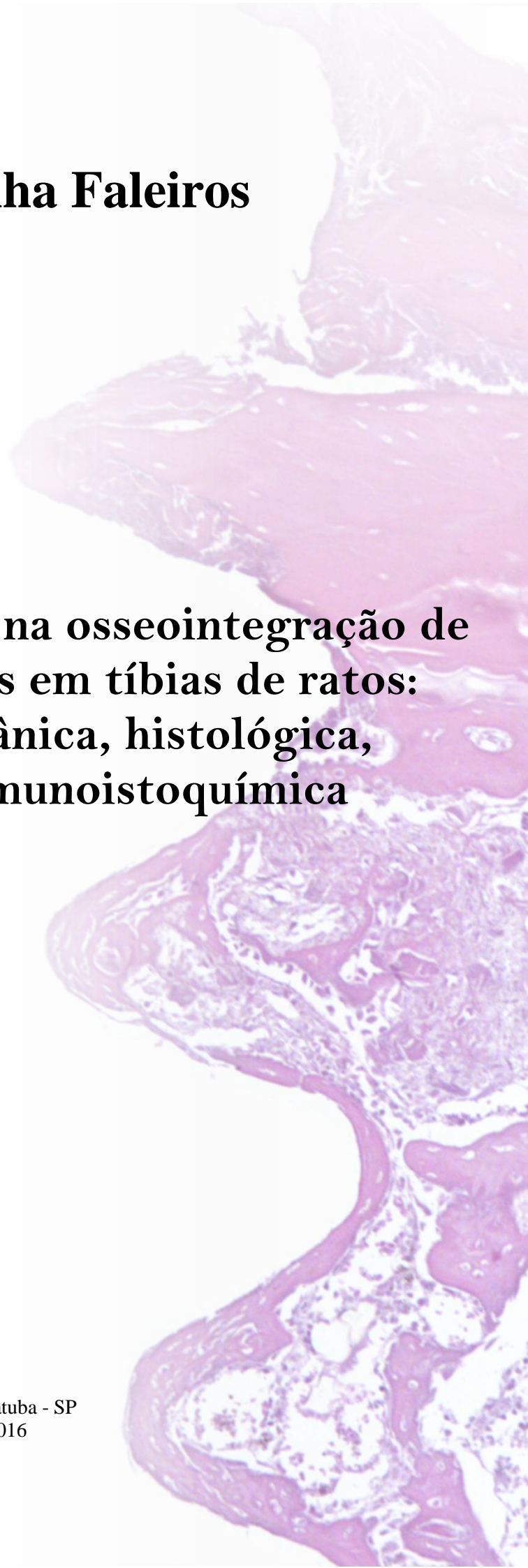


Paula Lazilha Faleiros

Influência da nicotina na osseointegração de implantes instalados em tíbias de ratos: avaliação biomecânica, histológica, histométrica e imunohistoquímica

Araçatuba - SP
2016





Paula Lazilha Faleiros

Influência da nicotina na osseointegração de implantes instalados em tíbias de ratos: avaliação biomecânica, histológica, histométrica e imunoistoquímica

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do Título de DOUTOR EM ODONTOLOGIA (Área de concentração em Periodontia).

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Francisco Bosco

Coorientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia

Araçatuba - SP
2016

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F187i Faleiros, Paula Lazilha.
Influência da nicotina na osseointegração de implantes instalados em tíbias de ratos : avaliação biomecânica, histológica, histométrica e imunoistoquímica / Paula Lazilha Faleiros. - Araçatuba, 2016
197 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Alvaro Francisco Bosco
Coorientador: Prof. Juliano Milanezi de Almeida
Coorientador: Prof. Valdir Gouveia Garcia

1. Implantes dentários 2. Nicotina 4. Osseointegração
5. Lasers I. T.

Black 6
CDD 617.63

Dados Curriculares

Paula Lazilha Faleiros

- Nascimento: 18.03.1984 Penápolis - SP
- Filiação: Francisco Alberto Azanha Faleiros
Neide Lazilha Faleiros
- 2004- 2009: Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
- 2010-2012: Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Periodontia
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
- 2013-2016: Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Periodontia
Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP



Dedicatória

Dedico este trabalho...

A Deus

Para Ti...

A minha alma, o meu coração e o meu tempo...

"Plantar o bem, através de tudo e de todos, por todos os meios lícitos ao nosso alcance, compreendendo que, se em matéria de colheita Deus pede tempo ao homem, o homem deve entregar tempo a Deus."

André Luiz por Francisco Cândido Xavier

À minha Família...

Aqueles que sonharam meus sonhos e vibraram com minhas conquistas!

Aos meus pais, **Francisco e Neide,**

Por terem dedicado as suas vidas para fazer o meu irmão e eu felizes!

Ao meu irmão, **Roberto,**

Pelo exemplo de coragem, simplicidade e persistência em suas metas!

Por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas!

No percorrer dos meus caminhos, na decepção de todas as minhas derrotas, na motivação de todas as minhas lutas, no desempenho das minhas atitudes, na satisfação de todas as minhas conquistas, no decorrer dos meus dias, no viver da minha vida...

Saibam que vocês são a razão de todas as minhas ações!

Eu os amo infinitamente!

Aos meus queridos avós **Manoel Monteiro Faleiros (Vô Mané)** (in memoriam), **Thereza Azanha Faleiros** (in memoriam), **André Lasilha** (in memoriam), e **Maria Aparecida Garcia Lasilha (Vó Zita)** (in memoriam).

Eu não estou longe, apenas estou do outro lado do caminho...

Eu os amo por toda a eternidade! Até breve!

Aos meus queridos tios, tias, primos e primas...

Aqueles que fizeram parte do meu crescimento e da minha história. Vocês que estiveram presentes nos melhores momentos da minha vida e nas minhas mais doces lembranças. Como no dia em que ganhei minha primeira bicicleta de rodinhas do papai Noel... Azul com “florzinhas” brancas! Ou como nos dias que nos reuníamos à mesa para a tradicional bacalhoda de sexta-feira santa... Ah, o cheiro do azeite e das azeitonas! Por todas as vezes que me viram sair em busca dos meus sonhos, e sem entender, torceram por mim! **Obrigada! Eu os amo!**

The background of the slide features three vertical panels of histological sections of the endometrium, stained with hematoxylin and eosin (H&E). From left to right, the panels illustrate different phases of the menstrual cycle: 1) The first panel shows the proliferative phase with a thin, uniform endometrial lining. 2) The second panel shows the secretory phase, characterized by a thickened endometrium with prominent, coiled uterine arteries and a highly convoluted, saw-toothed surface. 3) The third panel shows the regenerative phase, where the endometrium is beginning to shed, with a more irregular and fragmented surface. The text 'Agradecimentos Especiais' is overlaid on a semi-transparent purple band across the middle of these images.

Agradecimentos Especiais

Aos meus queridos professores, responsáveis diretos da minha formação acadêmica e profissional e do desenvolvimento desta pesquisa...

Professor Alvaro Francisco Bosco

Pela oportunidade de realizar a iniciação científica, o mestrado e o doutorado sob sua orientação, e pela forma carinhosa e preocupada com que sempre a fez. Pela liberdade que sempre me deu para que eu fizesse as minhas próprias escolhas e desenvolvesse livremente as minhas atividades científicas e profissionais! E principalmente, pela paciência e respeito com que lidou com a minha inexperiência e as minhas dificuldades!

É uma honra e um orgulho citá-lo como meu orientador, professor! Muito obrigada!

Professor Juliano Milanezi de Almeida

Pela forma carinhosa com que me acolheu em seu grupo de alunos e pela forma responsável e atenciosa com que me conduziu e me orientou em todas as etapas deste estudo. Por todas as vezes que pude dividir com você os meus medos e anseios e você ajudou-me a enfrentá-los. Agradeço ainda imensamente pela forma como respeitou o meu tempo... Eu nunca esquecerei! Obrigada pela grande amizade que cultivamos e por todas as oportunidades que tem me dado!

Professor Edilson Ervolino

A sua ajuda foi de fundamental importância para a realização de todas as etapas laboratoriais e análises histológica, histoquímica e imunoistoquímica deste estudo. A sua dedicação e a sua competência como pesquisador tem nos ajudado a compreender e esclarecer com maior embasamento científico os nossos resultados, valorizando todas as nossas pesquisas. Agradeço especialmente a forma dedicada com que me auxiliou na conclusão deste estudo, dando maior segurança para defender a minha tese! Obrigada ainda por todas as vezes que se dispôs a me ouvir, oferecendo ombro e palavras amigas! Foi muito importante pra mim! Muito obrigada!

Aos queridos professores da Disciplina de Periodontia...

Professor Valdir Gouveia Garcia

Ficou marcado pelo seu olhar cauteloso e atencioso sobre seus alunos. Muitas vezes senti-me carinhosamente olhada e cuidada pelo senhor! A sua vasta experiência e competência como pesquisador me faz querer buscar os seus conselhos e ensinamentos sempre e sempre. Muito obrigada por todos os momentos de atenção e experiência transmitidas!

Professora Letícia Helena Theodoro

A qual muito admiro por sua conduta firme, objetividade e praticidade diante do seu trabalho. Tornou-se uma inspiração para a pessoa complicada que sou! Muito obrigada pela prontidão em me atender em todos os momentos que precisei! Muito obrigada pela amizade, carinho e respeito com o meu aprendizado!

Professora Maria José Hitomi Nagata

Ouvi muitas vezes a senhora dizer que precisávamos fazer tudo muito rápido e com excelência. Nós não fazíamos nada assim! Rs! Mas o seu rigor e exigências com as nossas atividades acadêmicas nos fizeram crescer muito e nos tornarmos as pessoas criteriosas que somos hoje! Confesso que no início eu tinha medo da senhora... Que ironia, nos tornamos amigas! Muito obrigada por todo carinho e cuidado para comigo! Sou uma grande admiradora da sua competência!

Aos queridos professores que me receberam de portas abertas para realizar esta pesquisa...

Ao **Professor Elcio Marcantônio Junior**, das Disciplinas de Periodontia e Implantes Ósseos Integrados do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara. Por ter se disponibilizado a me receber e me conduzir no processamento histológico dos espécimes não descalcificados no Exakt.

À **Professora Ana Claudia Nakamune**, da Disciplina de Bioquímica do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Pela gentileza em ajudar inúmeras vezes a proporcionar a nicotina em solução salina. E pela paciência que teve comigo ao fazê-la.

Ao **Professor Luciano Tavares Angelo Cintra**, da Disciplina de Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Pela gentileza em ceder o microscópio de luz polarizada para a análise histoquímica do presente estudo.

The background of the slide features a vertical strip of microscopic tissue sections on the right side. The tissue is stained with hematoxylin and eosin (H&E), showing various cellular structures and tissue layers. The sections appear to be from different parts of an organ, possibly the stomach or intestines, showing glandular structures and connective tissue. The overall color palette is dominated by the pink and purple hues of the stain.

Agradecimientos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, nas pessoas do seu Diretor **Prof. Dr. Wilson Roberto Poi** e vice-diretor **Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho**, pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

Ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa de seu coordenador **Prof. Dr. André Luiz Fraga Briso**, pelo empenho e dedicação com que o conduz.

Ao Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, representado pelo **Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior**, pela oportunidade de realizar o processamento laboratorial dos espécimes não descalcificados.

Ao Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, representado pelo **Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra**, pela oportunidade de realizar a análise histoquímica.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP**, pela concessão da Bolsa de Doutorado (processo nº 2013/11863-0) e Auxílio Regular à Pesquisa (processo nº 2012/00127-8).

À empresa **DSP Biomedical®**, por gentilmente fornecer os implantes utilizados nesta pesquisa.

À minhas amigas de infância e adolescência, em especial à **Ana Maria, Patrícia, Carina e Rebeca** e é claro ao meu querido **Zézinho!** Por que a mágica acontece quando estamos juntos! Pelas gargalhadas e lágrimas! Pelas noites regadas a Martini! Por tudo que aprendemos uns com os outros! Pela compreensão nos momentos de ausência... Perdoem-me! À querida amiga **Carol Freitas**, filha da minha primeira professora “**tia Tânia**”. Pelo carinho com que sempre me acolhe e me aconselha! Pelos extensos momentos de descontração e amizade! Pelo respeito e confiança depositados em mim! Muito obrigada!

Aos meus queridos amigos **Thiago e Moreira**, que me acolheram com tanto carinho e respeito na sua gangue da periferia, para formarmos “O trio parada dura”!

Ao querido **Duda**, que sempre me acolheu em momentos de dificuldade e mudanças! Pela relação de amizade e respeito que criamos!

A minha história está marcada pela presença dessas pessoas queridas. Apesar da distância que nos separa, os tenho guardados em meu coração sempre e sempre... **Amo muito todos vocês!**

À minha querida cunhada **Marcela**, por ter trazido mais luz à nossa casa e fazer meu irmão ainda mais feliz! Obrigada pelo carinho e atenção com a minha família!

Aos meus queridos amigos que ingressaram comigo na pós-graduação na Disciplina de Periodontia **Carolina Santinoni, Mariellen Longo, Vivian Cristina Noronha Novaes, Erivan Clementino Gualberto Júnior, Natália de Campos e Natália Pola**. Desde os primeiros momentos pude contar com ajuda de estas pessoas queridas. Cada detalhe foi fundamental para o meu crescimento pessoal e profissional. Foram tantos os dias que passamos juntos, dividindo experiências, dificuldades, sonhos e aflições, que criamos laços profundos de amizade e respeito com as nossas diversidades! Obrigada pelos momentos de convivência, pelas conversas alegres, pelos conselhos e carinho para comigo! Não existe outra

maneira de agradecer tantos esforços e tanta dedicação senão atribuir grande parte do mérito deste trabalho a vocês! Pra sempre estarei torcendo pelo seu sucesso!

Aos queridos amigos da pós-graduação **David Gusman, Nathália Januario de Araujo, Fred Lucas e Breno Sendão Alves**, e da iniciação científica **Henrique Rinaldi Matheus, Clara Possarle, Giovani Fernandes, Bianca Marques e Luiz Guilherme Fiorin**, orientados do Prof. Juliano. A alegria e espontaneidade dessa turminha deu vida ao nosso dia a dia! A sua dedicação e responsabilidade são admiráveis! Muito obrigada pela ajuda com minha pesquisa! Obrigada pelo convívio alegre, pelos momentos de descontração, pela torcida e pelo carinho com que me tratam! Me sinto mais viva perto de vocês! Vocês são feras!

Aos alunos de graduação **Edra Dias Stoque, Bruno Flumian, Barbara Flumian e Hiram Campanhã**, os quais eu tive a honra de acompanhar de perto o desenvolvimento científico. Muito obrigada pelo auxílio prestado na realização das etapas experimentais e laboratoriais deste estudo! Obrigada pelo agradável convívio e pela confiança depositada! Eu espero ter correspondido tudo o que vocês fizeram por mim!

Aos alunos de graduação pertencentes à “Família Zol” do Prof. Edilson, pelo suporte nas reações de imunoistoquímica. Em especial aos queridos amigos **Luan Toro, João Martins, Letícia Ferreira e Daniela Sá**, pelo carinho e amizade que cultivamos! Vocês são muito bons e vão voar longe! Não tenho nenhuma dúvida disso!

Às queridas amigas da pós-graduação **Eduarda Belem e Eliana Caliente**, orientadas da Profa. Maria José. As amigas que me dão mais trabalhos! Obrigada pela amizade, pelo

respeito com que me tratam e, especialmente, pela confiança em mim depositada! Tudo vai dar certo!

Aos queridos amigos da pós-graduação **Daniela Janjacomio, Márcio Ferro, Alessandra Lopes, Marta Nuernberg, e Marina Módulo**, orientados da Profa. Letícia, pelo carinho e agradável convívio!

Aos queridos amigos **Fabrizio Cabrera Pazmiño, Naida Assen e Adrieli De Paula Neves**, por todos os momentos de diversão que passamos juntos! Estou torcendo por vocês!

À querida amiga **Francine Benetti**, orientada do Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra, pela inestimável ajuda com a avaliação histoquímica desta pesquisa. Obrigada por me receber aos sábados, domingos e feriados!

À nossas queridas funcionárias **Marlene** (minha eterna babá), **Marcia, Crislaine e Beatriz**. Pela garra e pela força com que nos auxiliam todos os dias! Pela prontidão em ajudar sempre! Pela amizade e carinho cultivados todos os dias...
Agradeço imensamente a atenção! Devo muito a vocês!

Aos queridos amigos, os **Professores Leandro Araújo Fernandes, Thiago Marques Martins, Ana Cristina Murakawa e Ricardo Oliveira de Moraes**, que introduziram em mim o amor à pesquisa e acompanharam meus primeiros passos na minha Iniciação Científica. Pra sempre serão lembrados por terem estado presente no início de tudo!

Aos meus queridos amigos da graduação, em especial à **Renata Siqueira Scatolin, Renata Colturato Joaquim, Camila Sant'Ana, Joyce Finato Pires, Lidia Regina da Costa Hidalgo, Bruna dos Santos Kotake e Raquel Parra**. Pelos momentos de risadas, lágrimas e sonhos compartilhados! Obrigada por todo o apoio e torcida durante todos esses anos!

À **Profa. Roberta Okamoto** do Departamento de Ciências Básicas, pelo carinho com que sempre me tratou e pela atenção no momento do meu Exame Geral de Qualificação. Muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Michel Reis Messor**a da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e à sua linda e querida esposa, a **Prof. Dra. Flávia Furlaneto**, pelo carinho e atenção com que sempre se dispuseram!

Ao **Prof. Wilson Lopes Junior** da Faculdade de Odontologia de Lins - UNIMEP, pelo acolhimento e paciência com o meu aprendizado na minha primeira experiência como docente. Aos amigos **Flávia Castilho Cuculo e Leonardo Piza**, que dividiram esse momento comigo. Aos alunos da UNIMEP, pelo carinho e respeito.

Ao querido amigo e ex-funcionário do nosso departamento **Joilson de Barros Lellis**, por todo o tempo que se dispôs a ajudar. Pela amizade e agradável convívio. Parabéns pela sua conquista! Você é muito merecedor!

À **Ana Cláudia Gregolin Costa Miranda**, funcionária da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, que me conduziu com muita dedicação e responsabilidade no desenvolvimento de todas as etapas laboratoriais dos espécimes não

descalcificados no Exakt, preocupando-se com minha estadia e meu bem estar. Foi decisivo para a realização desta etapa da pesquisa! Muito obrigada!

Aos funcionários da Seção de Graduação e Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Diogo, Marina, Marie, Valéria, Lilian e Cristiane**, pela eficiência e presteza de sempre. Obrigada por tudo o que fizeram por mim e pelo professor Alvaro!

À querida **Celinha**, funcionária da Diretoria, pelo auxílio prestado com as questões relacionadas à FAPESP. Obrigada pela paciência e pela torcida!

À **Tânia**, funcionária do Setor de Patrimônio desta unidade, pelo auxílio prestado recentemente com a assistência e manutenção do torquímetro.

À **Eliseide** e ao **André**, funcionários do Departamento de Ciências Básicas, pela atenção e agradável convivência com os alunos! Obrigada pela paciência de vocês!

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada **Renato, Paulo e Marcos**. E também aos ex-funcionários e amigos **Sr. Odair, Dirce e Gilmar**. Pelo carinho, dedicação e simpatia com que sempre me atenderam. Estas pessoas me conduziram com muita paciência quando eu ainda era uma “menininha” com ambição de fazer pós-graduação! Muitas vezes saíram de casa para me atender em momentos de aflições! Muito obrigada!

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Camilo, Alan e João Batista** que ofereceram suporte para a obtenção dos animais utilizados nesta pesquisa. Ao funcionário do Departamento de Ciências Básicas, **Arnaldo**! Por todo zelo e

respeito com nossos animais experimentais. Vocês são fundamentais para o alicerce dos nossos modelos experimentais!

Aos funcionários **Pedro, Marcelinho, Dora e Isabel**, que estiveram presente em diversos momentos decisivos desta etapa de minha vida. Ajudaram-me a enfrentar desafios e a construir a minha história dentro desta Universidade. Tornaram-se amigos! Muito obrigada!

A todos os funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pelo carinho, atenção e eficiência com que sempre me atenderam.

Aos funcionários da Seção de Manutenção pela disponibilidade em ajudar sempre que surgiu algum imprevisto... Pela alegria contagiante!

A todos os funcionários do Setor de Vigilância, por todos os sorrisos de bom dia e por todas as vezes que zelaram por meu trabalho noturno.

Aos funcionários do SAEPE, que recentemente salvaram meu computador de um súbito colapso. Eu nem tenho com agradecer por isso!

Aos meus colegas de turma do curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Pela amizade e pela torcida.

Aos alunos do Curso de Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pelo respeito, credibilidade e confiança depositados aos alunos da Pós-graduação.

À todos os demais professores da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, pelos ensinamentos durante todo o decorrer do curso.

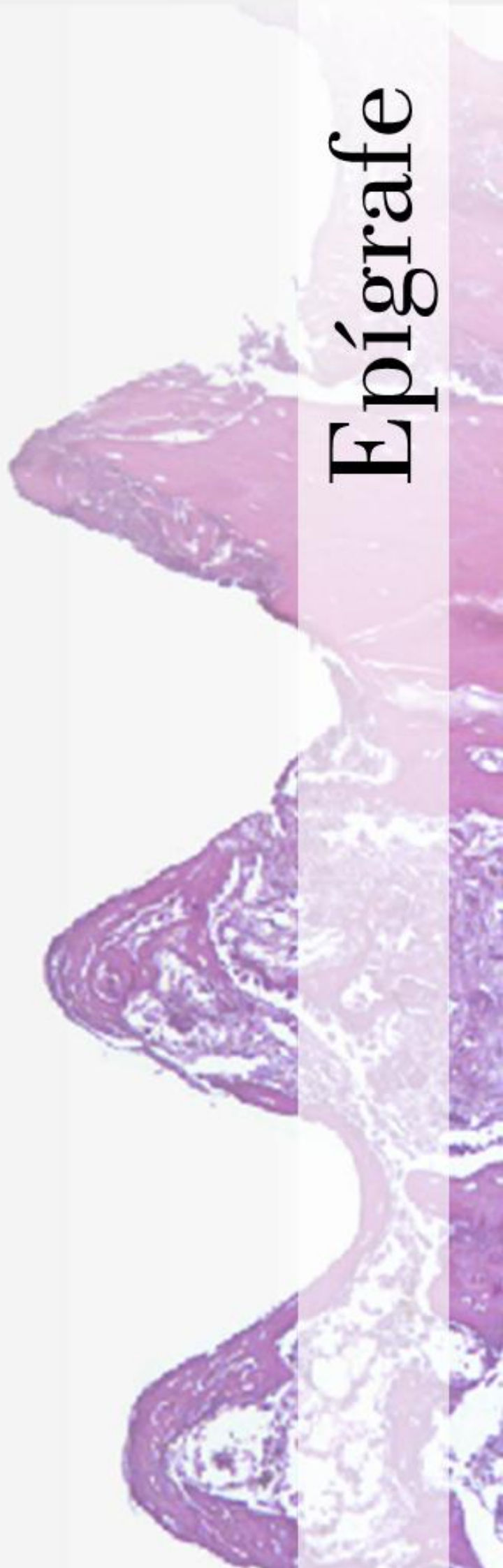
Aos **pacientes** que tive o privilégio de atender durante as clínicas de pós-graduação, pelo voto de confiança e pela esperança que depositam em mim... Muito obrigada!

Aos meus **animais experimentais**... Meu mais profundo respeito!

Não importa o tamanho do seu talento se você é incapaz de fazer parte de um grupo, de uma comunidade e se dá mais importância ao “Eu” do que ao “Nós”.

Bernardo Rocha de Rezende

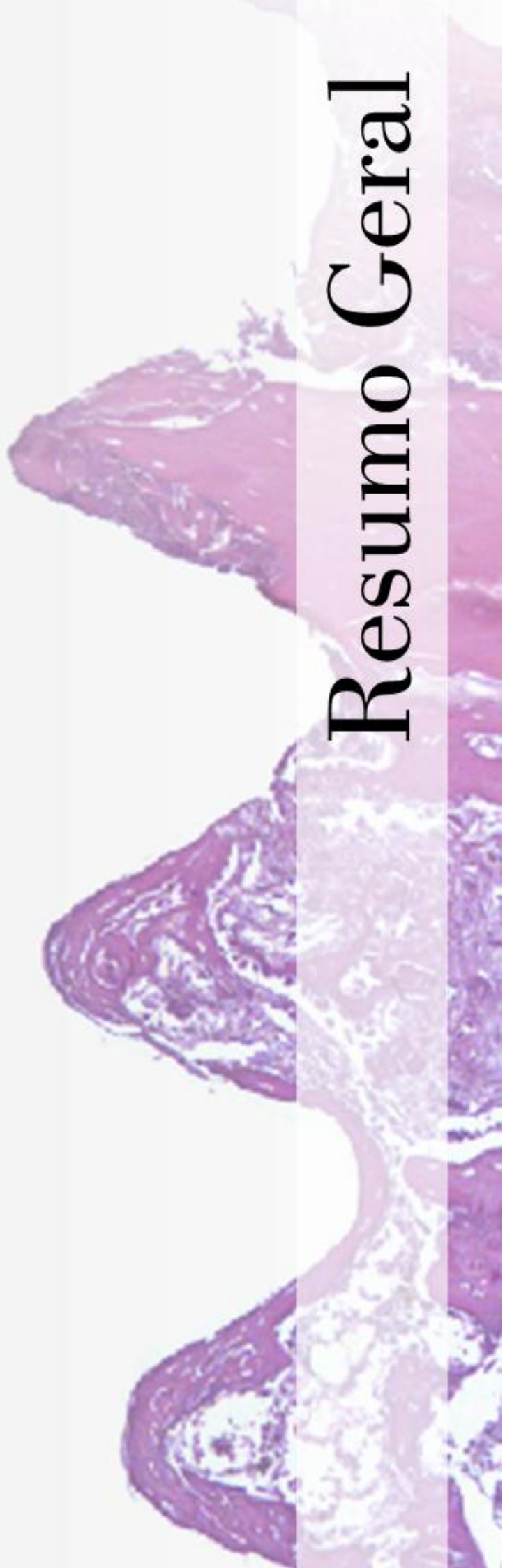
Epígrafe



“Construí amigos, enfrentei derrotas, venci
obstáculos, bati na porta da vida e disse-lhe:
Não tenho medo de vivê-la.”

Augusto Cury

Resumo Geral



Faleiros, P.L. **Influência da nicotina na osseointegração de implantes instalados em tíbias de ratos: avaliação biomecânica, histológica, histométrica e imunoistoquímica** [Tese]. Araçatuba: UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2016.

Objetivo: Avaliar do ponto de vista biomecânico, histomorfométrico, histoquímico e através de marcadores imunoistoquímicos a influência da terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) na osseointegração de implantes instalados em tíbias de ratos modificados ou não sistemicamente pela nicotina. **Materiais e métodos:** Um total de 120 ratos (Wistar) foi distribuído em dois grandes grupos experimentais (n = 60) submetidos a duas aplicações diárias de solução salina (Veh) ou nicotina (Nic). Após 30 dias, implantes de titânio (2.2 mm x 4 mm) foram instalados na metáfise proximal de ambas as tíbias de todos os animais. Grupos experimentais de diferentes tratamentos locais do alvéolo cirúrgico previamente a instalação do implante (n = 30) foram criados no momento da cirurgia: Veh - nenhum tratamento; Veh/LLLT - irradiação do alvéolo cirúrgico com laser em baixa intensidade; Nic - nenhum tratamento; Nic/LLLT - irradiação do alvéolo cirúrgico com laser em baixa intensidade. O laser utilizado foi o Thera Lase (InGaAlP 660 nm, modo de aplicação contínuo, em contato com a área, 35 mW, 0,14 J, 4,9 J/cm², por 4 segundos). Dez animais de cada grupo foram eutanasiados aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. As tíbias direitas foram submetidas à análise de torque reverso e posteriormente processadas para confecção de cortes histológicos descalcificados, corados por hematoxilina e eosina, vermelho picrossirius ou submetidos a reações imunoistoquímicas com os anticorpos primários policlonais: HIF-1 α , VEGF, BMP-2, RUNX-2, OCN, ALP, RANKL, OPG e TRAP. A partir das tíbias esquerdas foram preparados cortes histológicos calcificados para análise das porcentagens de contato osso-implante (BIC) e área óssea (BA), dentro dos limites das roscas do implante. A análise foi realizada através da microscopia de luz polarizada para análise histoquímica e da microscopia óptica de campo claro para a análise histológica, histométrica e

imunistoquímicas. As imunomarcações foram submetidas à análise qualitativa para os anticorpos HIF-1 α , VEGF, BMP-2, OCN, ALP, RANKL e OPG e análise quantitativa para os anticorpos RUNX-2 e TRAP. Os dados quantitativos foram analisados estatisticamente ($p \leq 0,05$). **Resultados:** A nicotina atrasou a produção de elementos da matriz óssea, diminuiu o padrão de imunomarcação de HIF-1 α , VEGF, BMP-2, OCN, ALP e OPG, aumentou o padrão de imunomarcação de RANKL e aumentou a quantidade de células imunorreativas a RUNX-2 e TRAP, diminuindo a BA, embora não tenha sido capaz de influenciar o torque de remoção e o BIC. O laser aumentou o padrão de imunomarcação de HIF-1 α , VEGF, BMP-2, OCN e ALP, aumentou a quantidade de células imunorreativas a RUNX-2 e TRAP, aumentou a BA, mas também não foi capaz de influenciar o torque de remoção e o BIC. Adicionalmente, o laser influenciou positivamente a BA e o torque de remoção dos implantes, aumentou a angiogênese e a diferenciação osteoblástica, promovendo a formação óssea, biomineralização e maturação óssea peri-implantar nos animais modificados sistemicamente pela nicotina. **Conclusão:** A LLLT é capaz de promover o processo de reparo ósseo peri-implantar em condições normais e compensar os efeitos negativos da nicotina na osseointegração.

Palavras-chave: Implantes dentais; lasers; nicotina; osseointegração.




General Abstract

Faleiros, P.L. **Influence of nicotine on osseointegration of implants installed in the tibia of rats: biomechanical, histological, histometric, and immunohistochemical evaluation** [Thesis]. Araçatuba: UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2016.

Objective: To evaluate, from biomechanical, histomorphometric, histochemical stand point and through of immunohistochemical markers, the influence of low level laser therapy (LLLT) on the osseointegration of implants placed in the tibiae of nicotine systemically modified (or not) rats. **Materials and methods:** A total of 120 rats (Wistar) was assigned into two major experimental groups (n = 60) underwent two-daily-applications of saline (Veh) or nicotine (Nic). After thirty days, titanium implants (2.2 mm x 4 mm) were placed in the proximal metaphysis of both tibiae from all animals. Experimental groups of different surgical alveolus local treatments prior to implant placement (n = 30) were created at the moment of the surgery: Veh - no local treatment; Veh/LLLT - irradiation of surgical alveoli with low level laser; Nic - no local treatment; Nic/LLLT - irradiation of surgical alveoli with low level laser. The laser used was Thera Lase® (InGaAlP 660 nm, in continuous mode, in contact with the area, 35 mW, 0.14 J, 4.9 J/cm², for 4 seconds). Ten animals from each group were euthanized at 15, 30 and 60 days postoperative. The right tibiae were submitted to reverse-torque analysis and, then processing in order to prepare decalcified histological sections, stained either by hematoxylin and eosin or picosirius red or subjected to immunohistochemical reactions with the primary polyclonal antibodies: HIF-1 α , VEGF, BMP-2, RUNX-2, OCN, ALP, RANKL, OPG and TRAP. From left tibiae were prepared undecalcified histological sections to evaluate the percentages of bone-to-implant contact (BIC) and bone area (BA) within the limits of the implant threads. The histochemical analysis was performed by a polarized light microscopy and the histological, histometric and immunohistochemical analysis were performed by a bright field optical microscopy. The HIF-1 α , VEGF, BMP-2, OCN, ALP, RANKL and OPG immunostaining were submitted to

qualitative analysis and the RUNX-2 and TRAP immunostaining were submitted to quantitative analysis. Quantitative data were analyzed statistically ($p \leq 0.05$). **Results:** The nicotine delayed the production of bone matrix components, decreased the immunolabeling pattern of HIF-1 α , VEGF, BMP-2, OCN, ALP and OPG, increased the immunolabeling pattern of RANKL, increased the amount of RUNX-2 and TRAP-immunoreactive cells, reduced the BA, but did not influence the BIC and the force required to break the osseointegration. The laser increased the immunolabeling pattern of HIF-1 α , VEGF, BMP-2, OCN and ALP, increased the amount of RUNX-2 and TRAP-immunoreactive cells, increased the BA, but also was not able to influence the BIC and the force required to break the osseointegration. In addition, the laser positively influenced the BA and the implant removal torque, increased the angiogenesis and osteoblast differentiation, promoted bone formation, biomineralization and peri-implant bone maturation in the nicotine systemically modified rats. **Conclusions:** LLLT is able to promote the peri-implant bone repair process in normal conditions and is able to compensate the negative effects of nicotine on osseointegration.

Key words: Dental implants; lasers; nicotine; osseointegration.

The image displays three vertical panels of histological sections of the endometrium, stained with hematoxylin and eosin (H&E). The top panel shows a thin, relatively uniform endometrial lining, characteristic of the menses phase. The middle panel shows a thickened endometrium with a prominent, highly convoluted and folded surface, representing the proliferative phase. The bottom panel shows a thick endometrium with a highly convoluted surface and a dense, cellular appearance, characteristic of the secretory phase. The text 'Introdução Geral' is overlaid on the right side of the image.

Introdução Geral

Introdução Geral

A osseointegração, essencial para o sucesso clínico em longo prazo das reabilitações implante suportadas, envolve a direta ancoragem do implante pela formação óssea sem o crescimento de um tecido fibroso na interface osso/implante, e representa um processo dinâmico tanto em seu estabelecimento quanto em sua manutenção (Albrektsson et al. 2003; Berglundh et al. 2003; Block & Achong 2004). Embora a taxa de sucesso relatada para os implantes de titânio seja elevada, falhas ocorrem, e o tabagismo é um dos fatores frequentemente associados (Lambert et al. 2000; Ekfeldt et al. 2001; Hinode et al. 2006).

Em 1993, um estudo de Bain & Moy, que investigou 540 pacientes com 2194 implantes Branemark, considerou o uso do tabaco o fator mais significativo responsável por falhas de implantes de titânio. Mais recentemente, Sánchez-Pérez et al. (2007) sugeriram que um consumo maior que 20 cigarros/dia pode aumentar o risco de falhas de implantes em 30,8%. Outros estudos indicam que o uso do tabaco está associado com comprometimento do processo de reparo ósseo pós-operatório (Pinto et al. 2002; Machado et al. 2010), maior taxa de perda óssea, redução da qualidade e densidade óssea (Carlsson et al. 2000; Ward & Klesges 2001; Rivera-Hidalgo 2003), e maior incidência de peri-implantites (Haas et al. 1996), todos contribuindo para maior taxa de falências de implantes entre fumantes em comparação com não fumantes (Chuang et al. 2002).

Embora alguns autores não tenham observado efeito prejudicial da exposição à nicotina sobre o reparo ósseo e osseointegração (Stefani et al. 2002; Balatsouka et al. 2005a; Balatsouka et al. 2005b; Gotfredsen et al. 2009), vários estudos histológicos em modelos animais mostraram que o tabagismo pode resultar em diminuição do contato osso/implante (BIC) e menor área óssea (BA) dentro das roscas de implantes de titânio (Nociti Júnior et al. 2002a; Nociti Júnior et al. 2002b; César-Neto et al. 2003; César-Neto et al. 2005a; César-Neto

et al. 2005b). Tais resultados indicam que novos estudos precisam ser conduzidos para se determinar os elementos causais e processos biológicos nos quais esses efeitos estão ocorrendo (Berley et al. 2010).

A nicotina, considerada o maior componente ativo da fase particulada do cigarro (Benowitz 1986), parece causar severas alterações no metabolismo e capacidade de reparo ósseo (César-Neto et al. 2003). Estudos *in vitro* demonstraram inibição da proliferação, migração, quimiotaxia e redução na produção de colágeno tipo I e III em culturas de fibroblastos tratados com nicotina (Yin et al. 2000; Wong & Martins-Green 2004). Tem sido sugerido que a colagenase fibroblástica, a qual exerce importante papel no metabolismo do colágeno e remodelação tecidual, pode ser afetada pela nicotina. Níveis aumentados de colagenase fibroblástica foram encontrados em culturas de células fibroblásticas tratadas com tabaco (Yin et al. 2000). Em adição, a inibição de responsividade celular ao TGF- β 1 ou um suplemento reduzido de oxigênio molecular e ascorbato para a biossíntese do colágeno tem sido sugerida (Yin et al. 2003; Sorensen et al. 2010). Juntos, esses achados indicam a redução da biossíntese do colágeno em pacientes que fazem uso do tabaco (Sorensen 2012).

O colágeno tipo I é um dos principais constituintes orgânicos da matriz extracelular e atua como arcabouço para a deposição de íons no processo de mineralização do tecido ósseo (Boskey 1992). Neste processo, a fosfatase alcalina (ALP) hidrolisa a ligação éster dos compostos orgânicos fosfatados produzindo concentração aumentada de íons fosfato, necessário para a cristalização da hidroxiapatita, além de hidrolisar substâncias que inibem a mineralização da matriz óssea (Anderson 1989). Tanaka et al. (2005) observaram que a nicotina pode suprimir a osteogênese reduzindo a concentração de ALP além da síntese de colágeno tipo I por osteoblastos.

A neoformação óssea requer o recrutamento de células multipotentes do sistema mesenquimal, as quais são capazes de se proliferar e se diferenciar em uma variedade de tipos

de células, incluindo os osteoblastos (Fang & Hall, 1997). Tem sido sugerido que a nicotina pode levar a alterações na proliferação, diferenciação e expressão gênica de osteoblastos (Rothen et al. 2011). Estas células, por sua vez, estão envolvidas com a diferenciação e função osteoclástica via interação célula a célula (Suda et al. 1999). Tais eventos ocorrem quando receptor ativador de NF Kappa β ligante (RANKL) ativa seu receptor ativador de NF Kappa β (RANK), situado na membrana plasmática de osteoclastos e pré-osteoclastos, regulando positivamente a reabsorção óssea. Em contrapartida, uma regulação negativa da reabsorção óssea ocorre quando osteoprotegerina (OPG) se liga a RANKL, impedindo sua interação com RANK e a ocorrência dos eventos citados anteriormente. Assim, o sistema RANK/RANKL/OPG exerce papel central na regulação local da osteoclastogênese, ativação de osteoclastos e inibição de apoptose em osteoclastos maduros (Yasuda et al. 1998; Fuller et al. 1998). A ação direta da nicotina na proliferação e maturação de osteoblastos (Theiss et al. 2000; Walker et al. 2001; Tanaka et al. 2005; Katono et al. 2006; Pereira et al. 2010) sugere que ela pode exercer efeito indireto sobre reabsorção óssea, via regulação do sistema RANK/RANKL/OPG. Enquanto isso, o efeito direto da nicotina sobre o mecanismo de reabsorção dos osteoclastos é pouco conhecido. Tanaka et al. (2013) reportaram que ela aumenta o número de osteoclastos com poucos núcleos, suprime a quantidade de osteoclastos com grandes núcleos, além de reduzir a área planar de reabsorção óssea dos osteoclastos.

