

RESSALVA

Atendendo solicitação da
autora, o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 29/10/2021.



UNESP – Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Taisa Nogueira Pansani

**Efeito da laserterapia de baixa potência e do fator de crescimento epidérmico
sobre a indução do metabolismo celular em superfícies de titânio e zircônia**

Araraquara

2019



UNESP – Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Taisa Nogueira Pansani

**Efeito da Laserterapia de Baixa Potência e do Fator de Crescimento
Epidérmico Sobre a Indução do Metabolismo Celular em Superfícies de Titânio
e Zircônia**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral - Área de Prótese, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Doutor, em Reabilitação Oral.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso

Araraquara

2019

Pansani, Taisa Nogueira

Efeito da laserterapia de baixa potência e do fator de crescimento epidérmico sobre a indução do metabolismo celular em superfícies de titânio e zircônia / Taisa Nogueira Pansani. -- Araraquara: [s.n.], 2019
101 f.; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Coorientador: Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso

1. Titânio 2. Zircônio 3. Terapia com luz de baixa
Intensidade 4. Fator de crescimento epidérmico I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Taisa Nogueira Pansani

Efeito da laserterapia de baixa potência e do fator de crescimento epidérmico sobre a indução do metabolismo celular em superfícies de titânio e zircônia

COMISSÃO JULGADORA

Tese para obtenção de grau de doutor em Reabilitação Oral

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Professor Titular do Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

2º examinador: Prof. Dr. Gelson Luís Adabo

Professor Titular do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

3º examinador: Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Pavarina

Professora Adjunta do Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP.

4º examinador: Prof.^a Dr.^a Carla Raquel Fontana Mendonça

Professora Adjunta do Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP.

5º examinador: Prof.^a Dr.^a Ana Paula Turrioni Hidalgo

Professora Adjunta do Departamento de Odontologia Pediátrica, Universidade Federal de Uberlândia, UFU.

Araraquara, 29 de Outubro de 2019.

DADOS CURRICULARES

Taisa Nogueira Pansani

NASCIMENTO: 07/03/1989, São José do Rio Preto/SP

FILIAÇÃO: Adriana Godoy Nogueira Pansani
Cyneu Aguiar Pansani

2008/2012: Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Bolsa de Iniciação Científica Fapesp – 24 meses (2010/08933-8)

2013/2015: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral
Nível Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Bolsa Mestrado Fapesp – 19 meses (2012/25070-9)

2015/2019: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral
Nível Doutorado
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

Bolsa Doutorado Fapesp – 47 meses (2015/19364-8)

Bolsa de Estágio Pesquisa no Exterior (BEPE) Fapesp – 8 meses (2018/05258-0)

À Deus pelas oportunidades colocadas em minha vida e todas as pessoas queridas que me incentivaram a buscar meus sonhos.

Agradecimentos

Ao meu pai **Cyneu Aguiar Pansani** que sempre me apoiou nas escolhas de minha vida, por mais árduas que fossem.

Aos meus irmãos **Larissa Nogueira Pansani de Matos, Lucas Nogueira Pansani e Thiago Viana Pansani** que me incentivaram com carinho durante esta longa jornada.

A minha vó **Amelinha** e a tia **Cidinha** pelo apoio e carinho sempre presentes.

A minha mãe **Adriana Godoy Nogueira Pansani** que aonde quer que esteja tenho certeza que está iluminando meu caminho.

Ao meu orientador **Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, professor do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por me incentivar e orientar durante minha carreira acadêmica, contribuindo para meu crescimento profissional.

A minha amiga e coorientadora **Profa. Dra. Fernanda Gonçalves Basso**, professora colaboradora do programa de Pós-graduação em Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, por todos os ensinamentos transmitidos, pelos conselhos, incentivos e parceria de trabalho todos esses anos. Sem sua ajuda certamente não estaria aqui hoje.

Aos meus grandes amigos, **Diego Giroto Bussaneli, Laís Medeiros Cardoso e Márcia Carvalho** que fizeram todos os momentos que compartilhamos especiais e únicos, me ajudando a superar as dificuldades de maneira mais leve. Ao meu querido **Marcelo Rodrigues de Amorim**, por ser um incentivador da minha jornada. Saber que vocês estão sempre ao meu lado me dá força para continuar em qualquer que seja a situação.

Aos meus amigos do **Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais** com quem convivo diariamente.

Ao **Prof. Wojciech Chrzanowski**, meu orientador no exterior, que me recebeu em seu laboratório e sempre se mostrou disposto a me ensinar, e à **Universidade de Sydney**.

Aos meus novos amigos **Esteban Cruz González, Kamini Divakarla, Thanh Huyen Phan, Qingyu Lei e Jonathan Du**. Fazer novas amizades nos recorda que a vida sempre é cheia de surpresas. Espero revê-los novamente.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP**, nas pessoas da atual Diretora **Profa. Dra. Elaine Maria Sgavioli Massucato** e Vice-diretor **Prof. Dr. Edson Alves de Campos**.

À Coordenação do **Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, representada pela Coordenadora **Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina** e pela Vice coordenadora **Profa. Dra. Daniela Aparecida Godoi Gonçalves**.

Aos **Professores do Programa de Reabilitação Oral** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pelos ensinamentos e experiências vividas.

Aos **funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP**, os quais foram sempre solícitos para comigo.

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

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos nº 2015/19364-8 e 2018/05258-0) por viabilizar o desenvolvimento dessa pesquisa, através dos auxílios de Bolsa de Doutorado – DR e Bolsa de Estágio Pesquisa no Exterior - BEPE.

