



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

Bianca Rafaeli Piovezan

***Avaliação da influência da Coenzima Q10
sobre o processo de reparo periimplantar de
implantes instalados em tíbias de ratos
expostos ou não à nicotina***

ARAÇATUBA – SP
2022

Bianca Rafaeli Piovezan

***Avaliação da influência da Coenzima Q10
sobre o processo de reparo periimplantar de
implantes instalados em tíbias de ratos
expostos ou não à nicotina***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia (Área de Periodontia).

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P662a Piovezan, Bianca Rafaeli.
Avaliação da influência da Coenzima Q10 sobre o processo de reparo periimplantar de implantes instalados em tíbias de ratos expostos ou não à nicotina / Bianca Rafaeli Piovezan. – Araçatuba, 2022
47 f. : il.; tab.

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

1. Nicotina 2. Reparo 3. Coenzimas I.T.

Black D64
CDD 617.64

Ana Claudia M. Grieger Manzatti CRB-8/6315

À Deus

Neste momento ofereço esta conquista à Deus, pois nos momentos mais difíceis, momentos pelos quais as pessoas ao redor não conseguiam ajudar, o Senhor me deu forças para continuar e forneceu anjos para me acompanhar durante essa jornada.

“Deus obrigado por iluminar o meu caminho. Minha vida tem sido marcada por realizações diárias, que às vezes não dou o devido valor, mas eu sei que a graça de Deus se faz presente em todos os momentos da minha vida.”

Aos Meus Pais

À minha mãe *Ana*, ao meu pai *Evandro*.

Ambos são exemplos de superação, amor e amizade para mim. Se não fosse pelo suporte, carinho e atenção que me forneceram em todos esses anos nada disso seria possível. Essa jornada nos uniu ainda mais.

Todos os dias em direção à Fernando Prestes eu me sentia alegre pela possibilidade de estar com vocês e a cada despedida era um pedaço de mim que ficava em casa. Nem eu sei o quanto vocês abdicaram de suas vidas para que eu esteja aqui hoje.

Vocês são e sempre serão meus maiores exemplos, meus ídolos.

Independente de qualquer conquista, a maior delas é poder ser sua filha e ter herdado seus princípios.

Minha eterna gratidão. Amo vocês.

Aos Meus Familiares

À *Dra. Camila Frare Ravazzi.*

Eu não tenho palavras para agradecer o seu incentivo a esta profissão e o quanto você acreditou e acredita em mim. Obrigada pela sua influência nesta mulher que estou me tornando.

Aos meus *Avós e Bisavós.*

Eles foram aqueles que realmente sofreram e que batalharam por uma filosofia de família. Jamais me esquecerei das minhas raízes, daqueles que me pegaram no colo e ao mesmo tempo que me educavam, me deixavam viver e deixar meus pais loucos.

*Às minhas avós **Rosângela** e **Iraci** sempre presentes, mesmo distantes, e realizando orações.*

*Ao meu avô de coração, **Juvenal**, desde sempre tenho orgulho de ser sua neta.*

*Aos meus eternos anjos, meu avô **Waldomiro**, meu bisavô **Oziride** e minha bisavô **Ruth**. Ah, que sorte a minha ter convivido com vocês! Suas partidas repentinas me abalaram. Sou eternamente grata aos anos que passamos juntos. Espero que estejam orgulhosos.*

Ao meu namorado, *Augusto.*

Tive muita sorte nestes anos ao seu lado. Obrigada por ser meu companheiro e sempre me proporcionar tranquilidade, estar ao meu lado nos momentos mais difíceis. Ouvir meus desabafos todos os dias dessa jornada ao telefone. Faremos a vida acontecer!

Aos meus *Tios e Primos.*

Agradeço pelo carinho e palavras de incentivo durante toda essa jornada.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida, mais do que um professor e orientador, o senhor sempre se propôs a ser um amigo. Gostaria de agradecer a oportunidade de entrar na pós graduação, a paciência em todos momentos difíceis e a disposição de sempre ajudar, não só a mim, mas como a todos seus orientados. Gostaria de agradecer por ouvir meus desabaços e loucuras. Eu sei que o senhor se preocupa com nosso futuro e quer que estejamos bem, independente do lugar onde estivermos. Eu poderia estar agradecendo nesse momento por todos seus ensinamentos e ajuda, mas o senhor já sabe que somos todos gratos. Então eu prefiro agradecer a pessoa Juliano Milanezi de Almeida, que deixa seus momentos de alegria com seus entes queridos para nos ajudar a enfrentar nossas batalhas diárias. Eu tenho muito orgulho de ter sido sua orientada e pretendo continuar sendo.

Ao Prof. Dr. Edilson Ervolino agradeço por todos ensinamentos, pela paciência e carinho que o senhor tem com alunos. O senhor é um profissional extremamente dedicado com tudo que participa dentro da instituição, demonstrando uma relação de amor pela profissão que passou a ser exemplo para mim. Muito obrigado pela oportunidade, atenção e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Francisley Ávila Souza,

O senhor sempre teve muito carinho e estive à disposição dos alunos do Prof. Juliano. Muito obrigado pela convivência e ensinamentos durante essa caminhada.

“Feliz é aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina” (Cora Coralina)

Ao amigo *David Jonhatan Rodrigues Gusman!* Eu não tenho nem palavras para te agradecer. Você está presente em minha vida desde a iniciação científica e me ensinou tanto; teve tanta paciência; sempre se fez presente e proativo. Me espelho em você e na sua dedicação.

Ao amigo *Henrique Rinaldi Matheus*, agradeço por todos os momentos de companheirismo, eu não tenho palavras para agradecer o quanto você ajuda, não só a mim, mas a todos os outros. Você é um exemplo maravilhoso de pessoa, profissional e de pós graduando. Obrigada por acreditar em mim mesmo quando nem eu mesmo acreditaria que pudesse conseguir.

Ao amigo *Luiz Guilherme Fiorin*, agradeço pela amizade, você é um menino excepcional, com uma personalidade singular e cada dia que passa é uma surpresa nova com você. Te desejo todo sucesso e muita sorte. Obrigada por ouvir minhas paranoias, e se fazer disposto sempre.

À todos os alunos de iniciação científica, em especial à *Giovanna Zancan Cattarin*, quem tive o privilégio de acompanhar mais de perto. Agradeço pelos momentos que precisei e vocês sempre estiveram disponíveis para ajudar. Sou muito grato por esse companheirismo e desejo tudo de melhor à vocês, sempre que precisarem estarei aqui.

Aos queridos amigos da pós graduação, *Elisa, Otávio, Halef, Juliana e Lara*, agradeço pelo carinho, longas conversas, agradável convívio, por estarem sempre prontos a ajudar, a dividir as tristezas e angústias, além de multiplicar a alegria.

À todos os professores do mestrado,

Vocês foram importantes e contribuíram muito em todo meu aprendizado e caminhada durante estes anos.

À todos os colegas do mestrado,

Agradeço pela oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas e pela amizade criada neste período.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, nas pessoas do Diretor Prof. **Glauco Issamu Miyahara**, e do senhor Vice-Diretor **Prof. Alberto Carlos Botazzo** Delbempor proporcionar a realização desta pesquisa e pelos anos de pós-graduação e crescimento profissional.

A coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa do **Prof. Dr. Wirley Gonçalves Assunção**.

Aos Funcionários e ex-funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada – obrigado pela ajuda e disposição.

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

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pelo excelente trabalho, atenção dispensada, grande disposição em atender e ótimo relacionamento.

Aos funcionários e professores do Departamento de Ciências Básicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, por sempre me acolherem tão bem.

Aos professores da Pós Graduação da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, pelos ensinamentos durante todo o decorrer do curso.

Aos pacientes, que nos depositando confiança, deram-nos a oportunidade de aprender.

Finalmente, agradeço à **Deus**, ser superior, por ter me concedido essa oportunidade e ter colocado todos esses anjos em meu caminho.

OBRIGADA!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é se não uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

PIOVEZAN, B. R. **Avaliação da influência da Coenzima Q10 sobre o processo de reparo peri-implantar de implantes instalados em tíbias de ratos expostos ou não à nicotina.** f. 2022. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

O propósito do presente estudo foi avaliar a influência da Coenzima Q10 (CoQ10) no reparo periimplantar em implantes instalados em tíbias de ratos modificados sistemicamente ou não pela nicotina. Oitenta ratos machos (Wistar), foram divididos em quatro grupos (n=20). No dia 0 os animais receberam um implante (4 x 2,2mm – SLA) na metáfise proximal das tíbias direita e esquerda. Nos 30 dias que antecedem o procedimento cirúrgico e nos 28 que o sucedem, os animais receberam duas injeções subcutâneas diárias de 3mg/kg de hemissulfato de nicotina ou solução salina na região dorsal, com 12 horas de intervalo entre elas. Logo após à cirurgia, o protocolo se constituiu na administração via gavagem gástrica de 1 ml de glicerina vegetal, ou suplementação diária com 120 mg de CoQ10, ambos até o final do experimento. **SS (SHAM):** o protocolo de aplicação utilizado foi o de solução salina subcutânea, e os animais receberam gavagem gástrica diária de 1 ml de glicerina vegetal. **SS-CoQ10:** o protocolo de aplicação utilizado foi o de solução salina subcutânea e, como suplementação, receberam 120 mg de Coenzima Q10 via gavagem gástrica. **NIC:** o protocolo de aplicação utilizado foi o de nicotina, e os animais receberam gavagem gástrica diária de 1 ml de glicerina vegetal. **NIC-CoQ10:** o protocolo de aplicação utilizado foi o de nicotina e, como suplementação, os animais receberam 120 mg de CoQ10 via gavagem gástrica. As eutanásias foram aos 7 e 28 dias pós-operatórios. As peças coletadas foram processadas com desmineralização para as análises histológica, histométrica (PTON) e imunoistoquímica para detecção de BMP/2, OCN e TRAP; e sem desmineralização para análise da área do contato direto osso/implante (BIC). Após análise de normalidade e homocedasticidade, os dados foram submetidos aos testes mais adequados com significância de 5% ($p \leq 0,05$). Com relação ao contato osso implante, o grupo SS, SS-Q10 e NIC-

Q10, apresentaram maior BIC em todos os períodos experimentais quando comparado com o grupo NIC. Os grupos SS, SS-Q10 e NIC-Q10 apresentaram também maior PTON em todos os períodos experimentais quando comparado com o grupo NIC. A análise histológica dos tecidos periimplantares mostrou que o grupo NIC-Q10 apresentou características histológicas que se mostraram similares ao grupo controle, no entanto, com maior quantidade de tecido ósseo periimplantar e menor quantidade de tecido conjuntivo. Nos padrões de marcação imunohistoquímica, quando comparado ao grupo SS, o grupo NIC-Q10 apresentou menor imunomarcação para e OCN, menor marcação para TRAP e não houve diferenças quanto a marcação de BMP2. Dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que a Coenzima Q10 exerceu uma influência positiva na remodelação óssea periimplantar em implantes osseointegrados.

