

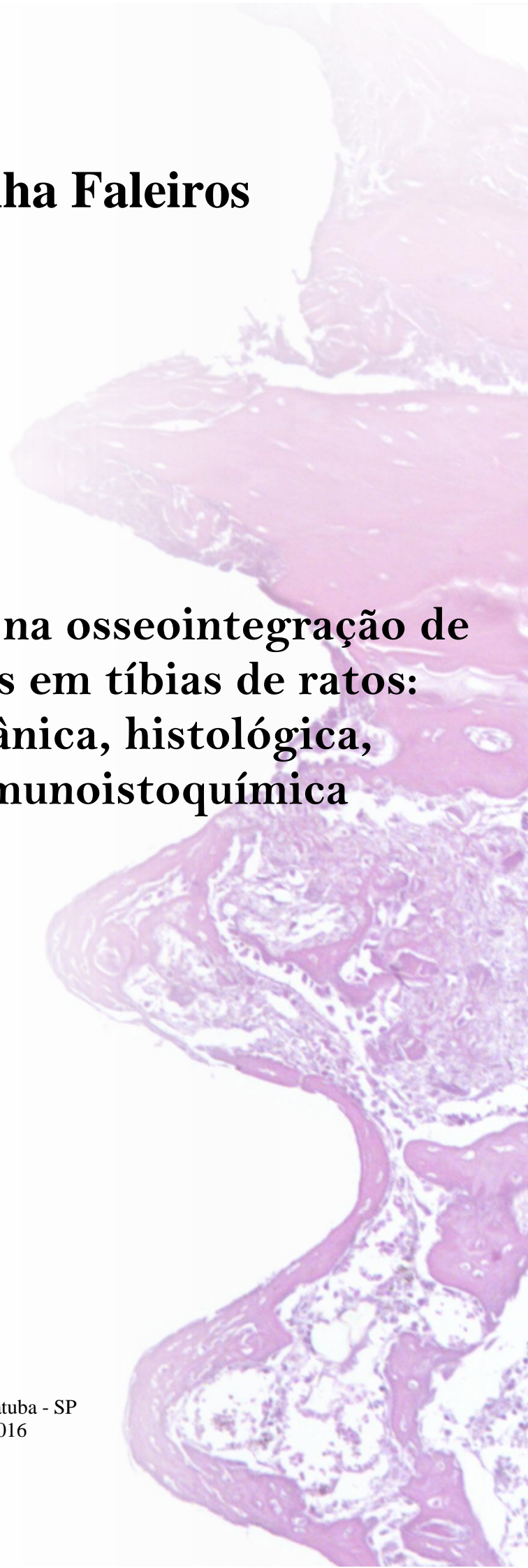
RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 05/07/2018.

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

A microscopic image showing three distinct tissue sections stained with hematoxylin and eosin (H&E). The sections are arranged horizontally across the top of the page. The leftmost section shows a dense, cellular structure. The middle section shows a more organized, layered structure. The rightmost section shows a highly cellular, possibly neoplastic, structure. A semi-transparent purple vertical bar is overlaid on the right side of the image, containing the text 'Dedicatória'.

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 image displays three vertical panels of histological sections of the endometrium, stained with hematoxylin and eosin (H&E). The top panel shows a thin, regenerative endometrium with a simple, unilaminar structure. The middle panel shows a thickened endometrium with a complex, coiled structure, characteristic of the proliferative phase. The bottom panel shows a thickened endometrium with a complex, coiled structure, characteristic of the secretory phase. The text 'Agradecimentos Especiais' is overlaid on the right side of the image.

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 is a composite of microscopic images of tissue sections, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E). The images show various cellular structures, including what appears to be the nucleus of a cell in the lower-left section, and other cellular components in the upper-right section. The colors are primarily shades of purple and pink. A semi-transparent white vertical bar is positioned on the right side of the slide, containing the text.

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.