A todos que de alguma maneira contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que
ninguém viu, mas pensar o que ninguém
ainda pensou sobre aquilo que todo
mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

Pansani TN. Efeito da laserterapia de baixa potência e do fator de crescimento epidérmico sobre a indução do metabolismo celular em superfícies de titânio e zircônia. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP; 2019.

RESUMO

A fixação do tecido conjuntivo à superfície dos abutments de implantes dentários impede a migração apical do epitélio juncional e previne a reabsorção da crista óssea normalmente ocasionada pela inflamação peri-implantar, o qual promove comprometimento estético e o sucesso do procedimento reabilitador. O uso de terapias para favorecer a adesão celular, a fim de induzir um selamento biológico efetivo, pode melhorar as condições estéticas e funcionais nas reabilitações protéticas. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito da laserterapia de baixa potência (LBP) e do recobrimento de superfícies de titânio (Ti) e zircônia (ZrO_2) com fator de crescimento epidérmico (EGF), sobre a adesão e metabolismo de células da mucosa oral humana expostas ao estímulo inflamatório com o fator de necrose tumoral α (TNF- α). Fibroblastos de gengiva e células epiteliais foram isolados e cultivados sobre discos de Ti e ZrO_2 , simulando o selamento biológico in vitro. Nos grupos com EGF, este fator de crescimento foi aplicado sobre as superfícies de Ti e ZrO_2 previamente ao cultivo celular. Após a semeadura das células, estas foram irradiadas 3 vezes com LBP (LaserTABLE, InGaAsP, $780\pm 3nm$), em intervalos de 24 h, nas doses de $0,5 J/cm^2$; $1,5 J/cm^2$ e $3,0 J/cm^2$, de acordo os grupos estabelecidos e então, o TNF- α foi aplicado sobre as mesmas por 24 h. Foram realizadas as análises de rugosidade da superfície dos discos por Microscopia Confocal (n=8) e de liberação do EGF dos substratos recobertos, além da avaliação da adesão celular por fluorescência direta. A viabilidade celular (AlamarBlue, n=8), expressão gênica de *IL-6*, *IL-8* e *VEGF* (qPCR, n=5), síntese de IL-6, IL-8 (ELISA, n=6), bem como a morfologia e adesão celular (MEV e Fluorescência, n=2) foram avaliados. Nos fibroblastos foi realizada cultura 3D em matriz de colágeno e avaliação morfológica em microscópio Confocal (n=2). Os dados quantitativos obtidos foram submetidos aos testes estatísticos de ANOVA complementado por Tukey ou Games-Howell ao nível de significância de 5%. Observou-se aumento da rugosidade média (Ra) após o recobrimento dos discos com EGF, porém com liberação imediata deste fator de crescimento e incorporação do mesmo após 1 h de contato com as células. Para todos os grupos experimentais observou-se aumento da viabilidade dos fibroblastos e das células epiteliais quando semeados sobre superfície de Ti comparados ao grupo controle. Quando as células foram semeadas sobre superfícies de ZrO_2 apenas as células epiteliais tratadas com LBP apresentaram aumento na viabilidade. Maior síntese de IL-6 e IL-8 foram verificadas nos grupos tratados com TNF- α , sendo que as terapias testadas, especialmente a LBP na dose de $3,0 J/cm^2$ inibiu a expressão das interleucinas independente do tipo de células e superfície. Houve aumento na expressão gênica de *IL-6* de ambas células tratadas com TNF- α semeadas sobre discos de Ti e ZrO_2 com modulação negativa na síntese desta interleucina quando tratados com LBP e EGF. Resultados semelhantes foram observados para expressão de *IL-8* pelas células epiteliais submetidas aos tratamentos com TNF- α e EGF. Também foi observado aumento na expressão gênica de *VEGF* pelos fibroblastos expostos ao EGF e submetidas à LBP com redução na expressão gênica de *VEGF* nos grupos expostos ao TNF- α . Independente dos grupos avaliados, houve

espalhamento uniforme das células por toda superfície dos discos de Ti e ZrO_2 quando realizada a MEV. Porém foi observado alterações no citoesqueleto das células na presença do estímulo inflamatório bem evidentes quando realizada cultura 3D de fibroblastos através da Microscopia Confocal. De acordo com as metodologias usadas neste estudo, foi possível demonstrar que o EGF e parâmetros específicos de LBP podem biomodular a resposta inflamatória celular, auxiliando na recuperação destas células quando expostas a agentes inflamatórios.

Palavras-chave: Titânio. Zircônio. Terapia com luz de baixa intensidade. Fator de crescimento epidérmico.

Pansani TN. Effects of low-level laser therapy and epidermal growth factor on cell metabolism in titanium and zirconia surfaces. [Tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2019.

