334	3	208
7	763.798	27.578	9	78
8	380.491.176	81.411	2	255

LÂMINA 02 D

BIC cortical

	Area	Mean	Min	Max	Length
1	59.776	34.463	22.667	50.667	30.979
2	119.551	19.300	6.667	33.612	64.166
3	172.685	35.568	16.534	87.844	93.145
4	508.092	31.145	10.581	77.451	277.837
5	0.000	80.489	0.000	255.000	0.000
6	1.484.426	27.887	5.450	142.778	814.643
7	0.000	80.489	0.000	255.000	0.000
8	46.492	63.449	26.551	111.667	24.968
9	687.419	14.668	4.819	46.371	376.819
10	0.000	80.489	0.000	255.000	0.000
11	1.388.121	44.416	5.040	162.168	760.506
12	0.000	80.489	0.000	255.000	0.000

BIC cortical

	Area	Mean	Min	Max	Length
1	571.188	16.032	7.798	46.333	313.002
2	4.624.766.372	102.522	0.000	255.000	0.000
3	1.351.591	43.827	7.911	175.274	740.385
4	4.624.766.372	102.522	0.000	255.000	0.000
5	295.557	60.645	18.053	113.360	161.066
6	86.342	44.821	26.333	75.000	45.558
7	4.624.766.372	102.522	0.000	255.000	0.000
8	1.344.949	62.204	6.000	219.531	736.679
9	4.624.766.372	102.522	0.000	255.000	0.000

BIC medular

	Area	Mean	Min	Max	Length
1	1.102.526	44.540	6.333	158.259	604.157
2	156.081	44.220	15.333	87.000	83.827
3	4.624.766.372	102.522	0.000	255.000	0.000
4	1.411.367	42.444	9.958	156.001	774.229
5	3.321	245.333	245.333	245.333	0.000
6	624.322	23.335	4.833	95.322	340.957
7	4.624.766.372	102.522	0.000	255.000	0.000
8	1.434.613	42.611	5.277	172.315	786.688
9	4.624.766.372	102.522	0.000	255.000	0.000

BAFO

	Area	Mean	Min	Max
1	28.778.597	42.158	14	167
2	903.275	50.651	35	73
3	380.491.176	134.566	2	255
4	25.182.103	35.132	10	157

5	5.243.642	39.526	11	147
6	380.491.176	94.528	2	255

LÂMINA 03 E

BIC cortical

	Area	Mean	Min	Max	Length
1	450.610	17.912	5.568	46.643	246.826
2	99.399	4.507	3.403	9.000	53.069
3	268.378	4.675	3.094	17.577	146.210
4	43.073	17.531	7.000	31.490	22.219
5	245.185	16.401	6.778	63.473	133.661
6	99.399	15.636	5.623	93.264	53.535
7	397.597	31.773	6.206	80.593	217.604
8	62.953	10.530	6.230	14.286	34.537
9	815.075	14.315	4.206	80.407	446.875
10	367.778	19.247	5.905	62.333	200.468
11	192.172	10.674	4.021	22.005	103.898
12	106.026	21.054	5.111	42.469	56.983
13	4.614.249.567	94.092	0.000	255.000	0.000
14	4.410.017	14.904	3.140	113.512	2.425.322

BIC cortical

	Area	Mean	Min	Max	Length
1	593.083	10.536	4.247	64.846	325.586
2	593.083	7.783	3.794	37.467	324.222
3	4.614.249.567	102.644	0.000	255.000	0.000
4	1.381.651	14.211	3.732	89.895	758.572
5	4.614.249.567	102.644	0.000	255.000	0.000
6	142.472	39.393	20.760	67.179	76.472
7	271.692	12.478	5.667	26.333	147.488
8	298.198	10.585	5.333	24.000	162.002
9	4.614.249.567	102.644	0.000	255.000	0.000
10	1.361.771	50.974	4.380	197.333	746.920
11	4.614.249.567	102.644	0.000	255.000	0.000

BIC medular

	Area	Mean	Min	Max	Length
1	62.953	13.846	5.128	60.142	33.564
2	612.963	16.249	5.130	52.170	335.716
3	4.614.249.567	102.644	0.000	255.000	0.000
4	1.626.836	29.847	3.333	142.267	893.311
5	4.614.249.567	102.644	0.000	255.000	0.000
6	278.318	28.644	12.566	61.899	151.092
7	487.057	24.871	9.720	51.248	266.858
8	4.614.249.567	102.644	0.000	255.000	0.000
9	1.497.617	30.504	6.000	116.820	822.412
10	4.614.249.567	102.644	0.000	255.000	0.000

BAFO

	Area	Mean	Min	Max
1	3.266.925	84.780	15	217

2	2.932.280	37.246	12	105
3	25.293.817	38.315	4	171
4	379.625.932	137.716	0	255
5	30.459.269	55.022	9	153
6	5.930.827	47.837	7	121
7	379.625.932	111.808	2	255

LÂMINA 03 D

BIC cortical

	Area	Mean	Min	Max	Length
1	430.730	50.533	18.824	150.092	235.535
2	0.000	127.164	0.000	255.000	0.000
3	1.457.857	63.302	20.251	216.070	800.624
4	0.000	127.164	0.000	255.000	0.000
5	437.357	30.314	11.561	158.323	239.364
6	46.386	120.919	89.870	145.333	24.421
7	400.911	69.544	21.983	184.443	218.703
8	129.219	80.475	45.077	150.950	70.494
9	0.000	127.164	0.000	255.000	0.000
10	1.610.269	76.177	13.194	252.152	883.853
11	0.000	127.164	0.000	255.000	0.000

BIC cortical

	Area	Mean	Min	Max	Length
1	1.301.778	119.520	10.480	255.000	713.214
2	4.624.766.372	119.541	0.000	255.000	0.000
3	371.937	27.858	14.730	138.333	202.807
4	46.492	91.644	55.845	119.568	23.969
5	235.781	134.908	28.942	255.000	128.344
6	4.624.766.372	119.541	0.000	255.000	0.000
7	1.348.270	122.195	14.853	255.000	739.172
8	4.624.766.372	119.541	0.000	255.000	0.000

BIC medular

	Area	Mean	Min	Max	Length
1	169.364	14.959	12.430	27.333	91.134
2	4.624.766.372	119.541	0.000	255.000	0.000
3	1.351.591	115.129	13.291	255.000	740.544
4	4.624.766.372	119.541	0.000	255.000	0.000
5	1.258.607	115.853	14.186	255.000	690.246
6	4.624.766.372	119.541	0.000	255.000	0.000

