

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 14/08/2025.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

HENRIQUE RINALDI MATHEUS

***Desenvolvimento, caracterização e avaliação
in vivo de um filme de quitosana-sinvastatina
sobre a superfície do titânio: avaliação do
potencial de osseointegração sob a influência
de nicotina***

HENRIQUE RINALDI MATHEUS

***Desenvolvimento, caracterização e avaliação
in vivo de um filme de quitosana-sinvastatina
sobre a superfície do titânio: avaliação do
potencial de osseointegração sob a influência
de nicotina***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista (Unesp), como requisito para a
obtenção do Título de Doutor em Odontologia
– Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de
Almeida

ARAÇATUBA – SP
2023

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M427d Matheus, Henrique Rinaldi.
Desenvolvimento, caracterização e avaliação in vivo de um filme de quitosana-sinvastatina sobre a superfície do titânio: avaliação do potencial de osseointegração sob a influência de nicotina / Henrique Rinaldi Matheus. – Araçatuba, 2023
136 f. : il.; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Juliano Milanezi de Almeida

1. Nicotina 2. Osseointegração 3. Inibidores de hidroximetilglutaril-coa redutases I.T.

Black D6
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatoria

À minha família

Pelo apoio e amor incondicionais dedicados a mim durante os anos da minha existência. Sou mais do que privilegiado por ter nascido e sido criado na presença e sob os ensinamentos de cada um de vocês. Também me considero abençoado pela família que Deus me concedeu fora dos vínculos sanguíneos.

Aos meus pais, **Marcelo e Rosângela**, por terem me permitido o dom da vida. Vocês são as peças centrais do quebra-cabeça da minha existência. Foi em casa (lar) que eu aprendi valores, respeito, comprometimento, e, acima de tudo, a amar. Dedico essa conquista a vocês, porque não haveria meio mais apropriado de retribuir toda dedicação de tempo e amor que dispensam a mim. Não importa a dimensão das dificuldades, ter pais como vocês me conferem a maior segurança em todos os momentos. Não sou capaz de agradecer o suficiente o merecimento de ser seu filho. Amo vocês.

Aos meus irmãos, **Raul e Aitana**, por terem dado uma perspectiva diferente para o meu caminhar. Hoje, tendo vocês ao meu lado, tenho a certeza de

que jamais conseguiria viver meus dias sem amor de irmão. Confesso que carrego uma grade responsabilidade, que é ser o “irmão”. Tenham a certeza de que jamais estarão distantes do meu amor. Estarei aqui para todos os mementos das suas vidas. Amo vocês.

Aos meus avôs, **Oliveira e José**, e minhas avós, **Leonor e Lourdes**.

Realmente, amor de avô/avó é algo incapaz de ser traduzido. Desde a minha infância tenho marcas poderosas do amor que vocês exercem em mim. Cada um, das mais diversas maneiras, fez com que eu me sentisse pessoa mais amada desse mundo. Estar e conversar com cada um tem um sabor diferente. Carrego, por influência de vocês, conhecimento, costumes, e faço questão de seguir um pouquinho adiante a história de cada um. Dedico essa conquista a vocês por cada momento de afastamento (ainda que temporário) que gostaríamos que não existisse entre nós. Amo vocês.

Às minhas tias, **Luciana e Elisângela**, e meu primo **João Gabriel**. Tias, vocês acumularam funções de cuidadoras e “passeadoras”, que jamais esquecerei. Os momentos que tivemos juntos são parte de mim. Por mais que eu tenha

passado, sempre vou ser o “Rique” que não dava paz e não deixava vocês irem sozinhas em canto nenhum. João, você é meu único primo, e confesso que não poderia imaginar um melhor. Que você continue sendo essa criança cuidadosa e amora, independente do que você passe no curso da sua vida. Pode contar comigo sempre. Amo vocês.

Ao **Tio Homero** e à **Tia Eliane**. Foi através de vocês que eu soube que “família” não se restringe a hereditariedade. Vocês me mostraram que amor verdadeiro transcende as barreiras sanguíneas. O amor e o cuidado de vocês sempre estiveram comigo. Com vocês eu compartilhei alegrias e angústias, certezas e dúvidas, e nunca recebi menos do que todo amor de vocês. Diante de tanta partilha, muito de vocês está gravado em mim para sempre. Amo vocês.