ABSTRACT

The attachment of the connective tissue to abutment surface of dental implants prevents the apical migration of the junctional epithelium and the bone crest reabsorption, normally caused by the peri-implant inflammation, which compromises the aesthetics and the success of the rehabilitation procedure. The use of therapies to promote cell adhesion in order to induce effective biological sealing can improve aesthetic and functional conditions in prosthetic rehabilitation. The aim of this study was to evaluate the effects of low-level laser therapy (LLLT) and surfaces coating of titanium (Ti) and zirconia (ZrO₂) with epidermal growth factor (EGF) on adhesion and metabolism of oral mucosa cells exposed or not to tumor necrosis alpha (TNF- α) inflammatory stimuli. Gingival fibroblasts and epithelial cells were isolated and seeded on surface Ti or ZrO₂ surfaces, simulating the in vitro biological sealing. In EGF-coated groups, this growth factor was applied to Ti and ZrO₂ surfaces prior to cell culture. After seeding cells, they were irradiated 3 times with LLLT (LaserTABLE, InGaAsP, 780 $\pm$ 3 nm) at 24 h intervals at doses of 0.5 J/cm², 1.5 J/cm² and 3.0 J/cm², according to the established groups and then, TNF- α was applied to them for 24 h. Discs surface roughness analyzes were performed by confocal microscopy (n=8), EGF release of the coated substrates and cell adhesion by direct fluorescence. Cell viability (AlamarBlue, n=8), *IL-6*, *IL-8* and *VEGF* (qPCR, n=5) gene expression, *IL-6*, *IL-8* (ELISA, n=6) synthesis, as well as cell morphology and adhesion (SEM and Fluorescence, n=2) were evaluated. For fibroblasts, 3D culture in collagen matrix and morphological evaluation under Confocal Microscopy were performed (n=2). Quantitative data obtained were submitted to ANOVA statistical test complemented by Tukey or Games-Howell at 5% of significance level. It was observed an increase of roughness average (Ra) after the EGF-coating, but with immediate release of this growth factor and its incorporation after 1 h of contact with the cells. For all experimental groups, the viability of fibroblasts and epithelial cells was increased when cells were seeded onto Ti surface compared to the control group. When cells were seeded onto ZrO₂ surfaces only LLLT-treated epithelial cells demonstrated increased viability. Increased *IL-6* and *IL-8* synthesis were observed in the TNF- α treated groups and the LLLT tested, especially 3.0 J/cm² laser dose inhibited the interleukin expression regardless of cell type and surface. Increased *IL-6* gene expression in both cells seeded onto Ti and ZrO₂ discs and treated with TNF- α , and down modulation in this interleukin synthesis when cells were submitted to LLLT and EGF treatments. Similar results were observed for *IL-8* expression by epithelial cells submitted to TNF- α and EGF. There was also an increase in *VEGF* gene expression by fibroblasts submitted to EGF and LLLT with decreased *VEGF* gene expression in TNF- α -treated groups. Regardless of the groups evaluated, there was uniform spread of cells throughout the Ti and ZrO₂ discs when SEM was performed. However, alterations in the cells' cytoskeleton were very evident in the presence of inflammatory stimulus when fibroblast 3D culture in collagen matrix was performed by Confocal Microscopy. According to the methodologies used in this laboratorial study, it was possible to demonstrate that EGF and specific LLLT parameters can biomodulate some

inflammatory cell responses, improving the recovery of cell exposed to inflammatory conditions.

Key-words: Titanium. Zirconium. Low-level light therapy. Epidermal growth factor.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 PROPOSIÇÃO	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Preparação dos Discos	23
4.1.1 Preparação dos discos de titânio (Ti)	23
4.1.2 Preparação dos discos de zircônia (ZrO ₂)	24
4.1.3 Padronização dos discos de titânio (Ti) e zircônia (ZrO ₂) quanto à rugosidade.....	24
4.2 Padronização Metodológica e Validação Experimental	25
4.2.1 Isolamento e obtenção de cultura primária de fibroblastos de gengiva.....	25
4.3 Padronização da Aplicação do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) Sobre Discos de Titânio (Ti), Estudo de Liberação e Penetração nos Fibroblastos Gengivais	26
4.3.1 Preparação dos discos de Ti recobertos com EGF	26
4.3.2 Liberação de EGF em meio aquoso	27
4.3.3 Verificação da incorporação do EGF pelos fibroblastos	28
4.3.4 Avaliação da viabilidade dos fibroblastos gengivais semeados sobre superfícies de Ti recobertas com EGF	29
4.3.4.1 Ensaio de viabilidade celular (AlamarBlue®)	29
4.4 Avaliação da Concentração de TNF- α Como Estímulo Inflamatório	30
4.4.1 Análise da síntese de interleucina 6 (IL-6) por imunoensaio de ELISA	30
4.5 Avaliação do Delineamento Experimental Proposto	31
4.5.1 Irradiação (LBP)	32
4.5.2 Análise da viabilidade celular dos fibroblastos gengivais expostos ao TNF- α pelo ensaio de MTT	34
4.6 Desenvolvimento das Metodologias Propostas no Projeto	35
4.6.1 Análise da rugosidade dos discos de Ti e ZrO ₂ com e sem a aplicação do fator de crescimento epidérmico (EGF)	36
4.6.2 Experimentos utilizando os fibroblastos gengivais e as células epiteliais	36
4.6.2.1 Isolamento das células epiteliais de gengiva	36
4.6.2.2 Cultivo celular	38
4.6.2.3 Exposição das células ao TNF- α	39
4.7 Avaliação da Viabilidade Celular pelo Ensaio de AlamarBlue®	39
4.8 Avaliação de Interleucina 6 e 8 pelo Imunoensaio ELISA	39
4.9 Avaliação da Adesão e Morfologia Celular por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	39
4.10 Avaliação da Morfologia e Espreadimento Celular por Microscopia de Fluorescência	40