Palavras-chave: Nicotina. Reparo. Coenzima.

PIOVEZAN, B. R. Evaluation of the influence of Coenzyme Q10 on the periimplant repair processo of implants installed in the tíbias of rats exposed or not to nicotine. f. 2022. Disserta o (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

The purpose of the presente study was to evaluate the influence of Coenzyme Q10 (CoQ10) on periimplant repair in implants installed in the t bia of rats modiflicated sistemically or not by nicotine. Eighty male rats (Wistar) were divided into four groups(n=20). On day 0 the animals received na implant (4x2,2mm-SLA) in the proximal metaphasys of the right and left tíbias. In the 30 days preceding the surgical procedure and the 28 days following it, the animals received two daily subcutaneous injections of 3 mg/kg of nicotine hemissulfate or saline solution in the dorsal region, with a 12-hour interval between them. Soon after surgery, the protocol consisted of the administration via gastric gavage of 1ml of vegetable glycerin, or daily supplementation with 120 mg of CoQ10, both until the endo f of the experiment. SS (SHAM): the application protocol used was subcutaneous saline solution, and the animals received daily gastric gavage of 1 ml of vegetal glycerin. SS-CoQ10: the application protocol used was subcutaneous saline solution and, as a supplement, they received 120 mg of Coenzyme Q10 via gastric gavage. NIC: the application protocol used was nicotine, and the animals received daily gastric gavage of 1 ml of vegetable glycerin. NIC-CoQ10: the application protocol used was nicotine and, as a supplement, the animals received 120 mg of CoQ10 via gastric gavage. Euthanasias were performed at 7 and 28 days after surgery. The colleted pieces were processed with desmineralization for histological analysis, área of neofomad bone tissue, histomorfometric analysis (PTON) and immunohistochemistry for the detection of BMP2, OCN and TRAP; and without desmineralization for direct bone/implant contat (BIC) analysis. Regarding bon -implant contact, the SS, SS-Q10 and NIC-Q10 groups showed higher BIC in all experimental periods When compared to the NIC group. The histological analysis of the periimplant tissues

showed that the NIC-Q10 group presented histological characteristics that were similar to the control group, however, with a greater amount of periimplant bone tissue and less connective tissue. In immunohistochemical staining patterns, when compared to the SS group, the NIC-Q10 group showed lower immunostaining for and OCN, lower staining for TRAP and there were no differences regarding BMP2 staining. Within the limits of the present study, it can be concluded that Coenzyme Q10 exerted a positive influence on periimplant bone remodeling in osseointegrated implants.

Keywords: Nicotine. Repair. Coenzyme.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais e períodos de eutanásia	25
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Linha do tempo: administração de medicamentos e períodos de eutanásia.	26
Figura 2. Porcentagem de contato osso/implante (COI).	31
Figura 3. Porcentagem de tecido ósseo neoformado e características histológicas (PTON).	33
Figura 4. Padrão de imunomarcção de OCN nos tecidos periimplantares.	35
Figura 5. Padrão de imunomarcção de BMP2 nos tecidos periimplantares.	39
Figura 6. Padrão de imunomarcção de TRAP nos tecidos periimplantares.	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CoQ10 – Coenzima Q10
- BIC – Bone/Implant Contact
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- MMP-1 – Metaloproteinase 1
- MMP-2 – Metaloproteinase 2
- MMP-9 – Metaloproteinase 9
- RANKL – NF Kappa β Ligante
- RANK - NF Kappa β
- OPG – Osteoprotegerina
- BMP2 – Proteína Óssea Morfogenética
- TRAP – Tartarate-Resistant Acid Phosphatase
- NIC – Nicotina
- SS – Solução Salina
- HRP – Peroxidase Raiz Forte
- DAB – Tetracloridrato de Diaminobenzina
- HE – Hematoxilina & Eosina
- CEUA – Comitê de ética no Uso de Animais
- COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- PTON – Porcentagem de Tecido ósseo Neoformado
- COI- Contato Osso/Implante

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO	23
2.1 Objetivos Gerais	23
2.2 Objetivos Específicos	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Animais	24
3.2 Cálculo Amostral	24
3.3 Grupos Experimentais e Tratamentos	25
3.4 Períodos experimentais	25
3.5 Linha do Tempo	26
3.6 Protocolos experimentais	26
3.6.1 Protocolo de administração de nicotina ou solução de cloreto de sódio	27
3.6.2 Sedação e Anestesia	27
3.6.3 Protocolo de instalação dos implantes e grupos experimentais	28
3.6.4 Preparo e administração da Coenzima Q10	28
3.7 Processamentos laboratoriais	29
3.7.1 Processamento histológico sem desmineralização	29
3.7.2 Processamento histológico com desmineralização	29
3.7.3 Processamento imunohistoquímico	29
3.8 Análise dos resultados	30
3.8.1 Análise histométrica de contato direto osso/implante	30
3.8.2 Análise histométrica da área de tecido ósseo neoformado	31
3.8.3 Análise histológica	31
3.8.4 Análise imunohistoquímica	31
3.8.5 Análise estatística dos dados	31
4 RESULTADOS	32
4.1 Análise do contato osso/implante (COI)	32
4.2 Análise de Porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTON)	34
4.3 Análise histológica dos tecidos periimplantares	36
4.4 Análise imunohistoquímica	36
4.5 Análise imunohistoquímica dos tecidos periimplantares (OCN)	36
4.6 Análise imunohistoquímica dos tecidos periimplantares (BMP2)	38

4.7 Análise imunohistoquímica dos tecidos periimplantares (TRAP)	40
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXOS	55

1 INTRODUÇÃO*

A reabilitação protética dentária é crucial, pois a localização e o número de dentes perdidos é um importante fator que afeta a qualidade de vida (Cattoni, Tetè, Uccioli, Manazza, Gastaldi, & Perani, 2020)¹. Dentre as diferentes formas de reabilitação oral, o implante é considerado a melhor opção atualmente, proporcionando maior retenção, suporte, estabilidade e eficiência mastigatória, além de conforto e satisfação ao paciente (Bellia, Audenino, Ceruti, & Bassi, 2020; Hosseini, Worsaae, Gotfredsen, 2019)^{2,3} se comparado aos outros tipos de próteses; e alta taxa de sucesso (Hasanoglu Erbasar, Hocaoglu, & Erbasar, 2019)⁴, apresentando, aproximadamente, 89% a 96% em um período de 10 anos, em diferentes sistemas de implantes dentários (Howe, Keys, & Richards, 2019; Rismanchian, Bajoghli, Mostajeran, Fazel, & Eshkevari, 2009)^{5,6}. No entanto, apesar de todos os benefícios da reabilitação com esses dispositivos, podem haver falhas (Hasanoglu., Hocaoglu, & Erbasar 2019; Franchi, Bacchelli, Martini, Pasquale, Orsini, Ottani, Fini, Giavaresi, Giardino, & Ruggeri 2004)^{4,7}. Diferentes condições podem interferir no equilíbrio do reparo implantar, tais como o tipo de tratamento da superfície (Franchi, Bacchelli, Martini, Pasquale, Orsini, Ottani, Fini, Giavaresi, Giardino, & Ruggeri 2004)⁷, diâmetro do implante e a qualidade do tecido ósseo do leito receptor (Brink, Meraw, & Sarment 2007)⁸. Além do mais, condições sistêmicas desfavoráveis como o diabetes (Siqueira, Cavalher-Machado, Arana-Chavez, & Sannomiya 2003)⁹, osteoporose (Keller, & Steiger 2004)¹⁰, imunossupressão (Duarte, Nogueira Filho, Sallum, de Toledo, Sallum, & Nociti Júnior 2001; Sakakura, Marcantonio, Wenzel, & Scaf, 2007)^{11,12}, corticóide (Fujimoto, Niimi, Sawai, & Ueda 1998)¹³, cigarro (Ma, Zwahlen, Zheng, & Sham 2011)¹⁴, o tratamento de lesões cancerígenas (Nack, Raguse, Stricker, Nelson, & Nahles 2015; Al-Mahalawy, Marei, Abuhashish, Alhawaj, Alrefae, & Al-Jandan 2016; Javed, Rahman, & Romanos 2019)^{15,16,18} e processos redox eletroquímicos que ocorrem em suas superfícies metálicas (Tang, Chen, Yan, Shen, Wang, Weng, Wu, Xie, Shao, Yang, & Shen, 2020; Hameister, Kaur, Dheen, Lohma, & Singh, 2020)^{17,19}. Recentemente, foi relatado que os processos redox eletroquímicos que ocorrem nas superfícies dos implantes biocompatíveis têm um efeito profundo nos tecidos locais ao redor desses dispositivos periimplantes e intensificando a sua resposta inflamatória, sendo as reações de estresse oxidativo a

* Normalizado de acordo com Journal of Clinical Periodontology
<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/1600051x/homepage/forauthors.html>