Ao **professor Juliano**, que não podia estar em outro lugar que não “família”. De fato, a competência e o amor pela pesquisa foram fundamentais para que nos encontrássemos, mas jamais seriam suficientes para construir os laços que hoje compartilhamos. A admiração, o respeito, e a afinidade foram críticos para

que hoje, eu o admirasse, confiasse, e respeitasse o senhor como respeito meus pais. Dedico essa conquista ao senhor na certeza de que meu caminho jamais teria sido tão pleno e gratificante sem o senhor ao meu lado. Ser seu orientado coloca um fardo muito pesado na minha conduta durante meu caminhar. Sinto orgulho em poder falar que sou seu aluno e amigo. Em um meio de tanta disputa e egoísmo, é uma benção termos construído um convívio baseado no amor, no respeito, no companheirismo e amizade.

Se todos pudessem provar da minha família acima, tenho certeza de que a falta de empatia, paciência, dedicação e, acima de tudo, amor, não estariam entre os problemas que assolam a humanidade. Não se passa nenhum dia sem que eu agradeça a Deus por tê-los ao meu lado.

Agradecimentos

Especiais

*“A gratidão é uma forma singular de reconhecimento,
e o reconhecimento é uma forma sincera de gratidão”*

Alan Vaszatte

A Deus

Pela sua singularidade e presença irrestrita em todos os momentos da minha vida.

Por colocar em meu caminho as pessoas necessárias para eu continuar.

Por me prover as expiações necessárias para seguir evoluindo.

Por amparar àqueles que tanto amo.

Enfim, por ser a força maior guiando tudo e todos.

“Deus é o nosso refúgio e a nossa fortaleza, auxílio sempre presente na adversidade”

Salmos 46:1

Ao Professor Edilson Ervolino

Um grande exemplo e amigo que minha admiração, respeito e carinho só aumentaram com o passar dos anos. A presença do senhor em todas as minhas etapas desde o trabalho de conclusão de curso da graduação é de grande estima para mim. O suporte e conhecimento do senhor estiveram comigo durante todos esses anos. Hoje, depois de tanto tempo, enxergo com clareza o papel importante dos conhecimentos compartilhados pelo senhor na minha formação. A combinação de conhecimento, sucesso profissional e profunda humildade são de grande aprendizado a todos que o observam. Mas, acima de tudo, estes anos me mostraram a distância e o tempo não são capazes de interferir na amizade que construímos ao longo dos tempos. Fico feliz por isso. Que continuemos assim.

Ao Professor Alvaro Francisco Bosco

Um professor único, clínico exemplar, e mais do que isso, um grande amigo. Sou privilegiado por poder continuar aprendendo com o senhor, mesmo na “aposentadoria”. Desde que nossos caminhos se cruzaram (e entrelaçaram, aparentemente) seus ensinamentos de periodontia e, mais importante, os reflexos morais do senhor em mim têm sido de grande relevância na minha trajetória. Dia após dia sou influenciado pelo entusiasmo do senhor. Muitos conselhos e palavras de carinho vindos do senhor ecoam em mim. Que eu continue tendo o privilégio de conviver com o senhor. Muito obrigado por tudo.

Ao Professor Francisley Ávila Souza

De quem acabei me aproximando muito desde as primeiras conversas de Internacionalização. Mais do que ter sido a peça central do meu doutorado sanduíche, o senhor se tornou um grande exemplo de profissional e amigo. Deixo expresso aqui minha profunda gratidão por tudo que fez por mim, mas mais ainda pelo acolhimento, pelas boas conversas, e pela amizade.

À professora Maria José Hitomi Nagata

Uma verdadeira entusiasta pela pesquisa, que motiva e inspira muitos alunos a seguirem este caminho. Fui privilegiado pelo passar dos anos a poder conhecer a pessoa por trás da pesquisadora. Hoje, admiro a senhora em vários níveis. Obrigado por todo apoio a ensinamento conferidos a mim. Obrigado por ser sempre acolhedora, principalmente quando eu estive há milhares de quilômetros de casa (e me recebeu em New London). Agradeço também ao **Steve**, um grande amigo que conheci através da senhora. Que tenhamos muitos outros momentos juntos no futuro.