4.11 Avaliação da Expressão Gênica de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e Interleucina 6 e 8 (IL-6 e IL-8) por qPCR	41
4.12 Desenvolvimento de Modelo de Cultura de Células 3D sobre Superfícies de Ti e ZrO ₂	42
4.13 Análise de Microscopia 3D (Confocal)	43
4.14 Análise dos Resultados	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Padronização da Rugosidade dos Discos de Ti	45
5.2 Padronização da Rugosidade dos Discos de ZrO ₂	47
5.3 Padronização da Aplicação do EGF sobre Discos Ti: Estudo de Liberação e Penetração nas Células	49
5.4 Avaliação da Concentração de TNF- α Como Estímulo Inflamatório	51
5.4.1 Análise da síntese de interleucina 6 (IL-6) por imunoenensaio de ELISA	51
5.5 Validação do Delineamento Experimental Proposto Através da Análise da Viabilidade Celular dos Fibroblastos Gengivais Expostos ao TNF- α pelo Ensaio de MTT	52
5.6 Análise da Rugosidade dos Discos de Ti e ZrO ₂ Com e Sem a Aplicação do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF)	53
5.7 Experimentos Propostos no Projeto de Pesquisa Utilizando os Fibroblastos Gengivais e Células Epiteliais	55
5.7.1 Viabilidade celular pelo ensaio de AlamarBlue®	56
5.7.2 Síntese de IL-6 e IL-8	58
5.7.3 Adesão e Morfologia Celular por MEV	63
5.7.4 Expressão de faloidina e espraçamento das células (Fluorescência)	69
5.7.5 Expressão gênica de <i>IL-6</i> , <i>VEGF</i> e <i>IL-8</i> por qPCR	76
5.7.6 Análise em microscópio de fluorescência Confocal de cultura em 3D	80
6 DISCUSSÃO	85
7 CONCLUSÃO	90
7.1 Conclusão Geral	90
7.2 Conclusões Específicas	90
REFERÊNCIAS	91
ANEXO A – Comitê de Ética	100

1 INTRODUÇÃO

O selamento biológico após a instalação do implante dentário é caracterizado por uma íntima interação entre epitélio, tecido conjuntivo e a superfície dos componentes do implante. Este selamento tem o objetivo de prevenir a contaminação bacteriana local, prevenindo uma possível reabsorção óssea e recessão dos tecidos moles, sendo, portanto, um fator relevante para o sucesso, em longo prazo, de implantes dentários^{5,88}. A fixação direta do tecido conjuntivo à superfície dos pilares dos implantes dentários, os quais também são denominados abutments, deve ocorrer de forma a manter sua porção submucosa intacta, determinando a importante vedação biológica. O selamento biológico é capaz de prevenir a impacção alimentar e a contaminação bacteriana na interface implante-tecido, impedindo, portanto, a migração apical do epitélio juncional, evitando a reabsorção da crista óssea subjacente^{5,77,88}.

No dente natural, a interface dente-gengiva consiste das seguintes seções: 1) sulco gengival, 2) fixação epitelial, e 3) fixação do tecido conjuntivo⁷⁷. Para os implantes dentários, a porção da mucosa que envolve a superfície do pilar pode ser dividida em duas zonas diferentes: 1) uma zona marginal que abriga o epitélio juncional, e 2) uma zona apical constituído por tecido conjuntivo rico em fibras^{1,5,20,28}.

No selamento biológico, a adesão epitelial ao abutment do implante dental ocorre através de hemidesmossomos e uma lâmina basal^{47,48}, bem como pela fixação de fibroblastos, mantida pelo complexo de adesão focal (contatos focais), que consiste em proteínas (integrina e actina) que se comunicam com a matriz extracelular (ME) e citoesqueleto das células regionais^{27,34,55}.

Diversos estudos já avaliaram, através de análise morfológica qualitativa, as principais proteínas do aparato de inserção, tal como a integrina, com o objetivo de melhorar a interação do tecido mole com a superfície dos componentes dos implantes^{44,45,92}. Por outro lado, a quantificação da força de adesão celular ao implante e a avaliação dos papéis de proteínas ligantes neste evento tecidual são raros⁷⁷.

Quando ocorre infiltração bacteriana e instalação de um processo infeccioso/inflamatório no tecido conjuntivo ao redor dos componentes do implante, as células sofrem perda da adesão ao abutment, ocasionando migração apical do epitélio com consequente comprometimento da estética^{32,56,68}. Assim, a formação de um

selamento eficaz e biologicamente funcional, capaz de resistir à infiltração bacteriana, torna-se um desafio para a manutenção estética e função das próteses sobre implantes.

A laserterapia de baixa potência (LBP) tem sido amplamente utilizada na área da saúde devido aos seus diversos efeitos fotobiológicos, tais como: aumento do metabolismo e proliferação celular; aumento na síntese de colágeno; elevação na síntese protéica, de DNA e RNA; estímulo à formação de novos capilares sanguíneos; e aumento na expressão de fatores de crescimento^{11,13,21,38,51,71,74}. Estes efeitos positivos da LBP ocorrem como resultado da interação da luz com os tecidos e suas células, sendo que isto depende das características ópticas específicas do laser, tais como comprimento de onda, potência e densidade de energia, bem como das características dos tecidos alvos, como presença e tipo de cromóforos^{59,73}.

Alguns pesquisadores demonstraram que a irradiação de fibroblastos e células epiteliais em cultura com LBP causou aumento da proliferação e expressão gênica destas células, com significativo estímulo na expressão de colágeno tipo I e fator de crescimento vascular endotelial – VEGF^{3,8,11,12,36,37,60,61,64,65,84,85}. Além disso, esta terapia também se mostrou eficaz na modulação da expressão de citocinas inflamatórias^{14,16,86}. Desta forma, pode-se sugerir que o uso da LBP poderia acelerar o processo de adesão celular, bem como estimular a proliferação e síntese de moléculas da matriz extracelular e outras proteínas, favorecendo a formação de uma barreira biológica mais rápida e mais efetiva quando da realização de implantes dentários.