Os fatores de crescimento angiogênicos e osteogênicos também exercem importante papel no reparo ósseo. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um potente mediador angiogênico que induz a proliferação e migração das células endoteliais. Adicionalmente, tem sido demonstrado que ele promove quimiotaxia (Mayr-Wohlfart et al. 2002) e diferenciação de osteoblastos (Gerber et al. 1999). O VEGF pode interagir sinergicamente com a proteína morfogenética óssea (BMP) para promover o desenvolvimento esquelético e o reparo ósseo por melhorar o recrutamento celular, prolongar a sobrevivência

celular e aumentar a angiogênese (Patel et al. 2008). As BMPs são os mais potentes fatores de crescimento osteogênicos que induzem a diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais (ten Dijke et al. 2003; Osyczka et al. 2004; Lavery et al. 2008). Elas agem como um importante regulador que estimula a produção de VEGF nos osteoblastos (Deckers et al. 2002; Peng et al. 2005; Samee et al. 2008). A literatura relata que a nicotina promove severa vasoconstrição, a qual diminui a perfusão sanguínea e causa baixa concentração de oxigênio e isquemia tecidual (Ma et al. 2011). O fator induzido por hipóxia-1 alfa (HIF-1 α) é um regulador central da adaptação tecidual à hipóxia e exerce papel chave no desenvolvimento, fisiologia e doença (Riddle et al. 2009) e ativa genes responsivos à hipóxia, com o VEGF. A diminuição na expressão gênica de VEGF e BMP-2 pela nicotina também já foi relatada em estudos *in vitro* (Ma et al. 2011) e *in vivo* (Ma et al. 2010).

Alguns tratamentos têm sido propostos para melhorar e/ou acelerar a formação óssea sobre a superfície do implante, entre eles a terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) (Petri et al. 2010). Em odontologia, especificamente tratando-se do tecido ósseo, a LLLT foi capaz de acelerar o processo de reparo após extração dental (Luger et al. 1998) e fraturas ósseas (Takeda et al. 1988). No âmbito da implantodontia oral a utilização do laser tem sido relatada por diversos estudos (Dörtbudak et al. 2002; Khadra et al. 2004; Khadra et al. 2005; Maluf et al. 2010). Testes biomecânicos têm demonstrado que a LLLT pode aumentar o contato osso/implante e oferecer maior resistência ao torque de remoção do implante (Guzzardella et al. 2003; Campanha et al. 2010; Boldrini et al. 2013). É possível considerar que estes resultados se devem aos efeitos positivos da ação do laser nos eventos relacionados com o reparo ósseo (Petri et al. 2010).

Sabe-se que a LLLT modula respostas celulares em uma complexa via de estimulação da diferenciação osteoblástica, as quais podem estar relacionadas com os efeitos benéficos observados na osseointegração (Petri et al. 2010). Estudos também relataram que a LLLT foi

capaz de aumentar a expressão de ALP, OCN, RUNX-2, BMP (Petri et al. 2010; Fujimoto et al. 2010; Kiyosaki et al. 2010), OPG, RANK e RANKL (Kim et al. 2007), resultando no aumento da atividade das células do tecido ósseo e expansão da atividade óssea metabólica. Além do mais, ela pode exercer efeito biomodulador sobre a resposta inflamatória (Pretel et al. 2007), deposição de colágeno e formação da matriz óssea, se utilizada nos estágios iniciais do processo de reparo, ou seja, na fase proliferativa da resposta inflamatória (Pinheiro et al. 2006). Pinheiro et al. (2006) inferiram que a LLLT é capaz de bioestimular a formação de matriz óssea mineralizada após observações do aumento das proteínas osteocalcina (OCN), relacionada com o processo de mineralização, e diminuição de RUNX-2, frequentemente relacionado com o processo de diferenciação osteoblástica.

Até o presente momento, nenhum estudo analisou o efeito da LLLT na osseointegração de implantes de titânio sob a ação da nicotina. O uso da LLLT como método complementar para promover a osteogênese de tecidos ósseos afetados pelo tabagismo foi proposto apenas recentemente por um estudo de Franco et al. (2013) em um modelo com defeitos ósseos preenchidos por hidroxiapatita. Assim, o propósito do presente estudo foi avaliar a influência da LLLT na osseointegração de implantes instalados em tíbia de ratos modificados ou não sistemicamente pela nicotina. A avaliação consistiu de análise biomecânica, histomorfométrica, histoquímica aliada à microscopia de luz polarizada para avaliação do nível de maturação das fibras colágenas e imunohistoquímica para a detecção de: HIF-1 α , regulador central da adaptação tecidual à hipóxia; VEGF, potente mediador angiogênico; BMP-2, potente mediador osteogênico; RUNX-2, fator de transcrição regulador da diferenciação de osteoblastos; OCN, proteína não colagenosa sintetizada e secretada por osteoblastos na fase tardia da osteogênese; ALP, enzima sintetizada e secretada por osteoblastos especialmente durante o processo de biomineralização; RANKL, um regulador

positivo da reabsorção óssea; OPG, um regulador negativo da reabsorção óssea; TRAP, um biomarcador de osteoclastos.

Referências

Albrektsson, T., Berglundh, T. & Lindhe, J. (2003) Osseointegration: Historic background and current concepts. In: Lindh, J., Karring, T. & Niklaus, P.L., eds. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 4th edition, p 809–820 Oxford: Blackwell Munksgaard.

Anderson, H.C. (1989) Mechanism of mineral formation in bone. *Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology* **60**: 320-330.

Bain, C.A. & Moy, P.K. (1993) The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **8**: 609-615.

Balatsouka, D., Gotfredsen, K., Lindh, C.H. & Berglundh, T. (2005a) The impact of nicotine on bone healing and osseointegration. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 268-76. Erratum in: *Clinical Oral Implants Research* **16**: 387.

Balatsouka, D., Gotfredsen, K., Lindh, C.H. & Berglundh, T. (2005b) The impact of nicotine on osseointegration. An experimental study in the femur and tibia of rabbits. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 389-395.

Benowitz, N.L. (1986) Clinical pharmacology of nicotine. *Annual Review of Medicine* **37**: 21-32.

Berglundh, T., Abrahamsson, I., Lang, N.P. & Lindhe, J. (2003) De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 251-262.

Berley, J., Yamano, S. & Sukotjo, C. (2010) The effect of systemic nicotine on osseointegration of titanium implants in the rat femur. *Journal of Oral Implantology* **36**: 185-193.

Block, S.M. & Achong, M.R. (2004) Osseointegration. In: Miloro, M., Ghali, G.E., Larsen, E.P. & Waite, P.D, eds. *Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2nd edition, p 189–203 London: BC Decker.

Boldrini, C., de Almeida, J.M., Fernandes, L.A., Ribeiro, F.S., Garcia, V.G., Theodoro, L.H. & Pontes, A.E. (2013) Biomechanical effect of one session of low-level laser on the bone-titanium implant interface. *Lasers in Medical Science* **28**: 349-352.

Boskey, A.L. (1992) Mineral-matrix interactions in bone and cartilage. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 244-74.

Campanha, B.P., Gallina, C., Geremia, T., Loro, R.C., Valiati, R., Hübler, R. & de Oliveira, M.G. (2010) Low-level laser therapy for implants without initial stability. *Photomedicine and Laser Surgery* **28**: 365-369.

Carlsson, G.E., Lindquist, L.W. & Jemt, T. (2000) Long-term marginal periimplant bone loss in edentulous patients. *The International Journal of Prosthodontics* **13**: 295-302.

César-Neto, J.B., Benatti, B.B., Sallum, E.A. & Nociti, F.H. Jr. (2005a) Bone density around titanium implants may benefit from smoking cessation: a histologic study in rats. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **20**: 713-719.

César-Neto, J.B., Benatti, B.B., Sallum, E.A., Sallum, A.W. & Nociti, F.H. Jr. (2005b) Bone filling around titanium implants may benefit from smoking cessation: a histologic study in rats. *Journal of Periodontology* **76**: 1476-1481.

César-Neto, J.B., Duarte, P.M., Sallum, E.A., Barbieri, D., Moreno, H. Jr. & Nociti, F.H. Jr. (2003) A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *Journal of Periodontology* **74**: 1454-1459.

Chuang, S.K., Wei, L.J., Douglass, C.W. & Dodson, T.B. (2002) Risk factors for dental implant failure: a strategy for the analysis of clustered failure-time observations. *Journal of Dental Research* **81**: 572-577.

Deckers, M.M., van Bezooijen, R.L., van der Horst, G., Hoogendam, J., van Der Bent, C., Papapoulos, S.E. & Löwik, C.W. (2002) Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology* **143**: 1545-1553.

Dörtbudak, O., Haas, R. & Mailath-Pokorny, G. (2002) Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. *Clinical Oral Implants Research* **13**: 288-292.

Eckfeldt, A., Christiansson, U., Eriksson, T., Lindén, U., Lundqvist, S., Rundcrantz, T., Johansson, L.A, Nilner, K. & Billström, C. (2001) A retrospective analysis of factors associated with multiple implant failures in maxillae. *Clinical Oral Implants Research* **12**: 462-467.

Fang, J. & Hall, B.K. (1997) Chondrogenic cell differentiation from membrane bone periosteum. *Anatomy and Embryology* **196**: 349-362.

Franco, G.R., Laraia, I.O., Maciel, A.A., Miguel, N.M., Dos Santos, G.R., Fabrega-Carvalho, C.A., Pinto, C.A., Pettian, M.S & Cunha, M.R. (2013) Effects of chronic passive smoking on the regeneration of rat femoral defects filled with hydroxyapatite and stimulated by laser therapy. *Injury* **44**: 908-913.

Fujimoto, K., Kiyosaki, T., Mitsui, N., Mayahara, K., Omasa, S., Suzuki, N. & Shimizu, N. (2010) Low-intensity laser irradiation stimulates mineralization via increased BMPs in MC3T3-E1 cells. *Lasers in Surgery and Medicine* **42**: 519-526.

Fuller, K., Wong, B., Fox, S., Choi, Y. & Chambers, T.J. (1998) TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *The Journal of Experimental Medicine* **188**: 997-1001.

Gerber, H.P., Vu, T.H., Ryan, A.M., Kowalski, J., Werb, Z. & Ferrara, N. (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature Medicine* **5**: 623-628.

Gotfredsen, K., Lindh, C.H. & Berglundh, T. (2009) Does longstanding nicotine exposure impair bone healing and osseointegration? An experimental study in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* **91**: 918-923.

Guzzardella, G.A., Torricelli, P., Nicoli-Aldini, N. & Giardino, R. (2003) Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser stimulation: an in vivo comparative study. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 226-232.

Haas, R., Haimböck, W., Mailath, G. & Watzek, G. (1996) The relationship of smoking on peri-implant tissue: a retrospective study. *The Journal of Prosthetic Dentistry* **76**: 592-596.

Hinode, D., Tanabe, S., Yokoyama, M., Fujisawa, K., Yamauchi, E. & Miyamoto, Y. (2006) Influence of smoking on osseointegrated implant failure: a meta-analysis. *Clinical Oral Implants Research* **17**: 473-478.

Kanno, C.M., Oliveira, J.A., Garcia, J.F., Castro, A.L. & Crivelini, M.M. (2008) Effects of cyclosporin, phenytoin, and nifedipine on the synthesis and degradation of gingival collagen

in tuftedcapuchin monkeys (*Cebus apella*) histochemical and MMP-1 and -2 and collagen I gene expression analyses. *Journal of Periodontology* **79**: 114-122.

Katono, T., Kawato, T., Tanabe, N., Suzuki, N., Yamanaka, K., Oka, H., Motohashi, M. & Maeno, M. (2006) Nicotine treatment induces expression of matrix metalloproteinases in human osteoblastic Saos-2 cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **38**: 874-882.

Khadra, M. (2005) The effect of low level laser irradiation on implant-tissue interaction. In vivo and *in vitro* studies. *Swedish Dental Journal. Supplement* 1-63.

Khadra, M., Rønold, H.J., Lyngstadaas, S.P., Ellingsen, J.E. & Haanaes, H.R. (2004) Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 325-332.

Kim, Y.D., Kim, S.S., Hwang, D.S., Kim, S.G., Kwon, Y.H., Shin, S.H., Kim, U.K., Kim, J.R. & Chung, I.K. (2007) Effect of low-level laser treatment after installation of dental titanium implant-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: an experimental study in rats. *Lasers in Surgery and Medicine* **39**: 441-450.

Kiyosaki, T., Mitsui, N., Suzuki, N. & Shimizu, N. (2010) Low-level laser therapy stimulates mineralization via increased Runx2 expression and ERK phosphorylation in osteoblasts. *Photomedicine and Laser Surgery* **28**(Suppl 1): 167-172.

Lambert, P.M., Morris, H.F. & Ochi, S. (2000) The influence of smoking on 3-year clinical success of osseointegrated dental implants. *Annals of periodontology/the American Academy of Periodontology* **5**: 79-89.

Lavery, K., Swain, P., Falb, D. & Alaoui-Ismaili, M.H. (2008) BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human

bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 20948-20958.

Luger, E.J., Rochkind, S., Wollman, Y., Kogan, G. & Dekel, S. (1998) Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers in Surgery and Medicine* **22**: 97-102.

Ma, L., Zheng, L.W., Sham, M.H. & Cheung, L.K. (2010) Uncoupled angiogenesis and osteogenesis in nicotine-compromised bone healing. *Journal of Bone and Mineral Research* **25**: 1305-1313.

Ma, L., Zwahlen, R.A., Zheng, L.W. & Sham, M.H. (2011) Influence of nicotine on the biological activity of rabbit osteoblasts. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 338-342.

Machado, G.J., Dias, S.M., Bosco, A.F., Okamoto, T., Bedran de Castro, J.C. & Dornelles, R.C. (2010) Action of nicotine and ovariectomy on bone regeneration after tooth extraction in rats. *Journal of Oral & Maxillofacial Surgery* **68**: 2675-2681.

Maluf, A.P., Maluf, R.P., Brito, Cda R., França, F.M., de Brito, R.B. Jr. (2010) Mechanical evaluation of the influence of low-level laser therapy in secondary stability of implants in mice shinbones. *Lasers in Medical Science* **25**: 693-698.

Mayr-Wohlfart, U., Waltenberger, J., Hausser, H., Kessler, S., Günther, K.P., Dehio, C., Puhl, W. & Brenner, R.E. (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* **30**: 472-477.

Nociti Júnior, F.H., Cesar Neto, J.B., Carvalho, M.D., Sallum, E.A. & Sallum, A.W. (2002a) Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *Journal of Periodontology* **73**: 982-987.

Nociti, F.H. Jr., César, N.J., Carvalho, M.D. & Sallum, E.A. (2002b) Bone density around titanium implants may be influenced by intermittent cigarette smoke inhalation: a histometric study in rats. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **17**: 347-352.

Okamoto, M., Kita, T., Okuda, H., Tanaka, T. & Nakashima, T. (1994) Effects of aging on acute toxicity of nicotine in rats. *Pharmacology & Toxicology* **75**: 1-6.

Osyczka, A.M., Diefenderfer, D.L., Bhargava, G. & Leboy, P.S. (2004) Different effects of BMP-2 on marrow stromal cells from human and rat bone. *Cells Tissues Organs* **176**: 109-119.

Patel, Z.S., Young, S., Tabata, Y., Jansen, J.A., Wong, M.E. & Mikos, A.G. (2008) Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone* **43**: 931-940.

Pretel, H., Lizarelli, R.F. & Ramalho, L.T. (2007) Effect of low-level laser therapy on bone repair: histological study in rats. *Lasers in Surgery and Medicine* **39**: 788-796.

Peng, H., Usas, A., Olshanski, A., Ho, A.M., Gearhart, B., Cooper, G.M. & Huard, J. (2005) VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research* **20**: 2017-2027.

Pereira, M.L., Carvalho, J.C., Peres, F. & Fernandes, M.H. (2010) Simultaneous effects of nicotine, acrolein, and acetaldehyde on osteogenic-induced bone marrow cells cultured on plasma-sprayed titanium implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **25**: 112-122.

Petri, A.D., Teixeira, L.N., Crippa, G.E., Beloti, M.M., de Oliveira, P.T. & Rosa, A.L. (2010) Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium. *Brazilian Dental Journal* **21**: 491-498.

Pinheiro, A.L. & Gerbi, M.E. (2006) Photoengineering of bone repair processes. *Photomedicine and Laser Surgery* **24**: 169-178.

Pinto, J.R., Bosco, A.F., Okamoto, T., Guerra, J.B. & Piza, I.G. (2002) Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats. A histological study. *Brazilian Dental Journal* **13**: 3-9.

Riddle, R.C., Khatri, R., Schipani, E. & Clemens, T.L. (2009) Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in angiogenic-osteogenic coupling. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **87**: 583-590.

Rivera-Hidalgo, F. (2003) Smoking and periodontal disease. *Periodontology 2000* **32**: 50-58.

Rothem, D.E., Rothem, L., Dahan, A., Eliakim, R. & Soudry, M. (2011) Nicotinic modulation of gene expression in osteoblast cells, MG-63. *Bone* **48**: 903-909.

Samee, M., Kasugai, S., Kondo, H., Ohya, K., Shimokawa, H. & Kuroda, S. (2008) Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) transfection to humanperiosteal cells enhances osteoblast differentiation and bone formation. *Journal of Pharmacological Sciences* **108**: 18-31.

Sánchez-Pérez, A., Moya-Villaescusa, M.J. & Caffesse, R.G. (2007) Tobacco as a risk factor for survival of dental implants. *Journal of Periodontology* **78**: 351-359.

Sørensen, L.T. (2012) Wound healing and infection in surgery: the pathophysiological impact of smoking, smoking cessation, and nicotine replacement therapy: a systematic review. *Annals of Surgery* **255**: 1069-1079.

Sørensen, L.T., Toft, B.G., Rygaard, J., Ladelund, S., Paddon, M., James, T., Taylor, R. & Gottrup, F. (2010) Effect of smoking, smoking cessation, and nicotine patch on wound dimension, vitamin C, and systemic markers of collagen metabolism. *Surgery* **148**: 982-990.

Stefani, C.M., Nogueira, F., Sallum, E.A., de, T.S., Sallum, A.W. & Nociti, F.H. Jr. (2002) Influence of nicotine administration on different implant surfaces: a histometric study in rabbits. *Journal of Periodontology* **73**: 206-212.

Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T. & Martin, T.J. (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Reviews* **20**: 345-357.

Takeda, Y. (1988) Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction. Experimental study in rats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **17**: 388-391.

Tanaka, H., Tanabe, N., Kawato, T., Nakai, K., Kariya, T., Matsumoto, S., Zhao, N., Motohashi, M. & Maeno, M. (2013) Nicotine affects bone resorption and suppresses the expression of cathepsin K, MMP-9 and vacuolar-type H(+)-ATPase d2 and actin organization in osteoclasts. *PLoS One* **8**: e59402.

Tanaka, H., Tanabe, N., Suzuki, N., Shoji, M., Torigoe, H., Sugaya, A., Motohashi, M. & Maeno, M. (2005) Nicotine affects mineralized nodule formation by the human osteosarcoma cell line Saos-2. *Life Sciences* **77**: 2273-2284.

ten Dijke, P., Korchynskyi, O., Valdimarsdottir, G. & Goumans, M.J. (2003) Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* **211**: 105-113.

Theiss, S.M., Boden, S.D., Hair, G., Titus, L., Morone, M.A. & Ugbo, J. (2000) The effect of nicotine on gene expression during spine fusion. *Spine* **25**: 2588-2594.

Walker, L.M., Preston, M.R., Magnay, J.L., Thomas, P.B. & El Haj, A.J. (2001) Nicotinic regulation of c-fos and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. *Bone* 2001 **28**: 603-608.

Ward, K.D. & Klesges, R.C. (2001) A meta-analysis of the effects of cigarette smoking on bone mineral density. *Calcified Tissue International* **68**: 259-270.

Wong, L.S. & Martins-Green, M. (2004) Firsthand cigarette smoke alters fibroblast migration and survival: implications for impaired healing. *Wound Repair and Regeneration* **12**: 471-484.

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N. & Suda, T. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 3597-3602.

Yin, L., Morita, A. & Tsuji T. (2003) Tobacco smoke extract induces age-related changes due to modulation of TGF-beta. *Experimental Dermatology* **12**(Suppl. 2): 51-56.

Yin, L., Morita, A. & Tsuji, T. (2000) Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. *Archives of Dermatological Research* **292**: 188-194.

The background of the slide is a histological image showing several cross-sections of biological tissue, likely from the gastrointestinal tract. The tissue is stained with hematoxylin and eosin (H&E), showing various cellular structures and layers. A semi-transparent purple vertical bar is positioned on the right side of the slide, containing the title text.

Lista de Tabelas

CAPÍTULO 3

- Tabela 1 - Médias e desvios padrão ($M \pm DP$) dos dados de contra torque ($N.cm^2$), nas interações entre Grupos e Períodos. 172
- Tabela 2 - Médias e desvios padrão ($M \pm DP$) de contato osso/implantes (BIC, %) nas três primeiras roscas, na mesial e distal, para cada grupo e período. 173
- Tabela 3 - Médias e desvios padrão ($M \pm DP$) de área óssea (BA, %) dentro das três primeiras roscas dos implantes, na mesial e distal, para cada grupo e período. 174

The background of the slide features three vertical panels of histological sections of the endometrium, stained with hematoxylin and eosin (H&E). From left to right, the panels show: 1) A section with a thin, dark-stained functional layer and a thick, pale, coiled submucosal layer, characteristic of the proliferative phase. 2) A section showing a thick, dark-stained functional layer with a highly convoluted, saw-toothed surface, indicating the secretory phase. 3) A section showing a thick, dark-stained functional layer with a highly convoluted, saw-toothed surface, indicating the menstrual phase. The text 'Lista de Figuras' is overlaid on the right side of the image.

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Gráfico mostrando médias e desvios-padrão de contra torque ($N.cm^2$) nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos: * Diferença significativa com 15 dias pós-operatórios no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); † Diferença significativa com 30 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$). 94
- Figura 2 - Porcentagem de contato osso/implantes (BIC) e área óssea (BA) nas três primeiras roscas dos implantes. (A) Gráfico mostrando média e desvios-padrão de BIC nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos: * Diferença significativa com 15 dias pós-operatórios no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); † Diferença significativa com 30 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$). (B) Gráfico mostrando média e desvios-padrão de BA nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos: * Diferença significativa com o Grupo Veh no mesmo período ($p \leq 0,05$); † Diferença significativa com 15 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); ‡ Diferença significativa com 30 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$). (C-H) Fotomicrografias evidenciando o tecido ósseo neoformado nas roscas do implante nos grupos Veh (C, E e G) e Nic (D, F e H) aos 15 (C-D), 30 (E-F) e 60 (G-H) dias pós-operatórios. Abreviações: to, tecido ósseo. Coloração: H&E. 95
- Figura 3 - Nível de maturação das fibras colágenas nas roscas do implante. (A) Gráfico mostrando média e desvios-padrão das fibras colágenas maduras e imaturas nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos: *Diferença significativa com Grupo Veh no mesmo período ($p \leq 0,05$); †Diferença significativa com 15 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); ‡Diferença significativa com 30 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$). (B-G) Fotomicrografias evidenciando fibras colágenas maduras (vermelho – laranja) e imaturas (amarela – verde) nos grupos Veh (B, D e F) e Nic (C, E e G) aos 15 (B-C), 30 (D-E) e 60 (F-G) dias pós-operatórios. Abreviações: to, tecido ósseo. Coloração: Vermelho picosirius 96

visualizado em microscopia de luz polarizada.

- Figura 4 - Imunomarcção para HIF-1 α e VEGF. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para HIF-1 α nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B-C) Fotomicrografias evidenciando as células HIF-1 α -positivas nos grupos Veh (B) e Nic (C), aos 15 dias pós-operatórios. (D) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para VEGF nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (E-F) Fotomicrografias evidenciando as células VEGF-positivas nos grupos Veh (E) e Nic (F), aos 15 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. 97
- Figura 5 - Imunomarcção para BMP-2 e RUNX-2. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para BMP-2 nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B-C) Fotomicrografias evidenciando as células BMP-2-positivas nos grupos Veh (B) e Nic (C), aos 30 dias pós-operatórios. (D) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para RUNX-2 nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (E-F) Fotomicrografias evidenciando as células RUNX-2-positivas nos grupos Veh (E) e Nic (F) aos 30 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: (B-C) Hematoxilina de Harris, (E-F) Fast green. 98
- Figura 6 - Imunomarcção para OCN e ALP. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para OCN nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B-C) Fotomicrografias evidenciando as células OCN-positivas nos grupos Veh (B) e Nic (C), aos 30 dias pós-operatórios. (D) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para ALP nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (E-F) Fotomicrografias evidenciando as células ALP- 99

positivas nos grupos Veh (E) e Nic (F), aos 30 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

- Figura 7 - Imunomarcção para RANKL, OPG e TRAP. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para RANKL nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para OPG nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (C) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para TRAP nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (D-F) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção das células RANKL-positivas (D), OPG-positivas (E) e TRAP-positivas (F) aos 60 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. 100

CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Gráfico mostrando médias e desvios-padrão de contra torque ($N.cm^2$) nos grupos C e LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos. 133
- Figura 2 - Porcentagem de contato osso/implantes (BIC) e área óssea (BA) nas três primeiras roscas dos implantes. (A) Gráfico mostrando médias e desvios-padrão de BIC nos grupos C e LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos. (B) Gráfico mostrando médias e desvios-padrão de BA nos grupos C e LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos: * Diferença significativa com o Grupo C no mesmo período ($p \leq 0,05$); † Diferença significativa com 15 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); ‡ Diferença significativa com 30 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$). (C-H) Fotomicrografias evidenciando tecido ósseo 134

neoformado nas roscas do implante nos grupos C (C, E e G) e LLLT (D, F e G) aos 15 (C-D), 30 (E-F) e 60 (G-H) dias pós-operatórios. Abreviações: to, tecido ósseo. Coloração: H&E.

- Figura 3 - Nível de maturação das fibras colágenas nas roscas do implante. (A) 135
Gráfico mostrando médias e desvios-padrão das fibras colágenas maduras e imaturas nos grupos C e LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos: * Diferença significativa com 15 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); † Diferença significativa com 30 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$). (B-G) Fotomicrografias evidenciando fibras colágenas maduras (vermelho – laranja) e imaturas (amarela – verde) nos grupos C (B, D e F) e LLLT (C, E e G) aos 60 dias pós-operatórios. Abreviações: to, tecido ósseo. Coloração: Vermelho picrossirius visualizado em microscopia de luz polarizada.
- Figura 4 - Padrão de imunomarcacão para HIF-1 α e VEGF. (A) Gráfico 136
mostrando o padrão de imunomarcacão (mediana e desvio interquartil dos escores) para HIF-1 α nos grupos C e LLLT aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B-C) Fotomicrografias evidenciando as células HIF-1 α -positivas nos grupos C (B) e LLLT (C), aos 15 dias pós-operatórios. (D) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcacão (mediana e desvio interquartil dos escores) para VEGF nos grupos C e LLLT aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (E-F) Fotomicrografias evidenciando as células VEGF-positivas nos grupos C (E) e LLLT (F), aos 15 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.
- Figura 5 - Padrão de imunomarcacão para BMP-2 e RUNX-2. (A) Gráfico 137
mostrando o padrão de imunomarcacão (mediana e desvio interquartil dos escores) para BMP-2 nos grupos C e LLLT aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B-C) Fotomicrografias evidenciando as células BMP-2-positivas nos grupos C (B) e LLLT (C), aos 30 dias pós-operatórios. (D) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcacão (mediana e desvio

interquartil dos escores) para RUNX-2 nos grupos C e LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (E-F) Fotomicrografias evidenciando as células RUNX-2-positivas nos grupos C (E) e LLLT (F) aos 30 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: (B-C) Hematoxilina de Harris, (E-F) Fast green.

- Figura 6 - Padrão de imunomarcção para OCN e ALP. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para OCN nos grupos C e LLLT aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B-C) Fotomicrografias evidenciando as células OCN-positivas nos grupos C (B) e LLLT (C), aos 30 dias pós-operatórios. (D) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para ALP nos grupos C e LLLT aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (E-F) Fotomicrografias evidenciando as células ALP-positivas nos grupos C (E) e LLLT (F), aos 30 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. 138
- Figura 7 - Imunomarcção para RANKL, OPG e TRAP. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para RANKL nos grupos C e LLLT aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para OPG nos grupos C e LLLT aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (C) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para TRAP nos grupos C e LLLT aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (D-F) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção das células RANKL-positivas (D), OPG-positivas (E) e TRAP-positivas (F) aos 60 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. 139

CAPÍTULO 3

- Figura 1 - Fotomicrografias evidenciando o tecido ósseo neoformado nas roscas dos implantes nos grupos Nic (A, C e E) e Nic/LLLT (B, D e F) aos 15 (A-B), 30 (C-D) e 60 (E-F) dias pós-operatórios. Abreviações: to, tecido ósseo. Coloração: H&E. 179
- Figura 2 - Nível de maturação das fibras colágenas. (A) Gráfico mostrando médias e desvios-padrão da porcentagem de fibras colágenas maduras e imaturas nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos: * Diferença significativa com Grupo Veh no mesmo período ($p \leq 0,05$), † Diferença significativa com Grupo Veh/LLLT no mesmo período ($p \leq 0,05$); ‡ Diferença significativa com Grupo Nic no mesmo período ($p \leq 0,05$); # Diferença significativa com 15 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); s Diferença significativa com 30 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$). (B-G) Fotomicrografias evidenciando fibras colágenas maduras e imaturas nos grupos Nic (B, D e F) e Nic/LLLT (C, E e G), aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Abreviações: to, tecido ósseo. Coloração: Vermelho picrosirius visualizado em microscopia de luz polarizada. 180
- Figura 3 - Imunomarcção para HIF-1 α e VEGF. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para HIF-1 α nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para VEGF nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (C-D) Fotomicrografias evidenciando as células HIF-1 α -positivas (C) e VEGF-positivas (D) no grupo Nic/LLLT, aos 15 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. 181
- Figura 4 - Imunomarcção para BMP-2 e RUNX-2. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para BMP-2 nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 182

e 60 dias pós-operatórios. (B) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para RUNX-2 nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (C-D) Fotomicrografias evidenciando as células BMP-2-positivas (C) e RUNX-2-positivas (D) no grupo Nic/LLLT, aos 30 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: (C) Hematoxilina de Harris e (D) fast green.

- Figura 5 - Imunomarcção para OCN e ALP. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para OCN nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para ALP nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (C-D) Fotomicrografias evidenciando as células OCN-positivas (C) e ALP-positivas (D) no grupo Nic/LLLT, aos 30 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. 183
- Figura 6 - Imunomarcção para RANKL, OPG e TRAP. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para RANKL nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para OPG nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (C) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para TRAP nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (D-E) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção das células RANKL-positivas (D), OPG-positivas (E) e TRAP-positivas (F) aos 60 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris 184

The image displays three vertical panels of histological sections of the uterine cervix, stained with hematoxylin and eosin (H&E). The top panel shows normal stratified squamous epithelium with a well-defined basal layer and a surface layer of flattened, keratinized cells. The middle panel illustrates squamous metaplasia, where the normal columnar epithelium has been replaced by a stratified layer of squamous cells. The bottom panel shows a more advanced stage of metaplasia with increased cellular density and some architectural disorganization. A semi-transparent purple banner is overlaid on the right side of the image, containing the text 'Lista de Anexos' in a white, serif font.

Lista de Anexos

| | | |
|-----------|---|-----|
| Anexo A - | Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) | 186 |
| Anexo B - | Normas para publicação do Periódico “Clinical Oral Implants Research” | 188 |



Lista de Abreviaturas e Siglas

| | | |
|-------------------|---|--|
| ANOVA | = | Análise de Variância |
| ALP | = | Fosfatase Alcalina |
| BA | = | Área Óssea |
| BIC | = | Contato Osso Implante |
| BMP-2 | = | Proteína Morfogenética Óssea-2 |
| CEUA | = | Comissão de Ética no Uso Animal |
| cm ² | = | Centímetros quadrados |
| DNA | = | Ácido Desoxirribonucleico |
| DP | = | Desvio Padrão |
| EDTA | = | Ácido Etilenodiaminotetracético |
| FAPESP | = | Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo |
| g | = | Gramas |
| h | = | Horas |
| H&E | = | Hematoxilina e Eosina |
| HIF-1 α | = | Fator Induzido por Hipóxia-1 alfa |
| InGaAlP | = | Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo |
| J | = | Joule |
| J/cm ² | = | Joule por centímetro quadrado |
| LLLT | = | Terapia com laser em baixa intensidade |
| M | = | Média |
| mg/kg | = | Miligramas por quilogramas |
| mg/ml | = | Miligramas por mililitros |

| | | |
|-----------------|---|--|
| min | = | Minutos |
| ml | = | Mililitros |
| mm ² | = | Milímetros quadrados |
| mRNA | = | Ácido Ribonucleico Mensageiro |
| mW | = | Milivates |
| nm | = | Nanômetro |
| OCN | = | Osteocalcina |
| OPG | = | Osteoprotegerina |
| PBS | = | Tampão Fosfato Salino |
| RANK | = | Receptor ativador de NF Kappa β |
| RANKL | = | Receptor ativador de NF Kappa β ligante |
| RUNX-2 | = | Fator de Transcrição Relacionado à Runt |
| s | = | Segundos (Unidade de medida de tempo) |
| to | = | Tecido ósseo |
| TRAP | = | Fosfatase Ácida Tartarato Resistente |
| VEGF | = | Fator de Crescimento Endotelial Vascular |
| µg/ml | = | Microgramas por mililitros |
| µm | = | Micrômetros (Unidade de medida) |
| °C | = | Graus célsius (Unidade de medida de temperatura) |



Lista de Símbolos

| | | |
|----------------|---|---------------------------------|
| % | = | Por cento |
| @ | = | Arroba |
| < | = | Menor |
| ≤ | = | Menor ou Igual |
| = | = | Igual |
| + | = | Mais |
| ± | = | Mais ou menos |
| ® | = | Marca registrada |
| α | = | alfa |
| β | = | Beta |
| x | = | Veze |
| n | = | Tamanho da amostra |
| <i>p</i> | = | Probabilidade do valor do teste |
| pH | = | Potencial Hidrogeniônico |
| n ^o | = | Número |

Sumário

CAPÍTULO 1:

| | |
|--------------------------|----|
| Resumo..... | 64 |
| Introdução..... | 65 |
| Materiais e Métodos..... | 68 |
| Resultados..... | 75 |
| Discussão..... | 77 |
| Referências..... | 82 |

CAPÍTULO 2:

| | |
|--------------------------|-----|
| Resumo..... | 103 |
| Introdução..... | 104 |
| Materiais e Métodos..... | 105 |
| Resultados..... | 112 |
| Discussão..... | 115 |
| Referências..... | 120 |

CAPÍTULO 3:

| | |
|--------------------------|-----|
| Resumo..... | 142 |
| Introdução..... | 143 |
| Materiais e Métodos..... | 145 |
| Resultados..... | 152 |
| Discussão..... | 156 |
| Referências..... | 160 |

ANEXOS

| | |
|--------------|-----|
| Anexo A..... | 185 |
| Anexo B..... | 187 |

Capítulo 1

Segundo as normas do Periódico “**Clinical Oral Implants Research**” – AnexoB

Manuscrito para Publicação

A vertical histological section of tissue, stained with hematoxylin and eosin (H&E), showing various cellular structures and tissue layers. The tissue is oriented vertically, with the top of the image showing a more cellular, possibly epithelial layer, and the bottom showing more fibrous or connective tissue. The staining is in shades of purple and pink.

Título: O efeito da nicotina no processo de reparo ósseo peri-implantar.

Autores: Paula Lazilha Faleiros¹ MS; Juliano Milanezi de Almeida¹ PhD; Valdir Gouveia Garcia^{1,2} PhD; Alvaro Francisco Bosco¹ PhD

¹ Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada - Disciplina de Periodontia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Univ. Estadual Paulista - UNESP, Araçatuba, SP, Brasil.

² Curso de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Barretos, Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos - UNIFEB, Barretos, SP, Brasil.

Título resumido (“running title”): Efeitos da nicotina na osseointegração

Palavras-chave: Implantes dentais, nicotina, osseointegração.

Autor responsável pela correspondência:

Alvaro Francisco Bosco

Rua José Bonifácio, nº 1193

CEP: 16015-050, Araçatuba, SP, Brasil

Telefone: +55 18 36363239 (publicação autorizada)

Fax: +55 18 36363333 (publicação autorizada)

E-mail: afbosco@hotmail.com (publicação autorizada)

Resumo

Objetivo: Analisar o processo de reparo ósseo peri-implantar em tibia de ratos modificados sistemicamente pela nicotina. **Material e Métodos:** Um total de 60 ratos (Wistar) foi randomicamente distribuído em dois grupos experimentais (n = 30) submetidos a duas aplicações diárias de solução salina (Veh) ou nicotina (NIC). Após trinta dias, implantes de titânio foram instalados na metáfise proximal de ambas as tíbias. Dez animais de cada grupo foram eutanasiados aos 15, 30 e 60 dias pós-operatório. As tíbias direitas foram analisadas pelo teste de torque reverso e processadas para análise histológica, histoquímica e imunoistoquímicas de HIF-1 α , VEGF, BMP-2, RUNX-2, OCN, ALP, RANKL, OPG e TRAP. As tíbias esquerdas foram processadas para a análise do contato osso-implante (BIC) e área óssea (BA). Os dados quantitativos foram analisados estatisticamente ao nível de significância de 5%. **Resultados:** O Grupo Nic não apresentou diferença significativa em BIC e no torque de remoção dos implantes, mas apresentou diminuição da BA e qualidade das trabéculas ósseas no interior das suas roscas quando comparado ao Grupo Veh. Também foi observado atraso na remodelação da matriz óssea, diminuição no padrão de imunomarcção de HIF-1 α , VEGF, BMP-2, OCN, ALP e OPG, aumento no padrão de imunomarcção de RANKL e aumento na quantidade de células imunorreativas a RUNX-2 e TRAP no Grupo Nic em relação ao Grupo Veh. **Conclusão:** A nicotina é capaz de estimular a atividade reabsortiva, reduzir a angiogênese e a diferenciação osteoblástica local, prejudicar a remodelação do colágeno da matriz óssea, o processo de biomineralização e maturação óssea peri-implantar, o que é capaz de exercer potente efeito negativo sobre a osseointegração em fumantes.

Introdução

No contexto da implantodontia, a maior parte da literatura relaciona o tabagismo como importante fator de risco que afeta a taxa de sucesso clínico das reabilitações implanto suportadas, e apenas alguns estudos (Kronström et al. 2001; Bain et al. 2002; Kumar et al. 2002) falham ao tentar estabelecer essa interrelação (Baig & Rajan 2007). O assunto foi discutido pela primeira vez na década de noventa por Bain & Moy (1993) que, ao investigarem 540 pacientes com 2194 implantes Branemark, consideraram o uso do tabaco o fator mais significativo responsável por falhas de implantes de titânio. Recentemente, uma nova revisão sistemática e meta-análise reascendeu o tema para a comunidade científica, demonstrando que o tabagismo, além de levar ao fracasso dos implantes, ainda leva ao risco de infecções pós-operatórias, bem como a perda óssea marginal (Chrcanovic et al. 2015).