principal causa de falhas nos implantes. Embora as espécies reativas de oxigênio (ERO) sejam subprodutos metabólicos normais, elas desempenham papéis importantes na resposta inflamatória, servindo como moléculas sinalizadoras e efetoras. Os intermediários de oxigênio reativos produzidos nas interfaces implante/osso servem como fortes quimioatrativos para o recrutamento de células imunes, levando a danos teciduais e fibrose, enquanto os EROs produzidos pelas células imunes podem levar diretamente à corrosão dos implantes. Um desequilíbrio entre a geração excessiva de ERO e um mecanismo de defesa antioxidante insuficiente dificulta a osseointegração (Tang, Chen, Yan, Shen, Wang, Weng, Wu, Xie, Shao, Yang, & Shen, 2020; Hameister, Kaur, Dheen, Lohma, & Singh, 2020)^{17,18}. Hameister et al (2019), relatou que tais processos já ocorrem no próprio ato cirúrgico (Hameister, Kaur, Dheen, Lohmann, & Singh 2020)¹⁹. O tabagismo está, com certeza, entre os principais vícios que a humanidade está exposta, e a nicotina, considerada o maior componente ativo da fase particulada do cigarro (Benowitz 2008)²⁰, parece causar severas alterações no metabolismo corpóreo. Fumantes têm uma maior taxa de perda dentária do que os não fumantes, e as demandas por implantes dentários em pacientes fumantes têm sido gradualmente aumentada (Jansson, & Lavstedt 2002)⁵⁵. Em 1977, (Mosely, & Finseth)²¹ sugeriram que a nicotina agia negativamente no processo de cicatrização, levando à vasoconstrição tecidual, diminuição da proliferação de linfócitos, fibroblastos e colágeno (Skinovsky, Malafaia, Chibata, Tsumanuma, Panegalli, Filho, & Martins 2016)²². Em 2006, Figuero et. al., também confirmou o efeito inibitório da nicotina para a atividade da metaloproteinase-1 (MMP-1), MMP-2, e MMP-9 (Figuero, Soory, Cerero, & Bascones 2006)⁴⁸. A redução da produção de linfócitos leva à inibição da formação de novos vasos sanguíneos, causando deficiência no oxigênio circulante, que é um fator essencial para a síntese de colágeno (Skinovsky, Malafaia, Chibata, Tsumanuma, Panegalli, Filho, & Martins 2016)²². 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, Morita, & Tsuji 2003; Sørensen, Toft, Rygaard, Ladelund, Paddon, James, Taylor, & Gottrup 2010)^{23,24}. Esses achados indicam a redução da biossíntese do colágeno em pacientes que fazem uso do tabaco (Skinovsky, Malafaia, Chibata, Tsumanuma, Panegalli, Filho, & Martins 2016; Sørensen 2012)^{22,25}. Preocupantemente, esse composto também desempenha um efeito nocivo sobre a capacidade de reparo (César-Neto, Duarte, Sallum, Barbieri, Moreno Jr, & Nociti Jr 2003)²⁶. 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 osteoblastos (Fang & Hall 1997)²⁷. Tem sido sugerido que a nicotina pode levar a alterações na proliferação, na diferenciação e na expressão gênica de osteoblastos (Rothem, Rothem, Dahan, Eliakim, & Soudry 2011).²⁸. Estas células osteoblásticas, por sua vez, estão envolvidas na diferenciação e função osteoclástica via interação célula a célula (Suda, Takahashi, Udagawa, Jimi, Gillespie, & Martin 1999)²⁹. Tais eventos ocorrem quando o 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 a 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, Shima, Nakagawa, Yamaguchi, Kinosaki, Mochizuki, Tomoyasu, Yano, Goto, Murakami, Tsuda, Morinaga, Higashio, Udagawa, Takahashi, & Suda, 1998; Fuller, Wong, Fox, Choi, & Chambers 1998)^{30,31}. Sabe-se que a nicotina exerce ação direta na proliferação e maturação de osteoblastos (Suda, Takahashi, Udagawa, Jimi, Gillespie, & Martin 1999; Theiss, Boden, Hair, Titus, Morone, & Ugbo, 2000; Pereira, Carvalho, Peres, & Fernandes 2010)^{29,32-35}, sugerindo que ela pode exercer efeito indireto sobre reabsorção óssea, via regulação do sistema RANK/RANKL/OPG. (Tanaka, Tanabe, Kawato, Nakai, Kariya, Matsumoto, Zhao, Motohashi, & Maeno 2013)³⁶ reportaram que ela aumenta o número de osteoclastos com poucos núcleos e suprime a quantidade de osteoclastos com grandes núcleos. RANKL aumentado ou uma expressão local diminuída de OPG pode causar reabsorção óssea em vários locais do esqueleto humano (Dommisch, Kuzmanova, Jönsson, Grant, & Chapple 2018)⁴⁹. (Moraschini, & Barboza 2016)³⁷ e (Naseri, Yaghini, & Feizi 2020)⁵⁵, em uma meta-análise comparando os resultados de 15 e 23 artigos, respectivamente, apontaram diferença estatisticamente significativa de falhas de implantes favorecendo o grupo de não fumantes, bem como uma maior quantidade de perda óssea marginal no grupo de fumantes (Sánchez-Pérez, Moya-Villaescusa, & Caffesse 2007)³⁸ 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 (Tanaka, Tanabe, Kawato, Nakai, Kariya, Matsumoto, Zhao,

Motohashi, & Maeno 2013; Moraschini, & Barboza 2016)^{36,37}, maior taxa de perda óssea, redução da qualidade e densidade óssea (Sánchez-Pérez, Moya-Villaescusa, & Caffesse 2007; Pinto, Bosco, Okamoto, Guerra, & Piza 2002; Machado, Dias, Bosco, Okamoto, Bedran de Castro, & Dornelles, 2010)³⁸⁻⁴⁰, e maior incidência de peri-implantites (Yamano, Berley, Kuo, Gallucci, Weber, & Sukotjo, C 2010)⁴¹, todos contribuindo para maior taxa de falências de implantes entre fumantes em comparação com não fumantes (Ward, & Klesges 2001; Rivera-Hidalgo 2003; Haas, Haimböck, Mailath, & Watzek 1996; Chuang, Wei, Douglass, & Dodson 2002).^{42,45,46,47}. Em estudos realizados (Berley, Yamano, & Sukotjo 2010)⁴³ e (Yamano, Berley, Kuo, Gallucci, Weber, & Sukotjo 2010)⁴⁴ houve uma diminuição estatisticamente significativa no contato osso/implante entre ratos expostos à nicotina nas quatro semanas de acompanhamento, em comparação com ratos não expostos (Javed, Rahman, & Romanos 2019)¹⁸. Todavia, recentemente, acredita-se que esses efeitos catabólicos indesejáveis da nicotina podem ser minimizados com a suplementação oral da coenzima Q10 (CoQ10), (Figuro, Soory, Cerero, & Bascones 2006)⁴⁸.

A CoQ10 é uma coenzima natural, também conhecida como ubiquinona quando oxidada e ubiquinol, quando reduzida. É um produto químico lipossolúvel com propriedades antioxidantes; exógeno e endógeno, isto é, pode ser sintetizado no fígado e também está disponível nos alimentos ou suplementos, desempenhando um papel crucial no aproveitamento de ATP, onde está envolvido em processos redox e no transporte de elétrons nas mitocôndrias, eliminando EROs e radicais livres, protegendo as células contra o estresse oxidativo e o envelhecimento (Figuro, Soory, Cerero, & Bascones 2006; Kuzmanova, Jönsson, Grant, & Chapple 2018; Manthena, Penubolu, Putcha, & Harsha 2015; Shukla, & Dubey 2018; Varela-Lopez, Bullon, Battino, Ramirez-Tortosa, Ochoa, Cordero, Ramirez-Tortosa, Rubini, Zizzi, & Quiles 2016; Prakash, Sunitha, & Hans 2010; Raut, Sethi, Kohale, Mamajiwala, & Warang 2018)⁴⁸⁻⁵⁴. A CoQ10 vem sendo amplamente utilizada como agente profilático e terapêutico (Kuzmanova, Jönsson, Grant, & Chapple 2018)⁴⁹. Estudos atuais demonstram que a administração oral de CoQ10 é relacionada ao tratamento de várias doenças humanas como cardiomiopatias, Parkinson, Alzheimer, diabetes (Manthena, Penubolu, Putcha, & Harsha 2015)⁵⁰, distrofias e doença periodontal.

Muitos dos alimentos ricos nesta substância são consumidos em nossa dieta, como por exemplo, frutas e vegetais, nozes, amendoim, peixes, carnes, pão integral e soja. A CoQ10

foi isolada pela primeira vez em 1957 em mitocôndrias de carne bovina, e é encontrada em altas concentrações em tecidos corpóreos com grande rotatividade de energia, como coração, cérebro e rins. É um composto onipresente vital e está relacionada à uma série de atividades relacionadas com energia e metabolismo. Tem sido indicada no tratamento de doenças cardíacas, neurológicas, oncológicas e imunológicas; apresentando atividade de transferência adequada de elétrons dentro da cadeia respiratória oxidativa mitocondrial, cuja principal função é a produção de ATP (adenosina trifosfato); além disso, ajuda na eliminação de antioxidantes e estabilização dos canais de cálcio. Grande parte da pesquisa em apoio à suplementação de coenzima Q10 se baseou em pacientes com insuficiência cardíaca crônica, em que em análise do tecido do miocárdio, este apresentou aumento de estresse oxidativo e concentrações diminuídas de CoQ10. (Dommisch, Kuzmanova, Jönsson, Grant & Chapple, 2018; Manthena, Rao, Penubolu, Putcha, & Harsha 2015; Shukla, & Dubey 2018; Varela-Lopez, Bullon; Battino, Ramirez-Tortosa, Ochoa, Cordero, Ramirez-Tortosa, Rubini, Zizzi & Quiles 2016; Prakash, Sunitha & Hans 2010).⁴⁸⁻⁵²

(Figuro, Soory, Cerero, & Bascones 2006)⁴⁸ realizaram um estudo *in vitro* com dois tipos diferentes de células humanas: osteoblastos e fibroblastos para analisar os efeitos de um agente oxidante (nicotina) e antioxidantes, dentre eles a CoQ10. Tais células, quando incubadas com a nicotina resultaram em uma drástica redução de seus produtos. Por outro lado, quando incubadas com a CoQ10, seus valores de controle foram restaurados; sendo que as células formadoras de tecido ósseo foram as mais influenciadas pela ação antioxidante (Figuro, Soory, Cerero, & Bascones 2006)⁴⁸. Portanto, o uso da CoQ10 melhora a utilização de oxigênio no tecido gengival, parecendo reduzir o mecanismo da degradação do colágeno, que é severo em pacientes fumantes, fazendo com que o número de fibroblastos seja maior, facilitando o reparo tecidual (Varela-Lopez, Bullon, Battino, Ramirez-Tortosa, Ochoa, Cordero, Ramirez-Tortosa, Rubini, Zizzi, & Quiles 2016)⁵². O processo de formação e reabsorção óssea pela via RANK/RANKL/OPG também é modificado. O resultado é a regulação da interação entre esses mediadores, diminuindo a osteoclastogênese e aumentando a osteogênese (Raut, Sethi, Kohale, Mamajiwala, & Warang 2018)⁵⁴. (Manthena, Penubolu, Putcha, & Harsha 2015)⁵⁰, à partir de seus estudos, sugeriu que a dose segura para suplementação de CoQ10 em humanos é de 120mg, via oral, diariamente. O uso prolongado com baixas doses de CoQ10 parece ser eficaz em minimizar a reabsorção óssea (Raut, Sethi, Kohale, Mamajiwala, & Warang

2018)⁵⁴, e a deterioração do colágeno (Varela-Lopez, Bullon, Battino, Ramirez-Tortosa, Ochoa, Cordero, Ramirez-Tortosa, Rubini, Zizzi, & Quiles 2016)⁵², proporcionando melhoras no sistema de reparo, no DNA celular e modulando a sinalização inflamatória ((Raut, Sethi, Kohale, Mamajiwala, & Warang 2018)⁵⁴. Diante da ausência de informações na literatura atual à respeito do comportamento dos implantes nestas condições, principalmente relacionadas com os efeitos deletérios da nicotina, como ação direta na proliferação e maturação de osteoclastos, exercendo efeito indireto sobre a reabsorção óssea, e os efeitos benéficos da CoQ10 em promover a redução de EROs e radicais livres, protegendo as células contra o estresse oxidativo e envelhecimento; é de extrema importância o conhecimento acerca do reparo peri-implantar relacionado à esses casos. Deste modo, o presente estudo tem por objetivo avaliar do ponto de vista histológico, histométrico (PTON e BIC) e através de marcadores imunoistoquímicos, a influência da suplementação oral com CoQ10 no reparo periimplantar em implantes instalados em tíbias de ratos modificados sistemicamente, ou não, pela nicotina.

2 OBJETIVO

O propósito do presente estudo foi avaliar do ponto de vista histomorfométrico e através de marcadores imunoistoquímicos, a influência da Coenzima Q10 sobre o processo de reparo periimplantar em implantes instalados em tíbias de ratos modificados sistemicamente ou não pela nicotina.