Outra modalidade terapêutica que tem sido utilizada para acelerar o reparo tecidual é o uso de fatores de crescimento. O fator de crescimento epidérmico (EGF) é uma molécula de baixo peso molecular (6 kDa), produzida por glândulas salivares, incluindo parótida e submandibular e também por alguns tipos celulares específicos, tais como plaquetas, células epiteliais e do tecido conjuntivo^{31,80}. Dessa maneira, o EGF é essencial para a manutenção da mucosa oral, bem como para o processo de reparo deste tipo de tecido⁷⁹.

Já foi demonstrado que o EGF é capaz de estimular o metabolismo, proliferação e migração celular^{12,33,79,85,95}, sendo que seu uso tópico ou por via subcutânea acelera a re-epitelização de feridas. Isto indica que a terapia com EGF pode ser eficaz para o tratamento de úlceras e estomatites de difícil resolução⁴². Portanto, o potencial do EGF de bioestimular células, torna-o como um possível e

promissor agente a ser empregado como modalidade terapêutica coadjuvante para auxiliar e acelerar o processo de reparo tecidual.

7 CONCLUSÃO

As conclusões do presente estudo estão descritas a seguir.

7.1 Conclusão Geral

De acordo com a metodologia empregada nesta pesquisa e diante das limitações deste estudo laboratorial, é possível concluir, de maneira geral, que o fator de crescimento epidérmico (EGF) aplicado sobre os discos de titânio (Ti) e zircônia (ZrO_2) e a laserterapia direcionada sobre células da mucosa oral semeadas sobre estes substratos aumentam a viabilidade e metabolismo celular, bem modulam a resposta inflamatória celular induzida *in vitro*.

7.2 Conclusões Específicas

A impregnação das superfícies de Ti e ZrO_2 com EGF e o uso da LBP, principalmente na dose de $3,0 \text{ J/cm}^2$, influenciam positivamente a viabilidade celular, favorecem a síntese dos mediadores inflamatórios IL-6 e IL-8, bem como aumentam a expressão gênica de *VEGF*;

Apesar das células apresentarem boa adesão e espraiamento sobre as superfícies de Ti e ZrO_2 , a exposição delas ao $\text{TNF-}\alpha$ causa alteração de citoesqueleto, especialmente em fibroblastos gengivais cultivados em matriz 3D;

Ambas as terapias propostas neste estudo, caracterizadas pelo uso de EGF e aplicação da LBP, são capazes de modular negativamente a síntese de IL-6 e IL-8, bem como a expressão gênica de *IL-6* após exposição de células da mucosa oral ao estímulo inflamatório com $\text{TNF-}\alpha$.

REFERÊNCIAS*

1. Abrahamsson I, Berglundh T, Glantz PO, Lindhe J. The mucosal attachment at different abutments: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol*.1998; 25(9): 721–7.
2. Albrektsson T, Brånemark PI, Hansson HA, Lindström J. Osseointegrated titanium implants: requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta Orthop Scand*. 1981; 52(2):155-70.
3. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MMM. Comparison of the low-level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surg Med*. 2001; 29(2): 179-84.
4. Altay MA, Tasar F, Tosun E, Kan B. Low-level laser therapy supported surgical treatment of bisphosphonate related osteonecrosis of jaws: a retrospective analysis of 11 cases. *Photomed Laser Surg*. 2014; 32(8): 468-75.
5. An N, Rausch-fan X, Wieland M, Matejka M, Andrukhov O, Schedle A. Initial attachment, subsequent cell proliferation/viability and gene expression of epithelial cells related to attachment and wound healing in response to different titanium surfaces. *Dent Mater*. 2012; 28(12): 1207-14.
6. Aplin AE, Howe AK, Juliano RL. Cell adhesion molecules, signal transduction and cell growth. *Curr Opin Cell Biol*.1999; 11(6): 737-44.
7. Arany PR, Cho A, Hunt TD, Sidhu G, Shin K, Hahm E et al. Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor- β 1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. *Sci Transl Med*. 2014; 28; 6(238): 238ra69.
8. Azevedo LH, Eduardo FP, Moreira MS, Eduardo CP, Marques MM. Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth. *Lasers Med Sci*. 2006; 21(2): 86-9.
9. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008; 16(5): 585–601.
10. Basso FG, Oliveira CF, Fontana F, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA. In vitro effect of low level laser therapy on typical oral microbial biofilms. *Braz Dent J*. 2011; 22(6): 502-10.