À professora Diana Gabriela Soares dos Passos

Em pouco tempo a senhora cruzou meu caminho, proveu perspectivas entusiasmantes, se dedicou muito as mim (que nem fui aluno da senhora), e muito se concretizou a partir de lá. Admiro muito a senhora como pesquisadora. Aprendi muito sobre dedicação e pesquisa desde nossas primeiras conversas. Também, aprendi muito com a empatia que a senhora

tem pelos demais e entende as necessidades e perspectivas de cada aluno. É muito bom ter pessoas como a senhora no meio. Obrigado por tudo.

À professora Adriana Campos Passanezi Santana

Nossos caminhos se cruzaram em momentos pontuais e muito importantes da minha trajetória. Desde que nos encontramos no simpósio dedicado ao Professor Eulair, vieram o Osteology Research Academy, capítulo de livro, e, agora, minha defesa de tese. Nesse processo minha admiração pela senhora só aumentou. Obrigado por tudo.

To Dr. Sara I. Pai

Who opened the door of her lab so we could discuss the potential impact of periodontitis in the era of cancer immunotherapy. I could never imagine that from the initial idea something capable of completely changing my perspectives of “future” and “research” would be built. From each revision and correction, I learned something new from you. Thank to you I grew exponentially during my stay at MGH. Hopefully I’ll have the opportunity to seek answer to a few of the questions we raised.

À professora Magda Feres

Pela verdadeira devoção à mentoria. Obrigado por ter me proporcionado conhecer pessoalmente pesquisadores que admiro muito. Dr. Thomas E. Van Dyke e Dr. Willian Giannobile. Também, por ter me acolhido no PPG da UNG e continuar tão ativa e dedicada com as minhas perspectivas de futuro.

Ao Fernando P. S. Guastaldi

Por ter me recebido para o doutorado sagnuiche no Skeletal Biology Research Center (SBRC), Department of Oral and Maxillofacial Surgery (OMFS), Massachusetts General Hospital (MGH), Harvard School of Dental Medicine (HSDM). Esta experiênciia foi singular para que eu buscasse conhecimento em áreas que eu ainda não conhecia, aprendesse a buscar soluções por estar com maior independência e autonomia. Foi muito importante para meu crescimento profissional e pessoal.

“Um professor só se torna de fato mestre quando ensina seu aluno a pensar”

Agnes Quintanilha

À minha família de Manduri

Fernanda (Fer), Gabriel (Ga) e Alice, muito obrigado pelo verdadeiro acolhimento. As vezes que estive aí, não fui apenas bem tratado, com o passar do tempo (e aumento da frequência) me senti integrado à família de vocês. Compartilhamos bons momentos, outros nem tanto, e acho que é uma boa definição de família. O cuidado e o carinho de vocês têm um lugar especial para mim. Com o passar do tempo, fui integrado aos avós, tias, primas, todo mundo. Também agradeço todos eles. Nunca me senti um estranho estando no meio de vocês, e, confesso que às vezes, por estar mais distante de Auriflora (e perto daí) era em vocês que eu encontrava o acolhimento que precisava no momento. Obrigado por tudo. Minha família de Auriflora também é muito grata por saber todo o bem que fazem a mim.

Aos meus amigos e irmãos

Alex, Argílio, Bruno, Ivan, Guilherme, Rafael Castro, Rafael Jorge, Rafael Manzoli e Heitor. Não lembro a primeira vez que estive com cada um de vocês, mas desde então lembro de cada momento que passamos juntos. O bom humor (e muitas vezes a falta dele) são motivos de muita saudade quando passo tempos sem ver vocês. Sei que famílias vão sendo construídas e a vida acaba distanciando as pessoas, mas com vocês eu tenho a plena convicção que distância e tempo não são sinônimos de separação.

Ao meu amigo Henrique Hadad

Ainda que colegas em Araçatuba, Boston criou um vínculo muito grande, que resistiu ao tempo e algumas dificuldades para que se edificasse a amizade. Realmente, foi construída muita confiança, empatia e admiração. Uma amizade verdadeira que nossos caminhos distintos não serão capazes de apagar. O compartilhamento de experiências, divisão de

angústias e admiração mútua são os fundamentos da nossa amizade. É muito bom poder compartilhar sofrimento e conquistas com alguém que vive elas conosco. Obrigado por tudo. Também, através de você, agradeço a Laís, Maria Eduarda, Maísa e Paulo por me acolherem no grupo.