2.1 Objetivos Gerais

A - Avaliar o reparo periimplantar de implantes instalados em tíbias de ratos não modificados sistemicamente;

B - Avaliar o reparo periimplantar de implantes instalados em tíbias de ratos não modificados sistemicamente pela nicotina e que receberão suplementação com Coenzima Q10;

C - Avaliar o reparo periimplantar de implantes instalados em tíbias de ratos modificados sistemicamente pela nicotina;

D- Avaliar o reparo periimplantar de implantes instalados em tíbias de ratos modificados sistemicamente pela nicotina e que receberão suplementação com Coenzima Q10.

2.2 Objetivos Específicos

Constituem objetivos específicos do presente estudo, análise da influência da Coenzima Q10 no reparo periimplantar de implantes instalados em tíbias de ratos modificados ou não sistemicamente pela nicotina por meio de:

- Avaliação histométrica do contato linear entre o tecido ósseo e a superfície do implante;
- Avaliação histométrica da área de tecido ósseo neoformado na região periimplantar;
- Avaliação histológica dos seguintes parâmetros:
 - a – Intensidade da resposta inflamatória local;
 - b – Extensão do processo inflamatório;

c – Padrão de estruturação do tecido ósseo compacto neoformado;

d – Padrão de estruturação do tecido ósseo esponjoso neoformado;

• Avaliação imunohistoquímica para detecção de:

a - Proteína óssea morfogenética – 2 (BMP-2), um marcador da indução de formação óssea;

b – Osteocalcina (OCN), um marcador específico de “turn over” ósseo;

c - Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP: tartrate-resistant acid phosphatase), um biomarcador de osteoclastos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O protocolo experimental foi enviado para avaliação e homologação pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP – Campus de Araçatuba, dentro das normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos procedimentos serão realizados de acordo com os guias ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments), (Kilkenny, Browne, Cuthill, Emerson, & Altman 2010)⁵⁶.

3.1 Animais

Foram utilizados 80 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, de aproximadamente 250 a 350g, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, mantidos em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), com água e ração *ad libitum*. Os animais serão divididos em dois grandes grupos experimentais (n=40) submetidos a aplicações de solução salina (SS) ou de nicotina (NIC).

3.2 Cálculo Amostral

Para determinação do tamanho amostral, dois pontos foram considerados: 1–Estudos prévios com metodologia semelhante realizados em nosso laboratório (Gusman, Mello-Neto, Alves, Matheus, Ervolino, Theodoro, & de Almeida 2018)⁵⁷. 2 – Foi realizado um estudo piloto e determinada a diferença mínima entre as médias obtidas de cada tratamento. O tamanho da

amostra foi calculado com base na literatura anterior (Matheus et. al., 2018), para um poder de estudo de 0,8 e erro padrão alfa de 0,05 com base em um desvio padrão potencial de 12%, e na suposição de que uma diferença de 10% entre grupos/períodos seria relevante. Cinco espécimes foram suficientes para rejeitar a hipótese nula no contato osso/implante (BIC), enquanto para histologia, histometria de área óssea e imunohistoquímica, 10 espécimes serão necessárias. Estes dados foram submetidos ao BioEstat 5.0 (BioEstat5.0, Sociedade Civil de Mamirauá, Belém, PA, Brasil).

3.3 Grupos Experimentais e Tratamentos

Utilizando de um programa computacional, os animais dos grupos SS e NIC foram separados em 4 grupos, cada um composto por 20 animais, que receberam os seguintes tratamentos:

Grupo SS (n=20): também chamado de grupo sham. Os animais pertencentes a este grupo receberam duas aplicações subcutâneas diárias de 0,5 ml de solução de cloreto de sódio 0,9%(SS) durante todo o período experimental. Decorridos 30 dias após início das aplicações de SS por via subcutânea, foi realizada a instalação dos implantes no dia 0, e os animais iniciaram a receber diariamente, via gavagem gástrica, 1 ml de glicerina vegetal até o final do experimento.

Grupo SS-CoQ10 (n=20): Os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções subcutâneas diárias com 0,5ml de solução salina a 0.9%, durante todo o período experimental. Decorridos 30 dias após início das aplicações de SS por via subcutânea, foi realizada a instalação dos implantes no dia 0, e os animais iniciaram a receber diariamente, via gavagem gástrica, suplementação diária com 120mg de CoQ10 até o final do experimento.

Grupo NIC (n=20): Os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções subcutâneas diárias com 3 mg/kg de hemissulfato de nicotina por um período de 30 dias. Decorridos 30 dias após início das aplicações de NIC por via subcutânea, foi realizada a instalação dos implantes no dia 0, e se iniciaram a receber diariamente, via gavagem gástrica, 1 ml de glicerina vegetal até o final do experimento. Os animais, continuaram a receber aplicações subcutâneas de NIC por mais 28 dias até o final do experimento.

Grupo NIC-CoQ10 (n=20): Os animais pertencentes a este grupo receberam duas injeções subcutâneas com 3 mg/kg de hemissulfato de nicotina por um período de 30 dias. Decorridos 30 dias após início das aplicações de NIC por via subcutânea, foi realizada a instalação dos implantes no dia 0, e os animais iniciaram a receber diariamente, via gavagem gástrica, suplementação diária com 120mg de CoQ10 até o final do experimento. Os animais continuaram a receber aplicações subcutâneas de NIC por mais 28 dias.

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais e períodos de eutanásia.

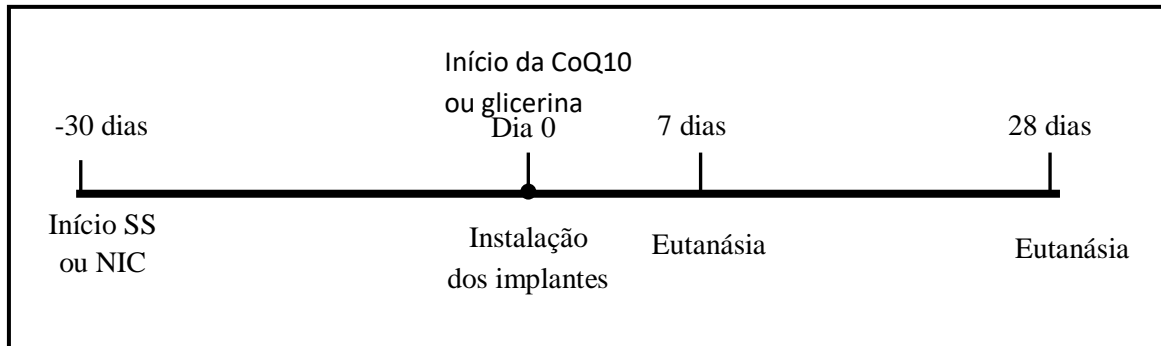
Grupos experimentais		
	Períodos de Eutanásia	
Grupo SS (n=20)	7 dias pós instalação dos implantes	28 dias pós instalação dos implantes
Grupo SS-CoQ10 (n=20)	7 dias pós instalação dos implantes	28 dias pós instalação dos implantes
Grupo NIC (n=20)	7 dias pós instalação dos implantes	28 dias pós instalação dos implantes
Grupo NIC-CoQ10 (n=20)	7 dias pós instalação dos implantes	28 dias pós instalação dos implantes

3.4 Períodos experimentais

Os animais receberam hemissulfato de nicotina ou solução salina durante 30 dias antes da cirurgia. Os implantes foram instalados no dia “0” e o protocolo de administração de NIC e SS prosseguiu por 28 dias. No dia da cirurgia se iniciou o protocolo de aplicação da coenzima Q10. As eutanásias foram realizadas por meio de superdosagem anestésica (150mg/kg de thiopental-Cristália, Itapira, São Paulo, Brazil) aos 7 e 28 dias após a instalação dos implantes, sendo que serão eutanasiados 10 animais por grupo/período.

3.5 Linha do Tempo

Figura 1. Linha do tempo: administração de medicamentos e períodos de eutanásia.



3.6 Protocolos experimentais

3.6.1 Protocolo de administração de nicotina ou solução de cloreto de sódio

A cada 12 horas os animais receberam injeções subcutâneas de nicotina ou solução salina na região dorsal em horário pré-estabelecido, com início 30 dias antes da instalação dos implantes, permanecendo até o fim do período experimental. O hemissulfato de nicotina (Sigma, St.Louis, MO, USA) foi diluído em solução salina na concentração de 5mg/ml. Para cada animal foi administrado um volume da solução diluída, na dosagem de 3mg/kg de peso de acordo com o protocolo de estudo (Okamoto, Kita, Okuda, Tanaka, & Nakashima 1994)⁵⁸. A administração da solução salina (cloreto de sódio 0,9%) foi realizada com o objetivo de simular as mesmas condições de estresse diário proveniente das aplicações de nicotina.

3.6.2 Sedação e Anestesia

Os animais receberam anestesia geral, obtida pela associação de 70mg/kg de Cloridrato de quetamina (Vetaset – ZoetisFlorham Park, NJ – USA) e 6mg/kg Cloridrato de xilazina (Coopazine– Coopers São Paulo– Brasil.), aplicados intramuscular no bíceps femoris da pata direita. Nos casos em que não se obtiver o efeito adequado do anestésico, a anestesia será suplementada com a metade da dose inicial aplicada.

3.6.3 Protocolo de instalação dos implantes e grupos experimentais

Após anestesia geral, a porção medial das patas direita e esquerda de cada animal foram tricotomizadas e foi realizada a antissepsia com solução tópica de iodopovidona a 10%. Os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada, a qual permitiu a manutenção do animal em posição adequada para acesso às tíbias. A seguir, uma incisão de aproximadamente 30 mm foi realizada com lâmina de bisturi 15 C pelo lado medial nas tíbias. Após a dissecação, com auxílio de um descolador de periósteo, o tecido ósseo foi exposto e então foi perfurado um leito bicortical na metáfise tibial proximal usando uma fresa de 2,0mm de diâmetro (Titanium FixA.S Technology, São José dos Campos, São Paulo, Brasil) montada em motor cirúrgico com 980 rpm (KaVo Konzept Surg, Filial KaVo, São Paulo, Brasil), acompanhado por irrigação constante com solução salina fisiológica e aspiração com sugador de alta potência. Nos leitos preparados foram instalados um implante com superfície tratada por meio de jateamento e ataque ácido. Os implantes tinham 4,0 mm de comprimento e 2,2 mm de diâmetro. A instalação foi realizada com auxílio de uma chave digital (1,2mm) acoplada ao hexágono do implante até que o mesmo atinja o nível ósseo. Em seguida, o tecido muscular foi suturado internamente com fio 4.0 de poliglactina 910 (Vicryl- Johnson & Johnson do Brasil Ind. Com. Prod. para Saúde Ltda, São Bernardo do Campo, Brasil), e externamente com fio de seda 4.0 (Ethicon - Johnson & Johnson do Brasil Ind. Com. Prod. para Saúde Ltda, São Bernardo do Campo, Brasil).