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

11. Basso FG, Oliveira CF, Kurachi C, Hebling J, de Souza Costa CA. Biostimulatory effect of low-level laser therapy on keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci.* 2013; 28(2): 367-74.
12. Basso FG, Pansani TN, Cardoso LM, Citta M, Soares DG, Scheffel DS, Hebling J, de Souza Costa CA. Epithelial cell-enhanced metabolism by low-level laser therapy and epidermal growth factor. *Laser Med Sci.* 2017; 33(2): 445-9.
13. Basso FG, Pansani TN, Turrioni APS, Bagnato VS, Hebling J, de Souza Costa CA. In vitro wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. *Int J Dent.* 2012; 2012: 719452.
14. Basso FG, Pansani TN, Soares DG, Scheffel DL, Bagnato VS, de Souza Costa CA et al. Biomodulation of inflammatory cytokines related to oral mucositis by low-level laser therapy. *Photochem Photobiol.* 2015; 91(4), 952-6. A
15. Basso FG, Soares DG, Pansani TN, Cardoso LM, Shceffel DL, de Souza Costa CA et al. Proliferation, migration, and expression of oral-mucosal-healing-related genes by oral fibroblasts receiving low-level laser therapy after inflammatory cytokines challenge. *Laser Surg Med.* 2016; 48(10):1006-14. A
16. Basso FG, Soares DG, Pansani TN, Turrioni AP, Scheffel DL, de Souza Costa CA et al. Effect of LPS treatment on the viability and chemokine syntesis by epithelial cells and gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(8): 1117-21. B
17. Basso FG, Soares DG, de Souza Costa CA, Hebling J. Low-level laser therapy in 3D cell culture model using gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(5): 973-8. B
18. Basso FG, Pansani TN, Turrioni AP, Soares DG, de Souza Costa CA, Hebling J. Tumor necrosis factor- α and interleukin (IL)-1 β , IL-6, and IL-8 impair in vitro migration and induce apoptosis of gingival fibroblasts and epithelial cells, delaying wound healing. *J Periodontol.* 2016; 87(8): 990-6. C
19. Baxter GD. Therapeutic lasers: theory and practice. Livingstone: Churchill; 1994.
20. Berglundh T, Lindhe J, Ericsson I, Marinello CP, Liljenberg B, Thomsen P. The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Implants Res.* 1991; 2(2): 81–90.
21. Bisht D, Gupta SC, Misra V, Mital VP, Sharma P. Effect of low intensity lasers radiation on healing of open skin wounds in rats. *Indian J Med Res.* 1994; 100: 43-6.
22. Blázquez-Hinarejos M, Ayuso-Montero R, Jané-Salas E, López-López J. Influence of surface modified dental implant abutments on connective tissue attachment: a systematic review. *Arch Oral Biol.* 2017; 80: 185-92.
23. Bottino MA, Faria R, Valandro LF. Percepção - Estética em Próteses Livres de Metal em Dentes Naturais e Implantados. 1 ed. São Paulo: Artes Médicas Ltda; 2009.

24. Brånemark PI, Adell R, Albrektsson T, Lekholm U, Lundkvist S, Rockler B. Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. *Biomaterials*. 1983; 4(1): 25-8.
25. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969; 3(2): 81-100.
26. Bürgers R, Gerlach T, Hahnel S, Schwarz F, Handel G, Gosau M. In vivo and in vitro biofilm formation on two different titanium implant surfaces. *Clin Oral Impl Res*. 2010; 21(2): 156–64.
27. Burrige K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu Rev Cell Biol*. 1988; 4: 487-525.
28. Buser D, Weber HP, Donath K, Fiorellini JP, Paquette DW, Williams RC. Soft tissue reactions to non-submerged unloaded titanium implants in beagle dogs. *J Periodontol*. 1992; 63(3): 225-35.
29. Capp C, Zennig N, Wajner S, Maia AL. The role of vascular endothelial growth factor in tumor. *Revista HCPA*. 2009; 29(1): 51-59.
30. Carreira A, Lojudice F, Halcsik E, Navarro R, Sogayar M, Granjeiro J. Bone morphogenetic proteins facts, challenges, and future perspectives. *J. Dent. Res*. 2014; 93(4): 335–45.
31. Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem*. 1990; 265(14): 7709–12.
32. Chehroudi B, Gould T, Brunette DM. The role of connective tissue in inhibiting epithelial downgrowth on titanium-coated percutaneous implants. *J Biomed Mater Res*. 1992; 26(4): 493–515.
33. Chen JD, Kim JP, Zhang K, Sarret Y, Wynn KC, Kramer RH, et al. Epidermal growth factor (EGF) promotes human keratinocytes locomotion on collagen by increasing the $\alpha 2$ integrin subunit. *Exp Cell Res*. 1993; 209(2): 216-23.
34. Chen WT, Singer SJ. Immunoelectron microscopic studies of the sites of cell–substratum and cell–cell contacts in cultured fibroblasts. *J Cell Biol*. 1982; 95(1): 205–22.
35. Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontol 2000*. 2002; 30: 70-8.
36. Damante CA, De Micheli G, Miyagi SPH, Feist IS, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of fibroblast growth factors by human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*. 2009; 24(6): 885-91.
37. Eduardo FP, Mehnert DU, Monezi TA, Zezell DM, Schubert MM, Eduardo CP, et al. Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg Med*. 2007; 39(4): 365-72.

38. Efendiev AI, Tosltykh PI, Dadashev AI, Azimov SA. Increasing the scar strength after preventive skin irradiation with low-intensity lasers. *Klin Khir.* 1992; 1: 23-5.
39. Ejiri K, Aoki A, Yamaguchi Y, Ohshima M, Yzumi Y. High-frequency low-level diode laser irradiation promotes proliferation and migration of primary cultured human gingival epithelial cells. *Lasers Med Sci.* 2014; 29(4): 1339-47.
40. Esfahanizadeh N, Motalebi S, Daneshparvar N, Akhoundi N, Bonakdar S. Morphology, proliferation, and gene expression of gingival fibroblasts on Laser-Lok, titanium, and zirconia surfaces. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(5): 863-73.
41. Fujihara NA, Hiraki KRN, Marques MM. Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(4): 332-6.
42. Fujisawa K, Miyamoto Y, Nagayama M. Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32(6): 358-66.
43. Gao X, Xing D. Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J Biomed Sci.* 2009; 16: 4–19.
44. Garrod DR. Cell to cell and cell to matrix adhesion. *BMJ.* 1993; 306 (6879): 703-5.
45. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science.* 1999; 285 (5430): 1028-32.
46. Gittens RA, Scheideler L, Rupp F, Hyzy SL, Geis-Gerstorfer J, Schwartz Z, Boyan BD. A review on the wettability of dental implant surfaces II: biological and clinical aspects. *Acta Biomater.* 2014; 10(7): 2907–18.
47. Gould TR, Brunette DM, Westbury L. The attachment mechanism of epithelial cells to titanium in vitro. *J Periodont Res.* 1981; 16(6): 611–16.
48. Gould TR, Westbury L, Brunette DM. Ultrastructural study of the attachment of human gingiva to titanium in vivo. *J Prosthet Dent.* 1984; 52(3): 418–20.
49. Gündoğar H, Şenyurt SZ, Erciyas K, Yalım M, Üstün K. The effect of low-level laser therapy on non-surgical periodontal treatment: a randomized controlled, single-blind, split-mouth clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(9):1767-73.
50. Hameedaldeen A, Liu J, Batres A, Graves GS, Graves DT. FOXO1, TGF- β regulation and wound healing. *Int J Mol Sci.* 2014; 15; 15(9):16257-69.
51. Hawkins DH, Abrahamse H. The role of lasers fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon lasers irradiation. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(1): 74-83.