O tabaco contém uma complexa mistura de substâncias, incluindo a nicotina, várias nitrosaminas, oligoelementos, e muitas outras substâncias pouco caracterizadas (Tanaka et al. 2013). O efeito potencial desses múltiplos componentes no metabolismo ósseo ainda não é compreendido, (Gotfredsen et al. 2009) e por isso a maioria dos efeitos indesejáveis do tabaco tem sido atribuído à nicotina (Ma et al. 2010b; Ma et al. 2011a). A nicotina, o maior componente da fase particulada do tabaco, é um alcaloide altamente tóxico (Balbani & Montovani, 2005). É o agonista prototípico dos receptores colinérgicos nicotínicos que estimula drasticamente os neurônios e, em última análise bloqueia a transmissão sináptica. Ela também assumiu importante papel nas pesquisas científicas na área da implantodontia uma vez que tem sido amplamente utilizada em modelos experimentais com animais que visam elucidar os efeitos do tabaco sobre a osseointegração e reparo ósseo peri-implantar (Stefani et al. 2002; Nociti Júnior et al. 2002; César-Neto et al. 2003; Balatsouka et al. 2005a;

Balatsouka et al. 2005b; Bonfante et al. 2008; Gotfredsen et al. 2009; Berley et al. 2010; Yamano et al. 2010).

A literatura relata severas alterações no metabolismo e capacidade de reparo ósseo frente à nicotina, incluindo: (1) inibição da proliferação, migração, quimiotaxia de fibroblastos, e com isso a redução na produção de colágeno (Yin et al. 2000; Wong & Martins-Green 2004); (2) promoção de severa vasoconstrição, a qual diminui a perfusão sanguínea e causa baixa concentração de oxigênio e isquemia tecidual, ao passo que estimula a angiogênese (Ma et al. 2008; Zheng et al. 2008; Ma et al. 2010b); (3) alterações na proliferação, diferenciação, maturação e expressão gênica de osteoblastos (Theiss et al. 2000; Walker et al. 2001; Tanaka et al. 2005; Katono et al. 2006; Pereira et al. 2010; Rothem et al. 2011); (4) aumento do número de osteoclastos com poucos núcleos e diminuição do número de osteoclastos com grandes núcleos, além de redução da área planar de reabsorção óssea (Tanaka et al. 2013). Tais alterações poderiam influenciar a osseointegração, uma vez que ela está associada com a formação de um coágulo sanguíneo ao redor do implante, seguida pela diminuição da inflamação e aumento da angiogênese e osteogênese (Salvi et al. 2015), sendo a osteogênese o mecanismo que incorpora a diferenciação osteoblástica, formação e mineralização óssea (Salvi et al. 2015).

Contudo estudos pré-clínicos mostram resultados controversos ao tentar estabelecer uma correlação entre a exposição sistêmica à nicotina e o atraso na osseointegração (Takamiya et al. 2013) Por exemplo, um estudo que comparou a administração sistêmica de nicotina e a inalação da fumaça do cigarro mostrou que, enquanto a inalação da fumaça diminuiu o contato osso-implante e a neoformação óssea tanto em osso cortical quanto medular, a nicotina isolada apenas foi capaz de reduzir a neoformação óssea em área medular. (César-Neto et al 2003). Outros autores demonstraram ainda que altas doses de nicotina e por

longo período de tempo (6 meses) não afetaram a osseointegração em tíbias de coelhos (Balatsouka et al. 2005a; Balatsouka et al. 2005b; Gotfredsen et al.2009). Alguns chegaram a sugerir ainda que outros componentes do tabaco poderiam estar mais envolvidos no prejuízo ao sucesso clínico dos implantes dentais em fumantes (Balatsouka et al. 2005a). No entanto, frente a outros relatos que demonstram que a nicotina foi capaz de causar efeito prejudicial no processo de reparo ósseo peri-implantar (Berley et al. 2010; Yamano et al. 2010) nós consideramos este tópico ainda como controverso e inconclusivo, fazendo-se necessário novos estudos que elucidem a sua ação em mecanismos específicos no processo de osseointegração.

Assim, o propósito do presente estudo foi analisar o processo de reparo ósseo peri-implantar, e eventos celulares envolvidos, em tíbia de ratos modificados sistemicamente pela nicotina. A avaliação consistiu de análise biomecânica da força necessária para romper a osseointegração, histomorfométrica do contato osso-implante (BIC) e porcentagem de área óssea (BA) dentro dos limites das roscas dos implantes, histoquímica aliada à microscopia de luz polarizada para avaliação do nível de maturação das fibras colágenas e imunoistoquímica para a detecção de: HIF-1 α (Fator induzido por hipóxia-1 alfa, regulador central da adaptação tecidual à hipóxia); VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular, potente mediador angiogênico); BMP-2 (Proteína morfogenética óssea-2, potente mediador osteogênico); RUNX-2 (Fator de transcrição relacionado à Runt, regulador da diferenciação de osteoblastos); OCN (Osteocalcina, proteína não colagenosa sintetizada e secretada por osteoblastos na fase tardia da osteogênese); ALP (Fosfatase alcalina, enzima sintetizada e secretada por osteoblastos especialmente durante o processo de biomineralização); RANKL (Receptor ativador de NF Kappa β ligante, um regulador positivo da reabsorção óssea); OPG (Osteoprotegerina, um regulador negativo da reabsorção óssea); TRAP (Fosfatase ácida resistente ao tartarato, um biomarcador de osteoclastos).

Materiais e métodos

1. Animais, cálculo amostral e grupos experimentais

Este estudo foi conduzido em conformidade com as diretrizes propostas pela ARRIVE (Pesquisa Animal: Descrevendo Experimentos *In Vivo*) (Kilkenny et al. 2010). O tamanho da amostra foi determinado com um nível de significância de $\alpha = 0,05$; um poder amostra de 80%. Considerando estes parâmetros, dez animais por tratamento foi considerado nosso tamanho da amostra. Um total de 60 ratos machos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) de 3 meses de idade, 250-300 g (Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP) foi estudado. Um total de 120 implantes foi instalado. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo de luz controlado (12-h claro/escuro), água e ração *ad libitum* durante todo o experimento. Seguindo uma tabela gerada em computador, os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais ($n = 30$) de duas aplicações diárias de solução salina, Grupo Veh; ou nicotina, Grupo Nic. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo nº 00934-2012) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP.

2. Protocolo Experimental

Administração da nicotina e solução salina

O hemissulfato de nicotina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi diluído em solução salina (cloreto de sódio 0,9%) para se obter uma solução com concentração de 5mg/ml. A cada 12 horas, os animais do Grupo Nic receberam injeções subcutâneas com dose de 3mg/kg de peso dessa solução na região dorsal em horário pré-estabelecido por um período de 30 dias que antecederam o procedimento cirúrgico até o momento da eutanásia (Okamoto et al. 1994). Os

animais do Grupo Veh receberam apenas o veículo (solução salina) com objetivo de simular as mesmas condições de estresse diário proveniente das aplicações de nicotina.

Instalação dos implantes

Após 30 dias do início das administrações foi realizado o procedimento cirúrgico para instalação dos implantes nas tíbias direita e esquerda de todos os animais. A anestesia geral foi realizada pela associação de ketamina (70 mg/kg de peso corporal) e xilazina (6 mg/kg de peso corporal). Após tricotomia da parte interna da perna e antissepsia com iodopolvidona (10%), foi realizada uma incisão de aproximadamente 30 mm do lado interno da coxa, logo abaixo do joelho, e a metáfise proximal foi exposta por dissecação romba. Um alvéolo cirúrgico bicortical foi preparado com uma fresa (2,0 mm) (Conexão Sistemas de Prótese, Arujá, SP, Brasil) montada em motor cirúrgico (45 N e 980 rpm) (Ômega, Dentscler Indústria de Aparelhos Odontológicos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) sob irrigação constante de solução salina. O implante (4,0 mm x 2,2 mm, Cone Morse, de superfície tratada convencionalmente por meio de jateamento e ataque ácido) (DSP Biomedical®, Campo Largo, PR, Brasil) foi instalado no alvéolo cirúrgico com uma chave digital (1,2 mm) acoplada ao hexágono do implante até que todas as suas roscas ficassem completamente cobertas pelo osso cortical. Em seguida, o tecido muscular foi suturado com fio 4.0 de poliglactina 910 (Ethicon, São Paulo, SP, Brasil), e o tecido epitelial foi suturado com fio de seda 4.0 (Ethicon, São Paulo, SP, Brasil). Os animais receberam uma injeção intramuscular de 24.000 IU de penicilina G-benzathina (Fort Dodge, Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) no pós-operatório imediato. Para evitar vieses, o procedimento cirúrgico sempre foi realizado pelo mesmo cirurgião experiente e calibrado (JMA), de acordo com um rígido protocolo, e cego aos grupos criados.

Períodos experimentais

Os animais foram eutanasiados com dose de 150mg/kg de Tiopental (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil) aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. As tíbias direitas foram coletadas, dissecadas para a exposição dos implantes, submetidas à avaliação biomecânica e depois processadas laboratorialmente para análise histológica, histoquímica e imunoistoquímica. As tíbias esquerdas foram processadas laboratorialmente para a confecção de cortes histológicos em sistema de corte específico para análise histométrica.

3. Avaliação biomecânica

Após a estabilização da tibia em uma morsa, o implante foi removido por movimento anti-horário com uma chave hexagonal (1,2 mm) conectada ao implante e a um medidor analógico de torque (BTG60CNS, Tohnichi Mfg. Co. Ltd., Tokyo, Japão), tomando-se cuidado para que nenhuma força fosse aplicada ao implante na direção vertical. O medidor registrou a força necessária para romper a osseointegração (N.cm²). Os dados coletados foram tabulados e submetidos à análise estatística.

4. Processamentos laboratoriais

Processamento histológico das tíbias direitas

As porções das tíbias direitas, previamente contendo o implante, foram dissecadas, fixadas em formaldeído tamponado (4%) por 48 h, desmineralizadas em ácido etilenodiaminotetracético a 10% (pH 7,2) e incluídas em parafina. Secções semi-seriadas (4 µm) foram confeccionadas na direção do longo eixo do alvéolo do implante. Duas secções de cada espécime foram coradas por hematoxilina e eosina (H&E) para análise histológica, duas foram coradas por picrossirius red para análise histoquímica e outras dezoito foram separadas

em nove lotes e submetidas a reações de imunistoquímica com os seguintes anticorpos primários policlonais: anti-HIF-1 α do rato gerado em camundongo (usc-53546, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-VEGF do rato gerado em camundongo (sc-7269, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-BMP-2 do rato gerado em camundongo (B9553, Sigma Aldrich, St. Louis, CA, USA), anti-RUNX-2 do rato gerado em camundongo (sc-10758, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-OCN do rato gerado em cabra (sc-18319, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-ALP do rato gerado em coelho (sc-30203, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-RANKL do rato gerado em camundongo (sc-7628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-OPG do rato gerado em cabra (sc-8468, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e anti-TRAP do rato gerado em cabra (sc-30833, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). O processamento imunistoquímico foi realizado pela técnica da imunoperoxidase indireta seguindo o protocolo descrito por Garcia et al. 2013.

Processamento histológico das tíbias esquerdas

As porções das tíbias esquerdas, contendo o implante, foram fixadas em formaldeído tamponado (4%) por 48 h e processadas pela técnica descrita por Donath & Breuner (1982), em laboratório especializado da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP. Os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol e embebidos em resina à base de glicometacrilato (Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Hesse, Alemanha). Os blocos foram cortados em secções de 100 μ m de espessura objetivando o centro do diâmetro do implante ao longo do seu eixo longitudinal com um aparelho de corte específico (EXAKT Apparatebau GmbH & Co., Norderstedt, Alemanha). Uma única secção foi obtida a partir de cada implante. As secções foram reduzidas por lixas a uma espessura final de 30 μ m por moagem e polimento usando uma unidade EXAKT *microgrinding*. As

secções foram coradas em azul toluidina a 1% e vermelho escarlata (Sigma Aldrich, St. Louis, CA, USA).

5. Análise das amostras

A análise das amostras foi realizada através de microscopia de luz polarizada para análise histoquímica e microscopia óptica de campo claro para a análise histológica, histométrica e imunoistoquímica. Em todas as análises foi considerada a porção do tecido ósseo presente nas três primeiras roscas do implante de cada animal (Sakakura et al. 2003).

Análise histológica e imunoistoquímica

As análises histológica e imunoistoquímica foram realizadas por um histologista certificado e cego aos tratamentos realizados (EE). A análise histológica constou da descrição das características morfológicas do tecido ósseo na região descrita. Os seguintes parâmetros histológicos foram considerados: presença e grau de inflamação; natureza do infiltrado inflamatório; presença e extensão de necrose tecidual; estado da vasculatura; padrão de celularidade dos tecidos ósseo, conjuntivo, adiposo e hematopoético e; padrão de estruturação da matriz extracelular dos tecidos ósseo, conjuntivo, adiposo e hematopoético. Para HIF-1 α ; VEGF, BMP-2, OCN, ALP, RANKL e OPG foi efetuada uma análise semi-quantitativa utilizando-se de duas secções histológicas de cada animal, no aumento original de 400x. Ao padrão de imunomarcção foi atribuído um escore. O critério adotado para o estabelecimento dos escores foi baseado naqueles estabelecidos por Faria et al. (2008), onde: 0 = ausência de imunomarcção; 1 = baixo padrão de imunomarcção; 2 = moderado padrão de imunomarcção; 3 = alto padrão de imunomarcção. Para RUNX-2 e TRAP foi efetuada uma análise quantitativa, também se utilizando de duas secções histológicas de cada animal no

aumento original de 400x. As células RUNX-2 e TRAP-positivas/mm² expressas nas três primeiras roscas, na região mesial e distal do implante, foram consideradas. Para TRAP foram consideradas apenas as células multinucleadas contendo três ou mais núcleos e em contato com o tecido ósseo.

Análise histoquímica

Outro examinador (PLF) treinado e cego aos tratamentos realizados executou a análise histoquímica com um *software* (AutoMeasure para AxelVision 4, Carl Zeiss, Alemanha) que permite a avaliação da distribuição espacial das fibras colágenas em função do limite de cores. As cores das fibras colágenas, quando coradas com vermelho picrosirius e visualizadas sob microscopia de luz polarizada, dependem da espessura da fibra e variam em ordem crescente em função do seu grau de maturação, indo de verde para amarelo, laranja, e vermelho. A identificação de áreas de diferentes matizes permitiu a quantificação das áreas ocupadas por diferentes cores (Kanno et al. 2008).

Análise histométrica

A análise histométrica foi realizada com auxílio de um sistema de análise de imagem (Axiovision v.4.8.2, Carl Zeiss, Jena, Germany.) acoplado a um microscópio óptico (Olympus BX 51), com ampliação de 4 x, pelo mesmo examinador (PLF). As imagens capturadas foram salvas no formato TIFF e analisadas em duas ocasiões diferentes, respeitando um intervalo de duas semanas entre a primeira e a segunda avaliação. O contato osso implante (BIC) e área de osso (BA) dentro nas roscas do implante foram avaliadas de acordo com os seguintes critérios descritos por Sakakura et al. (2003):

1. A extensão linear (mm) do tecido ósseo em contato direto com o titânio nas três primeiras roscas do implante na região mesial e distal.

2. Área de osso neoformado (mm^2) em relação à área total presente dentro dos limites das três primeiras roscas do implante na região mesial e distal.

Para as duas análises foram consideradas as médias dos valores obtidos nas regiões mesial e distal para cada implante.

Calibração dos examinadores

Para minimizar erros intra-examinador, todos os examinadores acima identificados foram mascarados para os grupos experimentais e tratamentos realizados antes das análises histométrica, histoquímica e imunoistoquímica. Os examinadores realizaram as medições de BA, BIC, RUNX-2 e TRAP duas vezes. O teste t pareado foi utilizado para calcular o erro intra-examinador. $P > 0,05$ no teste t emparelhado foi considerado para estimar a viabilidade do método proposto.

6. Análise estatística

Com um tamanho de amostra de 10 ($p \leq 0,05$), o poder do estudo foi de 90%. Os dados foram analisados através de em *software* (BioEstat, versão 5.0, Belém, PA, Brasil). Para todos os dados quantitativos (contra-torque, BA, BIC, RUNX-2 e TRAP) foi realizada a análise de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e análise de variância a dois critérios “ANOVA”, com nível de significância a 5% ($p < 0,05$). Foi aplicado o teste de Tukey para comparações múltiplas dos grupos como também dos períodos.

Resultados

Análise Biomecânica

Não houve diferença estatisticamente significativa no torque de remoção entre os grupos, no mesmo período. A comparação entre os períodos no mesmo grupo mostrou que apenas o Grupo Nic exibiu maior torque de remoção dos implantes aos 30 dias pós-operatórios quando comparados aos 15 dias pós-operatórios ($p<0,05$; Figura 1), e aos 60 dias pós-operatórios quando comparados aos 30 dias pós-operatórios ($p<0,05$; Figura 1).

Análise Histométrica

BIC

Não houve diferença estatisticamente significativa no BIC entre os grupos, no mesmo período. A comparação entre os períodos no mesmo grupo mostrou que apenas o Grupo Nic exibiu maior BIC aos 60 dias pós-operatórios quando comparados aos 15 e 30 dias pós-operatórios ($p<0,05$; Figura 2).

BA

A comparação intergrupos no mesmo período mostrou que o Grupo Nic exibiu menor BA em comparação ao Grupo Veh em todos os períodos experimentais estudados ($p<0,05$; Figura 2). A comparação entre os períodos no mesmo grupo mostrou que o Grupo Nic exibiu menor BA aos 30 dias pós-operatórios quando comparados aos 15 dias pós-operatórios ($p<0,05$; Figura 2). Os grupos Veh e Nic exibiram maior BA aos 60 dias pós-operatórios quando comparados aos 30 dias pós-operatórios ($p<0,05$; Figura 2).

Análise Histoquímica

A comparação intergrupos no mesmo período mostrou que apenas aos 60 dias pós-operatórios o Grupo Veh exibiu maior quantidade de fibras colágenas imaturas em comparação ao Grupo Nic ($p < 0,05$; Figura 3). A comparação entre os períodos no mesmo grupo mostrou que o Grupo Nic apresentou maior quantidade de fibras colágenas imaturas aos 30 dias pós-operatórios quando comparados aos 15 dias pós-operatórios ($p < 0,05$; Gráfico 4). Os grupos Veh e Nic exibiram maior quantidade de fibras colágenas imaturas aos 60 dias pós-operatórios quando comparados aos 30 dias pós-operatórios ($p < 0,05$; Figura 3).

Análise Imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica de HIF-1 α e VEGF mostrou, para ambos os marcadores, padrão de imunomarcção predominantemente moderado no Grupo Veh. O Grupo NIC exibiu padrão de imunomarcção baixo em todos os períodos experimentais estudados (Figura 4).

Na análise de BMP-2, o Grupo Veh apresentou padrão de imunomarcção moderado em todos os períodos experimentais estudados, enquanto o Grupo Nic apresentou padrão de imunomarcção predominantemente baixo (Figura 5). Na análise quantitativa das células imunorreativas a RUNX-2, foi observada uma maior quantidade de células RUNX2-positivas nos animais do Grupo Nic em comparação aos animais do Grupo Veh em todos os períodos experimentais estudados ($p \leq 0,05$; Figura 5).

Na análise de OCN e ALP, O Grupo Veh apresentou, para ambos os marcadores, padrão de imunomarcção moderado em todos os períodos experimentais estudados, enquanto o Grupo Nic apresentou padrão de imunomarcção predominantemente baixo (Figura 6).

Também foram observadas alterações tanto nos principais reguladores locais da osteoclastogênese, RANKL e OPG, quanto na quantidade de osteoclastos ativos. A análise dos marcadores RANKL e OPG mostrou uma tendência ao aumento no padrão de imunomarcagem de RANKL e diminuição no padrão de imunomarcagem de OPG no Grupo Nic em comparação ao Grupo Veh (Figura 7). Na análise quantitativa de osteoclastos imunorreativos à TRAP foi observada maior quantidade células TRAP-positivas nas três primeiras roscas dos implantes nos animais do Grupo Nic em comparação aos animais do Grupo Veh, aos 15 e 30 dias pós-operatórios ($p \leq 0,05$; Figura 7).

Discussão

O efeito prejudicial do tabaco sobre o sucesso clínico dos implantes já está bem definido na literatura (Chracanovic et al. 2015), contudo os mecanismos específicos e eventos celulares envolvidos nesse processo ainda não estão totalmente elucidados. Uma investigação sobre os protocolos de cessação do tabagismo mostrou que indivíduos que passaram por períodos de interrupção desse hábito, iniciando-se uma semana antes do procedimento cirúrgico para a instalação até oito semanas após, exibiram menores índices de falhas de implantes (Bain 1996). Mais notavelmente, o tabagismo foi responsável por falhas de implantes em humanos previamente a sua exposição a cargas funcionais (De Bruyn et al. 1994), importante evidência que aponta o seu efeito nocivo no processo reparo ósseo peri-implantar.

Apesar dos achados, estudos *in vivo* que utilizaram modelo animal sistemicamente modificado pela nicotina para a avaliação da osseointegração observaram que não houve influência significativa da nicotina em vários parâmetros avaliados, tais como força no torque de remoção, frequência de ressonância, densidade óssea dentro das roscas dos implantes,

densidade óssea no leito cirúrgico sem instalação do implante, BIC e BA (Stefani et al. 2002; Balatsouka et al. 2005a; Balatsouka et al. 2005b; Gotfredsen et al. 2009). Tais resultados demonstram certa dificuldade para se traçar um paralelo entre os resultados clínicos e alguns estudos experimentais em animais (Berley et al. 2010).

A administração sistêmica de nicotina para avaliar os efeitos do tabaco no processo de reparo ósseo é considerado um método consagrado entre os diferentes modelos experimentais *in vitro* (Pereira et al. 2008; Rothem et al. 2009; Ma et al. 2011b, Kim et al. 2012) e *in vivo* (Stefani et al. 2002; Balatsouka et al. 2005a; Balatsouka et al. 2005b; Bonfante et al. 2008; Gotfredsen et al. 2009; Ma et al. 2010a; Berley et al. 2010; Yamano et al. 2010). Além do mais, frente às evidências da necessidade de interrupção e/ou cessação do tabagismo (Bain 1996; César-Neto et al. 2005a; César-Neto et al. 2005b), diversos produtos à base de nicotina têm sido propostos aos pacientes como métodos auxiliares para parar de fumar, as chamadas “terapias de reposição” (Lindson-Hawley et al. 2016). Assim, do ponto de vista dos autores do presente estudo, é importante entender os mecanismos de ação da nicotina nos eventos celulares envolvidos no processo de reparo ósseo e osseointegração, justificando a escolha desse modelo no presente estudo. As nossas avaliações consistiram de: (1) análise biomecânica pelo teste de torque reverso; (2) análise histológica e histométrica da porcentagem de BIC e BA; (3) análise histoquímica do nível de maturação das fibras colágenas; (4) e análise imunoistoquímica de HIF-1 α , VEGF, BMP-2, RUNX-2, OCN, ALP, RANKL, OPG e TRAP. Todas realizadas dentro dos limites das três primeiras roscas dos implantes, na região mesial e distal como proposto por Sakakura et al. (2003).

Na análise biomecânica não foi observada diferença significativa no torque de remoção de implantes instalados em animais tratados ou não com nicotina, corroborando com estudos que também não observaram seu efeito prejudicial no torque de remoção de implantes em

tíbias e fêmures de coelhos (Balatsouka et al. 2005a; Balatsouka et al. 2005b; Gotfredsen et al. 2009). A análise histométrica do presente estudo demonstrou que também não houve diferença significativa no BIC entre os grupos. Porém, houve menor BA no Grupo Nic, em todos os períodos experimentais estudados. A análise histológica mostrou alvéolos cirúrgicos envoltos por delgada camada de osso trabecular imaturo, os quais se apresentavam com densidade e espessura comparativamente maiores nos animais do Grupo Veh. Tais resultados indicam que, apesar da nicotina não ter influenciado o torque de remoção e o contato osso implante, ela foi capaz de influenciar negativamente a quantidade e a qualidade óssea, corroborando com os resultados obtidos por Berley et al. (2010) e Yamano et al. (2010) que também observaram efeito prejudicial da nicotina na osseointegração.

Tem sido relatado que a nicotina é capaz de influenciar diversos eventos relacionados ao processo de reparo ósseo, tais como angiogênese, osteogênese, mineralização e maturação óssea, os quais poderiam explicar a menor neoformação óssea peri-implantar no Grupo Nic no presente estudo. No que diz respeito à angiogênese, foi relatado que ela promove severa vasoconstrição, diminuição da perfusão sanguínea e concentração de oxigênio, levando à isquemia tecidual (Zheng et al. 2008; Ma et al. 2011b). A hipóxia e a isquemia promovida pela nicotina poderia estimular a expressão de HIF-1 α , aumentando a expressão de VEGF, o que estimularia a angiogênese (Ma et al. 2010b). Contudo, de modo contrário, a análise imunohistoquímica dos principais reguladores locais da angiogênese avaliados neste estudo mostrou um padrão de imunomarcção tanto de HIF-1 α quanto de VEGF menor no Grupo Nic em comparação ao Grupo Veh, em todos os períodos experimentais estudados, indicando que ela comprometeu a angiogênese. O VEGF, por sua vez, e em situações fisiológicas normais, tem a capacidade interagir sinergicamente com a BMP, potente indutor de osteogênese (Patel et al. 2008). Neste estudo, foi observado um menor padrão de imunomarcção para BMP-2 no Grupo Nic, indicando que o comprometimento da

angiogênese resultou em efeitos negativos sobre a indução osteogênica mediada por BMP-2 nos animais tratados com nicotina. Estes achados corroboram com os obtidos por outros autores que também observaram concomitante diminuição da expressão dos mediadores angiogênicos e osteogênicos relacionados com o processo de reparo ósseo em modelo de distração osteogênica em coelhos (Ma et al. 2010a). Além do mais, a diminuição da proliferação de osteoblastos frente à nicotina foi relatada em modelo experimental *in vitro* (Ma et al. 2011b). Nele, foi observada a inibição da expressão de mediadores angiogênicos e osteogênicos, VEGF e o BMP-2 dentre outros, os quais poderiam refletir, segundo os autores, os efeitos prejudiciais do tabaco sobre a taxa de sobrevivência de implantes dentais (Ma et al. 2011b). Yamano et al. (2010), ao observarem a diminuição do BIC após 4 semanas da instalação de implantes de titânio em fêmur de rato tratados com nicotina, também atribuíram o resultado à inibição da expressão gênica de diversas proteínas relacionadas à matriz requeridas para o processo de reparo ósseo peri-implantar, dentre elas BMP-2.

O processo de mineralização da matriz é consequência da expressão de vários fatores relacionados com a diferenciação de osteoblastos (Tanaka et al. 2005). Entre eles, a OCN e a ALP são importantes reguladores da mineralização óssea (Tanaka et al. 2005). Estudos *in vitro* demonstraram a diminuição da expressão gênica de OCN e ALP frente a altas concentrações de nicotina (Rothen et al., 2009; Kim et al. 2012). No presente estudo também foi observada diminuição no padrão de imunomarcção de OCN e ALP no Grupo Nic em comparação ao Grupo Veh, em todos os períodos experimentais estudados. Adicionalmente, os animais do Grupo Nic exibiram maior quantidade de células imunorreativas a RUNX-2, fator regulador da diferenciação de osteoblastos, indo de encontro com achados *in vitro* que observaram diminuição na expressão de RUNX-2 frente à nicotina (Kim et al. 2012). A diminuição na imunomarcção de BMP-2, OCN e ALP, aliada ao aumento na imunomarcção de RUNX-2, podem indicar atraso no processo de diferenciação osteoblástica,

biomineralização e maturação óssea, uma vez que, enquanto nos animais do Grupo Nic ainda está havendo diferenciação de osteoblastos, nos animais do Grupo Veh já se observa um processo mais evoluído da maturação óssea. Portanto, estes resultados podem demonstrar que todo o processo de reparo ósseo peri-implantar pode estar se desenvolvendo de maneira mais lenta nos animais tratados com nicotina.

Também foram observadas alterações tanto nos principais reguladores locais da osteoclastogênese, RANKL e OPG, quanto no recrutamento de osteoclastos. O desenvolvimento e ativação dos osteoclastos é um processo essencial na homeostase do tecido ósseo durante o crescimento e remodelação deste tecido. Neste processo, o osteoclasto é responsável pela reabsorção da matriz óssea (Schaffler 2003), seguida pela subsequente neoformação da matriz pela ação dos osteoblastos (Bruzaniti & Baron 2006; Martin et al. 2009). A ação direta da nicotina na proliferação e maturação de osteoblastos (Suda et al. 1999; Theiss et al. 2000; Walker et al. 2001; Katono et al. 2006; Pereira et al. 2010), exercendo ação indireta sobre reabsorção óssea via regulação do sistema RANK/RANKL/OPG, já foi relatada na literatura. No presente estudo, OPG apresentou um padrão de imunmarcação que permaneceu inalterado entre os grupos, todavia, RANKL apresentou um padrão de imunmarcação mais alto no Grupo Nic quando comparado com o Grupo Veh. O aumento na razão RANKL/OPG exerce um papel central na osteoclastogênese e ativação osteoclástica, conseqüentemente, estimulando a reabsorção óssea (Eghbali-Fatourehchi et al. 2003). Também foi observada maior quantidade de osteoclastos multinucleados TRAP-positivos na região de roscas dos implantes nos animais do Grupo Nic quando comparados ao controle, em todos os períodos experimentais estudados. O efeito direto da nicotina sobre o mecanismo de reabsorção óssea mediado pelos osteoclastos é pouco conhecido na literatura e dificultam o embasamento dos resultados observados. Contudo, achados relacionados à ação da nicotina na osteoclastogênese, aliados à ação da nicotina na

osteoblastogênese e mineralização da matriz óssea, observados no presente estudo, indicam que nos animais tratados com nicotina está ocorrendo maior reabsorção óssea não correspondida pelo mecanismo compensatório de formação óssea, justificando a menor quantidade de tecido ósseo no interior das roscas dos implantes nestes animais.

Assim, dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que a nicotina é capaz de estimular a atividade reabsortiva, reduzir a angiogênese e a diferenciação osteoblástica local, prejudicar a remodelação das fibras colágenas da matriz óssea, o processo de biomineralização e maturação óssea peri-implantar, o que é capaz de exercer potente efeito negativo sobre a osseointegração em fumantes.

Agradecimentos

Os autores declaram não haver conflitos de interesse ou relações financeiras a quaisquer produtos envolvidos na pesquisa. O presente estudo foi desenvolvido no Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada e no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP e no Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP. Este estudo também foi financiado pela organização governamental Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - São Paulo, SP, Brasil (FAPESP – processo nº 2012/00127-8). A aluna Paula L. Faleiros recebeu bolsa de estudo da FAPESP (processo nº 2013/11863-0). À DSP Biomedical® por fornecer os implantes para a execução desta pesquisa.

Referências

- Baig, M.R. & Rajan, M. (2007) Effects of smoking on the outcome of implant treatment: a literature review. *Indian Journal of Dental Research* **18**: 190-195.
- Bain, C.A. & Moy, P.K. (1993) The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **8**: 609-615.
- Bain, C.A. (1996) Smoking and implant failure--benefits of a smoking cessation protocol. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **11**: 756-759.
- Bain, C.A., Weng, D., Meltzer, A., Kohles, S.S. & Stach, R.M. (2002) A meta-analysis evaluating the risk for implant failure in patients who smoke. *Compendium of Continuing Education in Dentistry* **23**: 695-699, 702, 704 passim; quiz 708.
- Balatsouka, D., Gotfredsen, K., Lindh, C.H. & Berglundh, T. (2005a) The impact of nicotine on bone healing and osseointegration. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 268-276. Erratum in: *Clinical Oral Implants Research* **16**: 387.
- Balatsouka, D., Gotfredsen, K., Lindh, C.H. & Berglundh, T. (2005b) The impact of nicotine on osseointegration. An experimental study in the femur and tibia of rabbits. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 389-395.
- Balbani, A.P. & Montovani, J.C. (2005) Methods for smoking cessation and treatment of nicotine dependence. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology* **71**: 820-827.
- Berley, J., Yamano, S. & Sukotjo, C. (2010) The effect of systemic nicotine on osseointegration of titanium implants in the rat femur. *Journal of Oral Implantology* **36**: 185-193.
- Bonfante, S., Bosco, A.F., Luize, D.S., de Almeida, J.M., Cestari, T.M. & Taga, R. (2008) Influence of nicotine on healing process of autogenous bone block grafts in the mandible: a

histomorphometric study in rats. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **23**: 437-444.

Bruzzaniti, A. & Baron, R. (2006) Molecular regulation of osteoclast activity. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* **7**: 123-139.

César-Neto, J.B., Benatti, B.B., Sallum, E.A. & Nociti, F.H. Jr. (2005a) Bone density around titanium implants may benefit from smoking cessation: a histologic study in rats. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **20**: 713-719.

César-Neto, J.B., Benatti, B.B., Sallum, E.A., Sallum, A.W. & Nociti, F.H. Jr. (2005b) Bone filling around titanium implants may benefit from smoking cessation: a histologic study in rats. *Journal of Periodontology* **76**: 1476-1481.

César-Neto, J.B., Duarte, P.M., Sallum, E.A., Barbieri, D., Moreno, H. Jr. & Nociti, F.H. Jr. (2003) A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *Journal of Periodontology* **74**: 1454-1459.

Chrcanovic, B.R., Albrektsson, T. & Wennerberg, A. (2015) Smoking and dental implants: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry* **43**: 487-498.

De Bruyn, H. & Collaert, B. (1994) The effect of smoking on early implant failure. *Clinical Oral Implants Research* **5**: 260-264.

Donath, K. & Breuner, G. (1982) A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *Journal of Oral Pathology* **11**: 318-326.

Eghbali-Fatourehchi, G., Khosla, S., Sanyal, A., Boyle, W.J., Lacey, D.L. & Riggs, B.L. (2003) Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *Journal of Clinical Investigation* **111**: 1221-1230.

Faria, P.E., Okamoto, R., Bonilha-Neto, R.M., Xavier, S.P., Santos, A.C. & Salata, L.A. (2008) Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 393-401.

Garcia, V.G., Gualberto Júnior, E.C., Fernandes, L.A., Bosco, A.F., Hitomi Nagata, M.J., Casatti, C.A., Ervolino, E. & Theodoro, L.H. (2013) Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *Journal of Periodontology* **84**: 556-565.

García-Morales, J.M., Tortamano-Neto, P., Todescan, F.F., de Andrade, J.C. Jr., Marotti, J. & Zezell, D.M. (2012) Stability of dental implants after irradiation with an 830-nm low-level laser: a double-blind randomized clinical study. *Lasers in Medical Science* **27**: 703-711.

Gotfredsen, K., Lindh, C.H. & Berglundh, T. (2009) Does longstanding nicotine exposure impair bone healing and osseointegration? An experimental study in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* **91**: 918-923.

Kanno, C.M., Oliveira, J.A., Garcia, J.F., Castro, A.L. & Crivelini, M.M. (2008) Effects of cyclosporin, phenytoin, and nifedipine on the synthesis and degradation of gingival collagen in tuftedcapuchin monkeys (*Cebus apella*) histochemical and MMP-1 and -2 and collagen I gene expression analyses. *Journal of Periodontology* **79**: 114-122.

Katono, T., Kawato, T., Tanabe, N., Suzuki, N., Yamanaka, K., Oka, H., Motohashi, M. & Maeno, M. (2006) Nicotine treatment induces expression of matrix metalloproteinases in human osteoblastic Saos-2 cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **38**: 874-882.

Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M. & Altman, D.G. (2010) Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics* **1**: 94-99

Kim, B.S., Kim, S.J., Kim, H.J., Lee, S.J., Park, Y.J., Lee, J. & You, H.K. (2012) Effects of nicotine on proliferation and osteoblast differentiation in human alveolar bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Life Sciences* **90**: 109-115.

Kronström, M., Svenson, B., Hellman, M. & Persson, G.R. (2001) Early implant failures in patients treated with Brånemark System titanium dental implants: a retrospective study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **16**: 201-207.

Kumar, A., Jaffin, R.A. & Berman, C. (2002) The effect of smoking on achieving osseointegration of surface-modified implants: a clinical report. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **17**: 816-819.

Lindson-Hawley, N., Shinkins, B., West, R., Michie, S. & Aveyard, P. (2016) Does cigarette reduction while using nicotine replacement therapy prior to a quit attempt predict abstinence following quit date? *Addiction* doi: 10.1111/add.13330. [Epub ahead of print]

Ma, L., Sham, M.H., Zheng, L.W. & Cheung, L.K. (2011a) Influence of low-dose nicotine on bone healing. *The Journal of Trauma* **70**: E117-121.

Ma, L., Zheng, L.W. & Cheung, L.K. (2008) Influence of nicotine on blood perfusion and bone healing during distraction osteogenesis. *Annals of the Royal Australasian College of Dental Surgeons* **19**: 52-54.

Ma, L., Zheng, L.W., Sham, M.H. & Cheung, L.K. (2010a) Effect of nicotine on gene expression of angiogenic and osteogenic factors in a rabbit model of bone regeneration. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **68**: 777-781.

Ma, L., Zheng, L.W., Sham, M.H. & Cheung, L.K. (2010b) Uncoupled angiogenesis and osteogenesis in nicotine-compromised bone healing. *Journal of Bone and Mineral Research* **25**: 1305-1313.

Ma, L., Zwahlen, R.A., Zheng, L.W. & Sham, M.H. (2011b) Influence of nicotine on the biological activity of rabbit osteoblasts. *Clinical Oral Implants Research* **22**: 338-342.

Martin, T., Gooi J.H. & Sims, N.A. (2009) Molecular mechanisms in coupling of bone formation to resorption. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* **19**: 73-88.

Nociti Júnior, F.H., Cesar Neto, J.B., Carvalho, M.D., Sallum, E.A. & Sallum, A.W. (2002) Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *Journal of Periodontology* **73**: 982-987.

Okamoto, M., Kita, T., Okuda, H., Tanaka, T. & Nakashima, T. (1994) Effects of aging on acute toxicity of nicotine in rats. *Pharmacology & Toxicology* **75**: 1-6.

Patel, Z.S., Young, S., Tabata, Y., Jansen, J.A., Wong, M.E. & Mikos, A.G. (2008) Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone* **43**: 931-940.

Pereira, M.L., Carvalho, J.C., Peres, F. & Fernandes, M.H. (2010) Simultaneous effects of nicotine, acrolein, and acetaldehyde on osteogenic-induced bone marrow cells cultured on plasma-sprayed titanium implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **25**: 112-22.

Pereira, M.L., Carvalho, J.C., Peres, F., Gutierrez, M. & Fernandes, M.H. (2008) Behaviour of human osteoblastic cells cultured on plasma-sprayed titanium implants in the presence of nicotine. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 582-589.

Rothem, D.E., Rothem, L., Dahan, A., Eliakim, R. & Soudry, M. (2011) Nicotinic modulation of gene expression in osteoblast cells, MG-63. *Bone* **48**: 903-909.