3.6.4 Preparo e administração da Coenzima Q10

A solução de CoQ10 foi preparada utilizando glicerina vegetal como veículo. A concentração final do produto foi de 120mg de CoQ10/ ml de glicerina (Raut, Sethi, Kohale, Mamajiwala, & Warang 2018; Caton, Armitage, Berglundh, Chapple, Jepsen, Kornman, Mealey, Papapanou, Sanz, & Tonetti 2018)^{54,59}. Sendo assim, os animais dos grupos SS-CoQ10 e NIC-CoQ10 receberam, via gavagem gástrica, suplementação diária com 1ml de solução contendo 120mg de CoQ10 a partir do dia da instalação dos implantes. Os animais dos grupos SS e NIC receberam, diariamente, 1 ml de glicerina vegetal via gavagem gástrica para simular o estresse a que os animais do grupo teste foram expostos.

3.7 Processamentos laboratoriais

3.7.1 Processamento histológico sem desmineralização

Para a análise histométrica do contato direto osso/implante, após fixação por 48 horas em solução de paraformaldeído tamponado 4%, as tíbias selecionadas foram submetidas à lavagem em água corrente e à desidratação gradual em soluções de concentrações crescentes de etanol com adição de fucsina, seguida por trocas de acetona. Foram, então, submetidas a banhos de resina cristal de alta viscosidade e incluídas a vácuo, utilizando-se a mesma resina com a adição do catalisador. Após a presa do material, foram recortados os excessos de resina e as peças foram lixadas com lixas metalográficas de crescente granulação (#100 - #400 - #600 - #1200, CarbiMet 2, Buehler, Lake Bluff, Illinois, EUA) até que atingissem a espessura de 50 µm (Caton, Armitage, Berglundh, Chapple, Jepsen, Kornman, Mealey, Papapanou, Sanz, & Tonetti 2018)⁵⁹.

3.7.2 Processamento histológico com desmineralização

Após fixação por 48 horas em solução de paraformaldeído tamponado 4%, as tíbias selecionadas foram submetidas à lavagem em água e imersas em solução desmineralizadora (constituída de PBS acrescida de 10% de ácido etileno diamino tetra-acético – EDTA, durante 60 dias). Após a desmineralização, o implante foi removido com o auxílio de uma chave digital (1,2 mm). As peças foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas, impregnadas, incluídas em parafina e seccionadas em micrótomo, com 4 µm de espessura. A microtomia foi executada seguindo um plano de corte longitudinal em relação à loja do implante e os cortes seriados que corresponderam à porção central da loja foram devidamente coletados. Seis secções equidistantes compreendendo a porção central de cada alvéolo do implante foram coradas com Hematoxilina & Eosina (HE) para análise histológica e histométrica de área de tecido ósseo neoformado, e três outras secções também equidistantes e compreendendo a porção central do alvéolo foram submetidas ao processamento imunohistoquímico para detecção de BMP2, OCN e TRAP.

3.7.3 Processamento imunohistoquímico

Para a análise imunoistoquímica, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100°-100°-100°-90°-70°GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão específico (Diva de cloaker, Biocare Medical, Concord, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking chamber, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95°C, por 20 minutos. No final de cada etapa da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em PBS 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovina por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em três lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-BMP2, anti-OCN e anti-TRAP. Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado por 2 horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP por 1 hora (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit, Dako Laboratories, CA, EUA). A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit, Dako Laboratories, CA, EUA). Foi realizado hematoxilina de Harris em BMP2, OCN e TRAP.

Os cortes foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol e, recobertos com meio de montagem (Permount, FisherScientific, SanDiego,CA,EUA) e lamínulas de vidro. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

3.8 Análise dos resultados

3.8.1 Análise histométrica de contato direto osso/implante

As mensurações do contato direto osso/implante foram realizadas utilizando-se um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Germany). A exigência determinada para a captura das imagens foi a de compreender o espaço entre uma rosca do implante localizada em tecido ósseo compacto e duas localizadas em tecido ósseo esponjoso. Neste caso, foram realizadas medidas lineares apenas do tecido ósseo em íntimo contato com a superfície das roscas do implante. As medidas obtidas foram expressas em mm e como média \pm desvio padrão em cada grupo experimental.

3.8.2 Análise histométrica da área de tecido ósseo neoformado

As mensurações de área de tecido ósseo neoformado na região periimplantar foram realizadas utilizando-se um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Germany). A exigência determinada para a captura das imagens foi a de compreender o espaço entre uma rosca do implante localizada em tecido ósseo compacto e duas localizadas em tecido ósseo esponjoso. A área de tecido ósseo neoformado no interior de cada rosca do implante foi expressa em mm^2 e como média \pm desvio padrão em cada grupo experimental.

3.8.3 Análise histológica

A análise histológica foi realizada nas secções coradas por hematoxilina e eosina, obtidas pelo processamento histológico com descalcificação, e foi efetuada em microscopia óptica avaliando-se os seguintes parâmetros: natureza e intensidade da resposta inflamatória local; extensão do processo inflamatório; padrão de celularidade e estruturação do tecido ósseo compacto neoformado; padrão de celularidade e estruturação do tecido ósseo esponjoso neoformado.

3.8.4 Análise imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica foi realizada nos tecidos periimplantares com o auxílio de um programa de análise de imagens (ImageLab, Diracom). Foi mensurada a quantidade de células imunomarcadas por contagem para BMP2, OCN e TRAP. Os valores da imunomarcção foram expressos como média \pm desvio padrão.

3.8.5 Análise estatística dos dados

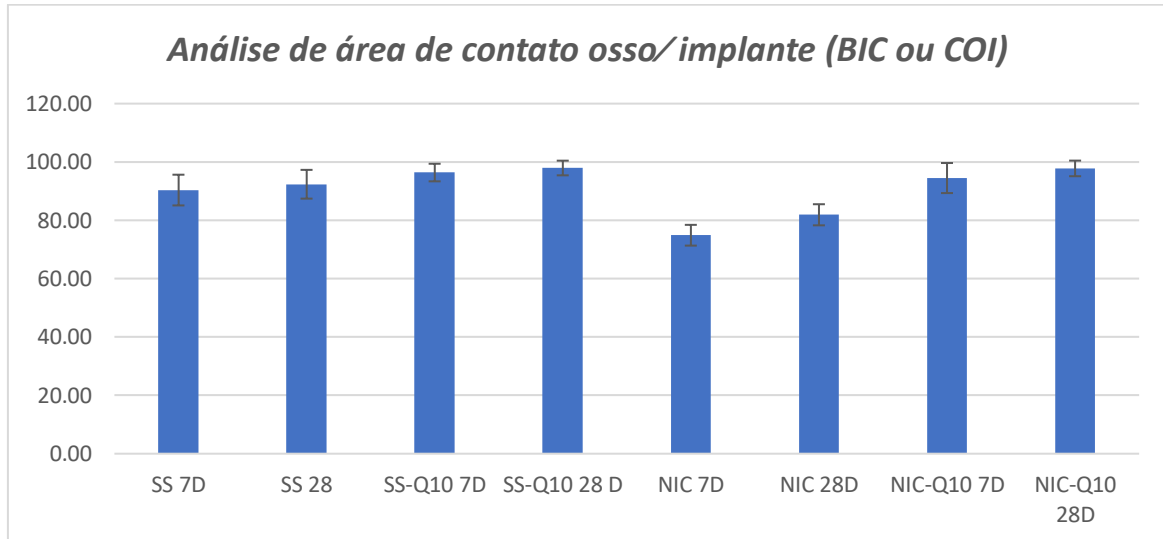
A normalidade e a homoscedasticidade dos dados foram analisados, e os mesmos foram submetidos ao teste paramétrico ou não paramétrico mais adequado. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS

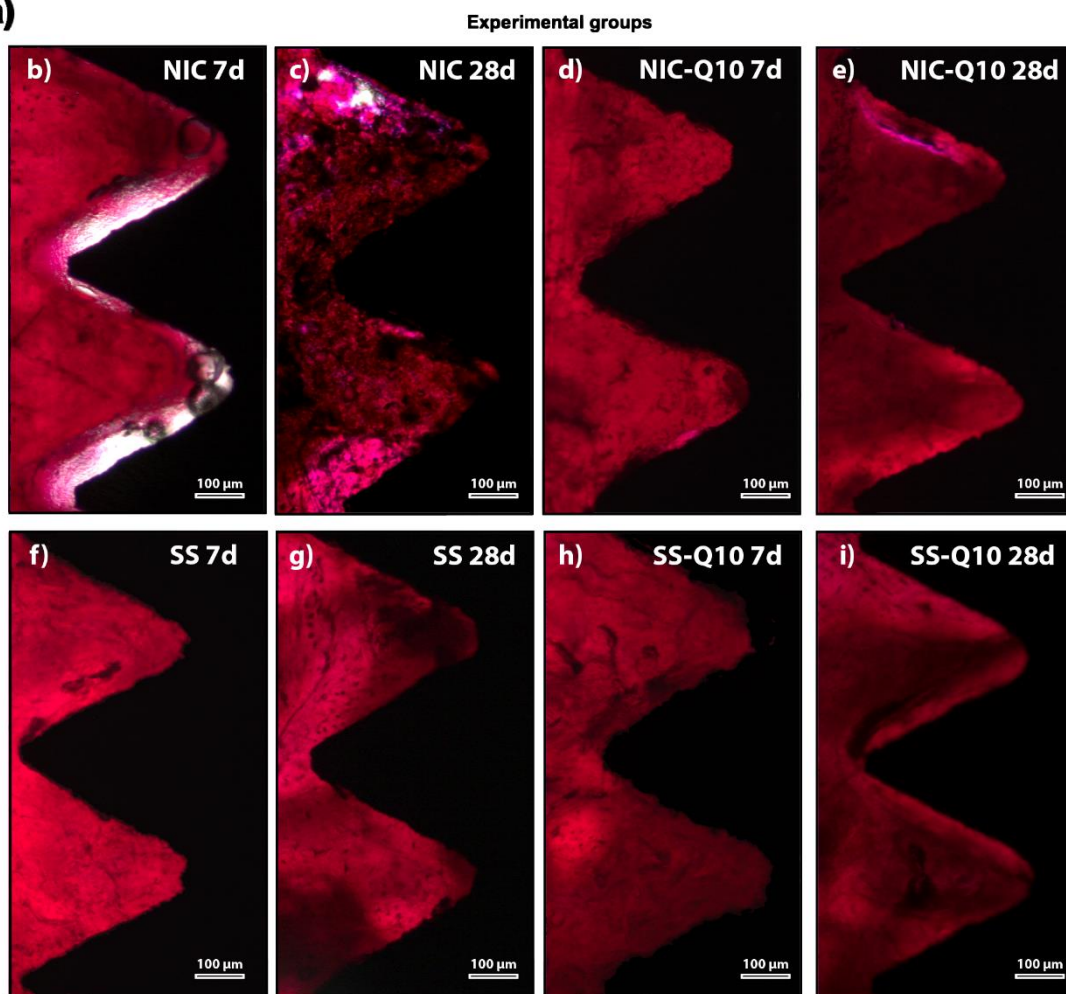
4.1 Análise do contato osso/implante (COI)

Os resultados para a análise de contato osso/implante (BIC ou COI) estão representados na figura 2. Na análise intergrupos, o grupo SS-Q10 ($96,37 \pm 3,01$; $97,93 \pm 2,52$) apresentaram maior BIC aos 7 e 28 dias, respectivamente, quando comparado ao grupo SS ($90,37 \pm 5,26$; $92,36 \pm 4,93$) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). Na análise intragrupo, os grupos suplementados com a coenzima apresentaram diferenças estatisticamente significante de BIC nos períodos de 7 e 28 dias ($p \leq 0,05$).