52. Hosoki M, Nishigawa K, Miyamoto Y, Ohe G, Matsuka Y. Allergic contact dermatitis caused by titanium screws and dental implants. *J Prosthodont Res.* 2016; 60(3): 213-9.
53. Houreld NN, Sekhejane PR, Abrahamse H. Irradiation at 830 nm stimulates nitric oxide production and inhibits proinflammatory cytokines in diabetic wounded fibroblast cells. *Lasers Surg Med.* 2010; 42: 494–502.
54. Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light laser. *Dose Response.* 2009; 7(4): 358-83.
55. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992; 69(1): 11-25.
56. Iglhaut G, Schwarz F, Winter RR, Mihatovic I, Stimmelmayer M, Schliephake H. Epithelial attachment and downgrowth on dental implant abutments. *J Esthet Restor Dent.* 2014; 26(5): 324-31.
57. Karu TI. Multiple Roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-radiation. *Life.* 2010; 62(8): 607–10.
58. Karu TI. Photobiological fundamentals of low level power laser therapy. *IEEE J. Quantum Electron.* 1987; 23: 1703-17.
59. Karu TI. Photobiology of low power lasers effects. *Health Phys.* 1989; 56: 691-704.
60. Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. Determining optimal dose of laser therapy for attachment and proliferation of human oral fibroblasts cultured on titanium implant material. *J Biomed Mater Res.* 2005; 73(1): 55–62. A
61. Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanæs HR, Mustafa K. Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials.* 2005; 26(17): 3503-9. B
62. Kim YD, Kim SS, Hwang DS, Kim SG, Kwon YH, Shin SH, Kim UK, Kim JR, Chung IK. Effect of low-level laser treatment after installation of dental titanium implant-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: an experimental study in rats. *Lasers Surg Med.* 2007; 39(5): 441-50.
63. Kim SS, Yeo IS, Lee SJ, Kim DJ, Jang BM, Kim SH, Han JS. Clinical use of alumina-toughened zirconia abutments for implant-supported restoration: prospective cohort study of survival analysis. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24(5): 517-22.
64. Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, d'Hoedt, B. Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med.* 2002; 30(5): 365-9.

65. Kreisler M, Christoffers AB, Willershausen B, d'Hoedt B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J Clin Periodontol*. 2003; 30(4): 353-8.
66. Lee DW, Kim JG, Kim MK, Ansari S, Moshaverinia A, Choi SH, Ryu JJ. Effect of laser-dimpled titanium surfaces on attachment of epithelial-like cells and fibroblasts. *J Adv Prosthodont*. 2015; 7(2):138-45.
67. Lima EMCX, Koo H, Smith AMV, Del Bel Cury AA. Adsorption of salivary and serum proteins, and bacterial adherence on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Clin Oral Impl Res*. 2008; 19(8): 780–5.
68. Lindhe J, Berglundh T. The interface between mucosa and implant. *Periodontol* 2000. 1998; 17: 47-54.
69. Lindhe J, Meyle J. Group D of European workshop on periodontology. Peri-implant diseases: consensus report of the sixth European workshop on periodontology. *J Clin Periodontol*. 2008; 35(8): 282-5.
70. Lins EC, Oliveira CF, Guimarães OC, Costa CA, Kurachi C, Bagnato VSA. A novel 785-nm laser diode-based system for standardization of cell culture irradiation. *Photomed Laser Surg*. 2013; 31(10): 466–73.
71. Loevschall H, Arenholt-Bindslev D. Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. *Lasers Surg Med*. 1994; 14(4): 347-54.
72. Lopes D, Bressan E, Chiapasco M, Rossi A, Romeo E. Zirconia and titanium implant abutments for single-tooth implant prostheses after 5 years of function in posterior regions. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2013; 28(1): 281-7.
73. Low L, Reed A. Eletroterapia explicada: principios e pratica. 3ed. Barrier: Manole; 2001.
74. Marques MM, Pereira NA, Fujihara NA, Nogueira FN, Eduardo CP. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2004; 34(3): 260 –5.
75. Mendonça G; Mendonça DB; Aragão FJ; Cooper LF. Advancing dental implant surface technology from micron-to nanotopography. *Biomaterials*. 2008; 29(28): 3822–35.
76. Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. Impaired wound healing. *Clin Dermatol*. 2007; 25(1): 19-25.
77. Moon YH, Yoon MK, Moon JS, Kang JH, Kim SH, Yang HS, Kim MS. Focal adhesion linker proteins expression of fibroblast related to adhesion in response to different transmucosal abutment surfaces. *J Adv Prosthodont*. 2013; 5(3): 341-50.
78. Navolanic PM, Steelman LS, McCubrey JA. EGFR family signaling and its association with breast cancer development and resistance to chemotherapy. *Int J Oncol* 2003; 22(2): 237– 52.