To the MGH squad

From the very first week on the fifth floor of Thier Research Building, Pierre has included me in the “French group”, and a great friendship with him, Marion, Golda, Victor, Hyshem, and Alec began. I never felt alone since. From that moment, my interactions and friendships with other people started. I felt included in the Plastic Surgery Research Lab by Mark, Maria, Kalyn, Tina, and Alana. It was always nice to have David for a good conversation too. Nicolò arrived a couple of months later, and I’m happy to have celebrated your very first birthday in the US and that we got to interact more and more over time. I thank all vets from Knight Surgery Research Laboratories, Anet, Jess, Nick, and Nelson, who provided all support for animal surgeries but were always down for coffee (and even more for drinks). Of course, so was Hadad. And, finally, the French group was renewed and, suddenly, Yannis arrived and became a true friend from the beginning. You were all key to turning my fellowship into a life-changing experience. I’m happy our friendship has stood the test of time and distance. I can’t wait to meet you all again.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa

Fiorin, Bianca, Otávio, Ruan e Elisa. Sem vocês eu não teria chegado ao final desta etapa como estou chegando. De cada um de vocês, carrego aprendizado e valores. Foi muito bom aprender com vocês durante esses anos. Desejo todo sucesso e prosperidade do mundo.

Contem comigo para tudo que estiver ao meu alcance. Fiorin, um agradecimento especial a você, que caminhou lado a lado desde a iniciação científica até agora. Seu caráter, dedicação e companheirismo são louváveis. Me considero privilegiado por ter um amigo como você.

À Érika e à Fernanda

Que abraçaram a causa da minha pesquisa de doutorado e me auxiliaram em etapas que eu jamais teria sido capaz de conduzir sozinho. Não importou a distância, afinal, mesmo comigo em Boston vocês estavam disponíveis a me socorrer quando eu não sabia mais onde buscar respostas. Meu sincero muito obrigado.

Ao programa de PG da UNG

Através do convite da professora Magda, me senti acolhido por todos em um ambiente totalmente novo. Apesar do apelido atribuído a mim, nunca foi de fato como me senti (“Avulso”). Apesar do aprendizado, foram muitas risadas que incluíram todos na minha trajetória. Em especial, agradeço à Magda, à Renata, à Andrea, e ao Rodrigo, verdadeiras amizades que trouxe comigo para Araçatuba. Espero que possamos nos reencontrar em breve.

“Não há solidão mais triste do que a do homem sem amizades. A falta de amigos faz com que o mundo pareça um deserto”

Francis Bacon

Agradecimentos

O agradecimento é a memória do coração

Lao Tse

AGRADECIMENTOS

*À Direção da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP. Em nome do Diretor, Prof. Titular **Glauco Issamu Miyahara** e Vice-Diretor, Prof. Titular **Alberto Carlos Botazzo Delbem**.*

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela concessão de bolsa de Doutorado Sanduíche (88887.194785/2018-00), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa de doutorado (processo 2020/09274-0).

À empresa DSP Biomedical pelo fornecimento dos discos de titânio e os implantes de que foram utilizados nessa pesquisa.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Odontologia, pela ajuda dada ao desenvolvimento do curso de Pós-graduação e lutar para termos o melhor curso de Pós-Graduação.

Aos Professores da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, pela dedicação e ensinamentos que me proporcionam no curso.

*A todos os funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, **Renato, Paulo e Marco**, que sempre estiveram dispostos a dar o melhor. Os meus sinceros agradecimentos e admiração.*

Ao Laboratório de Cultura Celular e Engenharia de Tecidos (LACET) da Faculdade de Odontologia de Bauru, USP.

À Sônia, técnica do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, pela atenção de dedicação com a captura das imagens.

À professora Elidiane e seu aluno Cesar, do Laboratório Multiusuário de Caracterização de Materiais da UNESP de Sorocaba, pela disponibilidade e auxílio para mensuração e interpretação dos dados de ângulo de contato.

À Márcia, técnica responsável pelo microscópio confocal a laser do Centro Integrado de Pesquisa 2 da Faculdade de Odontologia de Bauru,

A todos os funcionários da Biblioteca da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de Araçatuba, obrigado pela colaboração, ensinamentos e por fazer a “nossa” Biblioteca um lugar agradável e alegre.

A todos os funcionários da Seção de Pós-graduação, pela paciência, ajuda e estarem sempre disponíveis.