Figura 2. Porcentagem de contato osso/implante.



(a)

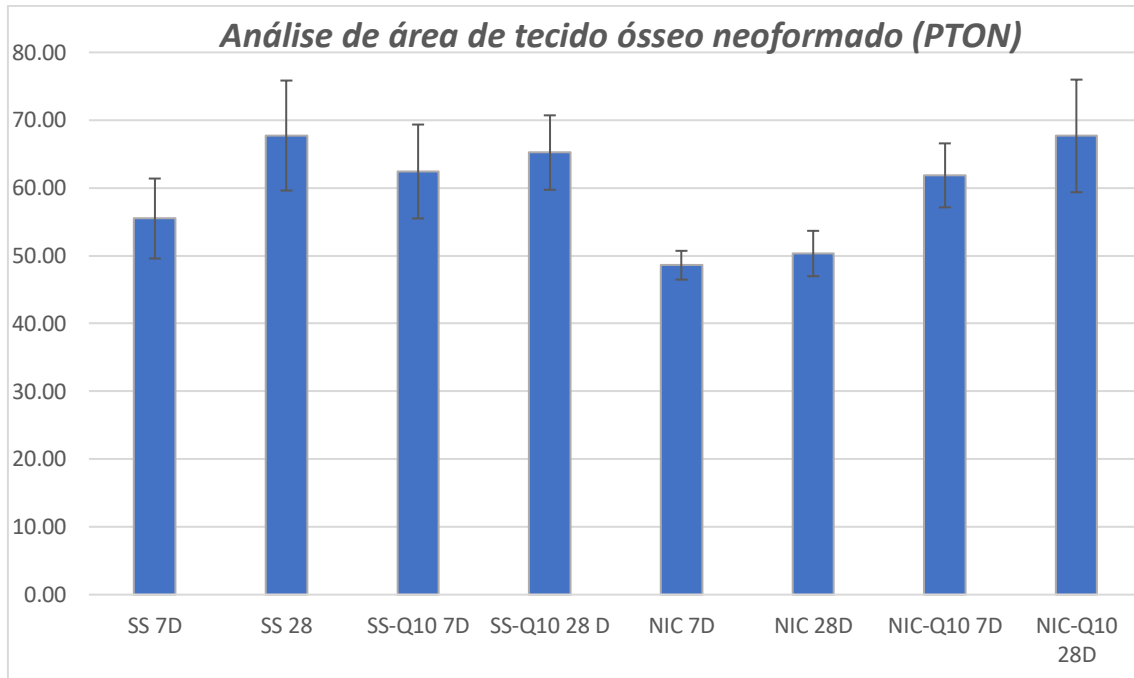


Porcentagem de área de contato osso/ para cada grupo experimental. a) Médias e Desvios Padrão ($M \pm DP$) da porcentagem da área de contato osso/implante (COI) na região periimplantar para cada grupo e período. Teste estatístico: ANOVA e Tukey (b-i). Fotomicrografias mostrando as características dos tecidos periimplantares nos grupos NIC 7d (b), NIC 28d (c), NIC-Q10 7d (d), NIC-Q10 28d (e), SS 7d (f), SS 28d (g), SS-Q10 7d (h) e SS-Q10 28d (i). Coloração: Fucsina. Barras de escala: b,c,d,e, f, g, h,i: 100 μ m.

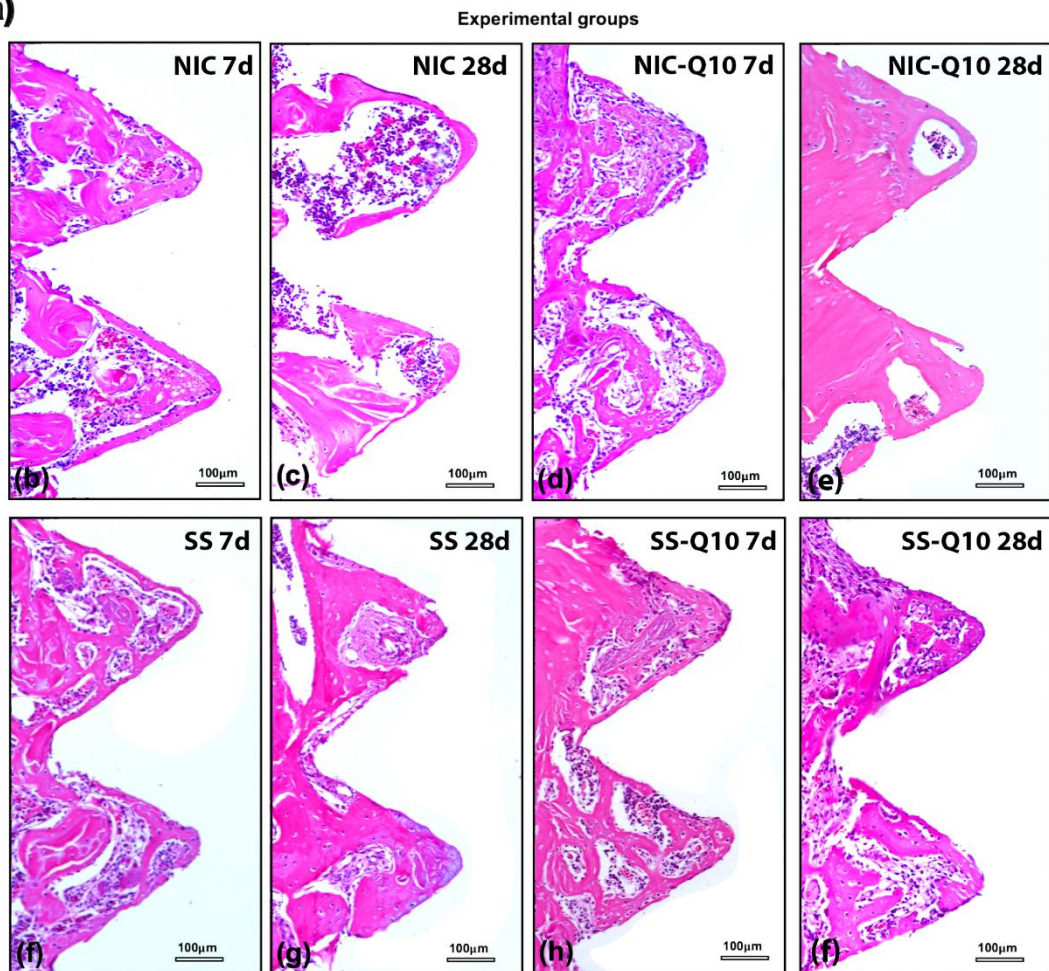
4.2 Análise de Porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTON)

Os resultados para a análise de tecido ósseo neoformado (PTON) estão representados na figura 3a. Na análise intergrupos, o grupo SS ($55,49 \pm 5,90$) e SS-Q10 ($62,43 \pm 6,93$) apresentaram menor PTON aos 7 dias, quando comparado ao grupo SS ($67,73 \pm 8,11$) e SS-Q10 ($65,22 \pm 5,49$) aos 28 dias ($p \leq 0,05$). Na análise intragrupo, os grupos suplementados com a CoQ10, SS-Q10 ($62,43 \pm 6,93$; $65,22 \pm 5,49$) e NIC-Q10 ($61,86 \pm 4,72$; $62,67,68 \pm 8,31$) apresentaram diferenças estatisticamente significantes de PTON nos períodos de 7 e 28 dias ($p \leq 0,05$).

Figura 3. Porcentagem de tecido ósseo neoformado e características histológicas dos tecidos periimplantares.



(a)



Porcentagem de tecido ósseo neoformado e características histológicas dos tecidos periimplantares para cada grupo experimental. a) Médias e Desvios Padrão ($M \pm DP$) da porcentagem de tecido ósseo neoformado (PTON) na região periimplantar para cada grupo e período. Teste estatístico: ANOVA e Tukey (b-h). Fotomicrografias mostrando as características histológicas dos tecidos periimplantares nos grupos NIC 7d (b), NIC 28d (c), NIC-Q10 7d (d), NIC-Q10 28d (e), SS 7d (f), SS 28d (g), SS-Q10 7d (h) e SS-Q10 28d (i).

4.3 Análise histológica dos tecidos periimplantares

Os resultados para a análise histológica estão representados na figura 3a. No grupo SS constatou-se aos 7 e 28 dias um predomínio de tecido ósseo vital na região periimplantar, tanto nas roscas situadas em tecido ósseo compacto quanto nas roscas constituídas por tecido ósseo medular. Nestes diferentes tipos de tecido ósseo observou-se pequena quantidade de osteoclastos ativos, grande quantidade de lacunas preenchidas por osteócitos e a superfície da matriz óssea revestida por osteoblastos ou células de revestimento ósseo. Em algumas regiões, especialmente aos 7 dias, observou-se associado a este tecido ósseo uma pequena quantidade de tecido conjuntivo, composto por quantidades equivalentes de fibroblastos e fibras colágenas, sendo raros os focos de células inflamatórias. Aos 60 dias, constatou-se poucas regiões ocupadas por tecido conjuntivo e os espaços medulares do tecido ósseo se mostravam ocupados por tecido hematopoético.

Nos grupos NIC-Q10, tanto aos 7 quanto aos 28 dias, as características histológicas se mostraram similares ao grupo controle, no entanto, com maior quantidade de tecido ósseo periimplantar e menor quantidade de tecido conjuntivo. No tecido ósseo periimplantar observou-se raros osteoclastos, grande quantidade de lacunas ocupadas por osteócitos, a matriz óssea se apresentou revestida predominantemente por células de revestimento ósseo.