Rothem, D.E., Rothem, L., Soudry, M., Dahan, A. & Eliakim, R. (2009) Nicotine modulates bone metabolism-associated gene expression in osteoblast cells. *Journal of Bone and Mineral Metabolism* **27**: 555-561.

Sakakura, C.E., Margonar, R., Holzhausen, M., Nociti, F.H. Jr., Alba, R.C. Jr., Marcantonio, E. Jr. (2003) Influence of cyclosporin A therapy on bone healing around titanium implants: a histometric and biomechanic study in rabbits. *Journal of Periodontology* **74**: 976-981.

Salvi, G.E., Bosshardt, D.D., Lang, N.P., Abrahamsson, I., Berglundh, T., Lindhe, J., Ivanovski, S. & Donos, N. (2015) Temporal sequence of hard and soft tissue healing around titanium dental implants. *Periodontology 2000* **68**: 135-152.

Schaffler, M.B. (2003) Role of bone turnover in microdamage. *Osteoporosis International* **14** Suppl 5:S73-77, discussion S77-80.

Stefani, C.M., Nogueira, F., Sallum, E.A., de, T.S., Sallum, A.W. & Nociti, F.H. Jr. (2002) Influence of nicotine administration on different implant surfaces: a histometric study in rabbits. *Journal of Periodontology* **73**: 206-212.

Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T., Martin, T.J. (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine Reviews* **20**: 345-357.

Takamiya, A.S., Goiato, M.C. & Gennari Filho, H. (2014) Effect of smoking on the survival of dental implants. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia* **158**: 650-653.

Tanaka, H., Tanabe, N., Kawato, T., Nakai, K., Kariya, T., Matsumoto, S., Zhao, N., Motohashi, M. & Maeno, M.. (2013) Nicotine affects bone resorption and suppresses the expression of cathepsin K, MMP-9 and vacuolar-type H(+)-ATPase d2 and actin organization in osteoclasts. *PLoS One* **8**: e59402.

Tanaka, H., Tanabe, N., Suzuki, N., Shoji, M., Torigoe, H., Sugaya, A., Motohashi, M., Maeno, M.. (2005) Nicotine affects mineralized nodule formation by the human osteosarcoma cell line Saos-2. *Life Sciences* **77**: 2273-2284.

Theiss SM, Boden SD, Hair G, Titus L, Morone MA, Ugbo J. The effect of nicotine on gene expression during spine fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2000 Oct 15;25(20):2588-94.

Walker, L.M., Preston, M.R., Magnay, J.L., Thomas, P.B. & El Haj, A.J. (2001) Nicotinic regulation of c-fos and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. *Bone* **28**: 603-608.

Wong, L.S. & Martins-Green, M. (2004) Firsthand cigarette smoke alters fibroblast migration and survival: implications for impaired healing. *Wound Repair and Regeneration* **12**: 471-484.

Yamano, S., Berley, J.A., Kuo, W.P., Gallucci, G.O., Weber, H.P. & Sukotjo, C. (2010) Effects of nicotine on gene expression and osseointegration in rats. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 1353-1359.

Yin, L., Morita, A. & Tsuji, T. (2000) Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. *Archives of Dermatological Research* **292**: 188-194.

Zheng, L.W., Ma, L. & Cheung, L.K. (2008) Changes in blood perfusion and bone healing induced by nicotine during distraction osteogenesis. *Bone* **43**: 355-361.



Figuras – Capítulo 1

Figura 1: Gráfico mostrando médias e desvios-padrão de contra torque (N.cm²) nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos: * Diferença significativa com 15 dias pós-operatórios no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); † Diferença significativa com 30 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$).

Figura 2: Porcentagem de contato osso/implantes (BIC) e área óssea (BA) nas três primeiras roscas dos implantes. (A) Gráfico mostrando médias e desvios-padrão de BIC nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos: * Diferença significativa com 15 dias pós-operatórios no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); † Diferença significativa com 30 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$). (B) Gráfico mostrando médias e desvios-padrão de BA nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos: * Diferença significativa com o Grupo Veh no mesmo período ($p \leq 0,05$); † Diferença significativa com 15 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); ‡ Diferença significativa com 30 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$). (C-H) Fotomicrografias evidenciando o tecido ósseo neoformado nas roscas do implante nos grupos Veh (C, E e G) e Nic (D, F e H) aos 15 (C-D), 30 (E-F) e 60 (G-H) dias pós-operatórios. Abreviações: to, tecido ósseo. Coloração: H&E.

Figura 3: Nível de maturação das fibras colágenas nas roscas do implante. (A) Gráfico mostrando médias e desvios-padrão das fibras colágenas maduras e imaturas nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos: *Diferença significativa com Grupo Veh no mesmo período ($p \leq 0,05$); †Diferença significativa com 15 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); ‡Diferença significativa com 30 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$). (B-G) Fotomicrografias evidenciando fibras colágenas maduras (vermelho – laranja) e imaturas (amarela – verde) nos grupos Veh (B, D e F) e Nic (C, E e G)

aos 15 (B-C), 30 (D-E) e 60 (F-G) dias pós-operatórios. Abreviações: to, tecido ósseo. Coloração: Vermelho picrosirius visualizado em microscopia de luz polarizada.

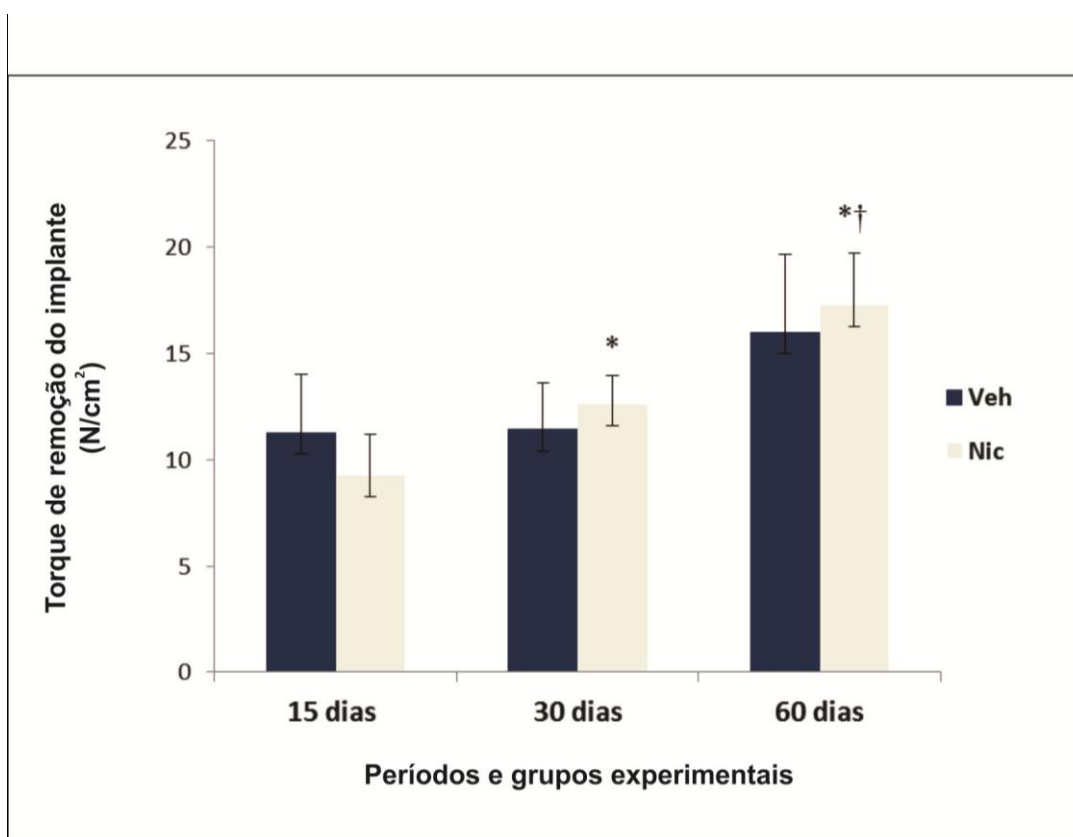
Figura 4: Imunomarcção para HIF-1 α e VEGF. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para HIF-1 α nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B-C) Fotomicrografias evidenciando as células HIF-1 α -positivas nos grupos Veh (B) e Nic (C), aos 15 dias pós-operatórios. (D) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para VEGF nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (E-F) Fotomicrografias evidenciando as células VEGF-positivas nos grupos Veh (E) e Nic (F), aos 15 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

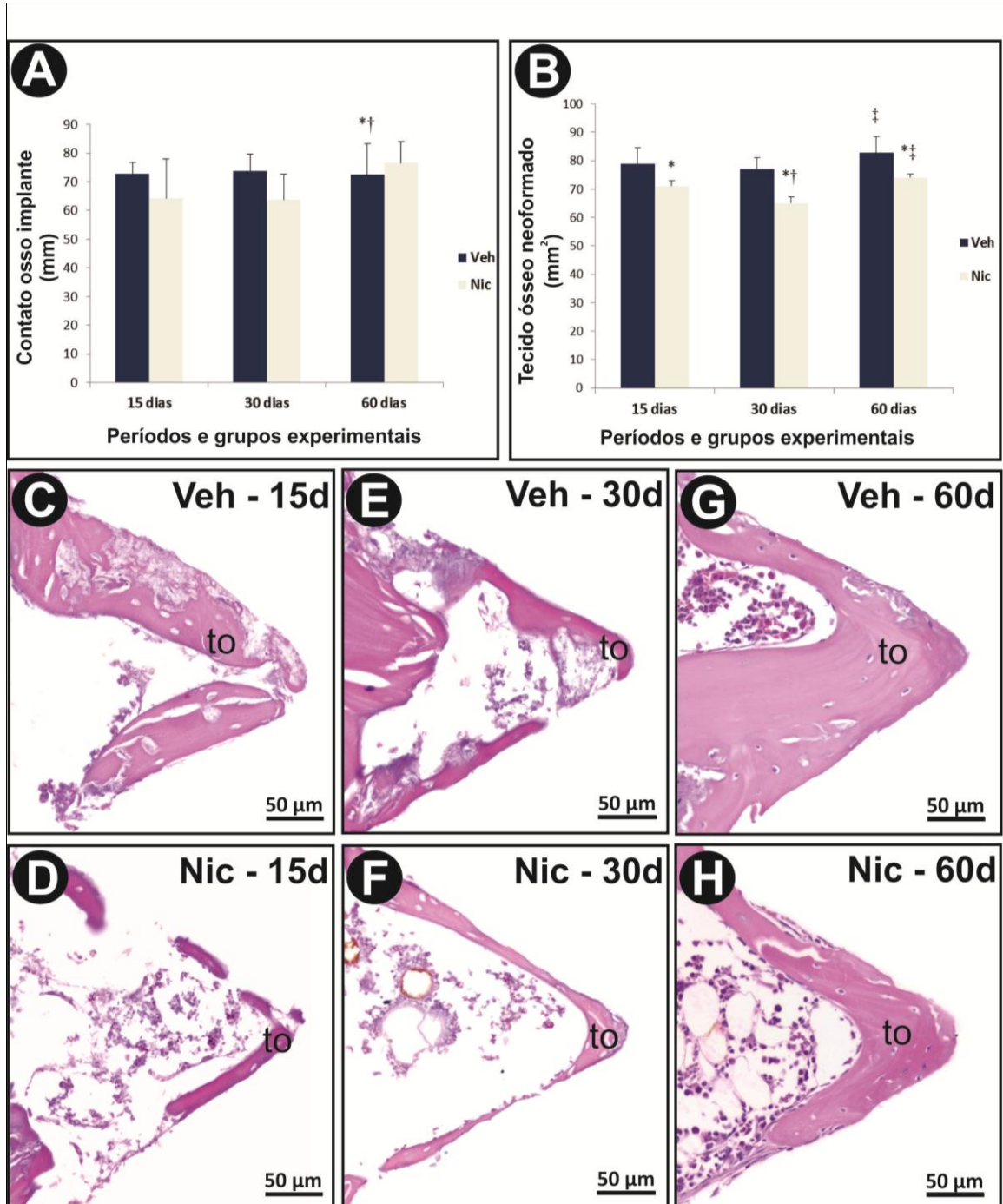
Figura 5: Imunomarcção para BMP-2 e RUNX-2. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para BMP-2 nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B-C) Fotomicrografias evidenciando as células BMP-2-positivas nos grupos Veh (B) e Nic (C), aos 30 dias pós-operatórios. (D) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para RUNX-2 nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (E-F) Fotomicrografias evidenciando as células RUNX-2-positivas nos grupos Veh (E) e Nic (F) aos 30 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: (B-C) Hematoxilina de Harris, (E-F) Fast green.

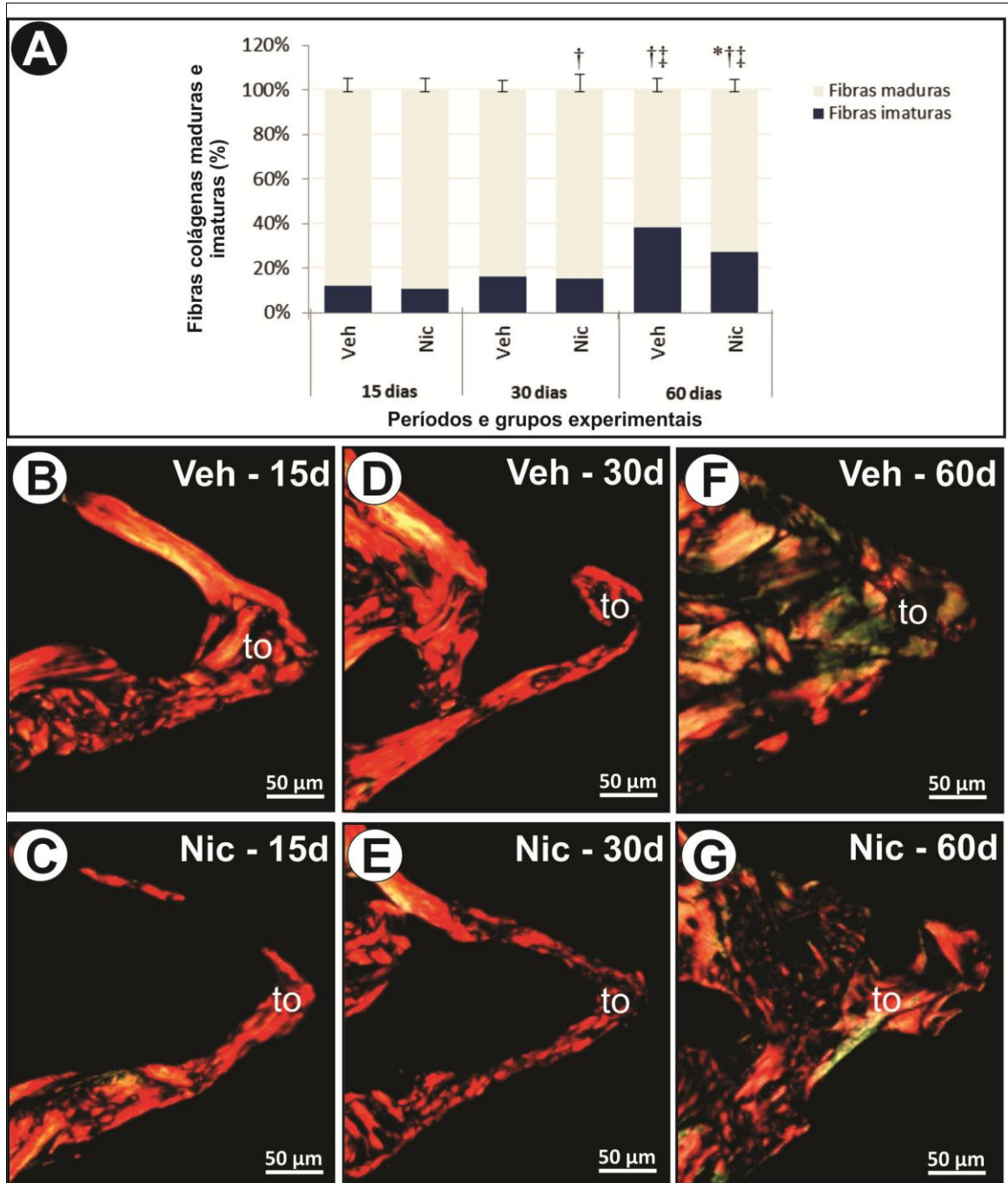
Figura 6: Imunomarcção para OCN e ALP. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para OCN nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B-C) Fotomicrografias evidenciando as células OCN-positivas nos grupos Veh (B) e Nic (C), aos 30 dias pós-operatórios. (D) Gráfico mostrando o

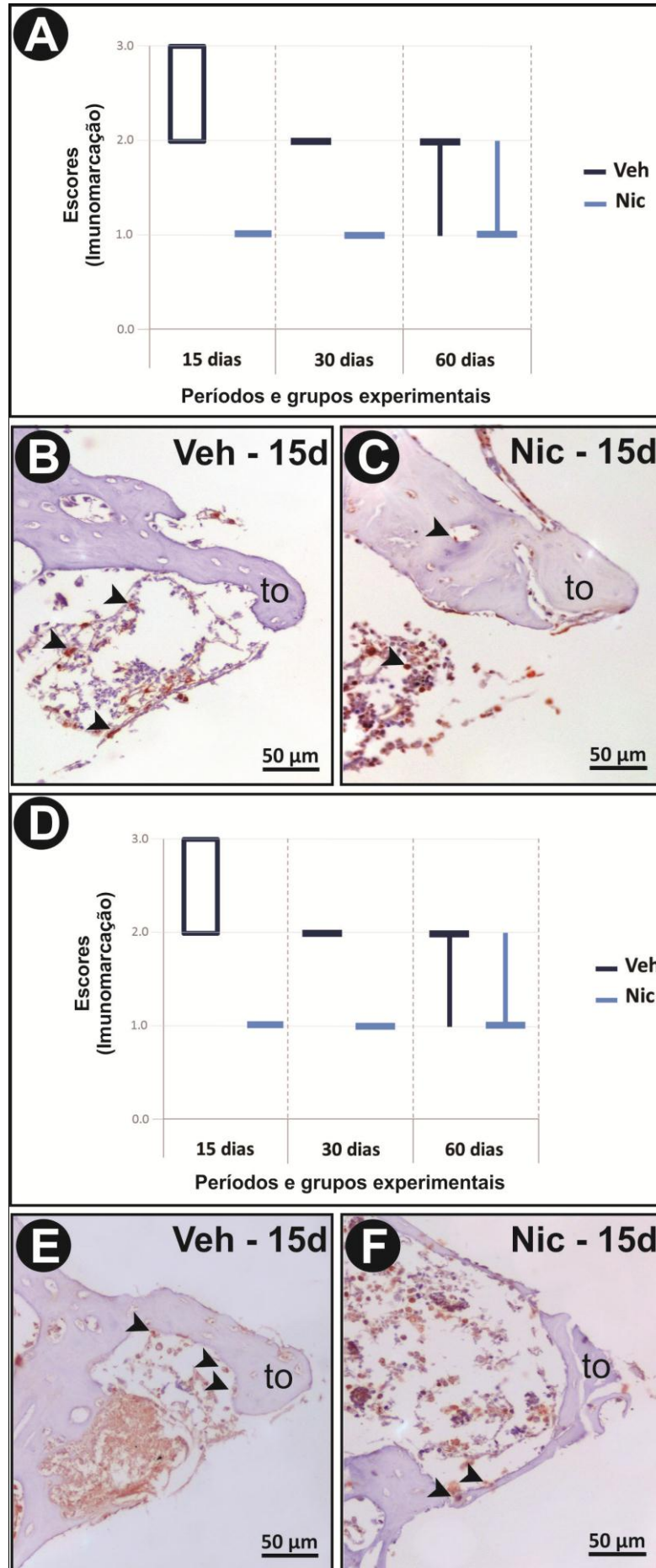
padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para ALP nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (E-F) Fotomicrografias evidenciando as células ALP-positivas nos grupos Veh (E) e Nic (F), aos 30 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

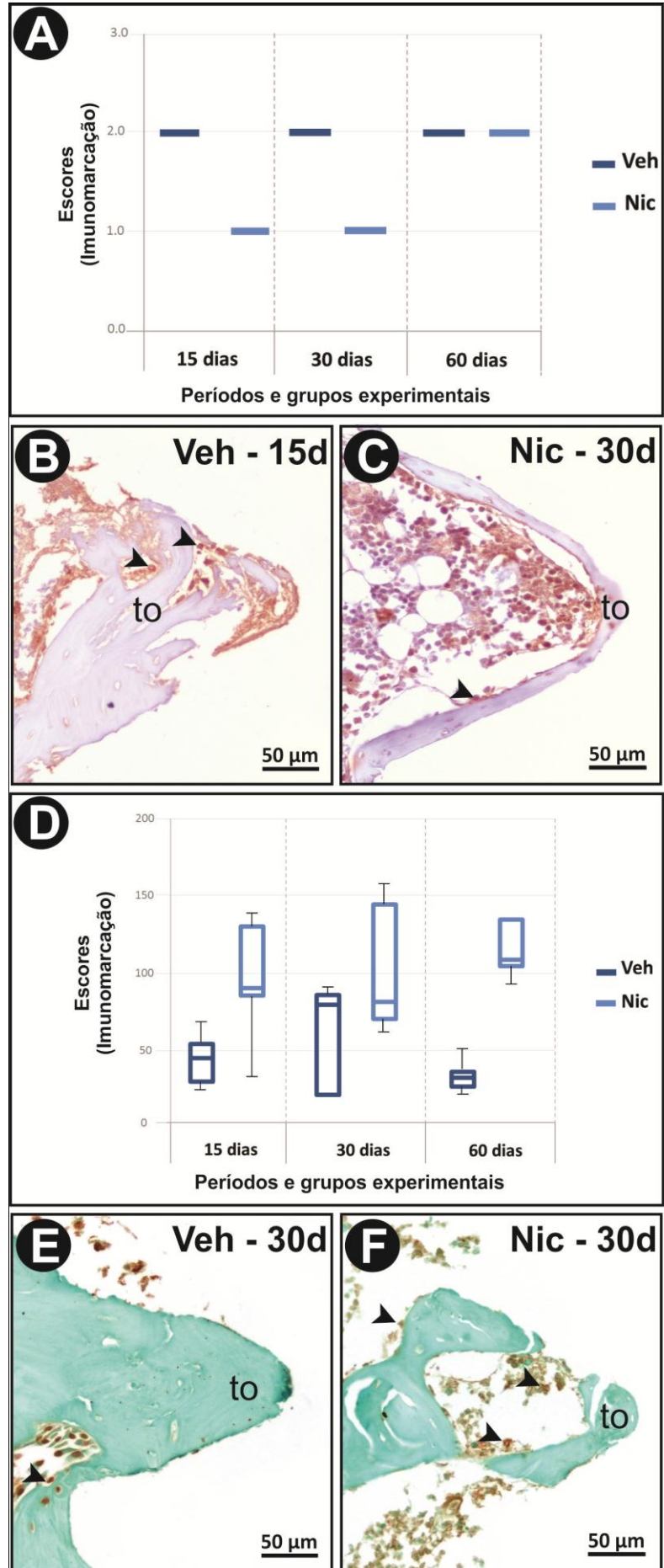
Figura 7: Imunomarcção para RANKL, OPG e TRAP. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para RANKL nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para OPG nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (C) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para TRAP nos grupos Veh e Nic, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (D-F) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção das células RANKL-positivas (D), OPG-positivas (E) e TRAP-positivas (F) aos 60 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

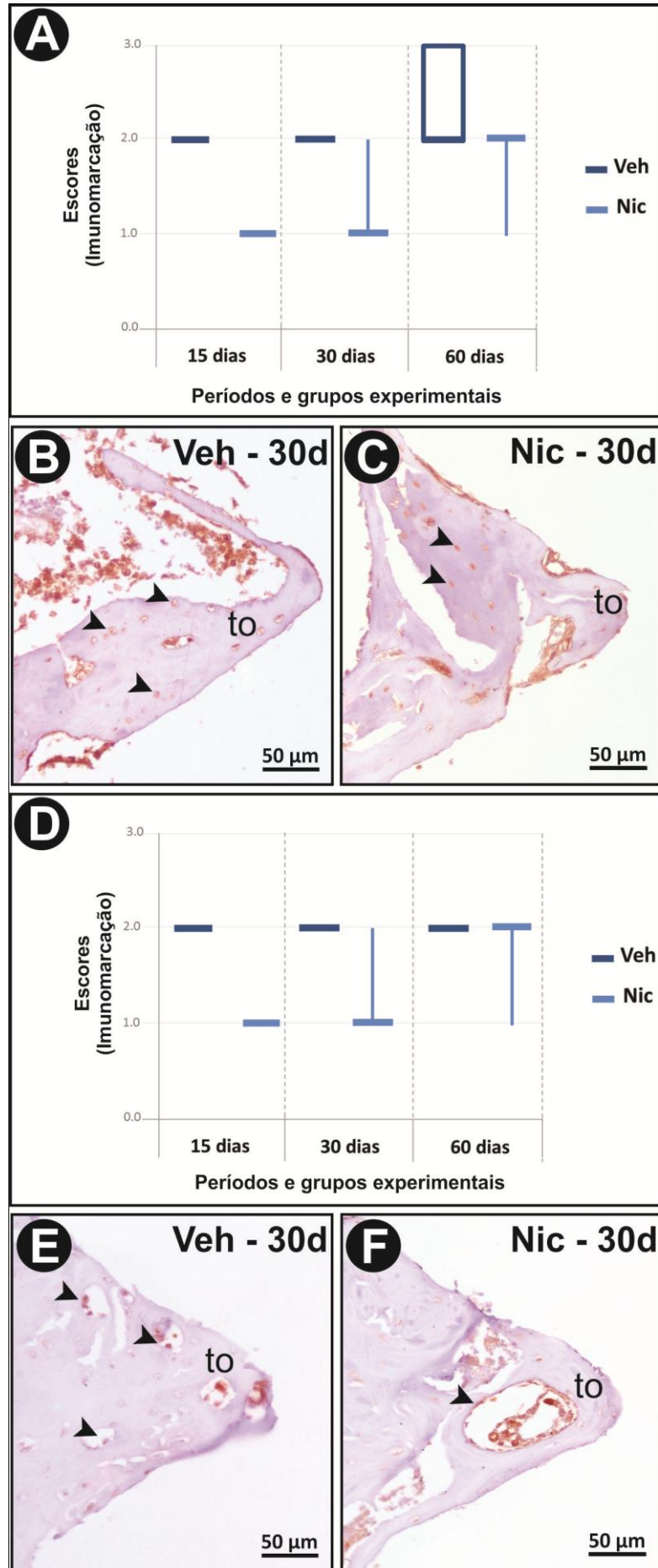


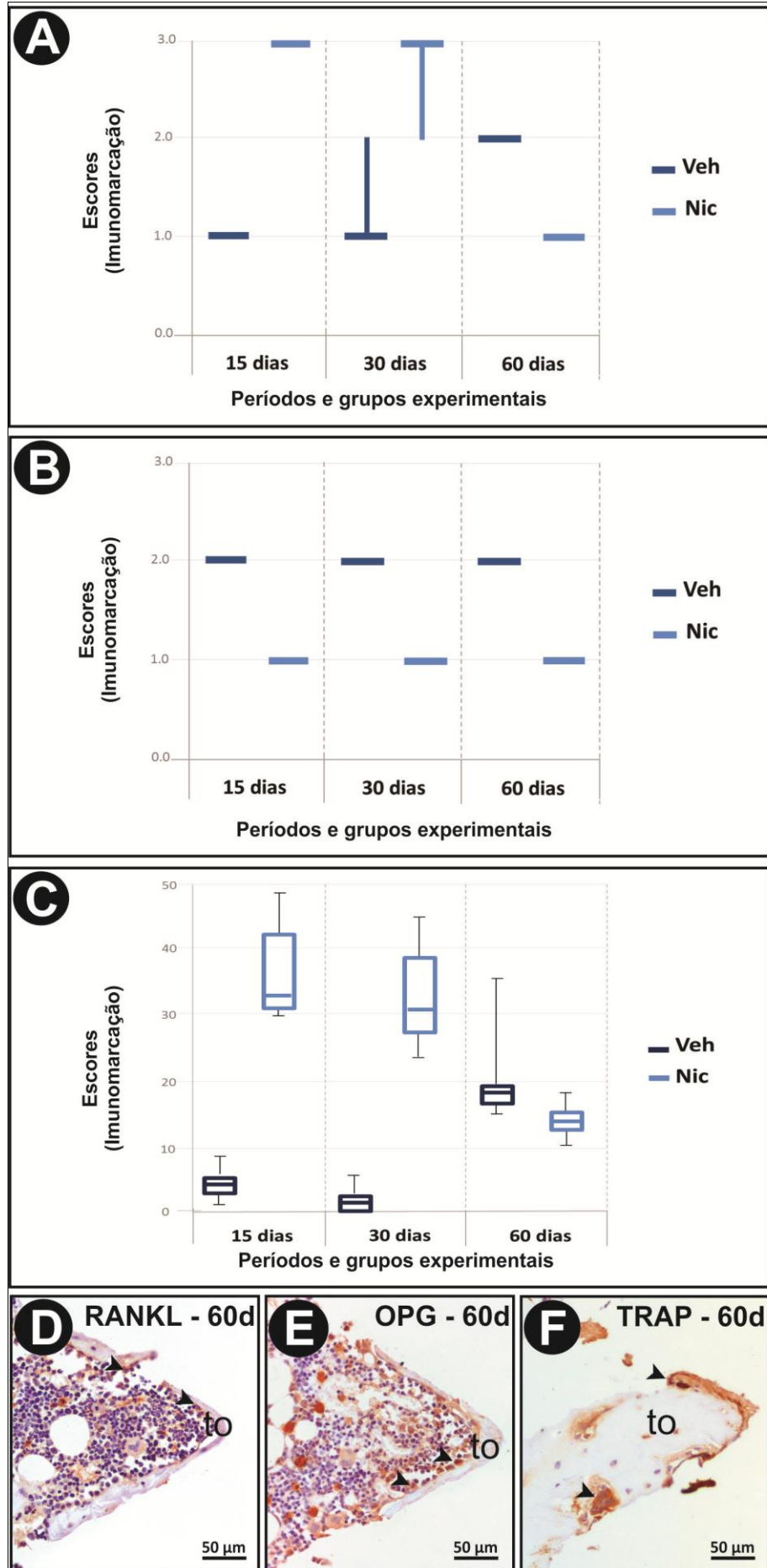












Capítulo 2

Segundo as normas do Periódico “**Clinical Oral Implants Research**” – AnexoB

Manuscrito para Publicação

A vertical histological section of tissue, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E), showing various cellular structures and tissue layers. The image is partially obscured by a vertical purple bar on the right side, which contains the text 'Manuscrito para Publicação'. The tissue shows a complex arrangement of cells, possibly including glandular or ductal structures, with varying degrees of cellular density and organization.

Título: O efeito da LLLT no processo de reparo ósseo peri-implantar.

Autores: Paula Lazilha Faleiros^{1,3} MS; Juliano Milanezi de Almeida^{1,3} PhD; Valdir Gouveia Garcia^{1,2,3} PhD; Alvaro Francisco Bosco^{1,3} PhD

¹ Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada - Disciplina de Periodontia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Univ. Estadual Paulista - UNESP, Araçatuba, SP, Brasil.

² Curso de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Barretos, Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos - UNIFEB, Barretos, SP, Brasil.

³ GEPLO – Grupo de Estudos e Pesquisas com Lasers em Odontologia, Univ. Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada - Disciplina de Periodontia, Araçatuba, SP, Brasil.

Título resumido (“running title”): Efeitos do laser na osseointegração

Palavras-chave: Implantes dentais, laser, osseointegração.

Autor responsável pela correspondência:

Alvaro Francisco Bosco

Rua José Bonifácio, nº 1193

CEP: 16015-050, Araçatuba, SP, Brasil.

Telefone: +55 18 36363239 (publicação autorizada)

Fax: +55 18 36363333 (publicação autorizada)

E-mail: afbosco@hotmail.com (publicação autorizada).

Resumo

Objetivo: Analisar o efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) no processo de reparo ósseo peri-implantar em tibia de ratos. **Material e Métodos:** Um total de 60 ratos (Wistar) receberam implantes de titânio na metáfise proximal de ambas as tíbias. No procedimento cirúrgico os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais (n = 30): Grupo C (controle) - nenhum tratamento local do alvéolo cirúrgico; Grupo LLLT – irradiação do alvéolo cirúrgico com laser em baixa intensidade previamente à instalação do implante. O laser utilizado foi o Thera Lase (InGaAlP 660 nm, modo de aplicação contínuo, em contato com a área, 0,035 W, 0,14 J, 4,9 J/cm², por 4 s). Dez animais de cada grupo foram eutanasiados aos 15, 30 e 60 dias pós-operatório. As tíbias direitas foram analisadas pelo teste de torque reverso e processadas para análise histológica, histoquímica e imunohistoquímicas dos anticorpos HIF-1 α , VEGF, BMP-2, RUNX-2, OCN, ALP, RANKL, OPG e TRAP. As tíbias esquerdas foram processadas para a análise do contato osso-implante (BIC) e área óssea (BA). Os dados quantitativos foram analisados estatisticamente ao nível de significância de 5%. **Resultados:** O Grupo LLLT não apresentou diferença significativa em BIC e no torque de remoção dos implantes, mas apresentou maior BA e maior qualidade das trabéculas ósseas peri-implantares quando comparado ao Grupo C. Também foi observado aumento no padrão de imunomarcção de HIF-1 α , VEGF, BMP-2, OCN, ALP, similaridades no padrão de imunomarcção de RANKL e OPG e aumento na quantidade de células imunorreativas a RUNX-2 e TRAP no Grupo LLLT em relação ao Grupo C, embora não tenha apresentado modificações nos elementos que compõem a matriz. **Conclusão:** A LLLT é capaz de promover maior neoangiogênese, diferenciação e atividade osteoblástica nas fases iniciais do reparo peri-implantar, assim como, estimular o processo de remodelação óssea na fase tardia deste processo, sendo capaz de exercer efeitos positivos sobre a osseointegração.

Introdução

A terapia com laser em baixa intensidade (LLLT) para a biomodulação tecidual é um tema de grande interesse para a comunidade científica e tem emergido como uma estratégia para acelerar o processo de reparo ósseo peri-implantar (Dörtbudak et al. 2002; Khadra et al. 2004; Lopes et al. 2005; Jakse et al. 2007; Kim et al. 2007; Pereira et al. 2009; Petri et al. 2010; Maluf et al. 2010; Campanha et al. 2010; Garcia-Morales et al. 2012; Boldrini et al. 2013; Vasconcellos et al. 2014; Massotti et al. 2015; Mayer et al. 2015; Gomes et al. 2015; Kim et al. 2016). Estudos pré-clínicos têm demonstrado que a LLLT foi capaz de aumentar o contato osso/implante, a produção de fibras colágenas e área de neoformação óssea no interior de suas roscas, aumentar o coeficiente de estabilidade e oferecer maior resistência ao torque de remoção do implante em diferentes modelos de estudo experimentais (Guzzardella et al. 2003; Pereira et al. 2009; Campanha et al. 2010; Maluf et al. 2010; Boldrini et al. 2013; Gomes et al. 2015; Mayer et al. 2015; Massotti et al. 2015).

A literatura relata que o laser é capaz de estimular o processo de reparo ósseo uma vez que pode aumentar a proliferação de células endoteliais e promover a angiogênese (Szymanska et al. 2013; Góralczyk et al. 2015; Briteño-Vázquez et al. 2015), estimular a proliferação e diferenciação osteoblástica (Stein et al. 2005; Grassi et al. 2011; Tim et al. 2014; Tim et al. 2015), estimular a produção de colágeno (Massotti et al. 2015) e a formação de matriz óssea, bem como a mineralização e a maturação óssea (Fávaro-Pípi et al. 2011; de Souza Merli et al. 2012; Barbosa et al. 2013). Contudo o exato mecanismo de ação do laser especificamente no reparo ósseo peri-implantar, e eventos celulares envolvidos, ainda não estão totalmente elucidados. Com base nestes achados, este estudo objetivou avaliar o efeito da LLLT no processo de reparo ósseo peri-implantar através de: (1) análise biomecânica da força necessária para romper a osseointegração; (2) análise histomorfométrica do contato

osso-implante (BIC) e porcentagem de área óssea (BA) dentro dos limites das roscas dos implantes; (3) análise histoquímica aliada à microscopia de luz polarizada para avaliação do nível de maturação do colágeno e (4) análise imunoistoquímica para a detecção de HIF-1 α (Fator induzido por hipóxia-1 alfa, regulador central da adaptação tecidual à hipóxia), VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular, potente mediador angiogênico), BMP-2 (Proteína morfogenética óssea-2, potente mediador osteogênico), RUNX-2 (Fator de transcrição relacionado à Runt, regulador da diferenciação de osteoblastos), OCN (Osteocalcina, proteína não colagenosa sintetizada e secretada por osteoblastos na fase tardia da osteogênese), ALP (Fosfatase alcalina, enzima sintetizada e secretada por osteoblastos especialmente durante o processo de biomineralização), RANKL (Receptor ativador de NF Kappa β ligante, um regulador positivo da reabsorção óssea), OPG (Osteoprotegerina, um regulador negativo da reabsorção óssea) e TRAP (Fosfatase ácida resistente ao tartarato, um biomarcador de osteoclastos).

Materiais e métodos

1. Animais e cálculo amostral

Este estudo foi conduzido em conformidade com as diretrizes propostas pela ARRIVE (Pesquisa Animal: Descrevendo Experimentos *In Vivo*) (Kilkenny et al. 2010). O tamanho da amostra foi determinado com um nível de significância de $\alpha = 0,05$; um poder amostra de 80%. Considerando estes parâmetros, dez animais por tratamento foi considerado nosso tamanho da amostra. Um total de 60 ratos machos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) de 3 meses de idade, 250-300 g (Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP) foi estudado. Um total de 120 implantes foi instalado. Os animais foram mantidos

em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo de luz controlado (12-h claro/escuro), água e ração *ad libitum* durante todo o experimento. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo n° 00934-2012) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP.