BAFO

	Area	Mean	Min	Max
1	133.641.482	99.759	23	255
2	380.491.176	168.997	8	255
3	4.024.886	71.826	35	178
4	141.063.610	73.031	17	251
5	1.922.780	77.461	35	160
6	380.491.176	130.318	8	255

LÂMINA 04 E

BIC cortical	Area	Mean	Min	Max	Length
1	69.738	102.919	47.309	213.333	38.899
2	176.006	52.275	23.308	125.217	94.778
3	225.819	46.777	26.316	126.333	122.747
4	4.624.766.372	127.961	0.000	255.000	0.000
5	1.471.142	122.854	25.866	255.000	807.508
6	4.624.766.372	127.961	0.000	255.000	0.000
7	159.401	63.555	19.829	135.192	86.945
8	129.514	55.343	31.930	101.130	69.344
9	83.022	201.980	110.637	255.000	43.812
10	39.850	157.762	96.707	252.688	20.778
11	4.624.766.372	127.961	0.000	255.000	0.000
12	1.364.875	142.737	25.333	255.000	747.840
BIC cortical	Area	Mean	Min	Max	Length
1	92.984	29.352	14.801	58.185	50.039
2	222.498	47.515	18.419	105.139	121.810
3	215.856	27.083	12.020	62.000	116.682
4	4.624.766.372	130.272	0.000	255.000	0.000
5	1.344.949	70.874	13.619	230.238	737.142
6	4.624.766.372	130.272	0.000	255.000	0.000
7	109.588	181.354	83.119	253.746	59.739
8	102.947	29.785	18.000	70.000	54.670
9	116.230	29.467	16.000	79.000	61.959
10	4.624.766.372	130.272	0.000	255.000	0.000
11	1.331.666	104.691	13.413	255.000	730.104
BIC medular	Area	Mean	Min	Max	Length
1	401.824	20.972	11.979	46.719	220.268
2	249.065	58.209	25.667	100.134	135.343
3	76.380	14.856	10.675	25.621	40.133
4	4.624.766.372	130.272	0.000	255.000	0.000
5	1.504.351	41.579	9.653	148.277	826.963
6	4.624.766.372	130.272	0.000	255.000	0.000
7	464.921	83.272	21.900	198.236	254.197
8	564.547	40.428	9.860	190.944	308.272
9	4.624.766.372	130.272	0.000	255.000	0.000
10	1.580.731	103.518	11.279	255.000	866.400
11	4.624.766.372	130.272	0.000	255.000	0.000
BAFO	Area	Mean	Min	Max	
1	86.282.657	58.351	12	255	
2	380.491.176	150.378	9	255	
3	64.690.407	62.578	11	222	
4	25.328.221	67.674	18	223	
5	380.491.176	138.686	7	255	

LÂMINA 04 D

BIC cortical	Area	Mean	Min	Max	Length
1	597.755	81.421	23.900	159.824	327.320
2	4.624.766.372	128.113	0.000	255.000	0.000
3	1.454.538	93.317	32.078	205.774	796.925
4	4.624.766.372	128.113	0.000	255.000	0.000
5	4.624.766.372	128.113	0.000	255.000	0.000
6	1.301.778	121.466	22.495	255.000	714.547
7	4.624.766.372	128.113	0.000	255.000	0.000

BIC cortical	Area	Mean	Min	Max	Length
1	49.813	141.240	85.559	197.974	25.772
2	159.401	37.933	22.418	90.975	86.441
3	537.980	33.880	21.182	78.121	293.674
4	4.624.766.372	128.205	0.000	255.000	0.000
5	1.278.532	95.658	18.919	255.000	700.038
6	4.624.766.372	128.205	0.000	255.000	0.000
7	219.177	161.566	100.946	231.780	120.258
8	780.403	26.194	16.738	108.667	427.534
9	4.624.766.372	128.205	0.000	255.000	0.000
10	1.301.778	70.065	16.429	202.620	713.203
11	4.624.766.372	128.205	0.000	255.000	0.000

BIC medular	Area	Mean	Min	Max	Length
1	1.288.495	27.913	13.000	85.999	706.683
2	4.624.766.372	128.205	0.000	255.000	0.000
3	4.624.766.372	128.205	0.000	255.000	0.000
4	694.060	56.778	14.497	238.667	380.127
5	252.386	23.788	14.786	55.248	137.336
6	4.624.766.372	128.205	0.000	255.000	0.000
7	1.371.516	77.293	13.093	255.000	751.108
8	4.624.766.372	128.205	0.000	255.000	0.000

BAFO	Area	Mean	Min	Max
1	45.183.659	63.847	16	255
2	380.491.176	141.865	11	255
3	27.114.845	66.209	13	255
4	9.700.240	54.192	12	115
5	6.651.688	77.605	29	246
6	380.491.176	193.910	10	255

LÂMINA 06 E

BIC cortical	Area	Mean	Min	Max	Length
1	302.199	94.704	15.108	239.249	164.019
2	710.665	100.413	23.964	211.135	389.432
3	4.624.766.372	69.867	0.000	255.000	0.000
4	1.640.506	82.904	11.717	241.648	899.665