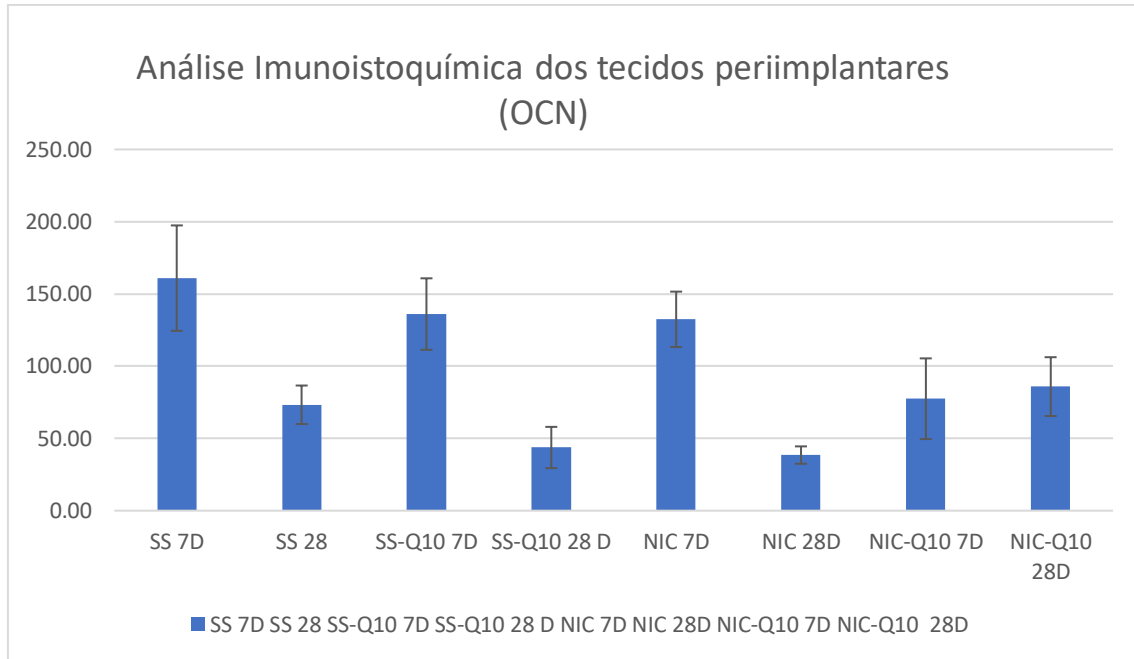
4.4 Análise imunohistoquímica

A reação imunohistoquímica utilizada para detecção de BMP2, OCN e TRAP mostrou alta especificidade por esses biomarcadores, confirmada pela completa ausência de marcação no controle negativo. A imunomarcação apresentou coloração acastanhada, confinada ao citoplasma para TRAP e confinada ao citoplasma e fracamente a matriz extracelular para BMP2 e OCN.

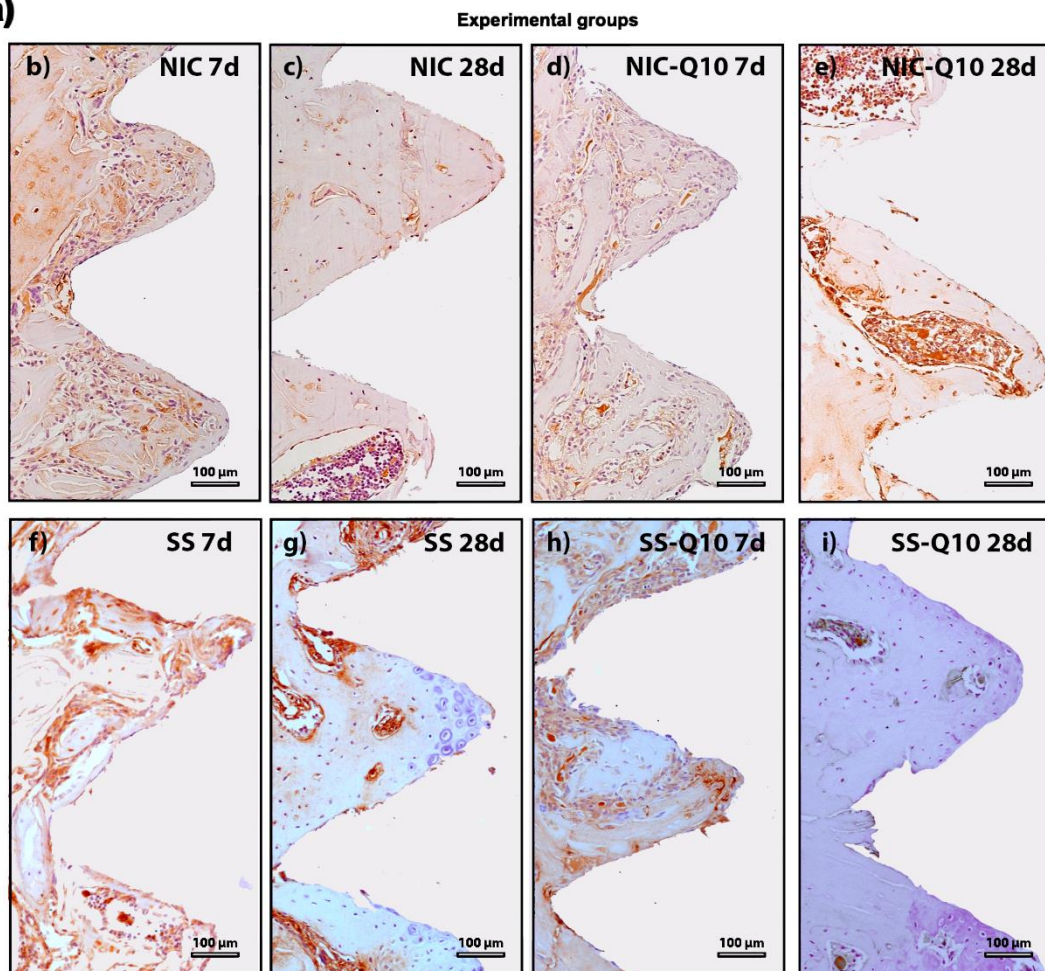
4.5 Análise imunohistoquímica dos tecidos periimplantares (OCN)

Os resultados da análise de contagem de células imunorreativas a OCN estão apresentados na Figura 4A. Na análise intergrupo quando comparado ao grupo SS (160,93±036), o grupo SS-Q10 (136,07±24,74) apresentou maior número de células OCN-positivas no período de 7. Aos 28 dias, o grupo SS (73,29±13,32) apresentou maior número de células OCN-positivas quando comparado ao SS-Q10 (43,71±14,28) ($p \leq 0,05$). Na análise intragrupo, o grupo SS apresentou diferença estatística no número de células OCN-positivas em todos os períodos ($p \leq 0,05$).

Figura 4. Padrão de Imunomarcção (OCN) nos tecidos periimplantares.



(a)

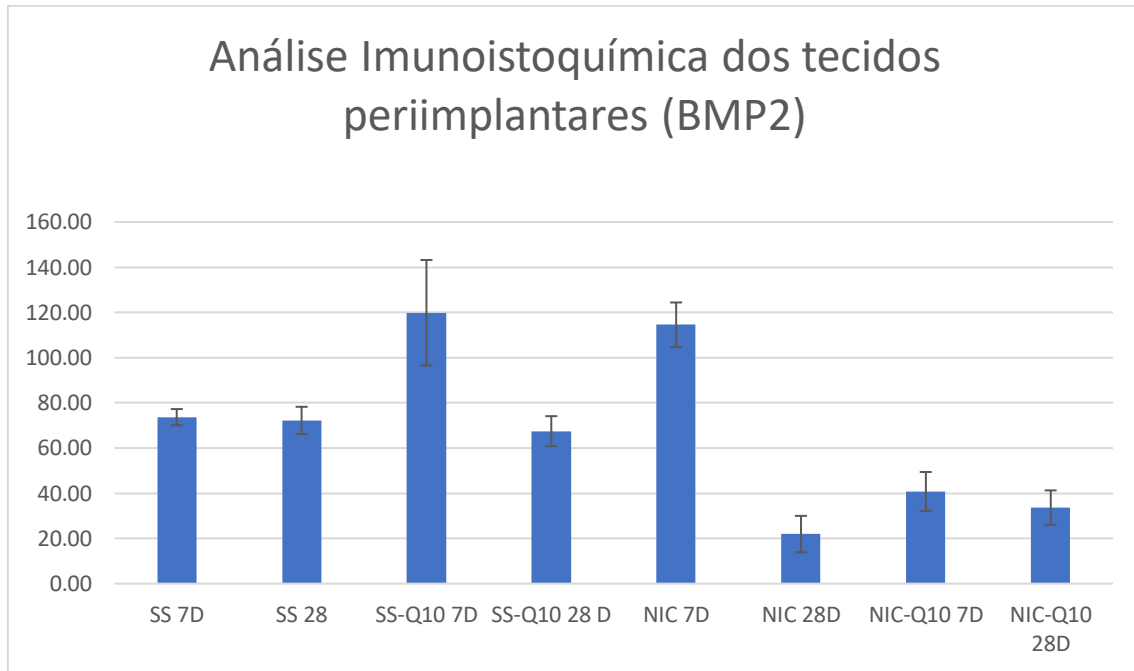


Padrão de imunomarcção de OCN nos tecidos periimplantares para cada grupo experimental. a) Médias e Desvios Padrão ($M \pm DP$) da contagem de células OCN positivas na região periimplantar para cada grupo e período. Teste estatístico: Kruskal-Wallis e Dunn (b-i). Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para OCN nos tecidos periimplantares nos grupos NIC 7d (b), NIC 28d (c), NIC-Q10 7d (d), NIC-Q10 28d (e), SS 7d (f), SS 28d (g), SS-Q10 7d (h) e SS-Q10 28d (i). Coloração: Hematoxilina de Harris. Barras de escala: b, c, d, e, f, g, h: 100 µm.