2. Protocolo Experimental

Instalação dos implantes e grupos experimentais

Inicialmente os animais foram submetidos à anestesia geral pela associação de ketamina (70 mg/kg de peso corporal) e xilazina (6 mg/kg de peso corporal). Após tricotomia da parte interior da perna e antissepsia com iodopolvidona (10%), foi realizada uma incisão de aproximadamente 30 mm do lado interno de ambas as coxas, logo abaixo do joelho, e as metáfises proximais foram expostas por dissecação romba. Um alvéolo cirúrgico bicortical foi preparado com uma fresa (2,0 mm) (Conexão Sistemas de Prótese, Arujá, SP, Brasil) montada em motor cirúrgico (45 N e 980 rpm) (Ômega, Dentscler Indústria de Aparelhos Odontológicos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) sob irrigação constante de solução salina. Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais (n = 30): Grupo C (controle) - nenhum tratamento local do alvéolo cirúrgico; Grupo LLLT – irradiação do alvéolo cirúrgico com laser em baixa intensidade previamente à instalação do implante. Um total 120 implantes foram instalados nas tíbias direita e esquerda de todos os animais. O implante (4,0 mm x 2,2 mm, Cone Morse, de superfície tratada convencionalmente por meio de jateamento e ataque ácido) (DSP Biomedical®, Campo Largo, PR, Brasil) foi instalado com uma chave digital (1,2 mm) acoplada ao hexágono do implante até que todas as suas roscas ficassem completamente cobertas pelo osso cortical. Em seguida, o tecido muscular foi suturado com fio 4.0 de poliglactina 910 (Ethicon, São Paulo, SP, Brasil), e o tecido epitelial foi suturado com fio de seda 4.0 (Ethicon, São Paulo, SP, Brasil). Os animais receberam uma injeção

intramuscular de 24.000 IU de penicilina G-benzathina (Fort Dodge, Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) no pós-operatório imediato. Para evitar vieses e garantir a randomização do estudo, o procedimento cirúrgico sempre foi realizado por dois cirurgiões experientes e calibrados e de acordo com um rígido protocolo. O primeiro operador (JMA) não teve conhecimento se o alvéolo cirúrgico seria ou não irradiado. O segundo operador (AFB) determinou, aleatoriamente e com auxílio de software de computador, os alvéolos a serem irradiados. Este mesmo operador sempre fez a irradiação do alvéolo, ou sua simulação, previamente à instalação do implante. A informação foi mantida em segredo por este operador até o fim da análise.

Irradiação laser

O laser utilizado foi o Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo (InGaAlP) (Thera Lase; D.M.C. Equipamentos Ltda., São Carlos, SP, Brasil), com comprimento de onda de 660 nm, fibra ótica de 0,0283 cm² de diâmetro e no modo contínuo. O feixe de luz foi posicionado perpendicularmente ao tecido ósseo cortical, no longo eixo do alvéolo cirúrgico, em contato e incidindo para o seu interior, com 0,035 W de potência, por 4 s (energia total de 0,14 J). Cada alvéolo cirúrgico recebeu 4,9 J/cm² de densidade de energia.

Períodos experimentais

Os animais foram eutanasiados com dose de 150mg/kg de Tiopental (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil) aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. As tíbias direitas foram coletadas, dissecadas para a exposição dos implantes, submetidas à avaliação biomecânica e depois processadas laboratorialmente para análise histológica, histoquímica e imunoistoquímica. As tíbias esquerdas foram processadas

laboratorialmente para a confecção de cortes histológicos em sistema de corte específico para análise histométrica.

3. Avaliação biomecânica

Após a estabilização da tibia em uma morsa, o implante foi removido por movimento anti-horário com uma chave hexagonal (1,2 mm) conectada ao implante e a um medidor analógico de torque (BTG60CNS, Tohnichi Mfg. Co. Ltd., Tokyo, Japão), tramando-se cuidado para que nenhuma força fosse aplicada ao implante na direção vertical. O medidor registrou a força necessária para romper a osseointegração (N.cm²). Os dados coletados foram tabulados e submetidos à análise estatística.

4. Processamentos laboratoriais

Processamento histológico das tíbias direitas

As porções das tíbias direitas, previamente contendo o implante, foram dissecadas, fixadas em formaldeído (4%) por 48 h, desmineralizadas em ácido etilenodiaminotetracético a 10% (pH 7,2) e incluídas em parafina. Secções semi-seriados (4 µm) foram confeccionados na direção do longo eixo do alvéolo do implante. Duas secções de cada espécime foram coradas por hematoxilina e eosina (H&E) para análise histológica, duas foram coradas por picrossirius red para análise histoquímica e outras dezoito foram separadas em nove lotes e submetidas a reações imunistoquímica com os seguintes anticorpos primários policlonais: anti-HIF-1α do rato gerado em camundongo (sc-53546, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-VEGF do rato gerado em camundongo (sc-7269, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-BMP-2 do rato gerado em camundongo (B9553, Sigma Aldrich, St. Louis, CA, USA), anti-RUNX-2 do rato gerado em camundongo (sc-10758, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-OCN do rato gerado em cabra (sc-18319, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-ALP do rato gerado em coelho (sc-30203,

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-RANKL do rato gerado em camundongo (sc-7628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-OPG do rato gerado em cabra (sc-8468, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e anti-TRAP do rato gerado em cabra (sc-30833, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). O processamento imunoistoquímico foi realizado pela técnica da imunoperoxidase indireta seguindo o protocolo descrito por Garcia et al. 2013.

Processamento histológico das tíbias esquerdas

As porções das tíbias esquerdas, contendo o implante, foram fixadas em formaldeído tamponado (4%) por 48 h e processadas pela técnica descrita por Donath & Breuner (1982), em laboratório especializado da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP. Os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol e embebidos em resina à base de glycolmethacrylate (Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Hesse, Alemanha). Os blocos foram cortados em secções de 100 µm de espessura objetivando o centro do diâmetro do implante ao longo do seu eixo longitudinal com um aparelho de corte específico (EXAKT Apparatebau GmbH & Co., Norderstedt, Alemanha). Uma única secção foi obtida a partir de cada implante. As secções foram reduzidas por lixas a uma espessura final de 30 µm por moagem e polimento usando uma unidade EXAKT *microgrinding*. As secções foram coradas em azul toluidina a 1% e vermelho escarlata (Sigma Aldrich, St. Louis, CA, USA).

5. Análise das amostras

A análise das amostras foi realizada através de microscopia de luz polarizada para análise histoquímica e microscopia óptica de campo claro para a análise histológica,

histométrica e imunoistoquímica. Em todas as análises foi considerada a porção do tecido ósseo presente nas três primeiras roscas do implante de cada animal (Sakakura et al. 2003).

Análise histológica e imunoistoquímica

As análises histológica e imunoistoquímica foram realizadas por um histologista certificado e cego aos tratamentos realizados (EE). A análise histológica constou da descrição das características morfológicas do tecido ósseo na região descrita. Os seguintes parâmetros histológicos foram considerados: presença e grau de inflamação; natureza do infiltrado inflamatório; presença e extensão de necrose tecidual; estado da vasculatura; padrão de celularidade dos tecidos ósseo, conjuntivo, adiposo e hematopoético e; padrão de estruturação da matriz extracelular dos tecidos ósseo, conjuntivo, adiposo e hematopoético. Para HIF-1 α , VEGF, BMP-2, OCN, ALP, RANKL e OPG foi efetuada uma análise semi-quantitativa utilizando-se de duas secções histológicas de cada animal, no aumento original de 400x. Ao padrão de imunomarcção foi atribuído um escore. O critério adotado para o estabelecimento dos escores foi baseado naqueles estabelecidos por Faria et al. (2008), onde: 0 = ausência de imunomarcção; 1 = baixo padrão de imunomarcção; 2 = moderado padrão de imunomarcção; 3 = alto padrão de imunomarcção. Para RUNX-2 e TRAP foi efetuada uma análise quantitativa, também se utilizando de duas secções histológicas de cada animal no aumento original de 400x. As células RUNX-2e TRAP-positivas/mm² expressas nas três primeiras roscas, na região mesial e distal do implante, foram consideradas. Para TRAP foram consideradas apenas as células multinucleadas contendo três ou mais núcleos e em contato com o tecido ósseo.

Análise histoquímica

Outro examinador (PLF) treinado e cego aos tratamentos realizados executou a análise histoquímica com um *software* (AutoMeasure para AxelVision 4, Carl Zeiss, Alemanha) que permite a avaliação da distribuição espacial das fibras colágenas em função do limite de cores. As cores das fibras colágenas, quando coradas com vermelho picrosirius e visualizadas sob microscopia de luz polarizada, dependem da espessura da fibra e variam em ordem crescente em função do seu grau de maturação, indo de verde para amarelo, laranja, e vermelho. A identificação de áreas de diferentes matizes permitiu a quantificação das áreas ocupadas por diferentes cores (Kanno et al. 2008).

Análise histométrica

A análise histométrica foi realizada com auxílio de um sistema de análise de imagem (Axiovision v.4.8.2, Carl Zeiss, Jena, Germany.) acoplado a um microscópio óptico (Olympus BX 51), com ampliação de 4 x, pelo mesmo examinador (PLF). As imagens capturadas foram salvas no formato TIFF e analisadas em duas ocasiões diferentes, respeitando um intervalo de duas semanas entre a primeira e a segunda avaliação. O contato osso-implante (BIC) e área de osso (BA) dentro nas roscas do implante foram avaliadas de acordo com os seguintes critérios descritos por Sakakura et al. (2003):

3. A extensão linear (mm) do tecido ósseo em contato direto com o titânio nas três primeiras roscas do implante na região mesial e distal.
4. Área de osso neoformado (mm²) em relação à área total presente dentro dos limites das três primeiras roscas do implante na região mesial e distal.

Para as duas análises foram consideradas as médias dos valores obtidos nas regiões mesial e distal para cada implante.

Calibração dos examinadores

Para minimizar erros intra-examinador, todos os examinadores acima identificados foram mascarados para os grupos experimentais e tratamentos realizados antes das análises histométrica, histoquímica e imunoistoquímica. Os examinadores realizaram as medições de BA, BIC, RUNX-2 e TRAP duas vezes. O teste t pareado foi utilizado para calcular o erro intra-examinador. $P > 0,05$ no teste t emparelhado foi considerado para estimar a viabilidade do método proposto.

Análise estatística

Com um tamanho de amostra de 10 ($p \leq 0,05$), o poder do estudo foi de 90%. Os dados foram analisados através de em *software* (BioEstat, versão 5.0, Belém, PA, Brasil). Para todos os dados quantitativos (contra-torque, BA, BIC, RUNX-2 e TRAP) foi realizada a análise de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e análise de variância a dois critérios “ANOVA”, com nível de significância a 5% ($p < 0,05$). Foi aplicado o teste de Tukey para comparações múltiplas dos grupos como também dos períodos.

Resultados

Análise Biomecânica

Não houve diferença estatisticamente significante no torque de remoção entre os grupos no mesmo período e entre os períodos no mesmo grupo (Figura 1).

Análise Histométrica

BIC

Não houve diferença estatisticamente significativa no BIC entre os grupos no mesmo período e entre os períodos no mesmo grupo (Figura 2).

BA

A comparação intergrupos no mesmo período mostrou que o Grupo LLLT exibiu maior BA em comparação ao Grupo C, aos 15 e 60 dias pós-operatórios, e menor BA aos 30 dias pós-operatórios, quando comparado ao mesmo grupo ($p < 0,05$; Figura 2). A comparação entre os períodos no mesmo grupo mostrou que o Grupo LLLT exibiu menor BA aos 30 dias pós-operatórios quando comparados aos 15 dias pós-operatórios ($p < 0,05$; Figura 2). Os grupos C e LLLT exibiram maior BA aos 60 dias pós-operatórios quando comparados aos 30 dias pós-operatórios ($p < 0,05$; Figura 2).

Análise Histoquímica

Não houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de fibras colágenas maduras entre os grupos no mesmo período. A comparação entre os períodos no mesmo grupo mostrou que tanto o Grupo C quanto o Grupo LLLT apresentou maior quantidade de fibras colágenas imaturas aos 60 dias pós-operatórios quando comparados aos 15 e 30 dias pós-operatórios ($p < 0,05$; Figura 3).

Análise Imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica de VEGF e HIF-1 α mostrou, para ambos os marcadores, padrão de imunomarcção predominantemente moderado no Grupo C e predominantemente alto no Grupo LLLT (Figura 4).

Na análise de BMP-2 o Grupo C mostrou padrão de imunomarcção moderado em todos os períodos experimentais estudados enquanto o Grupo LLLT mostrou padrão de imunomarcção predominantemente alto (Figura 5). Na análise quantitativa RUNX-2 foi observada maior quantidade de células RUNX-2-positivas nos animais do Grupo LLLT em comparação aos animais do Grupo C em todos os períodos experimentais estudados ($p \leq 0,05$; Figura 5).

Na análise de OCN e ALP o Grupo C apresentou padrão de imunomarcção moderado em todos os períodos experimentais estudados enquanto o Grupo LLLT apresentou padrão de imunomarcção predominantemente alto (Figura 6).

Também foram observadas alterações tanto nos principais reguladores locais da osteoclastogênese, RANKL e OPG, quanto na quantidade de osteoclastos ativos. A análise de RANKL mostrou uma tendência ao aumento no padrão de imunomarcção aos 60 dias pós-operatórios enquanto a análise de OPG mostrou moderado padrão de imunomarcção em todos os grupos e períodos experimentais estudados (Figura 7). Nos animais do Grupo LLLT foi observado maior quantidade de osteoclastos imunorreativos à TRAP quando comparados aos animais do Grupo C, aos 30 e 60 dias pós-operatórios ($p \leq 0,05$; Figura 7).

Discussão

A biomodulação tecidual pelo laser em baixa intensidade emergiu como uma estratégia para estimular a osseointegração, embora pouco se saiba sobre os eventos celulares e moleculares envolvidos neste processo (Prados-Frutos et al. 2016). O presente estudo avaliou o efeito da LLLT no processo de reparo ósseo peri-implantar via monitoramento de eventos celulares e teciduais essenciais para a osseointegração tais como angiogênese, osteogênese, biomineralização e remodelação óssea ao redor do implante. A avaliação consistiu de análise biomecânica do torque necessário para romper a osseointegração, histométrica da porcentagem de BIC e BA, histoquímica do nível de maturação das fibras colágenas da matriz óssea e análise imunohistoquímica direcionada para a detecção de HIF-1 α , VEGF, BMP-2, RUNX-2, OCN, ALP, RANKL, OPG e TRAP, dentro dos limites das rosca dos implantes.

A maioria dos estudos da literatura relatam que o laser é capaz de aumentar o torque de remoção dos implantes (Khadra et al. 2004; Campanha et al. 2010; Maluf et al. 2010; Boldrini et al. 2013) e o contato do implante de titânio com o tecido ósseo irradiado (BIC) (Khadra et al. 2004; Pereira et al. 2009; Massoti et al. 2015; Mayer et al. 2015; Gomes et al. 2015). Contudo, os resultados da análise biomecânica e histométrica de BIC do presente estudo não demonstraram diferenças significantes nestes parâmetros entre os grupos de animais tratados com LLLT e controle, corroborando com os resultados obtidos por Kim et al. (2016), os quais não verificaram diferença no torque de remoção e estabilidade dos implantes (medida por análise de frequência de ressonância) após a irradiação pelo laser. Apesar das similaridades entre os grupos na análise biomecânica e de BIC, a análise histométrica de BA mostrou aumento da neoformação óssea peri-implantar aos 15 e 60 dias pós-operatórios, sendo que os alvéolos cirúrgicos se apresentaram envoltos por osso trabecular imaturo, os

quais se apresentavam com densidade e espessura comparativamente maiores nos animais tratados com laser, sugerindo que ele foi capaz de bioestimular a formação óssea dentro dos limites das roscas do implante nestes períodos.

O efeito positivo do laser na neoformação óssea (BA) já foi observado por outros autores (Gomes et al. 2015) e pode ser explicado por sua ação sobre reguladores locais da angiogênese, osteoblastogênese e atividade osteoblástica e osteoclastogênese e atividade osteoclástica. Estudos pré-clínicos relatam que o laser em baixa intensidade é capaz de estimular a proliferação de células endoteliais e promover a angiogênese (Szymanska et al. 2013; Góralczyk et al. 2015; Briteño-Vázquez et al. 2015). A produção de fatores com ação angiogênica é regulada principalmente pelo teor de oxigênio tecidual (Shibuya 2001; Szymanska et al. 2013). Sob condições de hipóxia tecidual, HIF-1 α promove a ativação de genes envolvidos com a angiogênese, dentre eles aquele que codifica o principal fator de crescimento que regula este processo, VEGF, o qual é responsável por regular a sobrevivência, proliferação e migração das células endoteliais (Peplow et al. 2010; Szymanska et al. 2013). Acredita-se que o VEGF é responsável pela fase inicial da angiogênese, regulando e estimulando a iniciação deste processo. No presente estudo foi observado maior padrão de imunomarcagem tanto para HIF1- α quanto para VEGF, nos animais tratados com laser, demonstrando que a LLLT influenciou positivamente a angiogênese local, corroborando com os estudos *in vitro* que demonstraram o aumento de VEGF e proliferação de células endoteliais após sua estimulação com laser de luz visível (Szymanska et al. 2013; Góralczyk et al. 2015).

Além disso, VEGF age de modo sinérgico com as BMPs, potentes indutores osteogênicos, para promover o reparo ósseo (Patel et al. 2008). As BMPs são fatores de crescimento osteogênicos que induzem a diferenciação de osteoblastos (ten Dijke et al. 2003, Osyczka et al. 2004, Lavery et al. 2008). No presente estudo foi observada um maior padrão

de imunomarcação para BMP-2 nos animais irradiados, corroborando com outros autores que observaram aumento de BMP-2 nos tecidos peri-implantares irradiados com laser (Omasa et al. 2012). Além disso, o Grupo LLLT apresentou maior quantidade de células RUNX-2-positivas quando comparado com o Grupo C em todos os períodos experimentais estudados. Tais achados indicam um efeito positivo do laser sobre a osteoblastogênese, corroborando com os estudos de Grassi et al. (2011) e Pinheiro et al. (2006).

Os efeitos positivos da LLLT sobre a maturação do tecido ósseo foram confirmados no presente estudo pelo aumento no padrão de imunomarcação tanto para OCN quanto para ALP nos animais irradiados pelo laser. Tais resultados corroboram com os obtidos por um estudo *in vitro* que verificou aumento da expressão de RUNX-2, da atividade da ALP, e da proliferação de células semelhantes à osteoblastos após a irradiação com laser (Grassi et al. 2011). Outros relatam ainda que a LLLT foi capaz de aumentar a expressão de BMP, RUNX-2, OCN e ALP (Petri et al. 2010; Fujimoto et al. 2010; Kiyosaki et al. 2010), além de estimular a produção de RANK, RANKL e OPG, os quais são os principais reguladores locais da reabsorção óssea, o que indica uma ação efetiva sob todo o processo de remodelação óssea (Kim et al. 2007).

No presente estudo o padrão de imunomarcação para OPG se manteve inalterada nos animais controle e irradiados com laser ao longo dos períodos experimentais estudados. Entretanto, o padrão de imunomarcação para RANKL e o recrutamento de osteoclastos TRAP-positivos foi maior aos 60 dias pós-operatórios no Grupo LLLT comparativamente ao Grupo C. Quando analisados em conjunto tais dados indicam que o processo de reparo ósseo peri-implantar está mais acelerado nos animais tratados com laser, uma vez que neste período o padrão de imunomarcação destes biomarcadores refere-se ao processo de remodelação óssea.

Embora diversos estudos tenham sido conduzidos para testar os efeitos do laser no processo de reparo ósseo em diferentes modelos experimentais, e ainda a maioria deles demonstrem efeitos positivos na neoformação óssea, poucos apresentam resultados elucidativos a respeito da ação do laser no processo de reparo ósseo peri-implantar e osseointegração. As diversas considerações a respeito da sua ação nos eventos relacionados à osseointegração de implantes de titânio são baseadas nas evidências de sua ação sobre a cicatrização óssea. Assim, os estudos presentes na literatura não nos oferecem base para explicar o motivo do laser não ter promovido maior força e contato entre o tecido ósseo e o implante, apesar de ter exercido efeito positivo sobre angiogênese e neoformação óssea. Ainda as diferentes doses e protocolos de aplicação também tornam difíceis as comparações entre os estudos e demonstram a necessidade de se estabelecer um protocolo único que ofereça resultados mais conclusivos sobre o assunto (Prados-Frutos et al. 2016).

Diversas variáveis tais como comprimento de onda, energia, tempo de exposição, potência e estado tecidual podem modificar os efeitos bioestimulatórios do laser (Garcia et al. 2014). A maioria dos estudos avaliaram o efeito do laser infravermelho, com comprimento de onda que variam entre 780 a 840 nm, sobre o processo de reparo ósseo peri-implantar (Khadra et al. 2004; Lopes et al. 2005; Lopes et al. 2007; Kim et al. 2007; Pereira et al. 2009; Campanha et al. 2010; Maluf et al. 2010; Garcia-Morales et al. 2012; Boldrini et al. 2013; Primo et al. 2013; Mayer et al. 2015; Massotti et al. 2015; Gomes et al. 2015), uma vez que estes teriam a capacidade de maior penetração nos tecidos irradiados e ofereceria ao clínico uma ferramenta de maior eficiência para se obter osseointegração mais rápida (Bossy et al 1985; Pereira et al. 2009). Esse poder de penetração permitiria irradiar a interface osso-implante partindo-se de pontos distantes, como osso cortical de mandíbula, durante dias e até semanas pós-operatórias (Pereira et al. 2009).

Contudo, considerando a aplicação clínica na implantodontia, este é um protocolo difícil de ser aplicado uma vez que o paciente teria a necessidade de fazer retornos periódicos no consultório após a instalação do implante. Alguns autores sugeriram ainda que, por essa razão, ele deveria ficar restrito a pacientes sistemicamente comprometidos, como em casos de osteoporose ou pacientes fumantes, os quais possuem condições de osseointegração desfavorável, (Pereira et al. 2009), ou novos estudos precisariam ser conduzidos na tentativa de reduzir o número de aplicações (Maluf et al. 2010). Em 2013, Boldrini et al. sugeriram a irradiação do alvéolo cirúrgico em uma única sessão, imediatamente após o seu preparo e anteriormente à instalação do implante. Outro estudo recente (Mandié et al. 2015) demonstrou que a luz visível do laser (comprimento de onda de 637 nm) foi capaz de aumentar a estabilidade de implantes instalados em humanos e por isso também pode ser utilizada para favorecer a osseointegração.

Com base nestas considerações, no presente estudo foi preconizada a utilização do protocolo intraoperatório, favorecendo a aplicabilidade clínica. Durante o procedimento o feixe de luz foi posicionado perpendicularmente em contato com o tecido ósseo cortical, no longo eixo do alvéolo cirúrgico preparado e incidindo para o seu interior. Dessa maneira foi possível irradiar todo o tecido presente no interior do alvéolo cirúrgico. Cabe salientar que um alvéolo cirúrgico para a instalação de um implante em ratos é muito menor que um alvéolo cirúrgico para a instalação de um implante em humanos. Talvez, nesse segundo caso houvesse a necessidade de se utilizar um laser infravermelho com maior poder de penetração nos tecidos. Outro aspecto importante a ser retratado é a necessidade da realização de estudos que avaliem a ação do laser em situações de comprometimento da osseointegração, como foi exemplificado anteriormente. Essa consideração se faz importante porque foi demonstrado que a suscetibilidade à irradiação e capacidade de ativação celular pelo laser depende do estado fisiológico das células irradiadas e por isso o seu efeito bioestimulatório é

potencializado em sítios com menor qualidade óssea ou envolvendo modelos sistemicamente comprometidos (Karu 1989).

Assim, dentro dos limites do presente estudo, pode se concluir que a LLLT é capaz de promover maior neoangiogênese, diferenciação e atividade osteoblástica nas fases iniciais do reparo peri-implantar, assim como, estimular o processo de remodelação óssea na fase tardia deste processo, sendo capaz de exercer efeitos positivos sobre a osseointegração.

Agradecimentos

Os autores declaram não haver conflitos de interesse ou relações financeiras a quaisquer produtos envolvidos na pesquisa. O presente estudo foi desenvolvido no Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada e no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP e no Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP. Este estudo também foi financiado pela organização governamental Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - São Paulo, SP, Brasil (FAPESP – processo nº 2012/00127-8). A aluna Paula L. Faleiros recebeu bolsa de estudo da FAPESP (processo nº 2013/11863-0). À DSP Biomedical® por fornecer os implantes para a execução desta pesquisa.

Referências

Anderson, H.C. (1989) Mechanism of mineral formation in bone. *Laboratory Investigation* **60**: 320–330.

Barbosa, D., de Souza, R.A., Xavier, M., da Silva, F.F., Arisawa, E.A. & Villaverde, A.G. (2013) Effects of low-level laser therapy (LLLT) on bone repair in rats: optical densitometry analysis. *Lasers in Medical Science* **28**: 651-656.

Boldrini, C., de Almeida, J.M., Fernandes, L.A., Ribeiro, F.S., Garcia, V.G., Theodoro, L.H. & Pontes, A.E. (2013) Biomechanical effect of one session of low-level laser on the bone-titanium implant interface. *Lasers in Medical Science* **28**: 349-352.

Bossy, J., Chevalier, J.M., Sambuc, P. & Quatrefages, R. (1985) In vitro survey of low energy laser beam penetration in compact bone. *Acupuncture & Electro-therapeutics Research* **10**: 35-39.

Briteño-Vázquez, M., Santillán-Díaz, G., González-Pérez, M., Gallego-Izquierdo, T., Pecos-Martín, D., Plaza-Manzano, G. & Romero-Franco, N. (2015) Low power laser stimulation of the bone consolidation in tibial fractures of rats: a radiologic and histopathological analysis. *Lasers in Medical Science* **30**: 333-338.

Campanha, B.P., Gallina, C., Geremia, T., Loro, R.C., Valiati, R., Hübler, R. & de Oliveira, M.G. (2010) Low-level laser therapy for implants without initial stability. *Photomedicine and Laser Surgery* **28**: 365-369.

de Souza Merli, L.A., de Medeiros, V.P., Toma, L., Reginato, R.D., Katchburian, E., Nader, H.B. & Faloppa, F. (2012) The low level laser therapy effect on the remodeling of bone extracellular matrix. *Photochemistry and Photobiology* **88**: 1293-1301.

de Vasconcellos, L.M., Barbara, M.A., Deco, C.P., Junqueira, J.C., do Prado, R.F., Anbinder, A.L., de Vasconcellos, L.G., Cairo, C.A. & Carvalho, Y.R. (2014) Healing of normal and osteopenic bone with titanium implant and low-level laser therapy (GaAlAs): a histomorphometric study in rats. *Lasers in Medical Science* **29**: 575-580.

Donath, K. & Breuner, G. (1982) A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *Journal of Oral Pathology* **11**: 318-326.

Dörtbudak, O., Haas, R. & Mailath-Pokorny, G. (2002) Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. *Clinical Oral Implants Research* **13**: 288-292.

Faria, P.E., Okamoto, R., Bonilha-Neto, R.M., Xavier, S.P., Santos, A.C. & Salata, L.A. (2008) Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 393-401.

Fávaro-Pípi, E., Ribeiro, D.A., Ribeiro, J.U., Bossini, P., Oliveira, P., Parizotto, N.A., Tim, C., de Araújo, H.S. & Renno, A.C. (2011) Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats. *Photomedicine and Laser Surgery* **29**: 311-317.

Fujimoto, K., Kiyosaki, T., Mitsui, N., Mayahara, K., Omasa, S., Suzuki, N. & Shimizu, N. (2010) Low-intensity laser irradiation stimulates mineralization via increased BMPs in MC3T3-E1 cells. *Lasers in Surgery and Medicine* **42**: 519-526.

Garcia, V.G., Gualberto Júnior, E.C., Fernandes, L.A., Bosco, A.F., Hitomi Nagata, M.J., Casatti, C.A., Ervolino, E. & Theodoro, L.H. (2013) Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *Journal of Periodontology* **84**: 556-565.

Garcia, V.G., Sahyon, A.S., Longo, M., Fernandes, L.A., Gualberto Junior, E.C., Novaes, V.C., Ervolino, E., de Almeida, J.M. & Theodoro, L.H. (2014) Effect of LLLT on autogenous bone grafts in the repair of critical size defects in the calvaria of immunosuppressed rats. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* **42**: 1196-1202.

García-Morales, J.M., Tortamano-Neto, P., Todescan, F.F., de Andrade, J.C. Jr., Marotti, J. & Zezell, D.M. (2012) Stability of dental implants after irradiation with an 830-nm low-level laser: a double-blind randomized clinical study. *Lasers in Medical Science* **27**: 703-111.

Gomes, F.V., Mayer, L., Massotti, F.P., Baraldi, C.E., Ponzoni, D., Webber, J.B. & de Oliveira, M.G. (2015) Low-level laser therapy improves peri-implant bone formation: resonance frequency, electron microscopy, and stereology findings in a rabbit model. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **44**: 245-251.

Góralczyk, K., Szymańska, J., Łukowicz, M., Drela, E., Kotzbach, R., Dubiel, M., Michalska, M., Góralczyk, B., Zajac, A. & Rość, D. (2015) Effect of LLLT on endothelial cells culture. *Lasers in Medical Science* **30**: 273-278.

Grassi, F.R., Ciccolella, F., D'Apolito, G., Papa, F., Iuso, A., Salzo, A.E., Trentadue, R., Nardi, G.M., Scivetti, M., De Matteo, M., Silvestris, F., Ballini, A., Inchingolo, F., Dipalma, G., Scacco, S. & Tetè, S. (2011) Effect of low-level laser irradiation on osteoblast proliferation and bone formation. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* **25**: 603-614.

Guzzardella, G.A., Torricelli, P., Nicoli-Aldini, N. & Giardino, R. (2003) Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser stimulation: an in vivo comparative study. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 226-232.

Jakse, N., Payer, M., Tangl, S., Berghold, A., Kirmeier, R. & Lorenzoni, M. (2007) Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants

following sinus augmentation. An experimental study on sheep. *Clinical Oral Implants Research* **18**: 517-524.

Kanno, C.M., Oliveira, J.A., Garcia, J.F., Castro, A.L. & Crivelini, M.M. (2008) Effects of cyclosporin, phenytoin, and nifedipine on the synthesis and degradation of gingival collagen in tuftedcapuchin monkeys (*Cebus apella*) histochemical and MMP-1 and -2 and collagen I gene expression analyses. *Journal of Periodontology* **79**: 114-122.

Karu, T. (1989) Photobiology of low-power laser effects. *Health Physics* **56**: 691-704.

Khadra, M., Rønold, H.J., Lyngstadaas, S.P., Ellingsen, J.E. & Haanaes, H.R. (2004) Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 325-332.

Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M. & Altman, D.G. (2010) Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* **1**: 94-99.

Kim, J.R., Kim, S.H., Kim, I.R., Park, B.S. & Kim, Y.D. (2016) Low-level laser therapy affects osseointegration in titanium implants: resonance frequency, removal torque, and histomorphometric analysis in rabbits. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **42**: 2-8.

Kim, Y.D., Kim, S.S., Hwang, D.S., Kim, S.G., Kwon, Y.H., Shin, S.H., Kim, U.K., Kim, J.R. & Chung, I.K. (2007) Effect of low-level laser treatment after installation of dental titanium implant-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: an experimental study in rats. *Lasers in Surgery and Medicine* **39**: 441-450.

Kiyosaki, T., Mitsui, N., Suzuki, N. & Shimizu, N. (2010) Low-level laser therapy stimulates mineralization via increased Runx2 expression and ERK phosphorylation in osteoblasts. *Photomedicine and Laser Surgery* **28** Suppl 1: 167-172.

Lavery, K., Swain, P., Falb, D. & Alaoui-Ismaili, M.H. (2008) BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: 20948-20958.

Lopes, C.B., Pinheiro, A.L., Sathaiiah, S., Da Silva, N.S. & Salgado, M.A. (2007) Infrared laser photobiomodulation (lambda 830 nm) on bone tissue around dental implants: a Raman spectroscopy and scanning electronic microscopy study in rabbits. *Photomedicine and Laser Surgery* **25**: 96-101.

Lopes, C.B., Pinheiro, A.L., Sathaiiah, S., Duarte, J. & Cristinamartins, M. (2005) Infrared laser light reduces loading time of dental implants: a Raman spectroscopic study. *Photomedicine and Laser Surgery* **23**: 27-31.

Maluf, A.P., Maluf, R.P., Brito, Cda. R., França, F.M. & de Brito, R.B. Jr. (2010) Mechanical evaluation of the influence of low-level laser therapy in secondary stability of implants in mice shinbones. *Lasers in Medical Science* **25**: 693-698.

Mandić, B., Lazić, Z., Marković, A., Mandić, B., Mandić, M. & Djinić, A. & Miličić, B. (2015) Influence of postoperative low-level laser therapy on the osseointegration of self-tapping implants in the posterior maxilla: a 6-week split-mouth clinical study. *Vojnosanitetski Pregled* **72**: 233-240.

Massotti, F.P., Gomes, F.V., Mayer, L., de Oliveira, M.G., Baraldi, C.E., Ponzoni, D. & Puricelli, E. (2015) Histomorphometric assessment of the influence of low-level laser therapy

on peri-implant tissue healing in the rabbit mandible. *Photomedicine and Laser Surgery* **33**: 123-128.

Mayer, L., Gomes, F.V., Carlsson, L. & Gerhardt-Oliveira, M. (2015) Histologic and resonance frequency analysis of peri-implant bone healing after low-level laser therapy: An In Vivo Study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **30**: 1028-1035.

Omasa, S., Motoyoshi, M., Arai, Y., Ejima, K. & Shimizu, N. (2012) Low-level laser therapy enhances the stability of orthodontic mini-implants via bone formation related to BMP-2 expression in a rat model. *Photomedicine and Laser Surgery* **30**: 255-261.

Osyczka, A.M., Diefenderfer, D.L., Bhargava, G. & Leboy, P.S. (2004) Different effects of BMP-2 on marrow stromal cells from human and rat bone. *Cells Tissues Organs* **176**: 109-119.

Patel, Z.S., Young, S., Tabata, Y., Jansen, J.A., Wong, M.E. & Mikos, A.G. (2008) Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone* **43**: 931-940.

Peplow, P.V., Chung, T.Y. & Baxter, G.D. (2010) Laser photobiomodulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. *Photomedicine and Laser Surgery* **28**: 291-325.

Pereira, C.L., Sallum, E.A., Nociti, F.H. Jr. & Moreira, R.W. (2009) The effect of low-intensity laser therapy on bone healing around titanium implants: a histometric study in rabbits. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **24**: 47-51.

Petri, A.D., Teixeira, L.N., Crippa, G.E., Beloti, M.M., de Oliveira, P.T. & Rosa, A.L. (2010) Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium. *Brazilian Dental Journal* **21**: 491-498.

Pinheiro, A.L. & Gerbi, M.E. (2006) Photoengineering of bone repair processes. *Photomedicine and Laser Surgery* **24**: 169-178.

Prados-Frutos, J.C., Rodríguez-Molinero, J., Prados-Privado, M., Torres, J.H. & Rojo, R.. (2016) Lack of clinical evidence on low-level laser therapy (LLLT) on dental titanium implant: a systematic review. *Lasers in Medical Science* **31**: 383-392.

Primo, B.T., da Silva, R.C., Grossmann, E., Miguens, S.A. Jr., Hernandez, P.A. & Silva, A.N. Jr. (2013) Effect of surface roughness and low-level laser therapy on removal torque of implants placed in rat femurs. *Journal of Oral Implantology* **39**: 533-538.

Sakakura, C.E., Margonar, R., Holzhausen, M., Nociti, F.H. Jr., Alba, R.C. Jr. & Marcantonio, E. Jr. (2003) Influence of cyclosporin A therapy on bone healing around titanium implants: a histometric and biomechanic study in rabbits. *Journal of Periodontology* **74**: 976-981.

Shibuya, M. (2001) Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Structure and Function* **26**: 25-35.

Stein, A., Benayahu, D., Maltz, L. & Oron, U. (2005) Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomedicine and Laser Surgery* **23**: 161-166.

Szymanska, J., Goralczyk, K., Klawe, J.J., Lukowicz, M., Michalska, M., Goralczyk, B., Zalewski, P., Newton, J.L., Gryko, L., Zajac, A. & Rosc, D. (2013) Phototherapy with low-

level laser influences the proliferation of endothelial cells and vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta secretion. *Journal of Physiology and Pharmacology* **64**: 387-391.

ten, Dijke. P., Korchynskiy, O., Valdimarsdottir, G. & Goumans, M.J. (2003) Controlling cell fate by bone morphogenetic protein receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* **211**: 105-113.

Tim, C.R., Bossini, P.S., Kido, H.W., Malavazi, I., von Zeska Kress, M.R., Carazzolle, M.F., Parizotto, N.A. & Rennó, A.C. (2015) Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes during the initial stages of bone healing in rats: a microarray analysis. *Lasers in Medical Science* **30**: 2325-2333.

Tim, C.R., Pinto, K.N., Rossi, B.R., Fernandes, K., Matsumoto, M.A., Parizotto, N.A. & Rennó, A.C. (2014) Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. *Lasers in Medical Science* **29**: 147-156.

The image displays three vertical panels of histological sections of the endometrium, stained with hematoxylin and eosin (H&E). The sections illustrate different phases of the menstrual cycle. The leftmost panel shows the proliferative phase with a thin, uniform endometrial lining. The middle panel shows the secretory phase, characterized by a thickened endometrium with prominent, coiled uterine arteries and a highly convoluted, saw-toothed surface. The rightmost panel shows the regenerative phase, where the endometrium is thinning and the surface is becoming smoother. A semi-transparent purple banner is overlaid on the right side of the image, containing the text 'Figuras – Capítulo 2' in a white, serif font.

Figuras – Capítulo 2

Figura 1: Gráfico mostrando médias e desvios-padrão de contra torque ($N.cm^2$) nos grupos C e LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos.

Figura 2: Porcentagem de contato osso/implantes (BIC) e área óssea (BA) nas três primeiras roscas dos implantes. (A) Gráfico mostrando médias e desvios-padrão de BIC nos grupos C e LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos. (B) Gráfico mostrando médias e desvios-padrão de BA nos grupos C e LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos: * Diferença significativa com o Grupo C no mesmo período ($p \leq 0,05$); † Diferença significativa com 15 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); ‡ Diferença significativa com 30 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$). (C-H) Fotomicrografias evidenciando tecido ósseo neoformado nas roscas do implante nos grupos C (C, E e G) e LLLT (D, F e G) aos 15 (C-D), 30 (E-F) e 60 (G-H) dias pós-operatórios. Abreviações: to, tecido ósseo. Coloração: H&E.

Figura 3: Nível de maturação das fibras colágenas nas roscas do implante. (A) Gráfico mostrando médias e desvios-padrão das fibras colágenas maduras e imaturas nos grupos C e LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos: * Diferença significativa com 15 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); † Diferença significativa com 30 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$). (B-G) Fotomicrografias evidenciando fibras colágenas maduras (vermelho – laranja) e imaturas (amarela – verde) nos grupos C (B, D e F) e LLLT (C, E e G) aos 60 dias pós-operatórios. Abreviações: to, tecido ósseo. Coloração: Vermelho picrosirius visualizado em microscopia de luz polarizada.