	5	4.624.766.372	69.867	0.000		255.000	0.000
	6	597.755	91.066	16.493		252.504	327.631
	7	235.781	109.726	21.391		210.244	129.580
	8	4.624.766.372	69.867	0.000		255.000	0.000
	9	1.408.046	114.970	11.638		255.000	772.358
	10	4.624.766.372	69.867	0.000		255.000	0.000
BIC cortical		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	889.991	56.540	41.090		99.680	486.937
	2	4.624.766.372	107.499	0.000		255.000	0.000
	3	1.308.420	84.024	42.687		188.874	716.749
	4	4.624.766.372	107.499	0.000		255.000	0.000
	5	1.122.452	60.680	39.503		139.257	615.042
	6	4.624.766.372	107.499	0.000		255.000	0.000
	7	1.215.436	62.366	36.037		139.564	665.555
	8	4.624.766.372	107.499	0.000		255.000	0.000
BIC medular		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	1.527.597	53.698	41.787		116.420	839.236
	2	1.527.597	53.698	41.787		116.420	839.236
	3	4.624.766.372	107.499	0.000		255.000	0.000
	4	4.624.766.372	107.499	0.000		255.000	0.000
	5	215.856	70.511	47.632		112.333	117.473
	6	644.247	62.086	35.327		220.900	352.657
	7	285.594	66.483	36.457		166.367	156.586
	8	4.624.766.372	107.499	0.000		255.000	0.000
	9	1.524.276	87.376	33.630		255.000	835.269
	10	4.624.766.372	107.499	0.000		255.000	0.000
BAFO		Area	Mean	Min		Max	
	1	58.842.368	74.490		40		253
	2	3.400.564	93.663		60		222
	3	380.491.176	147.414		35		255
	4	52.413.178	75.835		44		242
	5	5.701.921	62.374		43		151
	6	521.375	182.446		131		255
	7	385.220	153.888		86		255
	8	380.491.176	173.075		30		255
LÂMINA 06 D							
BIC cortical		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	53.134	28.070	16.720		49.124	28.170
	2	395.183	54.272	22.073		152.460	216.148
	3	4.624.766.372	125.776	0.000		255.000	0.000
	4	1.660.431	80.881	15.309		210.635	912.395
	5	4.624.766.372	125.776	0.000		255.000	0.000
	6	348.691	16.140	11.000		35.111	191.016

	7	199.252	48.072	23.981	95.548	109.407
	8	46.492	92.232	68.983	148.000	25.317
	9	348.691	100.366	25.287	222.905	190.997
	10	4.624.766.372	125.776	0.000	255.000	0.000
	11	1.660.431	85.531	13.667	255.000	911.653
BIC cortical		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	1.371.516	35.268	11.694	223.333	751.653
	2	1.371.516	35.268	11.694	223.333	751.653
	3	0.000	108.713	0.000	255.000	0.000
	4	0.000	108.713	0.000	255.000	0.000
	5	1.271.890	37.675	12.253	94.399	696.838
	6	1.271.890	37.675	12.253	94.399	696.838
	7	0.000	108.713	0.000	255.000	0.000
	8	0.000	108.713	0.000	255.000	0.000
BIC medular		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	1.368.195	25.897	10.788	82.845	750.828
	2	4.624.766.372	108.713	0.000	255.000	0.000
	3	1.457.859	24.388	11.111	64.252	799.438
	4	4.624.766.372	108.713	0.000	255.000	0.000
	5	903.275	35.522	11.329	160.941	494.899
	6	4.624.766.372	108.713	0.000	255.000	0.000
	7	1.368.195	34.403	11.624	117.246	750.455
	8	4.624.766.372	108.713	0.000	255.000	0.000
BAFO		Area	Mean	Min	Max	
	1	129.483.761	64.117	11	255	
	2	380.491.176	103.342	8	255	
	3	36.157.554	57.937	13	143	
	4	380.491.176	140.248	8	255	
LÂMINA 07 E						
BIC cortical		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	156.081	30.927	15.038	62.699	85.572
	2	1.052.714	25.065	8.672	148.333	576.284
	3	53.134	48.894	31.929	144.333	28.524
	4	46.492	59.508	23.800	177.866	23.969
	5	172.685	96.137	31.849	195.304	93.384
	6	112.909	132.883	58.007	244.912	60.577
	7	511.413	91.836	9.667	245.376	279.860
	8	89.663	52.845	16.674	146.333	47.520
	9	4.624.766.372	103.340	0.000	255.000	0.000
	10	3.965.110	52.979	8.709	255.000	2.176.179
	11	4.624.766.372	103.340	0.000	255.000	0.000
BIC cortical		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	723.948	50.088	42.331	73.021	395.871

	2	4.624.766.372	129.024	0.000		255.000	0.000
	3	1.301.778	94.632	41.967		253.411	713.249
	4	4.624.766.372	129.024	0.000		255.000	0.000
	5	1.135.735	50.351	37.683		113.800	623.168
	6	4.624.766.372	129.024	0.000		255.000	0.000
	7	1.188.869	48.805	36.213		126.667	651.790
	8	4.624.766.372	129.024	0.000		255.000	0.000
BIC medular		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	680.777	58.014	45.256		95.184	372.539
	2	192.610	53.550	45.299		80.145	105.663
	3	76.380	55.852	47.667		80.440	41.860
	4	4.624.766.372	129.024	0.000		255.000	0.000
	5	1.477.784	61.414	39.143		211.833	811.010
	6	4.624.766.372	129.024	0.000		255.000	0.000
	7	1.072.639	46.544	35.383		107.667	586.938
	8	239.102	54.656	39.943		96.120	130.273
	9	4.624.766.372	129.024	0.000		255.000	0.000
	10	1.457.859	48.319	36.156		137.667	798.850
	11	4.624.766.372	129.024	0.000		255.000	0.000
BAFO		Area	Mean	Min		Max	
	1	17.530.835	73.769		44		181
	2	3.373.997	80.259		44		131
	3	4.592.753	88.729		57		147
	4	380.491.176	169.423		37		255
	5	28.479.719	82.301		40		236
	6	2.792.846	61.553		40		163
	7	380.491.176	195.919		33		255
LÂMINA 07 D							
BIC cortical		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	1.145.698	20.993	7.858		112.289	629.264
	2	195.931	29.572	9.624		115.667	105.750
	3	212.535	43.724	10.741		83.622	115.787
	4	215.856	27.673	13.771		65.949	117.270
	5	577.830	23.200	10.582		54.969	316.958
	6	4.624.766.372	107.932	0.000		255.000	0.000
	7	4.629.283	38.940	7.729		189.565	2.548.366
	8	4.624.766.372	107.932	0.000		255.000	0.000
BIC cortical		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	109.588	17.768	14.217		26.527	59.022
	2	4.624.766.372	109.120	0.000		255.000	0.000
	3	1.447.896	133.529	13.198		253.968	792.778
	4	4.624.766.372	109.120	0.000		255.000	0.000
	5	684.098	24.635	8.458		97.013	374.582