79. Noguchi S, Ohba Y, Oka T. Effect of salivary epidermal growth factor on wound healing of tongue in mice. *Am J Physiol.* 1991; 260(4): E620–5.
80. Ohshima M, Sato M, Ishikawa M, Maeno M, Otsuka K. Physiologic levels of epidermal growth factor in saliva stimulate cell migration of and oral epithelial cell line, HO-1-N-1. *Eur J Oral Sci.* 2002; 100(2): 130-6.
81. Oliveira CF, Hebling J, Souza PPC, Sacono NT, Lessa FR, Lizareli RFZ et al. Effect of low level laser irradiation on odontoblast-like cells. *Laser Phys Lett.* 2008; 90(1): 14-8.
82. Oliveira CF, Basso FG, Lins ECCC, Kurachi C, Hebling J, Bagnato VS et al. In vitro effect of low level laser on odontoblast-like cells. *Laser Phys Lett.* 2011; 8: 155-63.
83. Pae A, Lee H, Kim HS, Kwon YD, Woo YH. Attachment and growth behaviour of human gingival fibroblasts on titanium and zirconia ceramic surfaces. *Biomed Mater.* 2009; 4(2): 025005.
84. Pansani TN, Basso FG, Turirioni AP, Kurachi C, Hebling J, de Souza Costa CA. Effects of low-level laser therapy on the proliferation and apoptosis of gingival fibroblasts treated with zoledronic acid. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014; 43(8): 1030-4.
85. Pansani TN, Basso FG, Turrioni APS, Soares DG, Hebling J, de Souza Costa CA. Effects of low-level laser therapy and epidermal growth factor on the activities of gingival fibroblasts obtained from young or elderly individuals. *Lasers Med Sci.* 2017; 32(1): 45-52.
86. Pansani TN, Basso FG, Soares DG, da Silveira Turrioni AP, Hebling J, de Souza Costa CA. Photobiomodulation in the metabolism of LPS-exposed epithelial cells and gingival fibroblasts. *Photochem Photobiol.* 2018; 94(3):598-603.
87. Pansani TN, Basso FG, Souza IDR, Hebling J, de Souza Costa CA. Characterization of titanium surface coated with epidermal growth factor and its effect on human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2019; 102:48-54.
88. Park JC, Kim HM, Ko J. Effects of extracellular matrix constituents on the attachment of human oral epithelial cells at the titanium surface. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1998; 13(6): 826-36.
89. Park JH, Olivares-Navarrete R, Baier RE, Meyer AE, Tannenbaum R, Boyan BD, Schwartz Z. Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response. *Acta Biomaterialia.* 2012; 8(5): 1966-75.
90. Passos CP, Casais PD e Machado S, Toralles MBP, Bahiana MC, Silva O, Aguiar MC, Nascimento RJM, Campos MIG. O VEGF na doença falciforme: Revisão de Literatura. *R Ci méd biol.* 2010; 9(1): 83-8.

91. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg.* 2005; 31(3): 334-9.
92. Räisänen L, Kononen M, Juhanoja J, Varpavaara P, Hautaniemi J, Kivilahti J, Hormia M. Expression of cell adhesion complexes in epithelial cells seeded on biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res.* 2000; 49(1): 79–87.
93. Ramineni SK, Fowler CB, Fisher PD, Cunningham LL, Puleo DA. Effects of epidermal growth factor-loaded mucoadhesive films on wounded oral tissue rafts. *Biomed Mater.* 2015; 10(1): 015026.
94. Renvert S, Aghazadeh A, Hallstrom H, Persson GR. Factors related to peri-implantitis – a retrospective study. *Clin Oral Impl Res.* 2014; 25(4): 522-9.
95. Ryu S, Moon SY, Yang Y, Moon SR, Hong JP, Choi J, Lee SW. Recombinant human epidermal growth factor accelerates the proliferation of irradiated human fibroblasts and keratinocytes in vitro and in vivo. *J Radiat Res.* 2009; 50(6): 545–52.
96. Sailer I, Philipp A, Zembic A, Pjetursson BE, Hammerle CH, Zwahlen M. A systematic review of the performance of ceramic and metal implant abutments supporting fixed implant reconstructions. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20(4): 4-31.
97. Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schion H, Schindl L. Low-intensity lasers therapy: a review. *J Investig Med.* 2000; 48(5): 312-26.
98. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res.* 2007; 86(4): 306-19.
99. Simunović-Soskić M, Pezelj-Ribarić S, Brumini G, Glazar I, Grzić R, Miletić I. Salivary levels of TNF-alpha and IL-6 in patients with denture stomatitis before and after laser phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(2): 189-93.
100. Tang E, Khan I, Andreana S, Arany PR. Laser-activated transforming growth factor- β 1 induces human β -defensin 2: implications for laser therapies for periodontitis and peri-implantitis. *Periodontal Res.* 2017; 52(3): 360-7.
101. Teng F, Ko C, Kuo H, Hu J, Lin J, Lou C, Hung C, Wang Y, Cheng C, Chen W. A comparison of epithelial cells, fibroblasts, and osteoblasts in dental implant titanium topographies. *Bioinorg Chem Appl.* 2012: 1-9.
102. Verran J, Airey P, Packer A, Whitehead KA. Microbial retention on open food contact surfaces and implications for food contamination. *Adv Appl Microbiol.* 2008; 64: 223-46.
103. Wagner VP, Meurer L, Danilevycz CK, Magnusson AS, Marques MM, Sant' Ana Filho M, Squarize CH, Martins MD. Influence of different energy densities of laser phototherapy on oral wound healing. *J Biomed Opt.* 2013; 18(12): 128002-7.