Aos professores da FOA/UNESP.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por proporcionarem o funcionamento e conforto da Instituição.

Aos animais experimentais, meu profundo respeito e agradecimento.

Enfim, a todos que me ajudaram de forma direta ou indireta. Os meus sinceros agradecimentos.

Epígrafe

A ciência não é só compatível com a espiritualidade; é uma profunda fonte de espiritualidade. Quando reconhecemos nosso lugar na imensidão de anos-luz e no transcorrer das eras, quando compreendemos a complexidade, a beleza e a sutileza da vida, então o sentimento sublime, misto de júbilo e humildade, é certamente espiritual. (...) A noção de que a espiritualidade e a ciência são de alguma maneira mutuamente exclusivas presta um desserviço a ambas.

Carl Sagan

Resumo

Matheus HR. Desenvolvimento, caracterização e avaliação *in vivo* de um filme de quitosana-sinvastatina sobre a superfície do titânio: avaliação do potencial de osseointegração sob a influência de nicotina [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia; 2023.

RESUMO

A osseointegração sob influência sistêmica de nicotina (NIC) apresenta-se como um desafio à implantodontia atual, visto que a capacidade de reparo ósseo mediado por células residentes é negativamente influenciada por esse fator. Neste projeto de pesquisa, objetiva-se desenvolver um filme de quitosana (CH)-sinvastatina (SV) sobre a superfície do titânio de forma a modular e otimizar o processo de reparo peri-implantar em modelos de comprometimento por NIC. Diferentes técnicas de funcionalização com quitosana (direta ou por meio de aminosilano [APTMS]) e incorporação de sinvastatina nas concentrações de 1, 2,5, e 5 μM foram aplicadas para obtenção de maior estabilidade e potencial modulatório do filme. Para caracterização da superfície, espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e ângulo de contato foram utilizados. O sucesso na adsorção de CH e SV foi confirmado pelas alterações elementares observadas através de XPS. Todos os filmes apresentaram estrutura nanofibrilar e super-hidrofilicidade. Células tronco da medula óssea suína (pBMSC) foram utilizadas para mapeamento inicial. Os filmes obtidos através da adsorção de CH por meio de APTMS e incorporação de SV nas concentrações de 1 e 2,5 μM (principalmente) apresentaram a melhor capacidade de induzir a deposição de matriz mineralizada por pBMSCs. APTMS-CH_SV 2,5 μM foi testada *in vitro* em cultura de SAOS-2 em meio suplementado com NIC. O filme testado foi capaz de bioestimular as células ainda que na presença de nicotina (quando comparado com controles não funcionalizados). Sendo assim, o filme foi testado em modelo *in vivo* de administração sistêmica de NIC. Os efeitos deletérios da NIC no processo de reparo ósseo peri-implantar ao redor de implantes tratados por jateamento e ataque ácido (convencionais; NF) foi reafirmado.

Assim como o filme de CH_SV se provou eficaz em reverter o impacto negativo mediado por NIC no processo de osseointegração. O maior contato osso/implante (BIC) e área de tecido ósseo peri-implantar (BAFO) em CH_SV quando comparado com controle (NF) na presença de nicotina foi suportado pelos mecanismos de regulação positiva da proteína morfogenética óssea (BMP)-2 e BMP-7, angiogênese (regulação positiva do fator de crescimento endotelial vascular [VEGF]), renovação acelerada (osteocalcina), modulação da inflamação (expressão reduzida do fator de necrose tumoral [TNF α] e interleucina [IL] 1 β) e redução da reabsorção óssea mediada por osteoclastos (expressão da fosfatase ácida resistente ao tartarato [TRAP]). Também, a maior formação óssea em período inicial (15 dias), que não diferiu com o período pós-osseointegração (45 dias) indica que o filme acelerou a formação óssea, tanto na presença quanto na ausência de NIC. O filme CH_SV é uma escolha eficaz para aumentar a taxa de sucesso de reabilitações mediadas por osseointegração sob influência sistêmica de NIC e amplia o escopo de aplicação de revestimentos bioativos na superfície de Ti.

Palavras-chave: Nicotina. Osseointegração. Estatina.

Abstract

Matheus HR. Development, characterization and in vivo assessment of a chitosan-simvastatin film for titanium coating: evaluation of the osseointegration potential under influence of nicotine [tese]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia; 2023.