	6	86.342	14.640	11.645	19.000	46.460
	7	202.573	14.792	10.000	20.667	109.339
	8	4.624.766.372	109.120	0.000	255.000	0.000
	9	1.378.158	23.463	7.501	129.501	754.636
	10	4.624.766.372	109.120	0.000	255.000	0.000
BIC medular		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	1.242.003	33.612	9.683	180.508	680.128
	2	4.624.766.372	109.120	0.000	255.000	0.000
	3	1.524.276	23.678	9.485	148.469	836.383
	4	4.624.766.372	109.120	0.000	255.000	0.000
	5	192.610	28.951	10.667	72.000	104.631
	6	458.279	10.963	7.333	30.333	250.408
	7	172.685	23.468	10.667	40.000	92.938
	8	4.624.766.372	109.120	0.000	255.000	0.000
	9	1.388.121	33.364	7.333	94.780	761.146
	10	4.624.766.372	109.120	0.000	255.000	0.000
BAFO		Area	Mean	Min	Max	
	1	133.282.829	56.738	13	255	
	2	380.491.176	89.869	6	255	
	3	43.064.949	49.573	8	207	
	4	2.430.872	50.689	16	105	
	5	4.855.101	71.334	29	209	
	6	380.491.176	152.599	6	255	
LÂMINA 09 E						
BIC cortical		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	39.850	100.503	50.492	167.845	21.035
	2	46.492	87.284	46.192	140.771	24.786
	3	0.000	92.156	0.000	255.000	0.000
	4	1.643.827	162.325	18.450	255.000	900.470
	5	0.000	92.156	0.000	255.000	0.000
	6	0.000	92.156	0.000	255.000	0.000
	7	1.514.313	167.962	16.607	255.000	831.221
	8	0.000	92.156	0.000	255.000	0.000
BIC cortical		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	112.909	59.215	25.215	121.919	61.231
	2	501.450	80.838	11.288	226.528	274.415
	3	56.455	18.465	8.182	71.667	29.384
	4	0.000	109.593	0.000	255.000	0.000
	5	1.361.554	56.846	7.036	210.851	746.116
	6	0.000	109.593	0.000	255.000	0.000
	7	531.338	24.961	11.507	45.115	290.651
	8	176.006	18.535	5.333	34.000	94.761
	9	0.000	109.593	0.000	255.000	0.000

	10	1.281.853	59.784	7.648	255.000	702.418
	11	0.000	109.593	0.000	255.000	0.000
BIC medular		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	561.226	27.401	5.498	89.737	306.665
	2	129.514	23.772	6.183	73.784	69.857
	3	4.624.766.372	109.593	0.000	255.000	0.000
	4	1.351.591	21.895	3.960	106.570	742.115
	5	4.624.766.372	109.593	0.000	255.000	0.000
	6	298.878	43.090	5.827	152.598	163.559
	7	478.204	7.714	3.261	33.908	261.138
	8	4.624.766.372	109.593	0.000	255.000	0.000
	9	1.487.747	17.680	3.027	205.366	815.224
	10	4.624.766.372	109.593	0.000	255.000	0.000
BAFO		Area	Mean	Min	Max	
	1	49.328.096	47.090	10	255	
	2	12.190.887	33.956	6	255	
	3	380.491.176	90.056	3	255	
	4	20.871.623	27.184	4	251	
	5	7.432.091	23.619	4	255	
	6	2.457.438	27.527	10	176	
	7	380.491.176	120.237	3	255	
LÂMINA 09 D						
BIC cortical		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	86.342	27.466	18.670	41.143	45.667
	2	56.455	69.318	52.439	88.116	29.384
	3	76.380	46.565	19.000	75.333	40.091
	4	0.000	123.956	0.000	255.000	0.000
	5	1.647.148	49.240	8.667	137.560	903.766
	6	0.000	123.956	0.000	255.000	0.000
	7	451.637	17.100	4.667	77.253	247.674
	8	106.268	108.466	53.914	168.726	57.447
	9	126.193	31.386	13.333	91.000	67.426
	10	0.000	123.956	0.000	255.000	0.000
	11	1.657.111	47.252	4.266	224.484	909.899
	12	0.000	123.956	0.000	255.000	0.000
BIC cortical		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	342.049	15.892	7.739	26.573	186.711
	2	4.624.766.372	100.797	0.000	255.000	0.000
	3	1.235.361	74.996	5.173	218.906	676.896
	4	4.624.766.372	100.797	0.000	255.000	0.000
	5	415.108	27.427	6.787	112.940	227.140
	6	53.134	31.000	14.667	52.000	27.335
	7	69.738	26.175	14.667	50.667	36.446

	8	4.624.766.372	100.797	0.000		255.000	0.000
	9	1.315.062	86.873		8.006	236.726	720.070
BIC medular		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	521.375	19.634		6.667	95.236	285.015
	2	189.289	5.799		4.163	14.449	102.602
	3	102.947	10.666		6.367	20.989	55.058
	4	4.624.766.372	100.797	0.000		255.000	0.000
	5	1.265.249	16.323		3.368	89.667	693.252
	6	4.624.766.372	100.797	0.000		255.000	0.000
	7	4.624.766.372	100.797	0.000		255.000	0.000
	8	1.570.768	43.224		2.847	248.153	861.541
	9	4.624.766.372	100.797	0.000		255.000	0.000
BAFO		Area	Mean	Min		Max	
	1	36.546.095	39.082		5	233	
	2	1.856.362	9.683		4	44	
	3	2.181.807	15.303		5	84	
	4	380.491.176	125.413		3	255	
	5	8.531.297	21.570		8	175	
	6	380.491.176	111.019		2	255	
LÂMINA 10 D		Area	Mean	Min		Max	Length
BIC cortical	1	26.567	42.346		32.667	48.865	13.878
	2	73.059	19.067		6.658	43.336	39.967
	3	219.177	9.819		6.713	15.881	119.387
	4	421.750	21.393		7.102	52.551	230.710
	5	391.862	29.958		6.447	59.047	214.289
	6	96.305	15.884		8.970	26.770	51.349
	7	179.327	10.406		6.482	27.095	97.473
	8	411.787	22.169		6.438	63.114	225.622
	9	242.423	14.522		5.475	32.333	132.591
	10	4.624.766.372	88.989	0.000		255.000	0.000
	11	4.327.084	29.187		3.796	170.988	2.377.864
	12	4.624.766.372	88.989	0.000		255.000	0.000
BIC cortical		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	1.261.928	59.798		45.334	168.211	692.198
	2	1.261.928	59.798		45.334	168.211	692.198
	3	4.624.766.372	136.514	0.000		255.000	0.000
	4	780.403	52.833		42.465	76.065	427.459
	5	4.624.766.372	136.514	0.000		255.000	0.000
	6	1.232.040	79.312		40.379	204.428	675.324
	7	4.624.766.372	136.514	0.000		255.000	0.000
BIC medular		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	561.226	53.764		42.667	89.667	307.263
	2	142.797	42.730		38.684	46.096	77.229