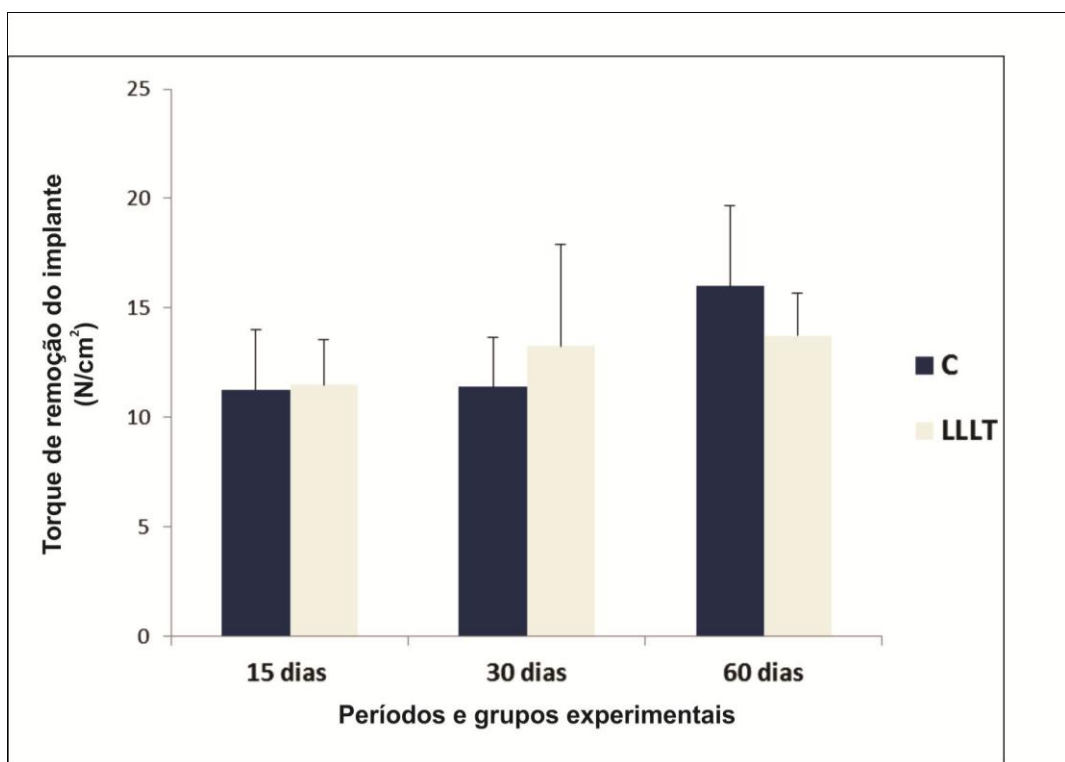
Figura 4: Padrão de imunomarcção para HIF-1 α e VEGF. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para HIF-1 α nos grupos C e LLLT aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B-C) Fotomicrografias evidenciando as células HIF-1 α -positivas nos grupos C (B) e LLLT (C), aos 15 dias pós-operatórios. (D) Gráfico

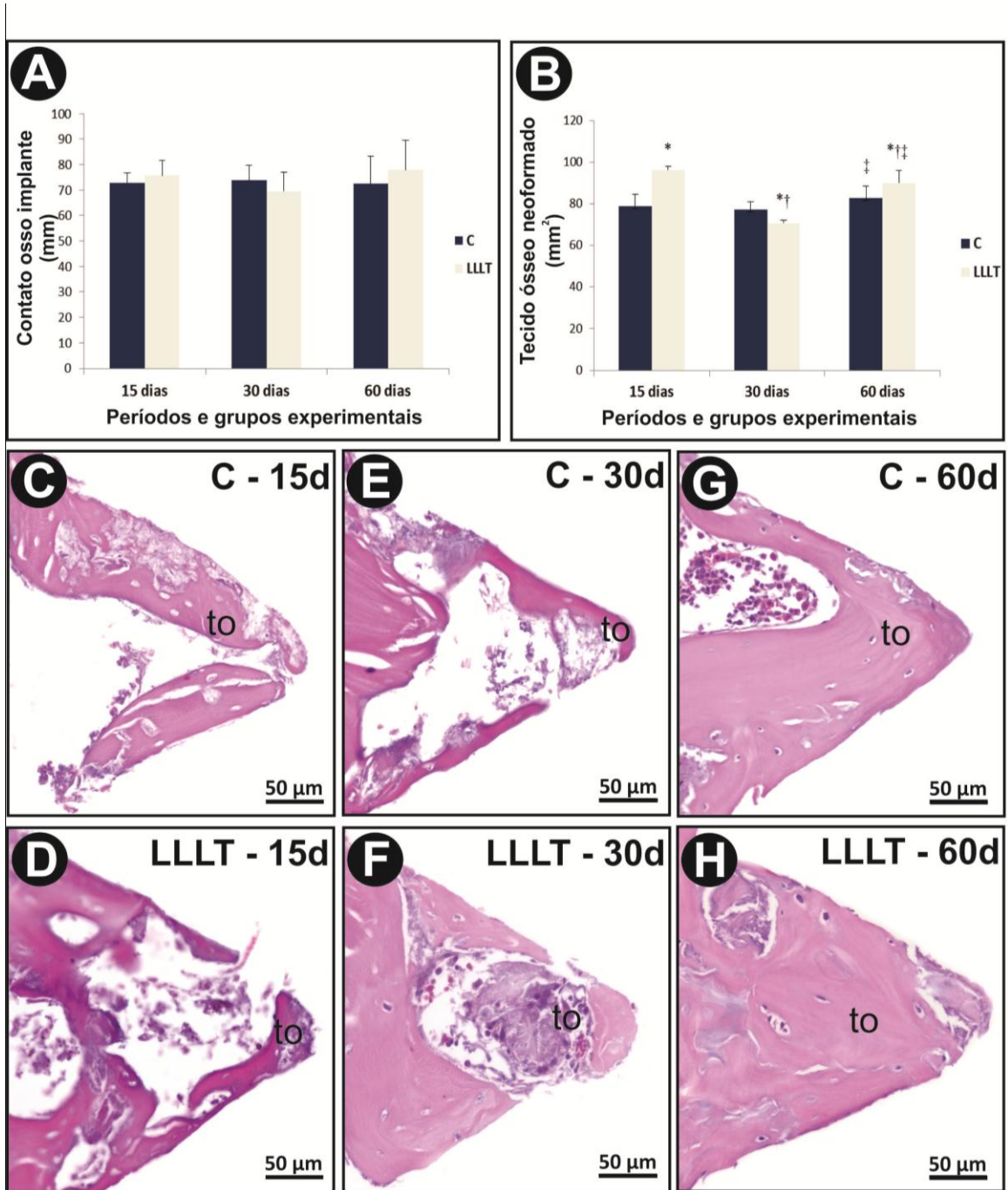
mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para VEGF nos grupos C e LLLT aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (E-F) Fotomicrografias evidenciando as células VEGF-positivas nos grupos C (E) e LLLT (F), aos 15 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

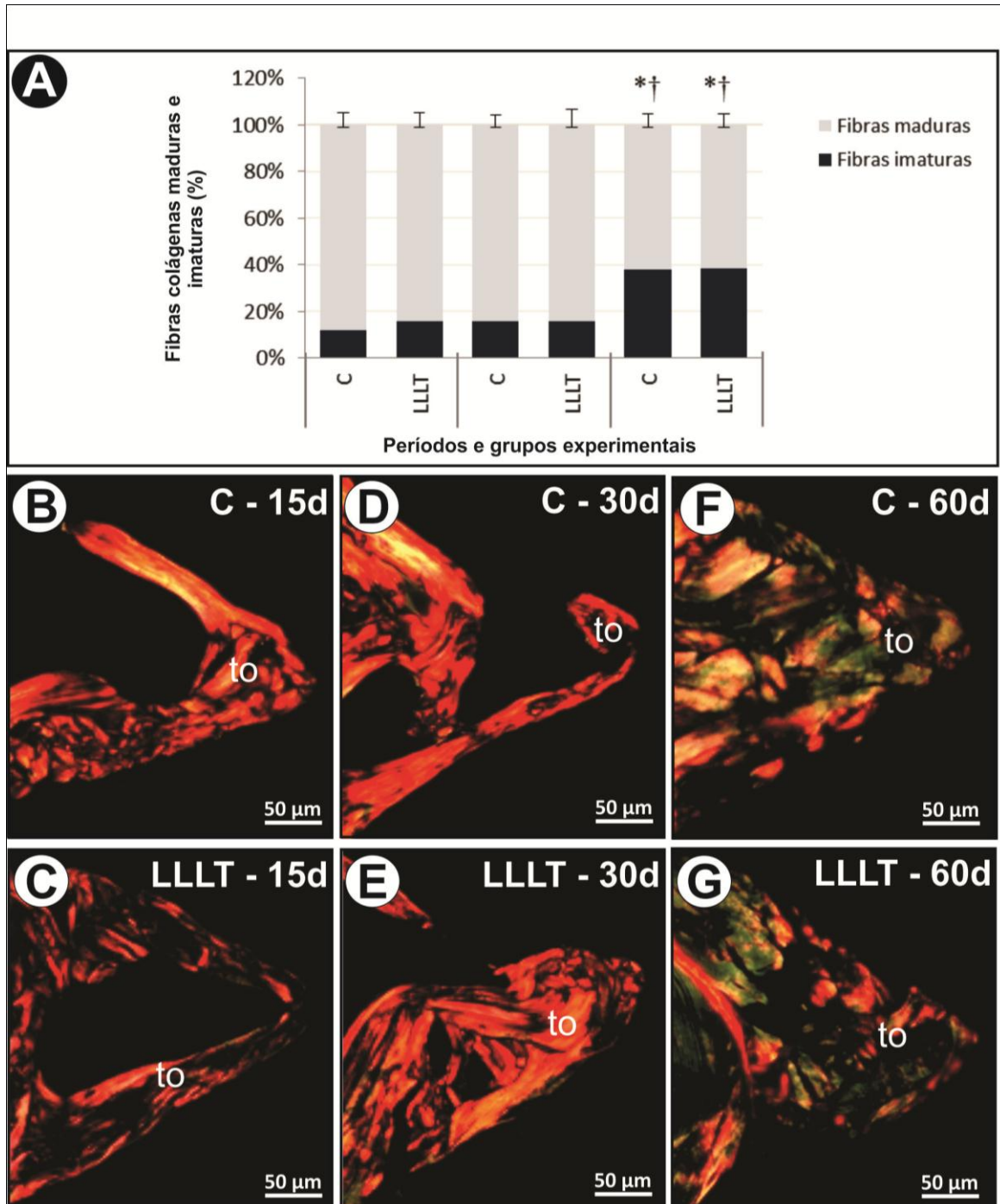
Figura 5: Padrão de imunomarcção para BMP-2 e RUNX-2. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para BMP-2 nos grupos C e LLLT aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B-C) Fotomicrografias evidenciando as células BMP-2-positivas nos grupos C (B) e LLLT (C), aos 30 dias pós-operatórios. (D) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para RUNX-2 nos grupos C e LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (E-F) Fotomicrografias evidenciando as células RUNX-2-positivas nos grupos C (E) e LLLT (F) aos 30 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: (B-C) Hematoxilina de Harris, (E-F) Fast green.

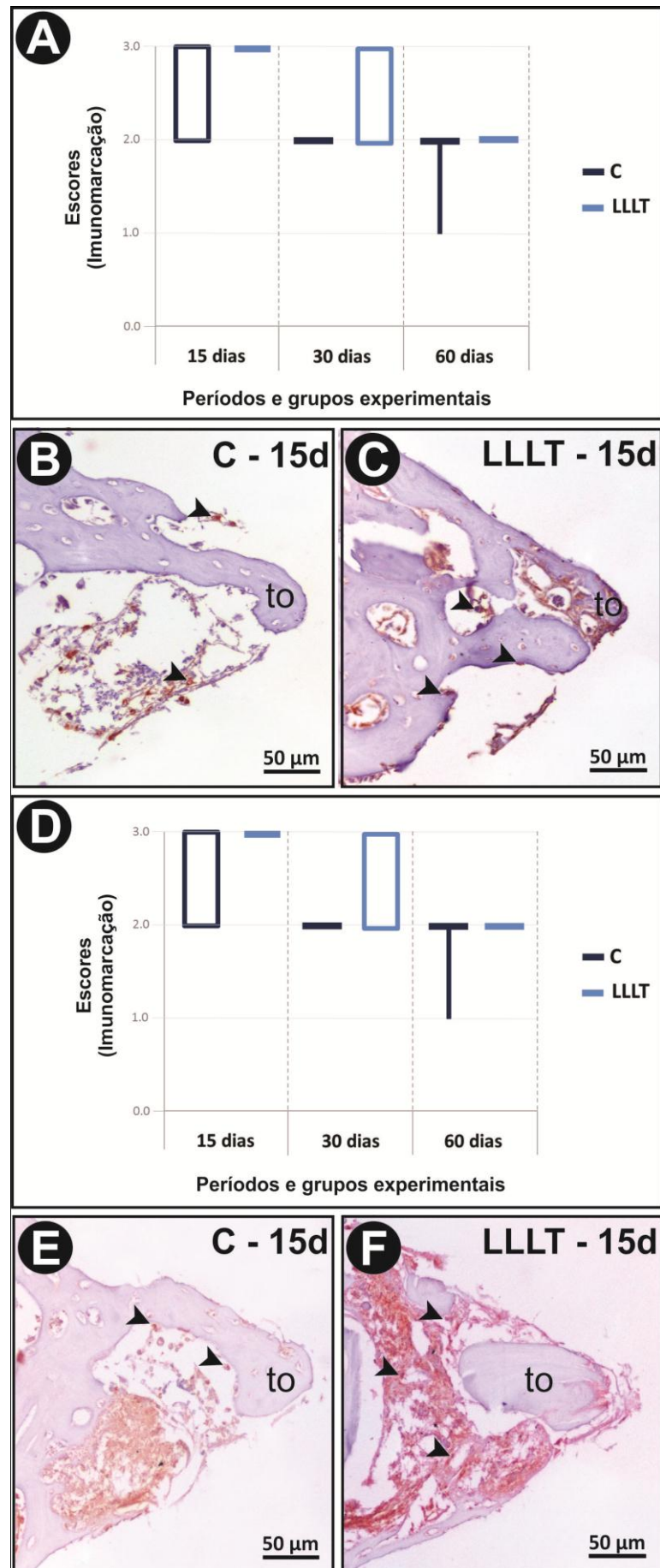
Figura 6: Padrão de imunomarcção para OCN e ALP. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para OCN nos grupos C e LLLT aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B-C) Fotomicrografias evidenciando as células OCN-positivas nos grupos C (B) e LLLT (C), aos 30 dias pós-operatórios. (D) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para ALP nos grupos C e LLLT aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (E-F) Fotomicrografias evidenciando as células ALP-positivas nos grupos C (E) e LLLT (F), aos 30 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

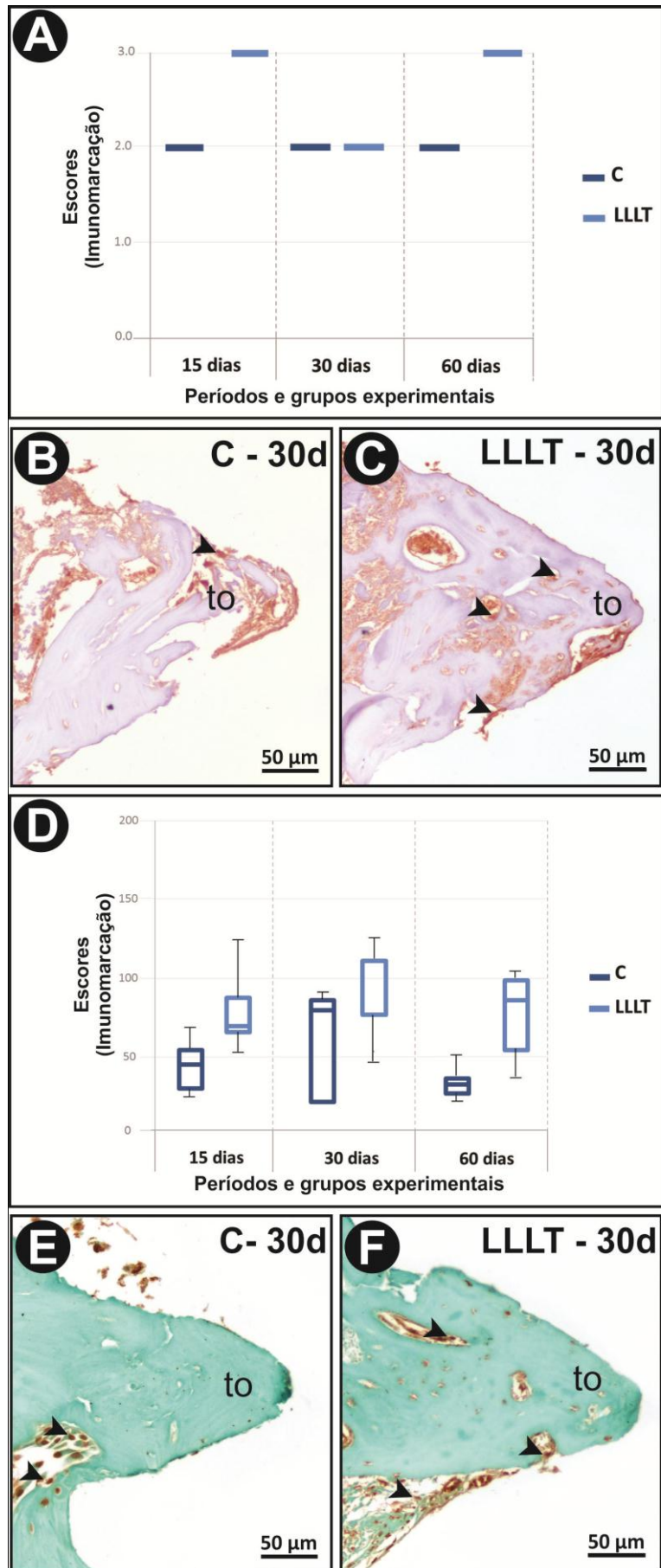
Figura 7: Imunomarcção para RANKL, OPG e TRAP. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para RANKL nos grupos C e LLLT aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para OPG nos grupos C e LLLT aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (C) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para TRAP nos grupos C e LLLT aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (D-F) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção das células RANKL-positivas (D), OPG-positivas (E) e TRAP-positivas (F) aos 60 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

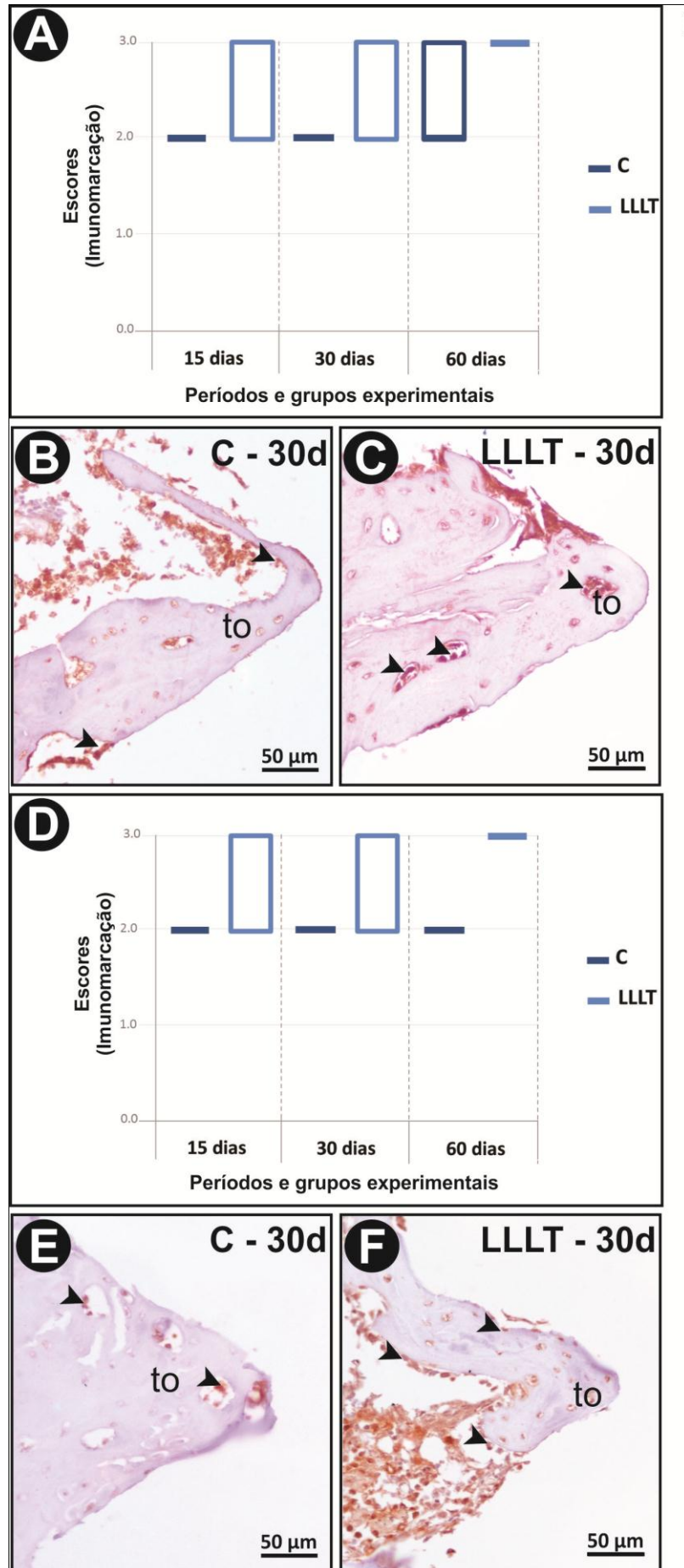


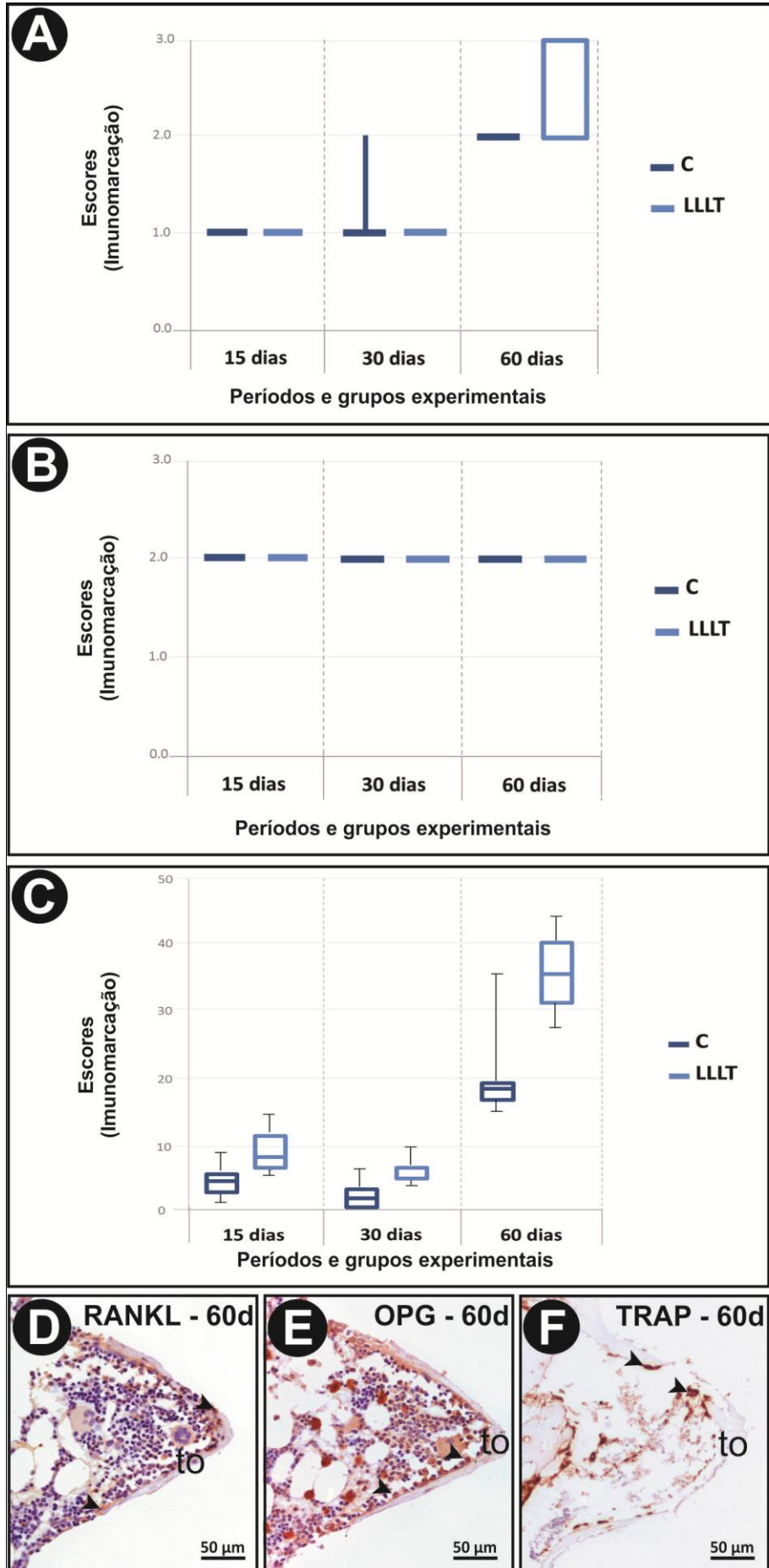












Capítulo 3

Segundo as normas do Periódico **“Clinical Oral Implants Research”** – AnexoB

Manuscrito para Publicação

A vertical histological section of tissue, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E), showing various cellular structures and tissue layers. The image is partially obscured by a vertical purple band on the right side, which contains the text 'Manuscrito para Publicação'.

Título: O efeito da LLLT no processo de reparo ósseo peri-implantar sob ação da nicotina.

Autores: Paula Lazilha Faleiros^{1,3} MS; Juliano Milanezi de Almeida^{1,3} PhD; Valdir Gouveia Garcia^{1,2,3} PhD; Alvaro Francisco Bosco^{1,3} PhD

¹ Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada - Disciplina de Periodontia, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Univ. Estadual Paulista - UNESP, Araçatuba, SP, Brasil.

² Curso de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Barretos, Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos - UNIFEB, Barretos, SP, Brasil.

³ GEPL0 – Grupo de Estudos e Pesquisas com Lasers em Odontologia, Univ. Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada - Disciplina de Periodontia, Araçatuba, SP, Brasil.

Título resumido (“running title”): Efeitos do laser e da nicotina na osseointegração

Palavras-chave: Implantes dentais, laser, nicotina, osseointegração.

Autor responsável pela correspondência:

Alvaro Francisco Bosco. Endereço

Rua José Bonifácio, nº 1193

CEP: 16015-050, Araçatuba, SP, Brasil

Telefone: +55 18 36363239 (publicação autorizada)

Fax: +55 18 36363333 (publicação autorizada)

E-mail: afbosco@hotmail.com (publicação autorizada)

Resumo

Objetivo: Analisar o efeito da LLLT no processo de reparo ósseo peri-implantar em ratos modificados sistemicamente pela nicotina. **Material e Métodos:** Um total de 120 ratos (Wistar) foi randomicamente distribuído em dois grandes grupos experimentais (n = 60) submetidos a duas aplicações diárias de solução salina (Veh) ou nicotina (NIC). Após 30 dias, foram instalados implantes de titânio na metáfise proximal de ambas as tíbias de todos os animais. No procedimento cirúrgico foram criados grupos de diferentes tratamentos locais do alvéolo cirúrgico previamente à instalação do implante (n = 30): Veh - nenhum tratamento local; Veh/LLLT - irradiação com laser em baixa intensidade (Thera Lase, InGaAlP 660 nm, modo de aplicação contínuo, em contato com a área, 0,035 W, 0,14 J, 4,9 J/cm², por 4 s); Nic - nenhum tratamento local; Nic/LLLT - irradiação com laser em baixa intensidade. Dez animais de cada grupo foram eutanasiados aos 15, 30 e 60 dias pós-operatório. As tíbias direitas foram submetidas à análise biomecânica e processadas para análise histológica, histoquímica e imunohistoquímicas dos anticorpos VEGF, HIF-1 α , RUNX-2, BMP-2, OCN, ALP, RANKL, OPG e TRAP. As tíbias esquerdas foram processadas para a análise do contato osso-implante (BIC) e área óssea (BA). Os dados quantitativos foram analisados estatisticamente ao nível de significância de 5%. **Resultados:** O Grupo Nic/LLLT apresentou maior BA comparativamente ao Grupo Nic em todos os períodos experimentais estudados e similar comparativamente ao Grupo Veh aos 15 e 30 dias pós-operatórios. Aos 60 dias o Grupo Nic/LLLT ainda apresentou maior BA comparativamente ao Grupo Veh e similar comparativamente ao Grupo Veh/LLLT. Houve aumento significativo no torque de remoção no Grupo Nic/LLLT comparativamente aos grupos Veh e Veh/LLLT aos 60 dias pós-operatórios, embora não tenha influenciado o BIC. O Grupo Nic/LLLT exibiu aumento no padrão de imunomarcção de HIF-1 α , VEGF, BMP-2, OCN, ALP e OPG, diminuição no padrão de imunomarcção de RANKL e similaridade na quantidade de células RUNX-2 e

TRAP-positivas comparativamente ao Grupo Nic. **Conclusão:** Assim, dentro dos limites do presente estudo pode-se concluir que a LLLT foi capaz de promover o processo ósseo peri-implantar em animais modificados sistemicamente pela nicotina, compensando os seus efeitos negativos na osseointegração.

Introdução

A Terapia com Laser em Baixa Intensidade (LLLT) tem emergido como uma estratégia para acelerar o processo de reparo ósseo peri-implantar (Dörtbudak et al. 2002; Khadra et al. 2004; Lopes et al. 2005; Jakse et al. 2007; Kim et al. 2007; Pereira et al. 2009; Petri et al. 2010; Maluf et al. 2010; Campanha et al. 2010; Garcia-Morales et al. 2012; Boldrini et al. 2013; Vasconcellos et al. 2014; Massotti et al. 2015; Mayer et al. 2015; Gomes et al. 2015; Kim et al. 2016). Foi demonstrado que a LLLT é capaz de estimular a produção de colágeno, aumentar a área de neoformação óssea e o contato osso/implante, além de aumentar a estabilidade e oferecer maior resistência ao torque de remoção dos implantes de titânio (Guzzardella et al. 2003; Pereira et al. 2009; Campanha et al. 2010; Maluf et al. 2010; Boldrini et al. 2013; Gomes et al. 2015; Mayer et al. 2015; Massotti et al. 2015). Também foi demonstrado que os efeitos benéficos da LLLT são potencializados em sítios com menor qualidade óssea ou envolvendo modelos sistemicamente comprometidos, uma vez que a suscetibilidade à irradiação e capacidade de ativação celular pelo laser depende do estado fisiológico das células irradiadas (Karu 1989). Células com diminuição do potencial redox, presentes em estados patológicos como tabagismo (Tinti & Soory 2013), diabetes (de Almeida et al. 2008), imunossupressão (Fernandes et al. 2009) e frente à depleção estrogênica (Garcia et al. 2013), são mais sensíveis a irradiação (Karu 1989). No tabagismo há um aumento do stress oxidativo no tecido e no plasma que leva ao aumento da susceptibilidade celular à irradiação laser (Karu 1989).

A literatura implica o tabagismo como importante fator de risco que afeta a taxa de sucesso clínico dos implantes dentais (Chrcanovic et al. 2015). Neste contexto, a nicotina assumiu importante papel por que tem sido amplamente utilizada em modelos experimentais com animais para elucidar os efeitos do tabaco sobre a osseointegração (Stefani et al. 2002; Balatsouka et al. 2005a; Balatsouka et al. 2005b; Bonfante et al. 2008; Gotfredsen et al. 2009; Berley et al. 2010; Yamano et al. 2010). Embora vários autores não tenham observado efeito prejudicial da exposição à nicotina sobre o reparo ósseo peri-implantar (Stefani et al. 2002, Balatsouka et al. 2005a, Balatsouka et al. 2005b, Gotfredsen et al. 2009), alguns estudos histológicos em modelos animais mostraram que o tabagismo pode diminuir o contato osso/implante e a neoformação óssea dentro das roscas do implante de titânio (Nociti Júnior et al. 2002; César-Neto et al. 2003; César-Neto et al. 2005; Berley et al. 2010; Yamano et al. 2010).

Até o presente momento, e ao nosso conhecimento, nenhum estudo da ação do LLLT na osseointegração de implantes de titânio frente à nicotina foi relatado na literatura. Assim, este estudo objetivou avaliar o efeito da LLLT no processo de reparo ósseo peri-implantar em ratos sistemicamente modificados pela nicotina. A avaliação consistiu de: (1) análise biomecânica da força necessária para romper a osseointegração; (2) análise histológica; (3) análise histométrica da porcentagem de contato osso-implante (BIC) e de área óssea (BA) dentro dos limites das roscas dos implantes; (4) análise histoquímica aliada à microscopia de luz polarizada para avaliação do nível de maturação do colágeno e (5) análise imunoistoquímica para a detecção de HIF-1 α (regulador central da adaptação tecidual à hipóxia), VEGF (potente mediador angiogênico), BMP-2 (potente mediador osteogênico), RUNX-2 (fator de transcrição regulador da diferenciação de osteoblastos), OCN (proteína não colagenosa sintetizada e secretada por osteoblastos na fase tardia da osteogênese) ALP, (enzima sintetizada e secretada por osteoblastos especialmente durante o processo de

biomineralização), RANKL (um regulador positivo da reabsorção óssea), OPG (um regulador negativo da reabsorção óssea) e TRAP (um biomarcador de osteoclastos).

Materiais e métodos

1. Animais e cálculo amostral

Este estudo foi conduzido em conformidade com as diretrizes propostas pela ARRIVE (Pesquisa Animal: Descrevendo Experimentos *In Vivo*) (Kilkenny et al. 2010). O tamanho da amostra foi determinado com um nível de significância de $\alpha = 0,05$; um poder amostra de 80%. Considerando estes parâmetros, dez animais por tratamento foi considerado nosso tamanho da amostra. Um total de 120 ratos machos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) de 3 meses de idade, 250-300 g (Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP) foi estudado. Um total de 240 implantes foi instalado. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo de luz controlado (12-h claro/escuro), água e ração *ad libitum* durante todo o experimento. Seguindo uma tabela gerada em computador, os animais foram distribuídos em dois grandes grupos experimentais ($n = 60$) de duas aplicações diárias de solução salina, Grupo Veh; ou nicotina, Grupo Nic. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (protocolo nº 00934-2012) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP.

2. Protocolo Experimental

Administração da nicotina e solução salina

O hemissulfato de nicotina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi diluído em solução salina (cloreto de sódio 0,9%) pra se obter uma solução com concentração de 5mg/ml. A cada 12 horas, os animais do Grupo Nic receberam injeções subcutâneas com dose de 3mg/kg de peso

dessa solução na região dorsal em horário pré-estabelecido por um período de 30 dias que antecederam o procedimento cirúrgico até o momento da eutanásia (Okamoto et al. 1994). Os animais do Grupo Veh receberam apenas o veículo (solução salina) com objetivo de simular as mesmas condições de estresse diário proveniente das aplicações de nicotina.

Instalação dos implantes e grupos experimentais

Após 30 dias do início das administrações foi realizado o procedimento cirúrgico para instalação dos implantes nas tíbias direita e esquerda de todos os animais. A anestesia geral foi realizada pela associação de ketamina (70 mg/kg de peso corporal) e xilazina (6 mg/kg de peso corporal). Após tricotomia da parte interior da perna e antissepsia com iodopolvidona (10%), foi realizada uma incisão de aproximadamente 30 mm do lado interno da coxa, logo abaixo do joelho, e a metáfise proximal foi exposta por dissecação romba. Um alvéolo cirúrgico bicortical foi preparado com uma fresa (2,0 mm) (Conexão Sistemas de Prótese, Arujá, SP, Brasil) montada em motor cirúrgico (45 N e 980 rpm) (Ômega, Dentscler Indústria de Aparelhos Odontológicos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil) sob irrigação constante de solução salina. Os animais foram subdivididos em grupos de diferentes tratamentos locais do alvéolo cirúrgico previamente à instalação do implante (n = 30): Veh - nenhum tratamento local; Veh/LLLT - irradiação com laser em baixa intensidade; Nic - nenhum tratamento local; Nic/LLLT - irradiação com laser em baixa intensidade. O implante (4,0 mm x 2,2 mm, Cone Morse, de superfície tratada convencionalmente por meio de jateamento e ataque ácido) (DSP Biomedical®, Campo Largo, PR, Brasil) foi instalado no alvéolo cirúrgico com uma chave digital (1,2 mm) acoplada ao hexágono do implante até que todas as suas roscas ficassem completamente cobertas pelo osso cortical. Em seguida, o tecido muscular foi suturado com fio 4.0 de poliglactina 910 (Ethicon, São Paulo, SP, Brasil), e o epitelial foi suturado com fio de seda 4.0 (Ethicon, São Paulo, SP, Brasil). Os animais receberam uma injeção intramuscular

de 24.000 IU de penicilina G-benzathina (Fort Dodge, Saúde Animal Ltda., Campinas, SP, Brasil) no pós-operatório imediato. Para evitar vieses e garantir a randomização do estudo, o procedimento cirúrgico sempre foi realizado por dois cirurgiões experientes e calibrados e de acordo com um rígido protocolo. O primeiro operador (JMA) não teve conhecimento se o alvéolo cirúrgico seria ou não irradiado. O segundo operador (AFB) determinou, aleatoriamente e com auxílio de software de computador, os alvéolos a serem irradiados. Este mesmo operador sempre fez a irradiação do alvéolo, ou sua simulação, previamente à instalação do implante. A informação foi mantida em segredo por este operador até o fim da análise.

Irradiação laser

O laser utilizado foi o Índio-Gálio-Alumínio-Fósforo (InGaAlP) (Thera Lase; D.M.C. Equipamentos Ltda., São Carlos, SP, Brasil), com comprimento de onda de 660 nm, fibra ótica de 0,0283 cm² de diâmetro e no modo contínuo. O feixe de luz foi posicionado perpendicularmente ao tecido ósseo cortical, no longo eixo do alvéolo cirúrgico, em contato e incidindo para o seu interior, com 0,035 W de potência, por 4 s (energia total de 0,14 J). Cada alvéolo cirúrgico recebeu 4,9 J/cm² de densidade de energia.

Períodos experimentais

Os animais foram eutanasiados com dose de 150mg/kg de Tiopental (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, SP, Brasil) aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. As tíbias direitas foram coletadas, dissecadas para a exposição dos implantes, submetidas à avaliação biomecânica e depois processadas laboratorialmente para análise histológica, histoquímica e imunoistoquímica. As tíbias esquerdas foram processadas

laboratorialmente para a confecção de cortes histológicos em sistema de corte específico para análise histométrica.

3. Avaliação biomecânica

Após a estabilização da tibia em uma morsa, o implante foi removido por movimento anti-horário com uma chave hexagonal (1,2 mm) conectada ao implante e a um medidor analógico de torque (BTG60CNS, Tohnichi Mfg. Co. Ltd., Tokyo, Japão), tomando-se cuidado para que nenhuma força fosse aplicada ao implante na direção vertical. O medidor registrou a força necessária para romper a osseointegração (N.cm²). Os dados coletados foram tabulados e submetidos à análise estatística.