ABSTRACT

The osseointegration under systemic modification by nicotine (NIC) remains a great challenge to implantology since the bone reparative potential of resident cells is negatively influenced in the presence of this factor. In this research project, the objective is to develop a chitosan (CH)-simvastatin (SV) film on the surface of titanium in order to modulate and optimize the peri-implant repair process in models of systemic compromise by NIC. Distinct technique for immobilization of CH (directly or by means of an aminosilane [APTMS]) and incorporation of SV at the concentrations of 1, 2.5, and 5 μM were used to obtain greater stability and modulatory capacity. For surface characterization, X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), scanning electron microscopy (SEM), and contact angle measurement were applied. The success in CH and SV adsorption were confirmed by the elemental changes observed through XPS. All films exhibited nanofibrillar super hydrophilic characteristics. Porcine bone marrow stem cells (pBMSCs) were used for initial screening. The films obtained by adsorption of CH through APTM and incorporation of SV at 1 and e 2,5 μM (specially) showed the best capacity to induce mineralized matrix deposition by pBMSCs. APTMS-CH_SV 2.5 μM was tested in vitro in SAOS-2 cultures in medium supplemented with NIC. The tested film exerted a bio-stimulatory potential in the presence of NIC (as compared in no-functionalized controls). Therefore, the model was tested in an *in vivo* model of systemic delivery of NIC. The hazardous effects of NIC on peri-implant bone healing around sandblasted acid etched implants (conventional, NF) were reaffirmed. The CH_SV film proved to be effective in reverting the impact of NIC on peri-implant bone healing. The greater bone-to-implant contact (BIC) and bone area fraction occupancy (BAFO) in CH_SV,

when compared with control (NF) in the presence of NIC was underlined by the mechanisms of upregulation of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-7, coupled angiogenesis (upregulation of vascular endothelial growth factor [VEGF]), accelerated turnover (osteocalcin), modulation of inflammation (reduced expression of tumor necrosis factor [TNF α] and interleukin [IL] 1 β), and reduced osteoclast-mediated bone resorption (tartrate-resistant acid phosphatase [TRAP] expression). Additionally, the increased bone formation in initial stages (15 days) did not differ from post-osseointegration phases (45 days), thus indicating that the osseointegration process was accelerated by CH_SV in the presence or absence of NIC. CH_SV film is an effective choice for widening success rate of osseointegration-mediated rehabilitations under systemic influence of NIC and enlarges the application scope of bioactive coatings on the surface of Ti.

Keywords: Nicotine. Osseointegration. Statins.

Lísta de Figuras

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - XPS widescan spectra. The concentration of the SV solution used for the preparation of the CH_SV and APTM-CH_SV substrates was 5 μ M. 68
- Figura 2 - Scanning electron microscopy images of the specimen's surface morphology. Images (a) to (i) provide an overview of the films at 10 000x. Higher magnification images (“j” to “r”) allow the appreciation of the fibril network. 69
- Figura 3 - Wettability test results obtained for investigated films. 70
- Figura 4 - Cell response at a distance. (a) Percentage of cell metabolism for each group and period. (b) quantification of mineralized matrix deposition. Statistical tests: ANOVA and Tukey. Distinct uppercase letters indicate statistically significant intragroup differences among periods. Distinct lower- case lattes indicate statistically significant intergroup differences in the same period of analysis. 71
- Figura 5 - Direct contact analysis. (a) Percentage of cell metabolism for each group and period. (b) quantification of mineralized matrix deposition. Statistical tests: ANOVA and Tukey. Distinct uppercase letters indicate statistically significant intragroup differences among periods. Distinct lower- case lattes indicate statistically significant intergroup differences in the same period of analysis. (c - g) photomicrographs of cell adhesion and speeding on the surface of the discs. 72