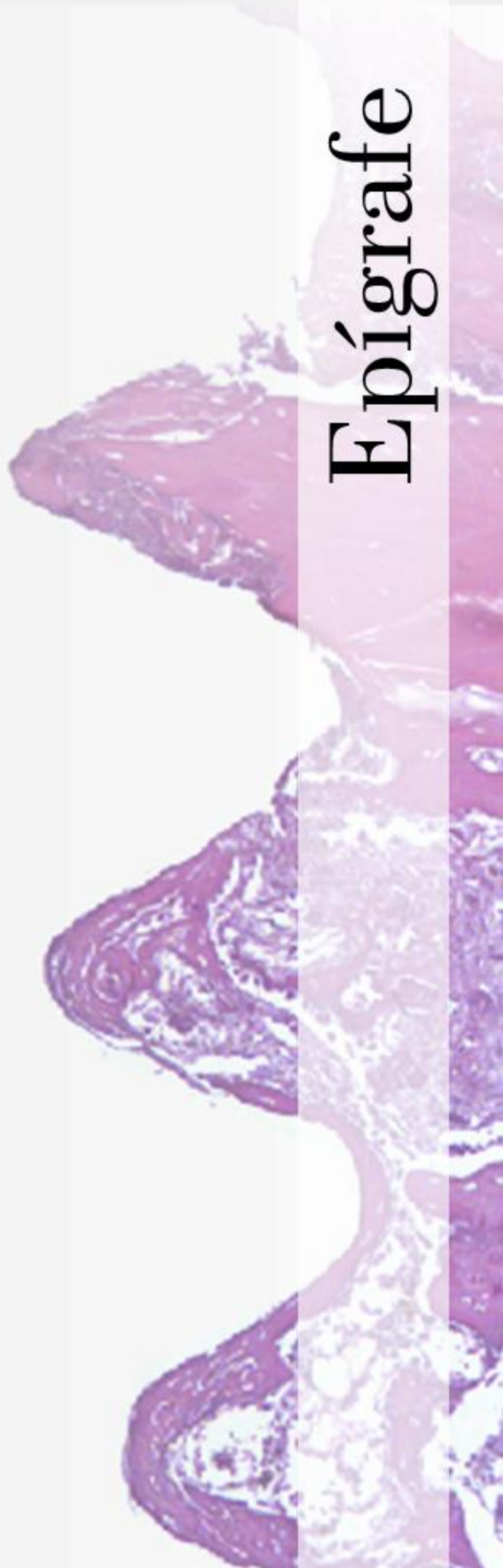
Aos **pacientes** que tive o privilégio de atender durante as clínicas de pós-graduação, pelo voto de confiança e pela esperança que depositam em mim... Muito obrigada!

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

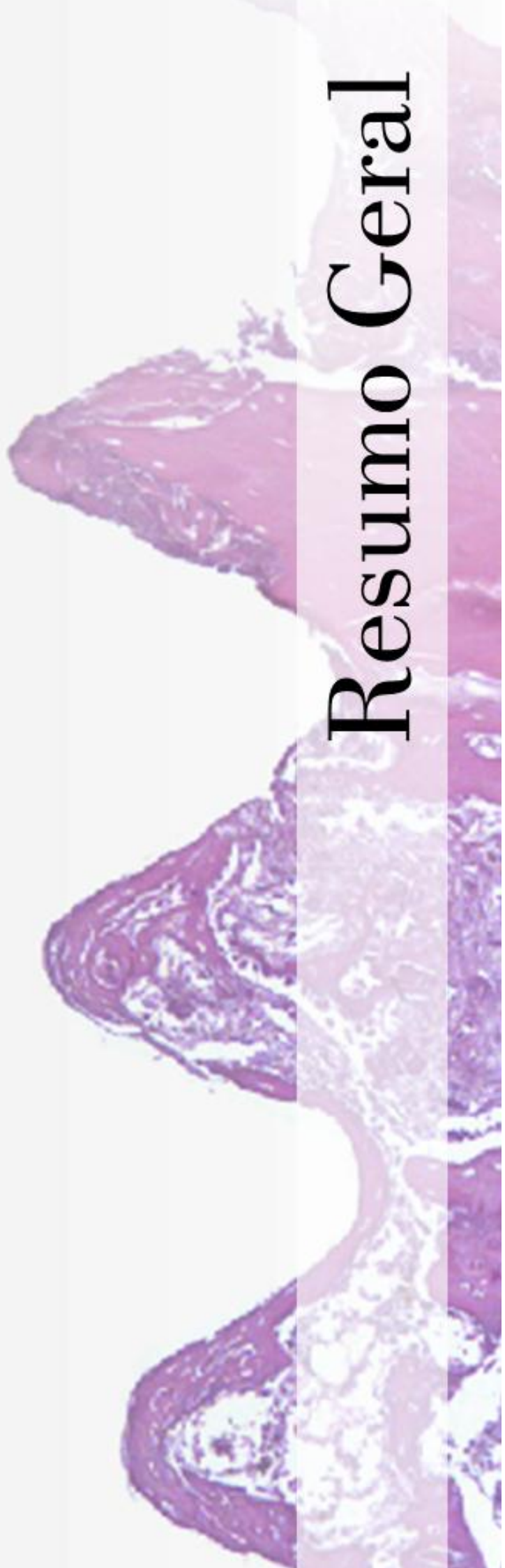
Epígrafe



“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 corkscrew-shaped uterine spiral artery, typical of the proliferative phase. The bottom panel shows a very thick endometrium with a highly convoluted spiral artery and a dense, cellular lining, 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 micrograph showing several cross-sections of what appear to be developing teeth or similar structures. The tissue is stained with hematoxylin and eosin (H&E), showing various cellular and structural components in shades of purple and pink. The structures are arranged in a row, with a central one being more prominent and showing a distinct crown-like shape.

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 illustrate different stages of the menstrual cycle: 1. The first panel shows the proliferative phase, characterized by a thin, uniform endometrial lining with a high density of small, dark-staining nuclei. 2. The second panel shows the secretory phase, where the endometrium is thicker and exhibits a distinct, wavy, coiled appearance of the uterine glands, indicating increased vascularization and development of the spiral arteries. 3. The third panel shows the regenerative phase, where the endometrium is thick and the glands are beginning to straighten and dilate, preparing for the next cycle. The text 'Lista de Figuras' is overlaid on a semi-transparent purple vertical band that spans across all three panels.

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 picrossirius 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