4. Processamentos laboratoriais

Processamento histológico das tíbias direitas

As porções das tíbias direitas, previamente contendo o implante, foram dissecadas, fixadas em formaldeído (4%) por 48 h, desmineralizadas em ácido etilenodiaminotetracético a 10% (pH 7,2) e incluídas em parafina. Secções semi-seriados (4 µm) foram confeccionados na direção do longo eixo do alvéolo do implante. Duas secções de cada espécime foram coradas por hematoxilina e eosina (H&E) para análise histológica, duas foram coradas por picrossirius red para análise histoquímica e outras dezoito foram separadas em nove lotes e submetidas à reações imunoistoquímica com os seguintes anticorpos primários policlonais: anti-HIF-1α do rato gerado em camundongo (sc-53546, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-VEGF do rato gerado em camundongo (sc-7269, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-BMP-2 do rato gerado em camundongo (B9553, Sigma Aldrich, St. Louis, CA, USA), anti-RUNX-2 do rato gerado em camundongo (sc-10758, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-OCN do rato gerado em cabra (sc-18319, Santa

Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-ALP do rato gerado em coelho (sc-30203, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-RANKL do rato gerado em camundongo (sc-7628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-OPG do rato gerado em cabra (sc-8468, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e anti-TRAP do rato gerado em cabra (sc-30833, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). O processamento imunistoquímico foi realizado pela técnica da imunoperoxidase indireta seguindo o protocolo descrito por Garcia et al. 2013

Processamento histológico das tíbias esquerdas

As porções das tíbias esquerdas, contendo o implante, foram fixadas em formaldeído tamponado (4%) por 48 h e processadas pela técnica descrita por Donath & Breuner (1982), em laboratório especializado da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP. Os espécimes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol e embebidos em resina à base de glycolmethacrylate (Technovit 7200 VLC, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Hesse, Alemanha). Os blocos foram cortados em secções de 100 µm de espessura objetivando o centro do diâmetro do implante ao longo do seu eixo longitudinal com um aparelho de corte específico (EXAKT Apparatebau GmbH & Co., Norderstedt, Alemanha). Uma única secção foi obtida a partir de cada implante. As secções foram reduzidas por lixas a uma espessura final de 30 µm por moagem e polimento usando uma unidade EXAKT *microgrinding*. As secções foram coradas em azul toluidina a 1% e vermelho escarlata (Sigma Aldrich, St. Louis, CA, USA).

5. Análise das amostras

A análise das amostras foi realizada através de microscopia de luz polarizada para análise histoquímica e microscopia óptica de campo claro para a análise histológica,

histométrica e imunoistoquímica. Em todas as análises foi considerada a porção do tecido ósseo presente nas três primeiras roscas do implante de cada animal (Sakakura et al. 2003).

Análise histológica e imunoistoquímica

As análises histológica e imunoistoquímica foram realizadas por um histologista certificado e cego aos tratamentos realizados (EE). A análise histológica constou da descrição das características morfológicas do tecido ósseo na região descrita. Os seguintes parâmetros histológicos foram considerados: presença e grau de inflamação; natureza do infiltrado inflamatório; presença e extensão de necrose tecidual; estado da vasculatura; padrão de celularidade dos tecidos ósseo, conjuntivo, adiposo e hematopoético e; padrão de estruturação da matriz extracelular dos tecidos ósseo, conjuntivo, adiposo e hematopoético. Para HIF-1 α , VEGF, BMP-2, OCN, ALP, RANKL e OPG foi efetuada uma análise semi-quantitativa utilizando-se de duas secções histológicas de cada animal, no aumento original de 400x. Ao padrão de imunomarcção foi atribuído um escore. O critério adotado para o estabelecimento dos escores foi baseado naqueles estabelecidos por Faria et al. (2008), onde: 0 = ausência de imunomarcção; 1 = baixo padrão de imunomarcção; 2 = moderado padrão de imunomarcção; 3 = alto padrão de imunomarcção. Para RUNX-2 e TRAP foi efetuada uma análise quantitativa, também se utilizando de duas secções histológicas de cada animal no aumento original de 400x. As células RUNX-2 e TRAP-positivas/mm² expressas nas três primeiras roscas, na região mesial e distal do implante, foram consideradas. Para TRAP foram consideradas apenas as células multinucleadas contendo três ou mais núcleos e em contato com o tecido ósseo.

Análise histoquímica

Outro examinador (PLF) treinado e cego aos tratamentos realizados executou a análise histoquímica com um *software* (AutoMeasure para AxelVision 4, Carl Zeiss, Alemanha) que permite a avaliação da distribuição espacial das fibras colágenas em função do limite de cores. As cores das fibras colágenas, quando coradas com vermelho picrosirius e visualizadas sob microscopia de luz polarizada, dependem da espessura da fibra e variam em ordem crescente em função do seu grau de maturação, indo de verde para amarelo, laranja, e vermelho. A identificação de áreas de diferentes matizes permitiu a quantificação das áreas ocupadas por diferentes cores (Kanno et al. 2008).

Análise histométrica

A análise histométrica foi realizada com auxílio de um sistema de análise de imagem (Axiovision v.4.8.2, Carl Zeiss, Jena, Germany.) acoplado a um microscópio óptico (Olympus BX 51), com ampliação de 4 x, pelo mesmo examinador (PLF). As imagens capturadas foram salvas no formato TIFF e analisadas em duas ocasiões diferentes, respeitando um intervalo de duas semanas entre a primeira e a segunda avaliação. O contato osso-implante (BIC) e área de osso (BA) dentro nas roscas do implante foram avaliadas de acordo com os seguintes critérios descritos por Sakakura et al. (2003):

A extensão linear (mm) do tecido ósseo em contato direto com o titânio nas três primeiras roscas do implante na região mesial e distal.

Área de osso neoformado (mm²) em relação à área total presente dentro dos limites das três primeiras roscas do implante na região mesial e distal.

Para as duas análises foram consideradas as médias dos valores obtidos nas regiões mesial e distal para cada implante.

Calibração dos examinadores

Para minimizar erros intra-examinador, todos os examinadores acima identificados foram mascarados para os grupos experimentais e tratamentos realizados antes das análises histométrica, histoquímica e imunoistoquímica. Os examinadores realizaram as medições de BA, BIC, RUNX-2 e TRAP duas vezes. O teste t pareado foi utilizado para calcular o erro intra-examinador. $P > 0,05$ no teste t emparelhado foi considerado para estimar a viabilidade do método proposto.

6. Análise estatística

Com um tamanho de amostra de 10 ($p \leq 0,05$), o poder do estudo foi de 90%. Os dados foram analisados através de em *software* (BioEstat, versão 5.0, Belém, PA, Brasil). Para todos os dados quantitativos (contra-torque, BA, BIC, RUNX-2 e TRAP) foi realizada a análise de normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e análise de variância a dois critérios “ANOVA”, com nível de significância a 5% ($p < 0,05$). Foi aplicado o teste de Tukey para comparações múltiplas dos grupos como também dos períodos.

Resultados

Análise Biomecânica

A comparação intergrupos no mesmo período mostrou que o Grupo Nic/LLLT apresentou maior torque de remoção quando comparado ao Grupo Veh, aos 60 dias pós-operatórios ($p < 0,05$; Tabela 1). O Grupo Nic apresentou também maior torque de remoção quando comparado ao Grupo Veh/LLLT, aos 60 dias pós-operatórios ($p < 0,05$; Tabela 1). A comparação entre os períodos no mesmo grupo mostrou que apenas os grupos Nic e NIC/LLLT exibiram maior torque de remoção dos implantes aos 60 dias pós-operatórios

quando comparados aos 15 e 30 dias pós-operatórios ($p<0,05$; Tabela 1), e aos 60 dias pós-operatórios quando comparados aos 30 dias pós-operatórios ($p<0,05$; Tabela 1).

Análise Histométrica

BIC

A comparação intergrupos no mesmo período mostrou que o Grupo Nic/LLLT exibiu menor BIC em comparação com o Grupo Veh aos 15 e 30 dias pós-operatórios ($p<0,05$; Tabela 2; Figura 1). Os grupos Nic e Nic/LLLT apresentaram menor BIC em comparação com o Grupo Veh/LLLT aos 15 dias pós-operatórios ($p<0,05$; Tabela 2; Figura 1). A comparação entre os períodos mostrou que os grupos Nic e Nic/LLLT exibiram maior BIC aos 60 dias pós-operatórios quando comparados aos 15 dias pós-operatórios e o Grupo Nic exibiu maior BIC aos 60 dias pós-operatórios quando comparados aos 30 dias pós-operatórios ($p<0,05$; Tabela 2; Figura 1).

BA

A comparação intergrupos no mesmo período mostrou que o Grupo Veh/LLLT exibiu maior BA em comparação ao Grupo Veh, aos 15 e 60 dias pós-operatórios, e menor BA aos 30 dias pós-operatórios, quando comparado ao mesmo grupo ($p<0,05$; Tabela 3; Figura 1). O Grupo Nic exibiu menor BA em comparação ao Grupo Veh em todos os períodos experimentais estudados ($p<0,05$; Tabela 3; Figura 1). O Grupo Nic/LLLT apresentou menor BA em comparação ao Grupo Veh/LLLT aos 15 dias pós-operatórios e maior BA em comparação ao mesmo grupo aos 30 dias pós-operatórios ($p<0,05$; Tabela 3; Figura 1). O Grupo Nic/LLLT apresentou ainda maior BA em comparação ao Grupo Nic em todos os períodos experimentais estudados ($p<0,05$; Tabela 3; Figura 1). A comparação entre os

períodos no mesmo grupo mostrou que aos 30 dias pós-operatórios os grupos Veh/LLLT e Nic exibiram menor BA quando comparados aos 15 dias pós-operatórios ($p<0,05$; Tabela 3; Figura 1). Aos 60 dias pós-operatórios o Grupo Veh/LLLT exibiu menor BA quando comparado aos 15 dias pós-operatórios, enquanto o Grupo Nic/LLLT exibiu maior BA quando comparado ao mesmo período ($p<0,05$; Tabela 3; Figura 1). Todos os grupos exibiram maior BA aos 60 dias pós-operatórios quando comparados aos 30 dias pós-operatórios ($p<0,05$; Tabela 3; Figura 1).

Análise Histoquímica

A comparação intergrupos no mesmo período mostrou que o Grupo Nic/LLLT exibiu maior quantidade de fibras colágenas imaturas aos 15 e 30 dias pós-operatórios, e menor quantidade de fibras colágenas imaturas aos 60 dias pós-operatórios quando comparado ao Grupo Veh ($p<0,05$; Figura 2). O Grupo Nic/LLLT exibiu maior quantidade de fibras colágenas imaturas aos 30 dias pós-operatórios, e menor quantidade de fibras colágenas imaturas aos 60 dias pós-operatórios quando comparado ao Grupo Veh/LLLT ($p<0,05$; Figura 2). O Grupo Nic também exibiu menor quantidade de fibras colágenas imaturas aos 60 dias pós-operatórios quando comparado aos grupos Veh e Veh/LLLT ($p<0,05$; Figura 2). O Grupo Nic/LLLT ainda exibiu maior quantidade de fibras colágenas imaturas aos 15 e 30 dias pós-operatórios quando comparado ao Grupo Nic ($p<0,05$; Figura 2). A comparação entre os períodos no mesmo grupo mostrou que o Grupo Nic apresentou maior quantidade de fibras colágenas imaturas aos 30 dias pós-operatórios quando comparado aos 15 dias pós-operatórios ($p<0,05$; Figura 2). Os grupos Veh, Veh/LLLT e Nic exibiram maior quantidade de fibras colágenas imaturas aos 60 dias pós-operatórios quando comparados aos 30 dias pós-operatórios ($p<0,05$; Figura 2).

Análise Imunoistoquímica

Na análise imunoistoquímica de VEGF e HIF-1 α , para ambos os marcadores, o Grupo Veh exibiu padrão de imunomarcção predominantemente moderado, enquanto o Grupo Veh/LLLT exibiu padrão de imunomarcção predominantemente alto. O Grupo Nic exibiu padrão de imunomarcção baixo em todos os períodos experimentais estudados. E o Grupo Nic/LLLT exibiu padrão de imunomarcção moderado em todos os períodos experimentais estudados (Figura 3).

Na análise de BMP-2 o Grupo Veh mostrou padrão de imunomarcção moderado em todos os períodos experimentais estudados, enquanto o Grupo Veh/LLLT exibiu padrão de imunomarcção predominantemente alto, e o Grupo Nic exibiu padrão de imunomarcção predominantemente baixo. O Grupo Nic/LLLT exibiu padrão de imunomarcção moderado em todos os períodos experimentais estudados (Figura 4). Na análise quantitativa de RUNX-2, os animais dos grupos Veh/LLLT e Nic exibiram maior quantidade de células RUNX-2-positivas em comparação aos animais do Grupo Veh em todos os períodos experimentais estudados ($p \leq 0,05$; Figura 4). O Grupo Nic/LLLT apresentou maior quantidade de células RUNX2-positivas em comparação aos animais do Grupo Veh aos 60 dias pós-operatórios ($p \leq 0,05$; Figura 4).

A análise de OCN e ALP mostrou, para ambos os marcadores, moderado padrão de imunomarcção no Grupo Veh em todos os períodos experimentais estudados. O Grupo Veh/LLLT exibiu padrão de imunomarcção predominantemente alto, e o Grupo Nic exibiu padrão de imunomarcção predominantemente baixo. O Grupo Nic/LLLT exibiu padrão de imunomarcção moderado em todos os períodos experimentais estudados (Figura 5).

A análise dos reguladores locais da osteoclastogênese, RANKL e OPG, mostrou uma tendência ao aumento no padrão de imunomarcção de RANKL e diminuição no padrão de

imunomarcção de OPG no Grupo Nic em comparação ao Grupo Veh. Também foi observada uma tendência ao aumento no padrão de imunomarcção de RANKL no Grupo Veh/LLLT aos 60 dias pós-operatórios quando comparado ao Grupo Veh, enquanto a análise de OPG mostrou moderado padrão de imunomarcção para ambos os grupos, em períodos experimentais estudados. O Grupo Nic/LLLT mostrou uma tendência à diminuição no padrão de imunomarcção de RANKL e tendência ao aumento no padrão de imunomarcção de OPG em comparação com o Grupo NIC (Figura 6).

Na análise quantitativa de osteoclastos multinucleados e imunorreativos à TRAP foi observada maior quantidade células TRAP-positivas nas três primeiras roscas dos implantes nos animais do Grupo Veh/LLLT quando comparados aos animais do Grupo Veh, aos 30 e 60 dias pós-operatórios ($p \leq 0,05$; Figura 6). Os animais do Grupo Nic e Nic/LLLT também apresentaram maior quantidade células TRAP-positivas em comparação aos animais do Grupo Veh, aos 15 e 30 dias pós-operatórios ($p \leq 0,05$; Figura 6). Além disso, os animais dos Grupos Nic e Nic/LLLT apresentaram maior quantidade células TRAP-positivas aos 15 e 30 dias pós-operatórios e menor quantidade células TRAP-positivas aos 60 dias pós-operatórios em comparação aos animais do Grupo Veh/LLLT ($p \leq 0,05$; Figura 6).

Discussão

Este é o primeiro estudo que avaliou o efeito da LLLT no processo de reparo ósseo peri-implantar em ratos sistemicamente modificados pela nicotina. O uso do laser como método alternativo para facilitar a osteogênese de tecidos ósseos afetados pelo tabagismo foi proposto apenas em um estudo de Franco et al. (2013), em um modelo com defeitos ósseos em fêmur de ratos preenchidos por hidroxiapatita. Nele, os autores observaram que a inalação da fumaça do cigarro comprometeu a neoformação óssea enquanto o laser não foi capaz de

estimular a osteogênese no local, independentemente dos animais terem sido expostos ou não ao fumo passivo crônico.

No presente estudo, o processo de reparo ósseo peri-implantar foi avaliado através de análise biomecânica do torque necessário para romper a osseointegração, histológica, histométrica da porcentagem de BIC e BA, histoquímica do nível de maturação do colágeno e análise imunohistoquímica de HIF-1 α , VEGF, BMP-2, RUNX-2, OCN, ALP, RANKL, OPG e TRAP, dentro dos limites das roscas dos implantes.

A análise histométrica demonstrou que o Grupo Nic/LLLT apresentou BA aumentada quando comparada ao Grupo Nic em todos os períodos experimentais estudados e similar quando comparada ao Grupo Veh aos 15 e 30 dias pós-operatórios. Aos 60 dias pós-operatórios o Grupo Nic/LLLT ainda apresentou BA aumentada quando comparada ao Grupo Veh e similar quando comparada ao Grupo Veh/LLLT, demonstrando que a LLLT foi capaz de aumentar a neoformação óssea peri-implantar nos animais sistemicamente modificados pela nicotina a ponto de atingir o nível de regeneração óssea ocorrida nos animais sem comprometimento sistêmico, especialmente aos 60 dias pós operatórios.

Essa observação se faz importante por que poderia justificar os efeitos do laser nos animais sistemicamente comprometidos pela nicotina, aos 60 dias pós-operatórios, apresentados pela análise biomecânica da força necessária para romper a osseointegração. Nela, houve um aumento significativo no torque de remoção dos implantes no Grupo Nic/LLLT comparativamente aos grupos Veh e Veh/LLLT, embora tenham sido observadas similaridades entre os grupos Nic/LLLT e Nic aos 60 dias pós-operatórios. O teste de remoção dos implantes tem sido proposto para fornecer informações a respeito do grau de contato entre o osso e o implante (Kim et al. 2016). Interessantemente, neste estudo a análise histométrica de BIC mostrou similaridades entre os animais dos grupos Nic/LLLT e Nic em todos os períodos experimentais estudados, demonstrando que embora a LLLT tenha

produzido efeitos positivos no torque de remoção aos 60 dias pós-operatórios ela não foi capaz de influenciar o contato existente entre o tecido ósseo e o implante de titânio. Sob o ponto de vista dos autores deste estudo, a informação de que o torque de remoção está diretamente relacionado com o contato osso/implante deve ser tomada com cautela, uma vez o rompimento da osseointegração também pode ser influenciado pela quantidade e qualidade óssea no interior das roscas do implante.

A literatura relata que a LLLT exerce efeitos benéficos no processo de reparo ósseo peri-implantar e osseointegração uma vez que é capaz de aumentar o contato osso/implante, a produção de fibras colágenas e área de neoformação óssea no interior de suas roscas, aumentar o coeficiente de estabilidade e oferecer maior resistência ao torque de remoção do implante em diferentes modelos de estudo experimentais (Guzzardella et al. 2003; Pereira et al. 2009; Campanha et al. 2010; Maluf et al. 2010; Boldrini et al. 2013; Gomes et al. 2015; Mayer et al. 2015; Massotti et al. 2015). É possível considerar que estes resultados se devem aos efeitos positivos da ação do laser nos eventos relacionados com o metabolismo e processo de reparo ósseo (Petri et al. 2010). Tem sido sugerido que ele é capaz de promover a angiogênese (Szymanska et al. 2013; Góralczyk et al. 2015; Briteño-Vázquez et al. 2015), estimular a proliferação e diferenciação osteoblástica (Stein et al. 2005; Grassi et al. 2011; Tim et al. 2014; Tim et al. 2015), estimular a produção de colágeno (Massotti et al. 2015) e a formação de matriz óssea, bem como a mineralização e a maturação óssea (Fávaro-Pípi et al. 2011; de Souza Merli et al. 2012; Barbosa et al. 2013).

Em contra partida a nicotina promove severas alterações na angiogênese (Ma et al. 2008; Zheng et al. 2008; Ma et al. 2010), produção de colágeno (Yin et al. 2000, Wong & Martins-Green 2004), proliferação, diferenciação e maturação de osteoblastos (Theiss et al. 2000; Walker et al. 2001; Tanaka et al. 2005; Katono et al. 2006; Pereira et al. 2010; Rothem

et al. 2011), além de alterações no número de osteoclastos ativos, além da redução da sua área planar de reabsorção óssea (Tanaka et al. 2013), que podem contribuir para o atraso na osseointegração em fumantes (Berley et al. 2010; Yamano et al. 2010). Para avaliar o efeito do laser no processo de reparo ósseo peri-implantar frente à nicotina, os principais reguladores locais da angiogênese, osteoblastogênese, mineralização óssea, osteoclastogênese e ainda a quantidade de osteoclastos ativos foram analisados no presente estudo pelo método imunohistoquímico.

Os nossos resultados mostraram maiores padrões de imunomarcção de HIF1- α e VEGF nos animais do Grupo Nic/LLLT comparativamente aos do Grupo Nic em todos os períodos experimentais estudados, demonstrando que a LLLT influenciou positivamente os principais reguladores locais neoangiogênicos. Ainda foi observado que embora não tenha influenciado a quantidade de células imunorreativas a RUNX-2, houve um aumento no padrão de imunomarcção de BMP-2 nos animais do Grupo Nic/LLLT comparativamente aos do Grupo Nic aos 15 e 30 dias pós-operatórios, demonstrando influência positiva também na osteoblastogênese. Os efeitos positivos da ação do laser na formação e mineralização do tecido ósseo também foram confirmados pelo aumento no padrão de imunomarcção de OCN e ALP nos animais do Grupo Nic/LLLT em comparação aos do Grupo Nic em todos os períodos experimentais estudados. Por fim, a análise dos reguladores da reabsorção óssea mostrou que houve uma diminuição no padrão de imunomarcção para RANKL aos 15 e 30 dias pós-operatórios e um aumento no padrão de imunomarcção para OPG aos 30 e 60 dias pós-operatórios nos animais do Grupo Nic/LLLT comparados aos do Grupo Nic, embora a quantidade de osteoclastos multinucleados imunorreativos a TRAP não tenha se mostrado significativamente alterado, demonstrando que a LLLT também foi capaz de influenciar o processo de remodelação óssea nos animais tratados com nicotina. Esses achados demonstram que a LLLT foi capaz de regular positivamente os principais marcadores da neoangiogênese,

osteoblastogênese e biomineralização e remodelação óssea. Juntos, podem explicar o aumento da neoformação óssea nos animais do Grupo Nic/LLLT.

O efeito negativo da nicotina no processo de reparo ósseo peri-implantar foi comprovado pela diminuição da neoformação óssea e qualidade das suas trabéculas no interior das roscas dos implantes, embora não tenha sido capaz de reduzir o BIC e a força necessária para romper a osseointegração. Interessantemente, os animais tratados com nicotina também apresentaram maior torque de remoção quando comparados aos controles tratados com laser aos 60 dias pós-operatórios. Tais achados nunca foram antes relatados na literatura e não foi possível de serem explicados no presente estudo. Na análise histoquímica e imunoistoquímica foi observado atraso na produção dos elementos que compõem a matriz óssea, diminuição no padrão de imunomarcacão de HIF-1 α , VEGF, BMP-2, OCN, ALP e OPG, aumento no padrão de imunomarcacão de RANKL e aumento na quantidade de células imunorreativas a RUNX-2 e TRAP no Grupo Nic em relação ao Grupo Veh. Os resultados demonstram que a nicotina foi capaz de reduzir a angiogênese e a diferenciação osteoblástica, comprometendo a formação óssea, incluindo a produção de elementos da matriz, biomineralização e maturação óssea peri-implantar. Esses achados já foram discutidos anteriormente pelos mesmos autores em estudo prévio e corroboram outros estudos da literatura que também observaram efeito prejudicial da nicotina no processo de reparo ósseo peri-implantar (Berley et al. 2010; Yamano et al. 2010).

O laser não foi capaz de influenciar o torque de remoção dos implantes nem o contato osso implante, mas aumentou a neoformação óssea peri-implantar e maior qualidade das trabéculas nos animais do Grupo Veh/LLLT em comparação os animais do Grupo Veh. Adicionalmente, também foi observado aumento no padrão de imunomarcacão de HIF-1 α , VEGF, BMP-2, OCN, ALP, similaridades no padrão de imunomarcacão de RANKL e OPG e aumento na quantidade de células imunorreativas a RUNX-2 e TRAP no Grupo LLLT em

relação ao Grupo C, embora não tenha apresentado modificações nos elementos que compõem a matriz. Esses resultados demonstram que a LLLT foi capaz de aumentar a angiogênese e a diferenciação osteoblástica, promovendo a formação óssea, biomineralização e maturação óssea peri-implantar, acelerando a osseointegração.

Assim, dentro dos limites do presente estudo pode-se concluir que a LLLT foi capaz de promover o processo ósseo peri-implantar em animais modificados sistemicamente pela nicotina, compensando os seus efeitos negativos na osseointegração.

Agradecimentos

Os autores declaram não haver conflitos de interesse ou relações financeiras a quaisquer produtos envolvidos na pesquisa. O presente estudo foi desenvolvido no Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada e no Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP e no Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP. Este estudo também foi financiado pela organização governamental Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - São Paulo, SP, Brasil (FAPESP – processo nº 2012/00127-8). A aluna Paula L. Faleiros recebeu bolsa de estudo da FAPESP (processo nº 2013/11863-0). À DSP Biomedical® por fornecer os implantes para a execução desta pesquisa.

Referências

Balatsouka, D., Gotfredsen, K., Lindh, C.H. & Berglundh, T. (2005a) The impact of nicotine on bone healing and osseointegration. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 268-76. Erratum in: *Clinical Oral Implants Research* **16**: 387.

Balatsouka, D., Gotfredsen, K., Lindh, C.H. & Berglundh, T. (2005b) The impact of nicotine on osseointegration. An experimental study in the femur and tibia of rabbits. *Clinical Oral Implants Research* **16**: 389-395.

Barbosa, D., de Souza, R.A., Xavier, M., da Silva, F.F., Arisawa, E.A. & Villaverde, A.G. (2013) Effects of low-level laser therapy (LLLT) on bone repair in rats: optical densitometry analysis. *Lasers in Medical Science* **28**: 651-656.

Berley, J., Yamano, S. & Sukotjo, C. (2010) The effect of systemic nicotine on osseointegration of titanium implants in the rat femur. *Journal of Oral Implantology* **36**: 185-193.

Boldrini, C., de Almeida, J.M., Fernandes, L.A., Ribeiro, F.S., Garcia, V.G., Theodoro, L.H. & Pontes, A.E. (2013) Biomechanical effect of one session of low-level laser on the bone-titanium implant interface. *Lasers in Medical Science* **28**: 349-352.

Bonfante, S., Bosco, A.F., Luize, D.S., de Almeida, J.M., Cestari, T.M. & Taga, R. (2008) Influence of nicotine on healing process of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in rats. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **23**: 437-444.

Briteño-Vázquez, M., Santillán-Díaz, G., González-Pérez, M., Gallego-Izquierdo, T., Pecos-Martín, D., Plaza-Manzano, G. & Romero-Franco, N. (2015) Low power laser stimulation of the bone consolidation in tibial fractures of rats: a radiologic and histopathological analysis. *Lasers in Medical Science* **30**: 333-338.

Campanha, B.P., Gallina, C., Geremia, T., Loro, R.C., Valiati, R., Hübler, R. & de Oliveira, M.G. (2010) Low-level laser therapy for implants without initial stability. *Photomedicine and Laser Surgery* **28**: 365-369.

César-Neto, J.B., Benatti, B.B., Sallum, E.A. & Nociti, F.H. Jr. (2005) Bone density around titanium implants may benefit from smoking cessation: a histologic study in rats. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **20**: 713-719.

César-Neto, J.B., Duarte, P.M., Sallum, E.A., Barbieri, D., Moreno, H. Jr. & Nociti, F.H. Jr. (2003) A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *Journal of Periodontology* **74**: 1454-1459.

Chrcanovic, B.R., Albrektsson, T. & Wennerberg, A. (2015) Smoking and dental implants: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry* **43**: 487-498.

de Almeida, J.M., Theodoro, L.H., Bosco, A.F., Nagata, M.J., Bonfante, S. & Garcia, V.G. (2008) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *Journal of Periodontology* **79**: 2156-2165.

de Souza Merli, L.A., de Medeiros, V.P., Toma, L., Reginato, R.D., Katchburian, E., Nader, H.B. & Faloppa, F. (2012) The low level laser therapy effect on the remodeling of bone extracellular matrix. *Photochemistry and Photobiology* **88**: 1293-1301.

de Vasconcellos, L.M., Barbara, M.A., Deco, C.P., Junqueira, J.C., do Prado, R.F., Anbinder, A.L., de Vasconcellos, L.G., Cairo, C.A. & Carvalho, Y.R. (2014) Healing of normal and osteopenic bone with titanium implant and low-level laser therapy (GaAlAs): a histomorphometric study in rats. *Lasers in Medical Science* **29**: 575-580.

Donath, K. & Breuner, G. (1982) A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Säge-Schliff (sawing and grinding) technique. *Journal of Oral Pathology* **11**: 318-326.

Dörtbudak, O., Haas, R. & Mailath-Pokorny, G. (2002) Effect of low-power laser irradiation on bony implant sites. *Clinical Oral Implants Research* **13**: 288-292.

Faria, P.E., Okamoto, R., Bonilha-Neto, R.M., Xavier, S.P., Santos, A.C. & Salata, L.A. (2008) Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. *Clinical Oral Implants Research* **19**: 393-401.

Fávaro-Pípi, E., Ribeiro, D.A., Ribeiro, J.U., Bossini, P., Oliveira, P., Parizotto, N.A., Tim, C., de Araújo, H.S. & Renno, A.C. (2011) Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats. *Photomedicine and Laser Surgery* **29**: 311-317.

Fernandes, L.A., de Almeida, J.M., Theodoro, L.H., Bosco, A.F., Nagata, M.J., Martins, T.M., Okamoto, T. & Garcia, V.G. (2009) Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in immunosuppressed rats. *Journal of Clinical Periodontology* **36**: 219-228.

Franco, G.R., Laraia, I.O., Maciel, A.A., Miguel, N.M., Dos Santos, G.R., Fabrega-Carvalho, C.A., Pinto, C.A., Pettian, M.S & Cunha, M.R. (2013) Effects of chronic passive smoking on the regeneration of rat femoral defects filled with hydroxyapatite and stimulated by laser therapy. *Injury* **44**: 908-913.

Garcia, V.G., Gualberto Júnior, E.C., Fernandes, L.A., Bosco, A.F., Hitomi Nagata, M.J., Casatti, C.A., Ervolino, E. & Theodoro, L.H. (2013) Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *Journal of Periodontology* **84**: 556-565.

García-Morales, J.M., Tortamano-Neto, P., Todescan, F.F., de Andrade, J.C. Jr., Marotti, J. & Zezell, D.M. (2012) Stability of dental implants after irradiation with an 830-nm low-level laser: a double-blind randomized clinical study. *Lasers in Medical Science* **27**: 703-711.

Gomes, F.V., Mayer, L., Massotti, F.P., Baraldi, C.E., Ponzoni, D., Webber, J.B. & de Oliveira, M.G. (2015) Low-level laser therapy improves peri-implant bone formation: resonance frequency, electron microscopy, and stereology findings in a rabbit model. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **44**: 245-251.

Góralczyk, K., Szymańska, J., Łukowicz, M., Drela, E., Kotzbach, R., Dubiel, M., Michalska, M., Góralczyk, B., Zając, A. & Rość, D. (2015) Effect of LLLT on endothelial cells culture. *Lasers in Medical Science* **30**: 273-278.

Gotfredsen, K., Lindh, C.H. & Berglundh, T. (2009) Does longstanding nicotine exposure impair bone healing and osseointegration? An experimental study in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials* **91**: 918-923.

Grassi, F.R., Ciccolella, F., D'Apolito, G., Papa, F., Iuso, A., Salzo, A.E., Trentadue, R., Nardi, G.M., Scivetti, M., De Matteo, M., Silvestris, F., Ballini, A., Inchingolo, F., Dipalma, G., Scacco, S. & Tetè, S. (2011) Effect of low-level laser irradiation on osteoblast proliferation and bone formation. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* **25**: 603-614.

Guzzardella, G.A., Torricelli, P., Nicoli-Aldini, N. & Giardino, R. (2003) Osseointegration of endosseous ceramic implants after postoperative low-power laser stimulation: an in vivo comparative study. *Clinical Oral Implants Research* **14**: 226-232.

Jakse, N., Payer, M., Tangl, S., Berghold, A., Kirmeier, R. & Lorenzoni, M. (2007) Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants

following sinus augmentation. An experimental study on sheep. *Clinical Oral Implants Research* **18**: 517-524.

Kanno, C.M., Oliveira, J.A., Garcia, J.F., Castro, A.L. & Crivelini, M.M. (2008) Effects of cyclosporin, phenytoin, and nifedipine on the synthesis and degradation of gingival collagen in tuftedcapuchin monkeys (*Cebus apella*) histochemical and MMP-1 and -2 and collagen I gene expression analyses. *Journal of Periodontology* **79**: 114-122.

Karu, T. (1989) Photobiology of low-power laser effects. *Health Physics* **56**: 691-704.

Katono, T., Kawato, T., Tanabe, N., Suzuki, N., Yamanaka, K., Oka, H., Motohashi, M. & Maeno, M. (2006) Nicotine treatment induces expression of matrix metalloproteinases in human osteoblastic Saos-2 cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **38**: 874-882.

Khadra, M., Rønold, H.J., Lyngstadaas, S.P., Ellingsen, J.E. & Haanaes, H.R. (2004) Low-level laser therapy stimulates bone-implant interaction: an experimental study in rabbits. *Clinical Oral Implants Research* **15**: 325-332.

Kilkenny, C., Browne, W.J., Cuthill, I.C., Emerson, M. & Altman, D.G. (2010) Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* **1**: 94-99.

Kim, J.R., Kim, S.H., Kim, I.R., Park, B.S. & Kim, Y.D. (2016) Low-level laser therapy affects osseointegration in titanium implants: resonance frequency, removal torque, and histomorphometric analysis in rabbits. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **42**: 2-8.

Kim, Y.D., Kim, S.S., Hwang, D.S., Kim, S.G., Kwon, Y.H., Shin, S.H., Kim, U.K., Kim, J.R. & Chung, I.K. (2007) Effect of low-level laser treatment after installation of dental

titanium implant-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: an experimental study in rats. *Lasers in Surgery and Medicine* **39**: 441-450.

Lopes, C.B., Pinheiro, A.L., Sathaiyah, S., Duarte, J. & Cristinamartins, M. (2005) Infrared laser light reduces loading time of dental implants: a Raman spectroscopic study. *Photomedicine and Laser Surgery* **23**: 27-31.

Ma, L., Zheng, L.W. & Cheung, L.K. (2008) Influence of nicotine on blood perfusion and bone healing during distraction osteogenesis. *Annals of the Royal Australasian College of Dental Surgeons* **19**: 52-54.

Ma, L., Zheng, L.W., Sham, M.H. & Cheung, L.K. (2010) Uncoupled angiogenesis and osteogenesis in nicotine-compromised bone healing. *Journal of Bone and Mineral Research* **25**: 1305-1313.

Maluf, A.P., Maluf, R.P., Brito, Cda R., França, F.M., de Brito, R.B. Jr. (2010) Mechanical evaluation of the influence of low-level laser therapy in secondary stability of implants in mice shinbones. *Lasers in Medical Science* **25**: 693-698.

Massotti, F.P., Gomes, F.V., Mayer, L., de Oliveira, M.G., Baraldi, C.E., Ponzoni, D. & Puricelli, E. (2015) Histomorphometric assessment of the influence of low-level laser therapy on peri-implant tissue healing in the rabbit mandible. *Photomedicine and Laser Surgery* **33**: 123-128.

Mayer, L., Gomes, F.V., Carlsson, L. & Gerhardt-Oliveira, M. (2015) Histologic and resonance frequency analysis of peri-implant bone healing after low-level laser therapy: An In Vivo Study. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **30**: 1028-1035.

Nociti Júnior, F.H., Cesar Neto, J.B., Carvalho, M.D., Sallum, E.A. & Sallum, A.W. (2002) Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *Journal of Periodontology* **73**: 982-987.

Okamoto, M., Kita, T., Okuda, H., Tanaka, T. & Nakashima, T. (1994) Effects of aging on acute toxicity of nicotine in rats. *Pharmacology & Toxicology* **75**: 1-6.

Pereira, C.L., Sallum, E.A., Nociti, F.H. Jr. & Moreira, R.W. (2009) The effect of low-intensity laser therapy on bone healing around titanium implants: a histometric study in rabbits. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **24**: 47-51.

Pereira, M.L., Carvalho, J.C., Peres, F. & Fernandes, M.H. (2010) Simultaneous effects of nicotine, acrolein, and acetaldehyde on osteogenic-induced bone marrow cells cultured on plasma-sprayed titanium implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **25**: 112-22.

Petri, A.D., Teixeira, L.N., Crippa, G.E., Beloti, M.M., de Oliveira, P.T. & Rosa, A.L. (2010) Effects of low-level laser therapy on human osteoblastic cells grown on titanium. *Brazilian Dental Journal* **21**: 491-498.

Rothem, D.E., Rothem, L., Dahan, A., Eliakim, R. & Soudry, M. (2011) Nicotinic modulation of gene expression in osteoblast cells, MG-63. *Bone* **48**: 903-909.

Sakakura, C.E., Margonar, R., Holzhausen, M., Nociti, F.H. Jr., Alba, R.C. Jr., Marcantonio, E. Jr. (2003) Influence of cyclosporin A therapy on bone healing around titanium implants: a histometric and biomechanic study in rabbits. *Journal of Periodontology* **74**: 976-981.

Stefani, C.M., Nogueira, F., Sallum, E.A., de, T.S., Sallum, A.W. & Nociti, F.H. Jr. (2002) Influence of nicotine administration on different implant surfaces: a histometric study in rabbits. *Journal of Periodontology* **73**: 206-212.

Stein, A., Benayahu, D., Maltz, L. & Oron, U. (2005) Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomedicine and Laser Surgery* **23**: 161-166.

Szymanska, J., Goralczyk, K., Klawe, J.J., Lukowicz, M., Michalska, M., Goralczyk, B., Zalewski, P., Newton, J.L., Gryko, L., Zajac, A. & Rosc, D. (2013) Phototherapy with low-level laser influences the proliferation of endothelial cells and vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta secretion. *Journal of Physiology and Pharmacology* **64**: 387-391.

Tanaka, H., Tanabe, N., Kawato, T., Nakai, K., Kariya, T., Matsumoto, S., Zhao, N., Motohashi, M. & Maeno, M. (2013) Nicotine affects bone resorption and suppresses the expression of cathepsin K, MMP-9 and vacuolar-type H(+)-ATPase d2 and actin organization in osteoclasts. *PLoS One* **8**: e59402.

Tanaka, H., Tanabe, N., Suzuki, N., Shoji, M., Torigoe, H., Sugaya, A., Motohashi, M. & Maeno, M. (2005) Nicotine affects mineralized nodule formation by the human osteosarcoma cell line Saos-2. *Life Sciences* **77**: 2273-2284.

Theiss, S.M., Boden, S.D., Hair, G., Titus, L., Morone, M.A. & Ugbo, J. (2000) The effect of nicotine on gene expression during spine fusion. *Spine* **25**: 2588-2594.

Tim, C.R., Bossini, P.S., Kido, H.W., Malavazi, I., von Zeska Kress, M.R., Carazzolle, M.F., Parizotto, N.A. & Rennó, A.C. (2015) Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes during the initial stages of bone healing in rats: a microarray analysis. *Lasers in Medical Science* **30**: 2325-2333.

Tim, C.R., Pinto, K.N., Rossi, B.R., Fernandes, K., Matsumoto, M.A., Parizotto, N.A. & Rennó, A.C. (2014) Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. *Lasers in Medical Science* **29**: 147-156.

Tinti, F. & Soory, M. (2013) Oxidative actions of hydrogen peroxide in human gingival and oral periosteal fibroblasts: responses to glutathione and nicotine, relevant to healing in a redox environment. *Redox Biology* **2**: 36-43.

Walker, L.M., Preston, M.R., Magnay, J.L., Thomas, P.B. & El Haj, A.J. (2001) Nicotinic regulation of c-fos and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. *Bone* 2001 **28**: 603-608.