CATÍTULO 2

- Figura 1 - Experimental design and animal surgery. Images showing the 111
exposure of the tibial metaphysis (a), macroscopic aspect of the
control (NF) (c) and CH_SV (d) implants, implant insertion (e),
adaptation of the torque wrench (f), insertion torque (g), bicortical
fixation of the implant with sufficient amount of bone at the site
(h), internal suture with reservable thread (i), and external suture
with nylon. It can be appreciated that following implant insertion
and immediate removal, the 3-dimension nanofibrilar network is
maintained (k). Original magnification: 50 000x (k).
- Figura 2 - *In vitro* assays to determine metabolism, viability and mineralized 112
matrix deposition by SAOS2. (a) Percentage of cell metabolism
for each group and period. (b) Live/Dead assay at day 1. (c)
quantification of mineralized matrix deposition. (d) representative
images of the Alizarin Red staining of the discs from each group
and period. Statistical tests: ANOVA and Tukey. Distinct
uppercase letters indicate statistically significant intragroup
differences among periods ($p \leq 0.05$). Distinct lower-case letters
indicate statistically significant intergroup differences in the same
period of analysis ($p \leq 0.05$).
- Figura 3 - Wound healing and cell adhesion and spreading. (a) Wound area 113
(mm²). (b) Representative photomicrographs of the wound (c)
adhesion and spreading of SAOS2 onto the surface of the discs
Statistical tests: ANOVA and Tukey. Distinct lower-case letters
indicate statistically significant intergroup differences ($p \leq 0.05$).
- Figura 4 - Bone formation and histological features of the peri-implant 114
tissues. Graphs showing BIC (a) and BAFO (b). Statistical tests:
ANOVA and Tukey. Symbols: *, statistically significant
difference with 15 days in the same group ($p \leq 0.05$); †,
statistically significant difference with VEH-NF in the same
period ($p \leq 0.05$); #, statistically significant difference with NIC-
NF in the same period ($p \leq 0.05$). (c-j) Photomicrographs showing

the histological features of the peri-implant tissues for each group and period. Satining: Hematoxylin and Eosin. Scale bars: 500 μm .

Figura 5 - Immunolabelling pattern for BMP-2 (a through i) and BMP-7 (j through r). Graph showing the density of immunolabelling of BMP-2 (a) and BMP-7 (j). Statistical tests: ANOVA and Tukey. Symbols: †, statistically significant difference with VEH-NF in the same period ($p \leq 0.05$); #, statistically significant difference with NIC-NF in the same period ($p \leq 0.05$). Photomicrographs representing the immunolabelling pattern of BMP-2 (b-i) and BMP-7 (k-r). Counterstaining: Harry's hematoxylin. Scale bars: 100 μm . 115

Figura 6 - Immunolabelling pattern for OCN. Graph showing the density of immunolabelling of OCN (a). Statistical tests: ANOVA and Tukey. Symbols: *, statistically significant difference with 15 days in the same group ($p \leq 0.05$); †, statistically significant difference with VEH-NF in the same period ($p \leq 0.05$); #, statistically significant difference with NIC-NF in the same period ($p \leq 0.05$). Photomicrographs representing the immunolabelling pattern of OCN (b-i). Counterstaining: Harry's hematoxylin. Scale bars: 100 μm . 116

Figura 7 - Immunolabelling pattern for VEGF. Graph showing the density of immunolabelling of VEGF (a). Statistical tests: ANOVA and Tukey. Symbols: †, statistically significant difference with VEH-NF in the same period ($p \leq 0.05$); #, statistically significant difference with NIC-NF in the same period ($p \leq 0.05$). Photomicrographs representing the immunolabelling pattern of OCN (b-i). Counterstaining: Harry's hematoxylin. Scale bars: 100 μm . 117

Figura 8 - Immunolabelling pattern for $\text{TNF}\alpha$ (a through i) and $\text{IL-1}\beta$ (j through r). Graph showing the density of immunolabelling of $\text{TNF}\alpha$ (a) and $\text{IL-1}\beta$ (j). Statistical tests: ANOVA and Tukey. Symbols: *, statistically significant difference with 15 days in the same group ($p \leq 0.05$); †, statistically significant difference with 118

VEH-NF in the same period ($p \leq 0.05$); #, statistically significant difference with NIC-NF in the same period ($p \leq 0.05$). Photomicrographs representing the immunolabelling pattern of $\text{TNF}\alpha$ (b-i) and $\text{IL-1}\beta$ (k-r). Counterstaining: Harry's hematoxylin. Scale bars: 100 μm .

Figura 9 - Immunolabelling pattern for TRAP. Graph showing the number of 119 TRAP-positive cells/mm (a). Statistical tests: ANOVA and Tukey. Symbols: *, statistically significant difference with 15 days in the same group ($p \leq 0.05$); †, statistically significant difference with VEH-NF in the same period ($p \leq 0.05$); #, statistically significant difference with NIC-NF in the same period ($p \leq 0.05$). Photomicrographs representing the immunolabelling pattern of TRAP (b-i). Black arrowheads, immunoreactive cells. Counterstaining: Harry's hematoxylin. Scale bars: 100 μm .