	3	4.624.766.372	136.514	0.000	255.000	0.000
	4	1.431.292	46.434	36.102	110.540	784.049
	5	89.663	64.407	53.667	81.667	47.380
	6	385.220	71.903	42.667	153.133	210.319
	7	4.624.766.372	136.514	0.000	255.000	0.000
	8	1.574.089	53.444	33.550	205.548	863.609
	9	4.624.766.372	136.514	0.000	255.000	0.000
BAFO		Area	Mean	Min	Max	
	1	35.772.334	90.962	40	255	
	2	1.544.201	109.363	64	226	
	3	1.494.388	59.171	39	100	
	4	5.502.670	77.132	48	172	
	5	836.857	76.980	59	195	
	6	345.370	69.750	50	92	
	7	380.491.176	125.682	33	255	
	8	4.904.914	67.508	33	229	
	9	7.285.973	81.973	44	248	
	10	6.744.672	87.177	44	255	
	11	18.776.158	73.073	42	251	
	12	380.491.176	143.791	32	255	
LÂMINA 10 E						
BIC cortical		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	106.268	62.728	23.915	139.537	57.627
	2	295.557	63.861	14.315	239.333	160.530
	3	4.624.766.372	109.920	0.000	255.000	0.000
	4	1.437.934	107.482	15.942	255.000	790.072
	5	132.835	52.622	14.090	131.713	72.275
	6	179.327	82.038	39.183	181.267	98.135
	7	162.722	49.937	22.391	110.727	88.865
	8	172.685	66.083	30.542	106.666	94.408
	9	4.624.766.372	109.920	0.000	255.000	0.000
	10	1.647.148	122.144	15.182	255.000	904.654
BIC cortical		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	713.986	59.874	50.363	85.760	390.450
	2	66.417	135.414	115.268	154.779	35.006
	3	252.386	65.901	53.051	133.667	138.421
	4	4.624.766.372	135.418	0.000	255.000	0.000
	5	1.391.442	72.619	50.520	178.750	762.917
	6	3.321	165.000	165.000	165.000	0.000
	7	1.235.361	66.404	41.333	122.400	676.335
	8	4.624.766.372	135.418	0.000	255.000	0.000
	9	1.255.286	65.569	41.333	122.450	687.220
	10	4.624.766.372	135.418	0.000	255.000	0.000

BIC medular	Area	Mean	Min	Max	Length
1	132.835	81.543	55.553	129.000	72.585
2	106.268	146.448	72.333	223.000	56.492
3	255.706	82.162	50.289	185.333	139.591
4	298.878	54.379	44.493	116.333	164.224
5	4.624.766.372	135.418	0.000	255.000	0.000
6	1.464.500	103.560	40.415	223.000	803.747
7	4.624.766.372	135.418	0.000	255.000	0.000
8	694.060	82.467	40.478	182.858	380.490
9	4.624.766.372	135.418	0.000	255.000	0.000
10	1.368.195	132.317	41.667	255.000	750.136
11	4.624.766.372	135.418	0.000	255.000	0.000

BAFO	Area	Mean	Min	Max
1	87.361.938	107.388	38	255
2	7.521.754	91.853	58	255
3	3.380.638	114.633	66	255
4	380.491.176	181.923	37	255
5	68.476.191	96.881	39	255
6	1.919.459	111.292	70	177
7	3.417.168	61.654	42	224
8	1.085.922	66.875	44	175
9	2.477.364	68.985	44	236
10	471.563	86.134	51	231
11	380.491.176	148.831	34	255

LÂMINA 11 E

BIC cortical	Area	Mean	Min	Max	Length
1	501.450	35.503	5.667	251.969	274.262
2	245.744	122.241	44.468	241.061	133.583
3	199.252	99.453	25.645	208.023	107.533
4	4.624.766.372	119.444	0.000	255.000	0.000
5	4.624.766.372	119.444	0.000	255.000	895.944
6	4.624.766.372	119.444	0.000	255.000	0.000
7	219.177	14.277	6.554	65.432	118.801
8	69.738	62.938	42.579	95.434	36.899
9	733.911	71.656	10.998	249.326	402.078
10	4.624.766.372	119.444	0.000	255.000	0.000
11	1.600.656	73.615	6.985	255.000	877.584
12	4.624.766.372	119.444	0.000	255.000	0.000

BIC cortical	Area	Mean	Min	Max	Length
1	53.134	12.508	9.252	25.333	28.466
2	820.253	14.591	5.101	64.855	448.868
3	4.624.766.372	115.395	0.000	255.000	0.000
4	1.378.158	51.698	6.367	247.000	755.741

	5	4.624.766.372	115.395	0.000		255.000	0.000
	6	680.777	14.721		4.757	74.257	373.142
	7	4.624.766.372	115.395	0.000		255.000	0.000
BIC medular		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	488.167	19.258		4.667	247.173	267.043
	2	63.096	7.901		5.809	17.333	32.852
	3	4.624.766.372	115.395	0.000		255.000	0.000
	4	1.418.008	12.568		4.140	249.991	777.919
	5	4.624.766.372	115.395	0.000		255.000	0.000
	6	650.889	10.600		5.133	86.667	356.136
	7	4.624.766.372	115.395	0.000		255.000	0.000
	8	1.261.928	14.300		4.473	115.453	691.832
	9	4.624.766.372	115.395	0.000		255.000	0.000
BAFO		Area	Mean	Min		Max	
	1	26.194.966	48.616		4	255	
	2	4.728.909	27.621		8	97	
	3	380.491.176	120.196		3	255	
	4	32.122.706	55.509		6	255	
	5	380.491.176	131.047		3	255	
LÂMINA 11 D							
BIC cortical		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	89.663	11.875		6.622	57.333	48.111
	2	650.889	9.865		3.168	39.359	355.933
	3	36.529	59.960		22.739	137.030	19.456
	4	305.519	19.260		7.927	80.736	165.841
	5	185.968	25.403		9.212	52.984	101.593
	6	199.252	34.645		9.667	70.525	108.416
	7	109.588	25.623		10.317	72.313	59.450
	8	59.776	15.616		7.188	62.187	32.599
	9	59.776	22.653		14.882	43.667	32.599
	10	169.364	15.529		9.730	48.667	92.149
	11	4.624.766.372	83.490	0.000		255.000	0.000
	12	4.270.630	44.607		3.000	209.249	2.346.046
	13	4.624.766.372	83.490	0.000		255.000	0.000
BIC cortical		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	687.419	10.172		4.409	23.347	376.836
	2	4.624.766.372	115.800	0.000		255.000	0.000
	3	1.308.420	39.219		5.375	163.527	716.544
	4	4.624.766.372	115.800	0.000		255.000	0.000
	5	690.739	14.949		5.117	34.052	378.316
	6	1.349.014.171	108.329		3.000	255.000	0.000
	7	1.394.762	65.030		3.337	189.000	764.555
	8	4.624.766.372	115.800	0.000		255.000	0.000