Wong, L.S. & Martins-Green, M. (2004) Firsthand cigarette smoke alters fibroblast migration and survival: implications for impaired healing. *Wound Repair and Regeneration* **12**: 471-484.

Yamano, S., Berley, J.A., Kuo, W.P., Gallucci, G.O., Weber, H.P. & Sukotjo, C. (2010) Effects of nicotine on gene expression and osseointegration in rats. *Clinical Oral Implants Research* **21**: 1353-1359.

Yin, L., Morita, A. & Tsuji, T. (2000) Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. *Archives of Dermatological Research* **292**: 188-194.

Zheng, L.W., Ma, L. & Cheung, L.K. (2008) Changes in blood perfusion and bone healing induced by nicotine during distraction osteogenesis. *Bone* **43**: 355-361.



Tabelas – Capítulo 3

Tabela 1: Médias e desvios padrão ($M \pm DP$) dos dados de contra torque ($N.cm^2$), nas interações entre Grupos e Períodos.

| Grupos | Períodos | | |
|----------|--------------|---------------|-------------------|
| | 15 dias | 30 dias | 60 dias |
| Veh | 11,25 ± 2,77 | 11,4 ± 2,24 | 16,00 ± 3,69 |
| Veh/LLLT | 11,5 ± 2,07 | 13,25 ± 4,65 | 13,75 ± 1,92 |
| Nic | 9,25 ± 1,92 | 12,6 ± 1,35 ‡ | 17,25 ± 2,48 †‡# |
| Nic/LLLT | 9,16 ± 1,34 | 14,4 ± 2,72‡ | 21,83 ± 1,21 *†‡# |

Comparação intergrupos no mesmo período:

* Diferença significativa com Grupo Veh. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

† Diferença significativa com Grupo Veh/LLLT. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Comparação entre os períodos no mesmo grupo:

‡ Diferença significativa com 15 dias pós-operatórios. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Diferença significativa com 30 dias pós-operatórios. ANOVA, seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 2: Médias e desvios padrão ($M \pm DP$) de contato osso/implantes (BIC, %) nas três primeiras roscas, na mesial e distal, para cada grupo e período.

| Grupos | Períodos | | |
|----------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 15 dias | 30 dias | 60 dias |
| Veh | 72.798 \pm 3.942 | 73.778 \pm 5.974 | 72.460 \pm 10.878 |
| Veh/LLLT | 75.693 \pm 5.948 | 69.602 \pm 7.529 | 77.885 \pm 11.592 |
| Nic | 64.287 \pm 13.791† | 63.813 \pm 8.959 | 76.614 \pm 7.285 #‡ |
| Nic/LLLT | 54.113 \pm 20.342 *† | 60.195 \pm 18.059 * | 71.030 \pm 4.543 # |

Comparação intergrupos no mesmo período:

* Diferença significativa com o Grupo Veh. ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

† Diferença significativa com o Grupo Veh/LLLT. ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Comparação entre os períodos no mesmo grupo:

Diferença significativa com 15 dias. ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

‡ Diferença significativa com 30 dias. ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$)

Tabela 3: Médias e desvios padrão ($M \pm DP$) de área óssea (BA, %) dentro das três primeiras roscas dos implantes, na mesial e distal, para cada grupo e período.

| Grupos | Períodos | | |
|----------|-----------------------|------------------------|-------------------------|
| | 15 dias | 30 dias | 60 dias |
| Veh | 78.831 \pm 5.768 | 77.080 \pm 3.954 | 82.775 \pm 5.785 s |
| Veh/LLLT | 96.329 \pm 1.728 * | 70.788 \pm 1.363 *‡ | 90.015 \pm 5.967 *‡s |
| Nic | 71.036 \pm 1.971 *† | 65.102 \pm 2.028 *†‡ | 74.074 \pm 1.182 *†s |
| Nic/LLLT | 79.048 \pm 4.147 †# | 77.730 \pm 9.635 †# | 94.423 \pm 1.049 *#‡s |

Comparação intergrupos no mesmo período:

* Diferença significativa com o Grupo Veh. ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

† Diferença significativa com o Grupo Veh/LLLT. ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Diferença significativa com o Grupo Nic. ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

Comparação entre os períodos no mesmo grupo:

‡ Diferença significativa com 15 dias. ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

s Diferença significativa com 30 dias. ANOVA seguido de Tukey ($p \leq 0,05$).

The background of the slide is a light purple and pink histological image, showing cross-sections of biological tissue, likely from the digestive tract, stained with hematoxylin and eosin (H&E). The tissue shows various cellular structures and layers.

Figuras – Capítulo 3

Figura 1: Fotomicrografias evidenciando o tecido ósseo neoformado nas roscas dos implantes nos grupos Nic (A, C e E) e Nic/LLLT (B, D e F) aos 15 (A-B), 30 (C-D) e 60 (E-F) dias pós-operatórios. Abreviações: to, tecido ósseo. Coloração: H&E.

Figura 2: Nível de maturação das fibras colágenas. (A) Gráfico mostrando média e desvios-padrão da porcentagem de fibras colágenas maduras e imaturas nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios, com comparação intergrupos e intragrupos: * Diferença significativa com Grupo Veh no mesmo período ($p \leq 0,05$), † Diferença significativa com Grupo Veh/LLLT no mesmo período ($p \leq 0,05$); ‡ Diferença significativa com Grupo Nic no mesmo período ($p \leq 0,05$); # Diferença significativa com 15 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); s Diferença significativa com 30 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$). (B-G) Fotomicrografias evidenciando fibras colágenas maduras e imaturas nos grupos Nic (B, D e F) e Nic/LLLT (C, E e G), aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. Abreviações: to, tecido ósseo. Coloração: Vermelho picrossirius visualizado em microscopia de luz polarizada.

Figura 3: Imunomarcação para HIF-1 α e VEGF. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcação (mediana e desvio interquartil dos escores) para HIF-1 α nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcação (mediana e desvio interquartil dos escores) para VEGF nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (C-D) Fotomicrografias evidenciando as células HIF-1 α -positivas (C) e VEGF-positivas (D) no grupo Nic/LLLT, aos 15 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

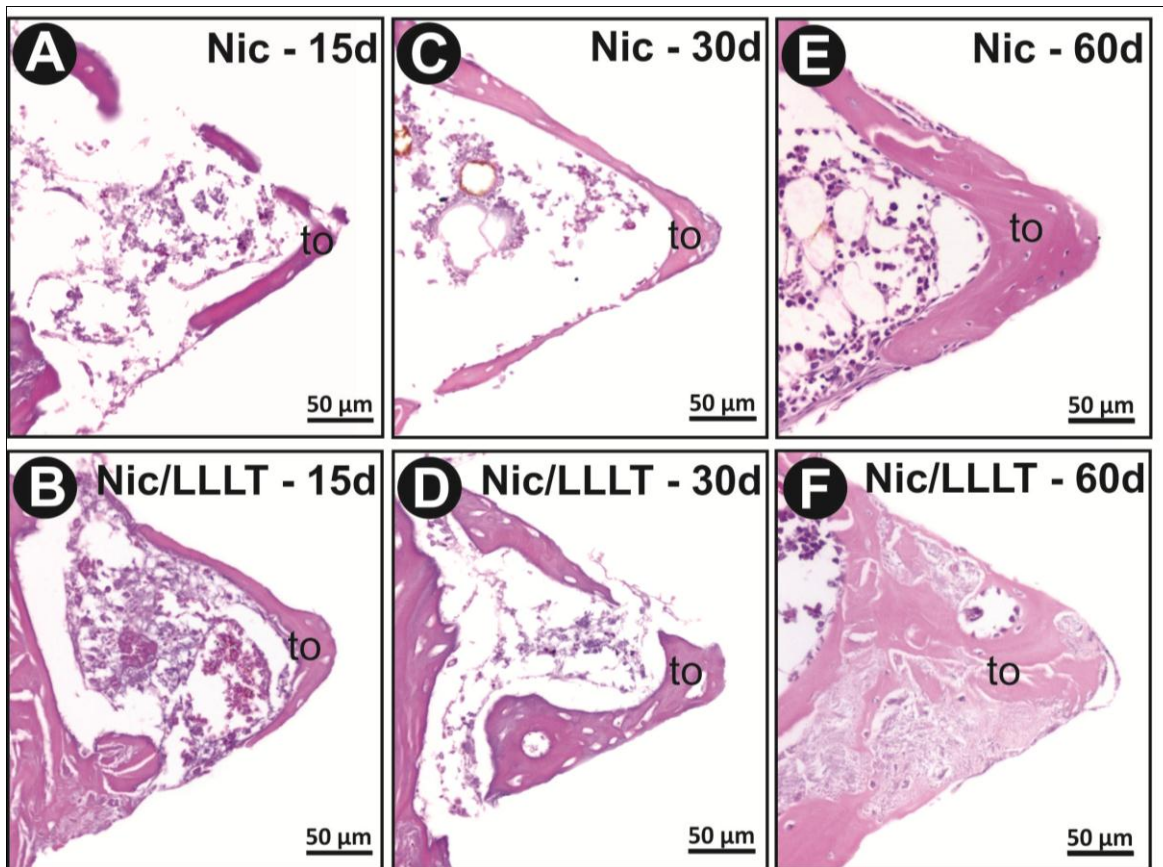
Figura 4: Imunomarcação para BMP-2 e RUNX-2. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcação (mediana e desvio interquartil dos escores) para BMP-2 nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B) Gráfico mostrando o

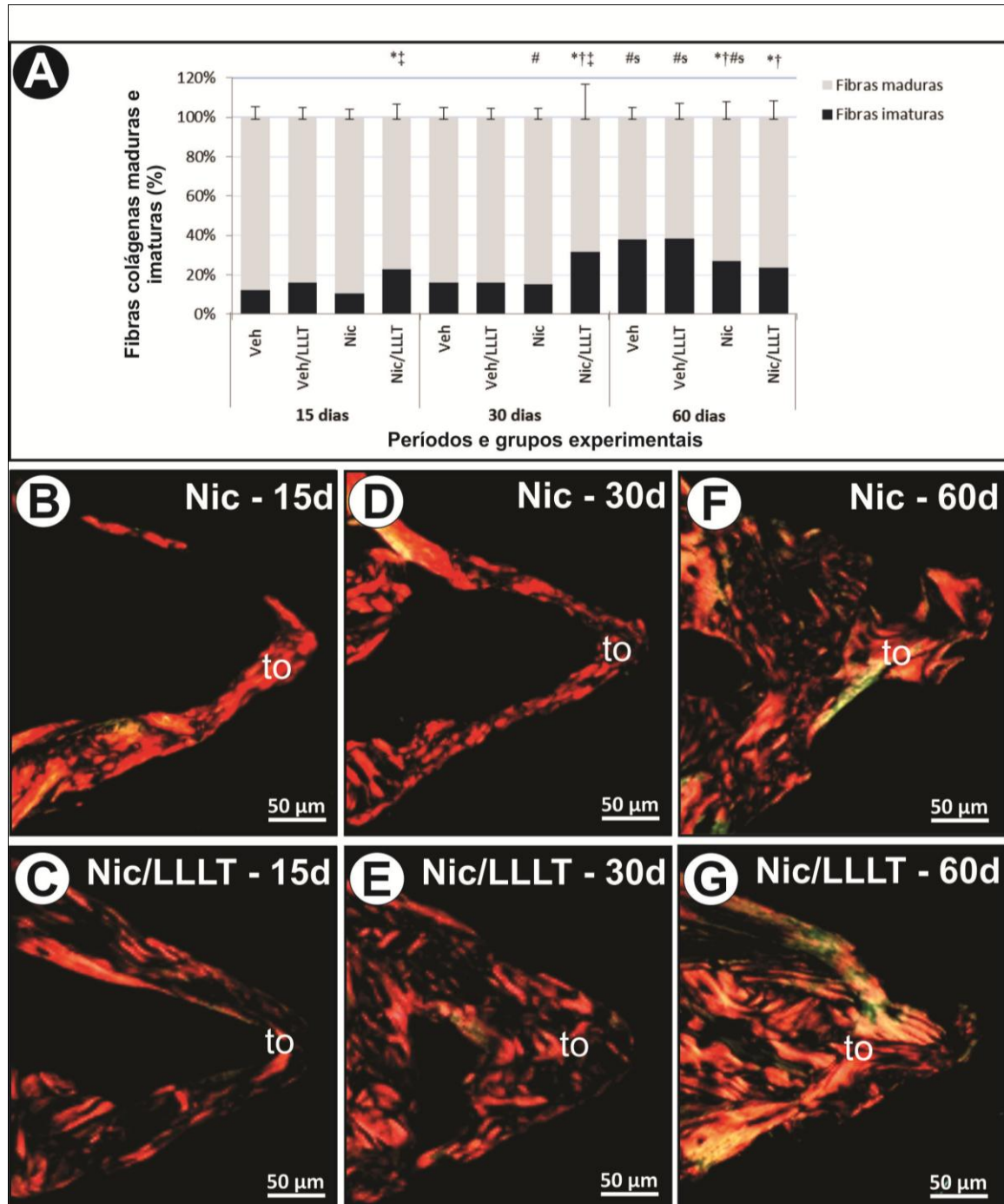
padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para RUNX-2 nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (C-D) Fotomicrografias evidenciando as células BMP-2-positivas (C) e RUNX-2-positivas (D) no grupo Nic/LLLT, aos 30 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: (C) Hematoxilina de Harris e (D) fast green.

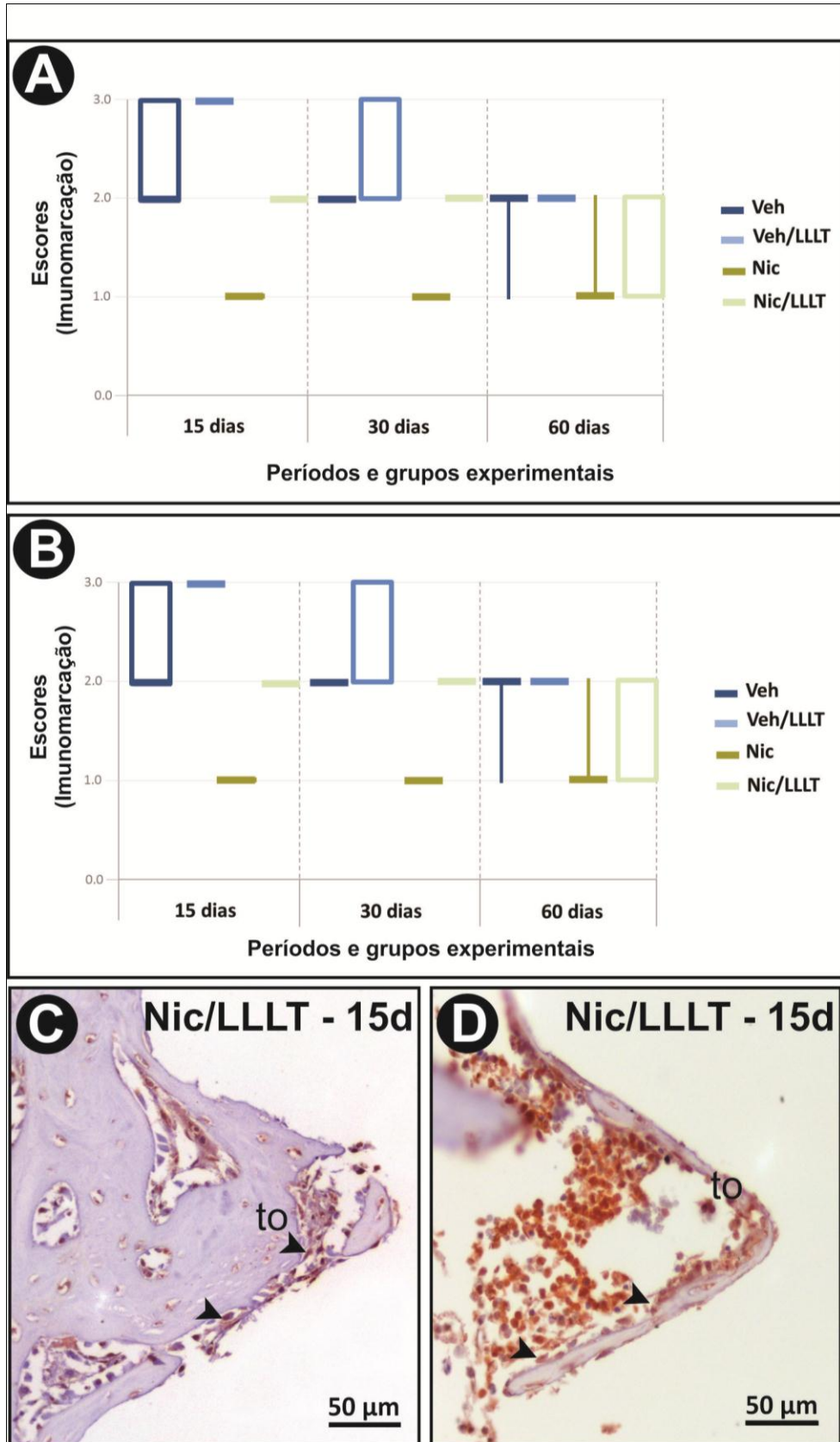
Figura 5: Imunomarcção para OCN e ALP. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para OCN nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para ALP nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (C-D) Fotomicrografias evidenciando as células OCN-positivas (C) e ALP-positivas (D) no grupo Nic/LLLT, aos 30 dias pós-operatórios. Abreviações e Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

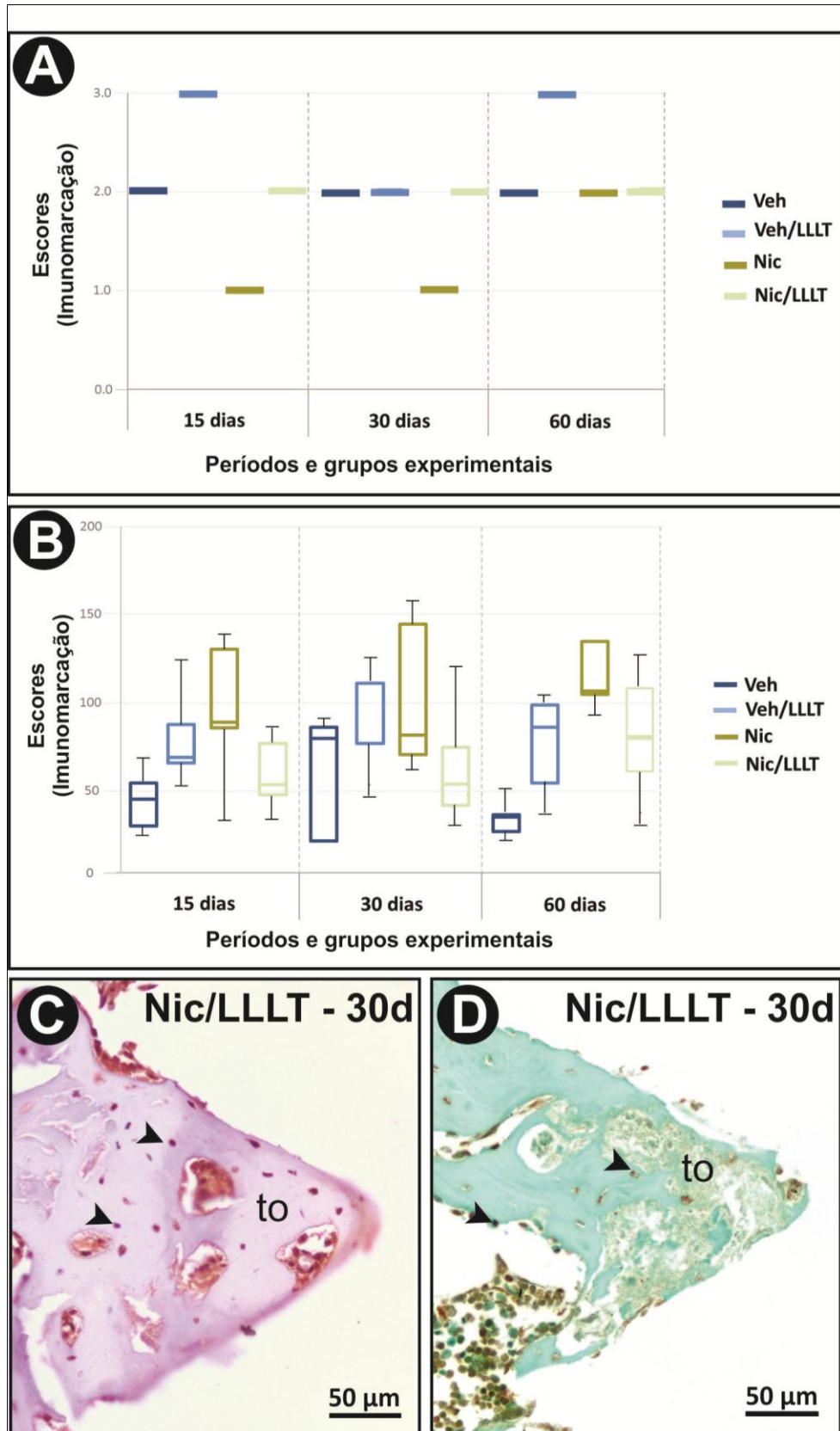
Figura 6: Imunomarcção para RANKL, OPG e TRAP. (A) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para RANKL nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (B) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para OPG nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (C) Gráfico mostrando o padrão de imunomarcção (mediana e desvio interquartil dos escores) para TRAP nos grupos Veh, Veh/LLLT, Nic e Nic/LLLT, aos 15, 30 e 60 dias pós-operatórios. (D-E) Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção das células RANKL-positivas (D), OPG-positivas (E) e TRAP-positivas (F) aos 60 dias pós-operatórios. Abreviações e

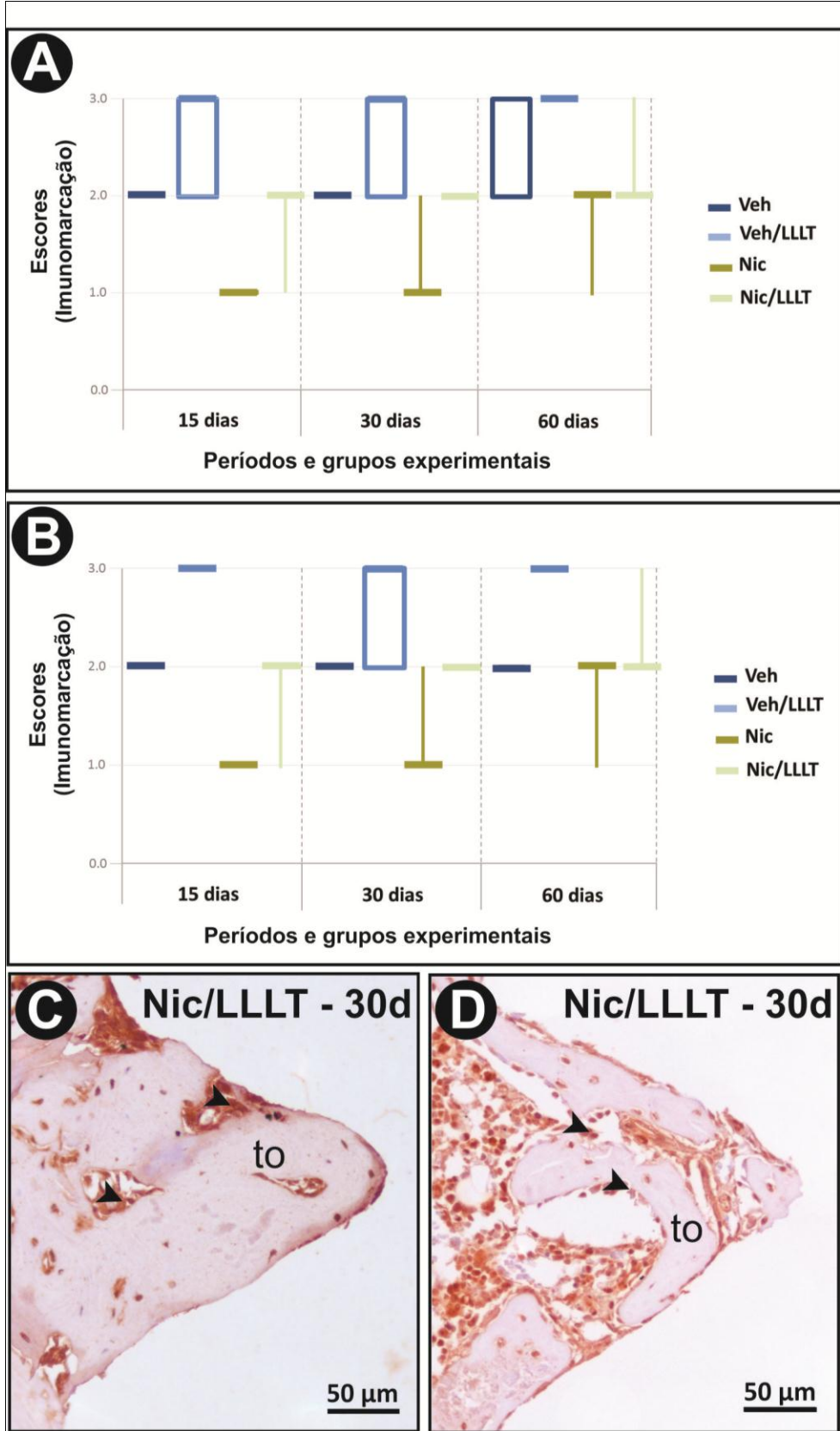
Símbolos: setas, células imunomarcadas; to, tecido ósseo. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris.

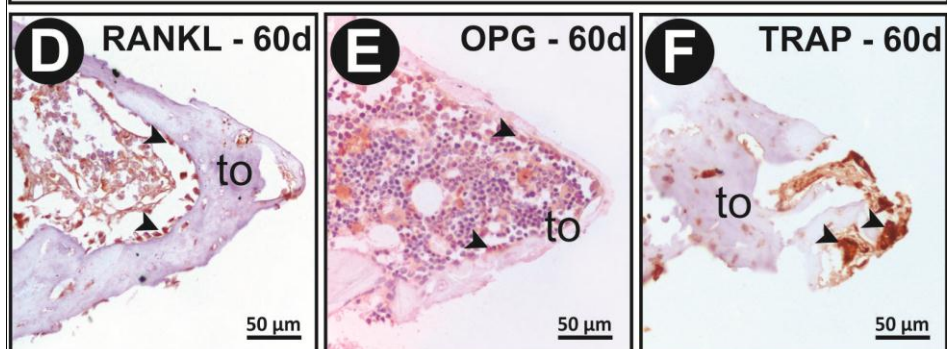
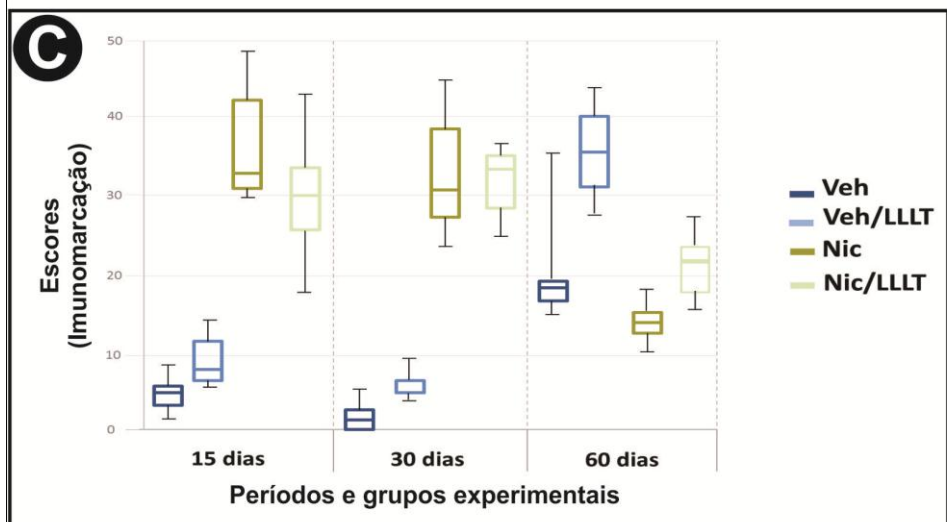
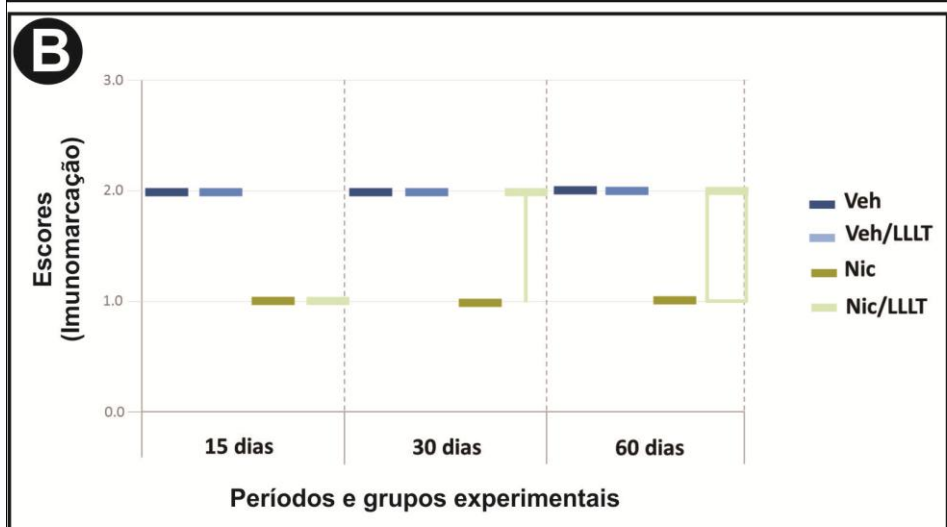
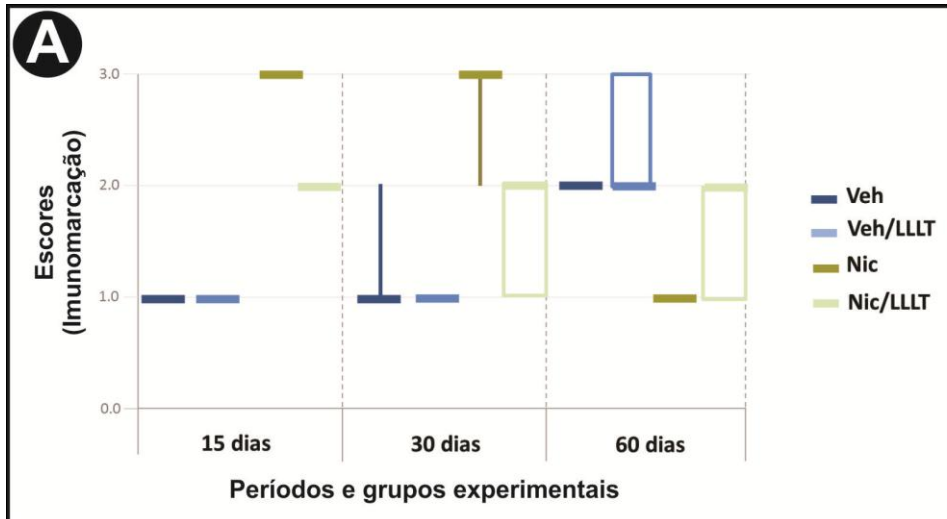












*Certificado do Comitê de Ética
no Uso de Animais (CEUA)*

Anexo A



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

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"Influência da nicotina na osseointegração de implantes instalados em tibia de ratos: Avaliação biomecânica, histológica, histométrica e imunoistoquímica"** sob responsabilidade do Pesquisador **ÁLVARO FRANCISCO BOSCO** e colaboração de Juliano Milanezi de Almeida, Valdir Gouveia Garcia, Letícia Helena Theodoro, Maria José Hitomi Nagata, Paula Lazilha Faleiros e Mariellen Longo está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **00934-2012**.

CERTIFICATE

We certify that the research **"Influence of nicotine on osseointegration of implants installed in the tibia of rats: Evaluation biomechanical, histological, immunohistochemical and histometric"**, process number **00934-2012**, under responsibility of **ÁLVARO FRANCISCO BOSCO** and with collaboration of Juliano Milanezi de Almeida, Valdir Gouveia Garcia, Letícia Helena Theodoro, Maria José Hitomi Nagata, Paula Lazilha Faleiros and Mariellen Longo agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.


Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli
CEUA Coordinator

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária - Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal - Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba - SP
Tel (18) 3636-1440 Fax (18) 3636-1403 E-mail: fabianocadioli@fmva.unesp.br

*Normas para publicação do
Periódico “Clinical Oral
Implants Research”*

Anexo B

A vertical histological section of tissue, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E), showing various cellular structures and tissue layers. The image is partially obscured by a vertical purple band on the right side, which serves as a background for the text.

Clinical Oral Implants Research

© John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd



Edited By: Niklaus P. Lang

Impact Factor: 3.889


ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2014: 3/88 (Dentistry Oral Surgery & Medicine); 8/76 (Engineering Biomedical)

Online ISSN: 1600-0501

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: [1. General](#), [2. Ethical Guidelines](#), [3. Submission of Manuscripts](#), [4. Manuscript Types Accepted](#), [5. Manuscript Format and Structure](#), [6. After Acceptance](#).

Useful Websites: [Submission Site](#), [Articles published in *Clinical Oral Implants Research*](#), [Author Services](#), [Wiley's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against  previously published works.

1. GENERAL

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

Clinical Oral Implants Research publishes:

Original research articles of high scientific merit in the field of material sciences, physiology of wound healing, biology of tissue integration of implants, diagnosis and treatment planning, prevention of pathologic processes jeopardizing the longevity of implants, clinical trials on implant systems, stoma-tognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation.

Review articles by experts on new developments in basic sciences related to implant dentistry and clinically applied concepts.

Case reports and case series only if they provide or document new fundamental knowledge.

Novel developments if they provide a technical novelty for any implant system.

Short communications of important research findings in a concise format and for rapid publication.

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Clinical Oral Implants Research*. Authors are encouraged to visit [Wiley-Blackwell Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Clinical Oral Implants Research adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal. ALL named authors must have made an active contribution to the conception and design and/or analysis and interpretation of the data and/or the drafting of the paper and ALL must have critically reviewed its content and have approved the final version submitted for publication. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship.

Clinical Oral Implants Research adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

Up to 6 authors are accepted without need for justification. In the case of a specific and detailed justification of the role of every author, up to 8 authors may be mentioned. It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association [Declaration of Helsinki](#) (version, 2008) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must

be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editor reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material.

Clinical Oral Implants Research encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.4 Conflict of Interest and Source of Funding

Clinical Oral Implants Research requires that sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest noted. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included. Information concerning conflict of interest and sources of funding should be included under Acknowledgements.

2.5 Appeal of Decision

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

2.6 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.7 Copyright Assignment

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere.

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

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements(OAA):

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the Online Open option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

For RCUK and Wellcome Trust authors click on the link below to preview the terms and conditions of this license:

Creative Commons Attribution License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

2.8 OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at:

https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts.

Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from the Editorial Office at CLRoffice@wiley.com.

3.1. Getting Started

Launch your web browser and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>

- Log-in or click the 'Create Account' option if you are a first-time user.
- If you are creating a new account.
 - After clicking on 'Create Account', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.
- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/coir> and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select Corresponding Author Center.

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged in, click the 'Submit a Manuscript' link in the menu bar.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop-down menu next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before sending to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Single Blind Review

All manuscripts submitted to *Clinical Oral Implants Research* will be reviewed by two experts in the field. *Clinical Oral Implants Research* uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.5. Suggest a Reviewer

Clinical Oral Implants Research attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of one potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the journal editor will choose one or two reviewers as well.

3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.7. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation email after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our email server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.9. Submission of Revised Manuscripts

To submit your revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original research articles of high scientific merit in the field of material sciences, physiology of wound healing, biology of tissue integration of implants, diagnosis and treatment planning, prevention of pathologic processes jeopardizing the longevity of implants, clinical trials on implant systems, stomatognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation.

Review articles by experts on new developments in basic sciences related to implant dentistry and clinically applied concepts. Reviews are generally by invitation only and have to be approved by the Editor-in-Chief before submission.

Case reports and case series, but only if they provide or document new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician.

Novel developments if they provide a technical novelty for any implant system.

Short communications of important research findings in a concise format and for rapid publication.

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

Proceedings of international meetings may also be considered for publication at the discretion of the Editor.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 10 published pages are subject to a charge of USD 160 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters (excluding figures and tables).

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language might choose to have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro*, *in vivo*, *in situ* and other Latin expressions are to be italicised. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point and not a comma will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of Webster's third new international dictionary will be adhered to.

Scientific Names: Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined on the typescript. The full proper name (e.g., *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e.g., *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e.g., streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalised and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e.g., *Ps.* for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names. If a proprietary name is used, it must be attached when the term is first used.

5.2. Structure

All manuscripts submitted to *Clinical Oral Implants Research* should include Title Page, Abstract, Main Text and Acknowledgements, Tables, Figures and Figure Legends as appropriate.

Title Page: should contain the title of the article, full name(s) of the authors (no more than 6) and institutional affiliation(s), a running title not exceeding 60 letters and spaces, and the name, telephone and fax numbers, email and complete mailing address of the author responsible for correspondence. The author must list appropriate key words for indexing purposes.

Abstract: should not to exceed 250 words. This should be structured into: objectives, material and methods, results, conclusions, and no other information.

Main Text of Original Research Article should include Introduction, Material and Methods, Results and Discussion.

Introduction: Summarise the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively. State clearly the working hypothesis.

Material and Methods: Material and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.

Results: Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all data in the tables and illustrations. The important observations should be emphasised.

Discussion: Summarise the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

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

Acknowledgements: Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support should be acknowledged.

5.3. References

References should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Black & Miller 1988). Three or more authors should always be referred to as, for example, (Fox et al. 1977).

A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in Units, symbols and abbreviations: a guide for biological and medical editors and authors (1988), p. 52, London: The Royal Society of Medicine.

The arrangement of the references should be alphabetical by author's surname.

The order of the items in each reference should be:

- (i) for journal references:
name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.
- (ii) for book references:
name(s) of author(s), year, title of book, edition, volume, chapter and/ or page number, town of publication, publisher.

Author's names should be arranged thus: Daniels, J.A., Kelly, R.A. & Til, T.C.

Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Author's names when repeated in the next reference are always spelled out in full.

The year of publication should be surrounded by parentheses: (1966).

The title of the paper should be included, without quotation marks.

The journal title should be written in full, italicised, and followed by volume number in bold type, and page numbers.

Examples:

Tonetti, M. S., Schmid, J., Hämmerle, C. H. & Lang, N. P. (1993) Intraepithelial antigen-presenting cells in the keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. *Clinical Oral Implants Research* **4**: 177-186.

Poole, B., Ohkuma, S. & Warburton, M. (1978) Some aspects of the intracellular breakdown of erogenous and endogenous proteins. In: Segal, H.S. & Doyle, D.J., eds. Protein turnover and lysosome function, 1st edition, p. 43. New York: Academic Press.

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Figures: All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single-column width (81 mm) after reduction, although in exceptional cases 120mm (double-column) and 168 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed. Each figure should have a legend

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley-Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document

format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

Articles should not normally exceed 10 printed pages, including illustrations and references. Additional pages will be charged to the author(s) at the rate of USD 160 per page.

6.2 Early View (Publication Prior to Print)

Clinical Oral Implants Research is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3 Author Services

Online production tracking is available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including