Lísta de Abreviaturas e Símbolos

Lista de Abreviaturas e Símbolos

%.....	percentage
®.....	trademark
±.....	plus-minus
≤.....	less than or equal to
≥.....	greater than or equal to
3Rs.....	replacement, reduction, and refinement
AKT.....	serine/threonine protein kinase
ANOVA.....	analysis of variance
APTMS.....	3-aminopropyltrimethoxysilane
ARRIVE.....	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
BA.....	bone area
BAFO.....	bone area fraction occupancy
BIC.....	bone-to-implant contact
BMP.....	Bone Morphogenetic Protein
C.....	Carbon
CH.....	Chitosan
CO ₂	carbon dioxide
d.....	days
Da.....	unified atomic mass unit
DAB.....	3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
DAPI.....	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM.....	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA.....	deoxyribonucleic acid
EA.....	Emission angle
EC.....	endothelial cells
ECM.....	extracellular matrix
EDTA.....	ethylenediaminetetraacetic acid
Erk.....	extracellular signal-regulated kinase
Et al.....	and others
eV.....	electric vehicle
FAPESP.....	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FBS.....	Fetal bovine serum
g.....	grams
h.....	hour
HE.....	hematoxylin and eosin
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor 1 α
HRP.....	horseradish peroxidase
i.m.	intramuscular
IACUC.....	Institutional Animal Care and Use Committee
IgG.....	immunoglobulin
IL-1 β	interleukin 1 β
L.....	liter
LACET.....	Laboratório de Cultura de Células e Engenharia de Tecidos
M.....	Molar
MC3T3-E1.....	mouse calvarium osteoblastic cell line
Mg/kg.....	milligram per kilogram
min.....	minute

mm.....	millimeters
mM.....	micromolar
mm ²	square millimeters
MPK.....	mitogen-activated protein kinase
MSC.....	mesenchymal stem cell
N.....	Nitrogen
NaOH.....	Sodium hydroxide
NEPPI.....	Núcleo de Estudo e Pesquisa em Periodontia e Implantodontia
NF.....	No functionalization
NIC.....	nicotine
nM.....	nanomolar
Nm.....	nanometers
°.....	degrees
O.....	Oxygen
°C.....	Degrees Celsius
OCN.....	osteocalcin
pBMSC.....	porcine Bone Marrow Stem Cell
PBS.....	phosphate buffered saline
pH.....	potential of hydrogen
ROI.....	region of interest
SAOS-2.....	human osteosarcoma cell line
SD.....	standard deviation
SEM.....	Scanning Electron Microscopy
Si.....	Silicon
SMAD.....	suppressor of Mothers against Decapentaplegic
SV.....	Simvastatin
TA.....	total area
Ti-6V1-4Al.....	Titanium, Vanadium, Alluminium alloy
Ti.....	Titânio
TiZr.....	Titanium Zirconium alloy
TNF α	tumor necrosis factor α
TRAP.....	tartrate-resistant acid phosphatase
UNESP.....	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho
v/v.....	Volume per volume
VEGF.....	vascular endothelial growth factor
VEH.....	Physiological saline solution
X-ray.....	x ray
x.....	times
XPS.....	X-ray Photoelectron Spectroscopy
μ L.....	microliter
μ M.....	micromolar

Lísta de Anexos

LISTA DE ANEXOS

Anexo A	Normas de publicação do Periódico “Journal of Biomedical Materials Research Part A”	121
Anexo B	Normas de publicação do Periódico “Biomaterials”	127
Anexo C	Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal	135

Sumário

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

PÁGINA DE TÍTULO	41
RESUMO	42
INTRODUÇÃO	43
MATERIAL E MÉTODOS	46
RESULTADOS	52
DISCUSSÃO	55
CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	61
FIGURAS	67
ANEXO A	121

CAPÍTULO 2

PÁGINA DE TÍTULO	74
RESUMO	75
INTRODUÇÃO	76
MATERIAL E MÉTODOS	80
RESULTADOS	89
DISCUSSÃO	95
CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS	102
FIGURAS	110
ANEXO B	127
ANEXO C	136