BIC medular	Area	Mean	Min	Max	Length
1	498.129	17.182	3.450	79.000	273.258
2	4.624.766.372	115.800	0.000	255.000	0.000
3	1.613.939	32.819	0.000	176.058	885.665
4	4.624.766.372	115.800	0.000	255.000	0.000
5	106.268	9.693	6.333	12.440	57.819
6	4.624.766.372	115.800	0.000	255.000	0.000
7	1.404.725	14.194	2.707	255.000	769.819
8	4.624.766.372	115.800	0.000	255.000	0.000

BAFO	Area	Mean	Min	Max
1	6.073.858	31.371	15	146
2	10.869.184	40.109	12	230
3	5.977.553	34.037	5	216
4	380.491.176	120.190	2	255
5	5.818.152	37.241	14	163
6	5.622.221	33.675	7	223
7	380.491.176	128.363	2	255

LÂMINA 12 E

BIC cortical	Area	Mean	Min	Max	Length
1	96.305	24.153	9.667	52.757	51.720
2	212.535	50.943	10.635	228.667	116.167
3	176.006	63.677	12.397	174.333	95.355
4	195.931	43.852	12.708	100.563	106.024
5	4.624.766.372	107.901	0.000	255.000	0.000
6	1.613.939	88.049	11.085	255.000	884.681
7	4.624.766.372	107.901	0.000	255.000	0.000
8	86.342	53.484	18.999	84.399	46.802
9	139.476	35.950	18.678	90.333	74.805
10	4.624.766.372	107.901	0.000	255.000	0.000
11	1.464.500	91.274	14.733	250.945	804.088
12	4.624.766.372	107.901	0.000	255.000	0.000

BIC cortical	Area	Mean	Min	Max	Length
1	903.275	15.425	4.703	53.013	495.031
2	4.624.766.372	127.241	0.000	255.000	0.000
3	1.301.778	26.223	4.600	155.697	713.650
4	3.321	117.333	117.333	117.333	0.000
5	1.185.548	31.169	7.074	154.199	650.163
6	4.624.766.372	127.241	0.000	255.000	0.000
7	1.394.762	30.086	5.674	153.217	764.157
8	4.624.766.372	127.241	0.000	255.000	0.000

BIC medular	Area	Mean	Min	Max	Length
1	202.573	9.137	5.000	19.333	109.339
2	4.624.766.372	127.241	0.000	255.000	0.000

	3	1.398.083	20.767	3.667	131.333	765.801
	4	4.624.766.372	127.241	0.000	255.000	0.000
	5	551.263	10.718	4.000	38.387	301.524
	6	4.624.766.372	127.241	0.000	255.000	0.000
	7	1.447.896	51.187	4.004	170.305	794.738
	8	4.624.766.372	127.241	0.000	255.000	0.000
BAFO		Area	Mean	Min	Max	
	1	23.368.912	56.055	5	135	
	2	380.491.176	128.113	0	255	
	3	12.004.919	47.593	8	215	
	4	4.277.271	19.571	4	103	
	5	380.491.176	149.567	3	255	
LÂMINA 12 D						
BIC cortical		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	73.059	15.681	7.732	33.405	39.967
	2	33.209	47.810	27.453	116.667	16.801
	3	461.600	29.994	10.916	71.462	253.582
	4	199.252	36.683	10.962	84.473	108.317
	5	199.252	29.189	6.503	193.821	108.411
	6	780.403	30.788	9.135	78.165	430.587
	7	388.541	22.977	8.431	95.689	211.872
	8	926.521	19.758	4.799	116.667	508.423
	9	4.624.766.372	104.704	0.000	255.000	0.000
	10	4.244.063	33.651	5.473	181.572	2.335.106
	11	4.624.766.372	104.704	0.000	255.000	0.000
BIC cortical		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	156.081	35.493	10.895	109.533	84.204
	2	292.236	12.266	6.333	54.667	159.979
	3	4.624.766.372	106.634	0.000	255.000	0.000
	4	1.424.650	47.762	6.513	225.667	781.628
	5	4.624.766.372	106.634	0.000	255.000	0.000
	6	112.909	94.642	60.997	138.667	60.905
	7	1.039.430	19.741	6.738	113.179	569.843
	8	4.624.766.372	106.634	0.000	255.000	0.000
	9	1.384.800	45.266	6.367	191.411	758.253
	10	4.624.766.372	106.634	0.000	255.000	0.000
BIC medular		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	255.706	20.942	5.312	89.325	138.830
	2	86.342	11.186	6.239	34.667	46.181
	3	378.578	19.475	4.633	67.281	207.044
	4	4.624.766.372	106.634	0.000	255.000	0.000
	5	1.577.410	29.697	3.813	158.187	865.570
	6	4.624.766.372	106.634	0.000	255.000	0.000

	7	418.429	20.237	4.751	63.107	227.969
	8	4.624.766.372	106.634	0.000	255.000	0.000
	9	1.437.934	32.886	2.227	243.701	789.264
	10	4.624.766.372	106.634	0.000	255.000	0.000
BAFO		Area	Mean	Min	Max	
	1	81.019.090	47.312	5	255	
	2	22.525.412	34.285	6	233	
	3	380.491.176	123.655	3	255	
	4	28.419.944	44.986	3	210	
	5	380.491.176	127.000	2	255	
LÂMINA 13 E						
BIC cortical		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	122.872	99.422	50.418	187.333	66.292
	2	122.872	139.982	68.000	193.333	65.604
	3	39.850	59.096	39.667	72.539	22.038
	4	235.781	137.153	50.459	248.435	128.858
	5	76.380	132.588	64.461	206.323	40.952
	6	4.624.766.372	96.031	0.000	255.000	0.000
	7	3.915.297	153.828	22.561	255.000	2.151.200
	8	4.624.766.372	96.031	0.000	255.000	0.000
BIC cortical		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	96.305	105.404	42.278	167.997	51.155
	2	428.391	35.755	19.333	65.677	233.775
	3	4.624.766.372	123.681	0.000	255.000	0.000
	4	1.212.115	98.104	19.333	255.000	664.667
	5	4.624.766.372	123.681	0.000	255.000	0.000
	6	92.984	106.758	33.430	255.000	49.260
	7	56.455	83.387	41.092	180.138	29.214
	8	790.365	40.005	18.701	147.822	432.525
	9	4.624.766.372	123.681	0.000	255.000	0.000
	10	1.424.650	83.787	16.416	255.000	781.318
	11	4.624.766.372	123.681	0.000	255.000	0.000
BIC medular		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	292.236	41.809	18.381	68.439	158.636
	2	102.947	32.549	19.894	55.429	55.154
	3	219.177	55.862	18.210	117.930	120.025
	4	69.738	121.714	24.667	197.667	36.446
	5	295.557	53.775	21.533	138.063	160.623
	6	4.624.766.372	123.681	0.000	255.000	0.000
	7	1.321.703	59.448	16.860	202.025	725.155
	8	4.624.766.372	123.681	0.000	255.000	0.000
	9	29.888	141.381	69.268	255.000	15.676
	10	136.155	40.355	25.727	98.000	74.180

	11	4.624.766.372	123.681	0.000		255.000	0.000
	12	1.520.955	135.760		24.555	255.000	833.399
	13	4.624.766.372	123.681	0.000		255.000	0.000
BAFO		Area	Mean	Min		Max	
	1	65.995.506	84.703		15	207	
	2	3.390.601	34.249		19	114	
	3	6.867.544	70.011		29	217	
	4	33.749.929	90.313		20	239	
	5	2.025.726	51.652		21	133	
	6	1.886.250	47.748		24	174	
	7	949.767	52.108		23	205	
	8	2.291.395	61.451		28	251	
	9	380.491.176	134.289		9	255	
	10	25.706.799	76.498		23	255	
	11	9.484.384	67.447		23	255	
	12	4.376.897	72.825		25	244	
	13	11.739.250	69.522		29	255	
	14	14.548.700	53.848		23	255	
	15	42.427.343	75.156		23	255	
	16	3.005.381	40.292		16	250	
	17	380.491.176	172.691		7	255	

LÂMINA 13 D

BIC cortical		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	102.947	26.981	11.074		52.251	56.007
	2	302.199	30.464	11.947		80.000	164.132
	3	89.663	56.671	25.268		143.000	47.939
	4	239.102	32.179	14.338		84.421	129.705
	5	4.624.766.372	121.315	0.000		255.000	0.000
	6	1.564.126	43.467	11.223		172.664	857.351
	7	1.584.052	133.389	19.239		255.000	869.054
	8	4.624.766.372	121.315	0.000		255.000	0.000
BIC cortical		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	1.238.682	15.314	7.167		44.551	679.075
	2	4.624.766.372	96.681	0.000		255.000	0.000
	3	1.447.896	20.253	6.672		187.703	794.807
	4	4.624.766.372	96.681	0.000		255.000	0.000
	5	1.095.885	14.855	7.474		60.729	601.216
	6	4.624.766.372	96.681	0.000		255.000	0.000
	7	1.205.473	19.393	8.147		165.419	661.109
	8	4.624.766.372	96.681	0.000		255.000	0.000
BIC medular		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	1.447.896	48.896	11.030		168.560	794.644
	2	4.624.766.372	96.681	0.000		255.000	0.000

	3	4.624.766.372	96.681	0.000		255.000	0.000
	4	4.624.766.372	96.681	0.000		255.000	0.000
	5	1.331.666	57.189		5.667	197.333	730.866
	6	4.624.766.372	96.681	0.000		255.000	0.000
	7	4.624.766.372	96.681	0.000		255.000	0.000
	8	4.624.766.372	96.681	0.000		255.000	0.000
BAFO		Area	Mean	Min		Max	
	1	3.171.424	58.758		15	104	
	2	25.786.500	44.293		12	193	
	3	45.761.489	52.690		13	231	
	4	15.143.134	39.161		8	206	
	5	8.886.629	22.976		9	145	
	6	1.016.184	19.209		10	59	
	7	380.491.176	140.711		7	255	
	8	380.491.176	80.028		5	255	

LÂMINA 14 E

BIC cortical		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	89.663	32.743		22.747	43.900	47.431
	2	803.649	48.875		20.265	239.035	440.336
	3	112.909	57.476		22.155	102.446	60.577
	4	112.909	53.357		22.823	119.667	61.443
	5	146.118	57.761		12.188	203.979	79.290
	6	49.813	45.204		23.333	78.276	26.282
	7	149.439	38.683		19.554	74.811	80.554
	8	4.624.766.372	126.374	0.000		255.000	0.000
	9	3.759.217	48.937		11.729	255.000	2.061.900
	10	4.624.766.372	126.374	0.000		255.000	0.000
BIC cortical		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	853.462	41.028		14.371	109.292	467.412
	2	182.647	76.022		31.040	155.787	99.888
	3	4.624.766.372	125.191	0.000		255.000	0.000
	4	1.454.538	55.663		11.024	255.000	796.936
	5	4.624.766.372	125.191	0.000		255.000	0.000
	6	1.248.644	38.260		11.022	255.000	684.838
	7	4.624.766.372	125.191	0.000		255.000	0.000
	8	1.328.345	44.527		14.139	255.000	728.633
	9	4.624.766.372	125.191	0.000		255.000	0.000
BIC medular		Area	Mean	Min		Max	Length
	1	205.893	23.787		10.333	64.080	111.375
	2	471.563	13.358		8.667	22.667	257.166
	3	86.342	23.878		11.238	34.000	46.146
	4	4.624.766.372	125.191	0.000		255.000	0.000
	5	1.524.276	26.548		8.997	154.285	837.235

	6	4.624.766.372	125.191	0.000	255.000	0.000
	7	587.793	32.580	15.672	97.114	321.789
	8	1.185.548	236.726	77.745	255.000	649.486
	9	4.624.766.372	125.191	0.000	255.000	0.000
	10	1.338.308	48.876	6.907	255.000	732.927
	11	4.624.766.372	125.191	0.000	255.000	0.000
BAFO		Area	Mean	Min	Max	
	1	27.307.455	43.751	14	254	
	2	24.913.113	44.473	11	255	
	3	866.745	44.490	21	73	
	4	380.491.176	115.072	0	255	
	5	26.527.052	71.814	13	255	
	6	380.491.176	146.565	7	255	
LÂMINA 14 D						
BIC cortical		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	305.519	14.229	6.333	36.152	167.102
	2	29.888	94.099	60.853	157.758	15.682
	3	106.268	15.188	10.599	33.284	56.521
	4	544.621	35.028	9.260	153.527	297.193
	5	494.809	21.763	7.872	53.000	270.317
	6	4.624.766.372	129.482	0.000	255.000	0.000
	7	4.101.266	57.707	5.704	255.000	2.251.595
	8	4.624.766.372	129.482	0.000	255.000	0.000
BIC cortical		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	740.552	58.154	45.756	115.333	405.273
	2	73.059	83.855	56.024	133.000	39.423
	3	4.624.766.372	132.820	0.000	255.000	0.000
	4	1.401.404	81.502	45.800	246.000	769.088
	5	3.321	96.667	96.667	96.667	0.000
	6	152.760	49.688	43.000	58.840	83.126
	7	561.226	60.163	44.567	73.547	307.071
	8	235.781	82.008	42.560	197.117	129.039
	9	4.624.766.372	132.820	0.000	255.000	0.000
	10	1.261.928	69.985	43.385	173.046	691.176
	11	4.624.766.372	132.820	0.000	255.000	0.000
BIC medular		Area	Mean	Min	Max	Length
	1	4.624.766.372	132.820	0.000	255.000	0.000
	2	1.693.640	68.387	38.867	177.900	928.220
	3	4.624.766.372	132.820	0.000	255.000	0.000
	4	481.525	41.421	34.890	57.230	262.560
	5	4.624.766.372	132.820	0.000	255.000	0.000
	6	1.361.554	42.165	31.667	114.941	746.823
	7	4.624.766.372	132.820	0.000	255.000	0.000

BAFO	Area	Mean	Min	Max
1	30.282.948	91.318	53	255
2	11.662.870	84.891	55	253
3	1.391.442	85.449	52	240
4	380.491.176	194.169	34	255
5	61.681.706	75.967	35	255
6	880.029	68.449	43	177
7	380.491.176	177.242	32	255

9.5 – Quadro descritivo das medidas de porcentagem mensuradas pelo software ImageJ 1.50^a

MEDIDAS DE PORCENTAGEM DAS REGIOES MENSURADAS PELO SOFTWARE IMAGE J POR REGIÃO							
IDENTIFICAÇÃO	TÍBIA	PARAFUSO	ROI 1 (BIC CORTICAL SUPERIOR)	ROI 2 (BIC CORTICAL INFERIOR)	ROI 3 (BIC MEDULAR)	BIC	ROI 4 (BAFO)
1	Direita	Experimental	0,553	0,606	0,828	0,662	0,120
	Esquerda	Controle	0,547	0,793	0,605	0,649	0,096
2	Direita	Experimental	0,352	0,414	0,659	0,475	0,079
	Esquerda	Controle	0,452	0,551	0,526	0,510	0,245
3	Direita	Controle	0,245	0,468	0,064	0,259	0,369
	Esquerda	Experimental	0,688	0,707	0,459	0,618	0,089
4	Direita	Controle	0,675	0,217	0,840	0,577	0,116
	Esquerda	Experimental	0,317	0,307	0,566	0,397	0,232
6	Direita	Experimental	1,000	0,417	0,804	0,740	0,218
	Esquerda	Controle	0,797	0,604	0,875	0,759	0,159
7	Direita	Experimental	0,381	0,504	0,706	0,530	0,241
	Esquerda	Controle	0,747	0,549	0,769	0,688	0,075
9	Direita	Controle	0,342	0,269	0,285	0,299	0,065
	Esquerda	Experimental	0,518	0,026	0,514	0,353	0,121
10	Direita	Controle	0,819	0,473	0,390	0,561	0,109
	Esquerda	Experimental	0,855	0,337	0,523	0,572	0,231
11	Direita	Experimental	0,510	0,433	0,200	0,381	0,045
	Esquerda	Controle	0,617	0,605	0,446	0,556	0,083
12	Direita	Controle	0,568	0,719	0,375	0,554	0,173
	Esquerda	Experimental	0,775	0,291	0,263	0,443	0,052
13	Direita	Experimental	0,879	0,230	0,000	0,370	0,131
	Esquerda	Controle	0,550	0,150	0,398	0,366	0,300
14	Direita	Experimental	0,660	0,358	0,157	0,392	0,139
	Esquerda	Controle	0,821	0,386	0,535	0,581	0,105

9.6 - Produção intelectual durante o curso

Artigos completos enviados para publicação em periódicos

Revista de Odontologia da UNESP

“Avaliação topográfica e in vitro de superfícies de titânio revestidas com vidro bioativo”

Journal of Esthetic and Restorative Dentistry

“Lítium dissilicate laminate to improve smile design: conservative treatment with one year follow up”

Apresentação de trabalho na 34ª Reunião da Sociedade Brasileira de pesquisa em Odontologia

Avaliação biológica in vivo do titânio revestido com vidro bioativo contendo fosfato de cálcio

Martinez LFP*, Moreira AN, Barros VM, Vasconcellos WA, Domingues RZ, Ferreira AJ

Trabalho enviado para 35ª Reunião da Sociedade Brasileira de pesquisa em Odontologia

Avaliação histomorfométrica da osseointegração em superfície de implante bioativa de titânio revestida com fosfato de cálcio

Martinez LFP*, Barros VM, Castro MAA, Ferreira RC, Magalhães CS, Vasconcellos WA, Moreira AN

Trabalho enviado como co-autor para a 35ª Reunião da Sociedade Brasileira de pesquisa em Odontologia

Aspectos morfológicos da dentina radicular humana e bovina em diferentes faixas etárias e terços radiculares

Limeira FIR*, Carvalho MFF, Santa-Rosa CC, Martinez LFP, Yamauti M, Moreira AN, Magalhães CS