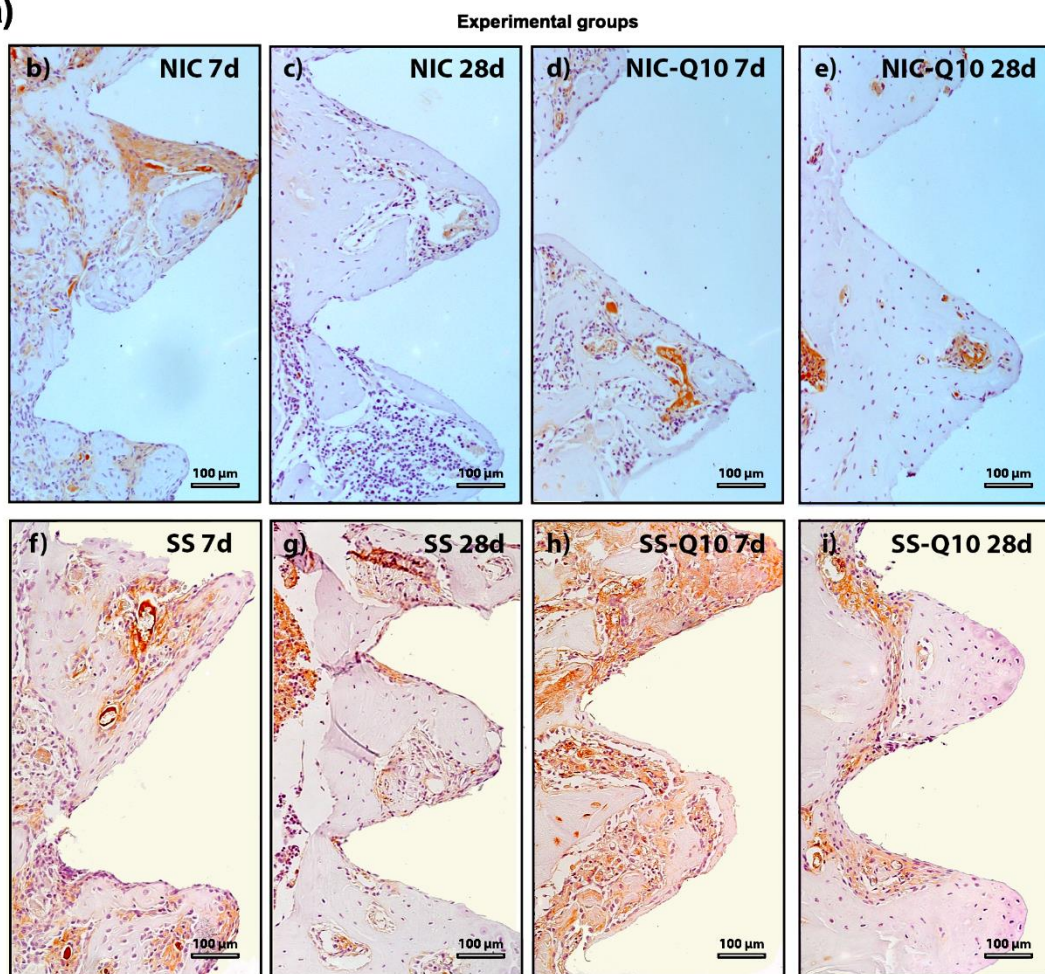
4.6 Análise imunohistoquímica dos tecidos periimplantares (BMP2)

Os resultados da análise de contagem de células imunorreativas a OCN estão apresentados na Figura 5A. Na análise intergrupo quando comparado ao grupo SS ($73,67 \pm 3,58$; $72,2 \pm 6,10$), o grupo SS-Q10 ($119,86 \pm 23,36$; $67,46 \pm 6,65$) apresentou maior número de células BMP2-positivas nos períodos de 7 e 28 dias. ($p \leq 0,05$). Na análise intragrupo, o grupo SS-Q10 ($119,86 \pm 23,36$) e NIC ($114,54 \pm 9,88$) quando comparados ao grupo SS ($73,67 \pm 3,58$) aos 7 dias. Aos 28 dias, o número de células BMP2 foi menor no grupo NIC ($21,92 \pm 8,07$) quando comparado ao SS ($72,2 \pm 6,10$) no mesmo período. Não houveram diferenças estatística no número de células BMP2-positivas nos demais grupos e períodos. ($p \leq 0,05$).

Figura 5. Padrão de Imunomarcção (BMP2) nos tecidos periimplantares.



(a)



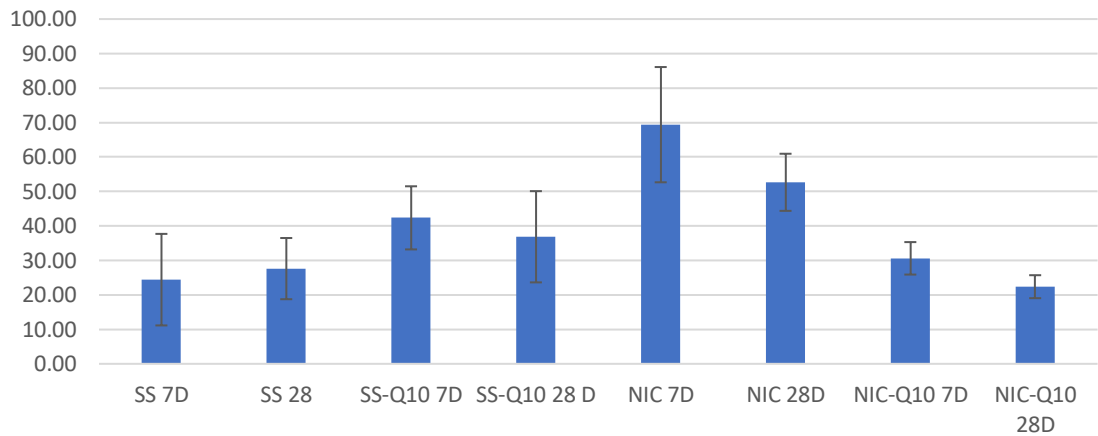
Padrão de imunomarcção de BMP2 nos tecidos periimplantares para cada grupo experimental. a) Médias e Desvios Padrão ($M \pm DP$) da contagem de células BMP2 positivas na região periimplantar para cada grupo e período. Teste estatístico: Kruskal-Wallis e Dunn (b-i). Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para BMP2 nos tecidos periimplantares nos grupos NIC 7d (b), NIC 28d (c), NIC-Q10 7d (d), NIC-Q10 28d (e), SS 7d (f), SS 28d (g), SS-Q10 7d (h) e SS-Q10 28d (i). Coloração: Hematoxilina de Harris. Barras de escala: b,c,d,e, f, g, h: 100 µm.

4.7 Análise imunohistoquímica dos tecidos periimplantares (TRAP)

Os resultados da análise de contagem de células imunorreativas a TRAP estão apresentados na Figura 6A. Na análise intergrupo quando comparado ao grupo SS ($24,41 \pm 13,28$; $27,61 \pm 8,88$), o grupo SS-Q10 ($42,34 \pm 9,15$; $36,86 \pm 13,23$) apresentou menor número de células TRAP-positivas nos períodos de 7 e 28 dias. ($p \leq 0,05$). Na análise intragrupo, o grupo NIC apresentou diferença estatística no número de células TRAP-positivas em ambos os períodos ($p \leq 0,05$).

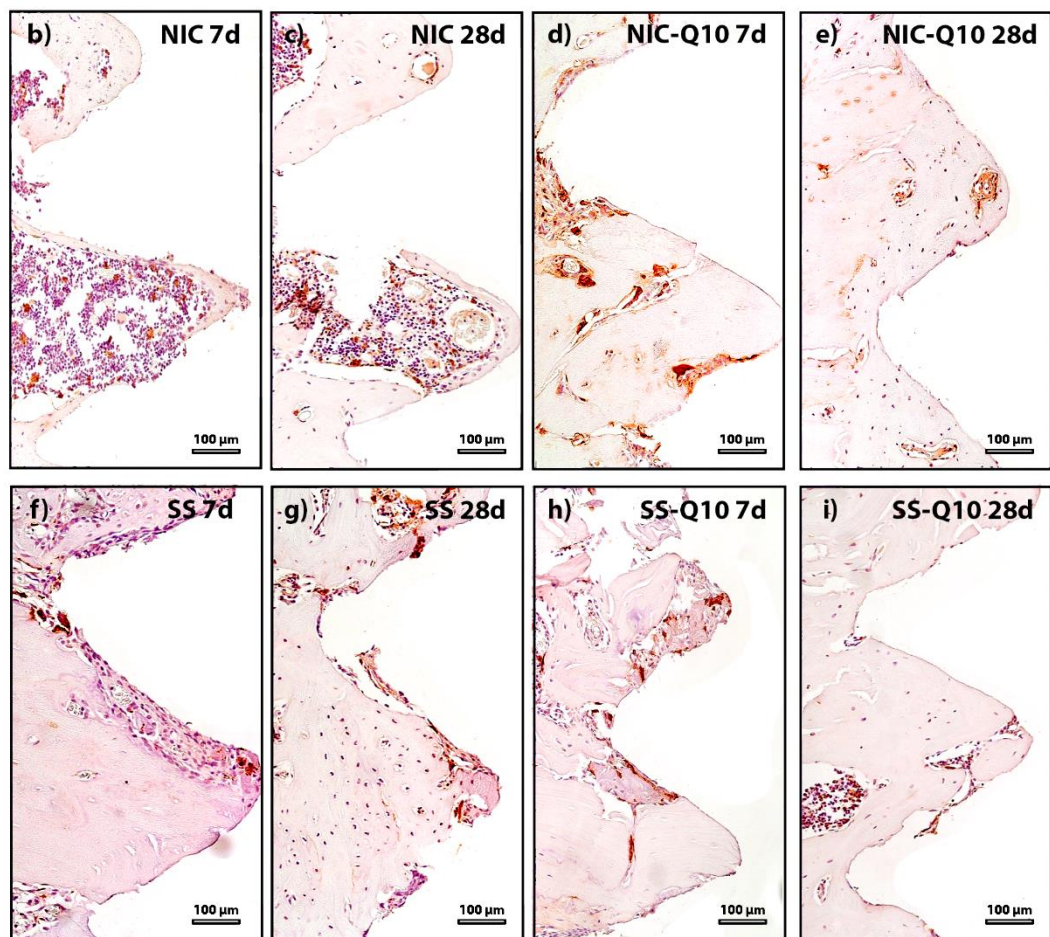
Figura 6. Padrão de Imunomarcção (TRAP) nos tecidos periimplantares.

Análise imunohistoquímica dos tecidos periimplantares (TRAP)



(a)

Experimental groups



Padrão de imunomarcção de TRAP nos tecidos periimplantares para cada grupo experimental. a) Médias e Desvios Padrão ($M \pm DP$) da contagem de células TRAP positivas na região periimplantar para cada grupo e período. Teste estatístico: Kruskal-Wallis e Dunn (b-i). Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para TRAP nos tecidos periimplantares nos grupos NIC 7d (b), NIC 28d (c), NIC-Q10 7d (d), NIC-Q10 28d (e), SS 7d (f), SS 28d (g), SS-Q10 7d (h) e SS-Q10 28d (i). Coloração: Hematoxilina de Harris. Barras de escala: b, c, d, e, f, g, h: 100 μ m.

5 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da Coenzima Q10 na remodelação óssea periimplantar associado à modificação ou não pela nicotina. Nós refutamos a hipótese nula, tendo em vista que a utilização de implantes de titânio osseointegráveis ainda são a melhor opção de reabilitações dentárias, mesmo que, alguns fatores sistêmicos e locais possam gerar falhas e prejudicar a osseointegração e a remodelação óssea. (Cury, Sendyk, & Sallum 2003).⁶⁰

Figuro et. al., 2006 (Figuro, Soory, Cerero, & Bascones 2006)⁴⁸ realizaram estudos *in vitro* avaliando as interações entre a CoQ10 e a nicotina em células fibroblásticas e osteoblásticas, onde os valores controles foram restaurados quando incubadas com CoQ10, e as células formadoras de tecido ósseo foram as mais influenciadas pela ação antioxidante.

Nosso estudo se caracteriza como primeiro na literatura *in vivo* utilizando modelos animais, avaliando a osseointegração de implantes em tíbias em ratos modificados sistemicamente ou não pela nicotina e suplementados com a CoQ10.

Aibrektsson (Papaspriidakos, Chen, Singh, Weber & Gallucci 2012)⁶¹ apresentaram dados sobre fatores que influenciam na osseointegração dos implantes. Durante a osseointegração, as causas mais frequentes para falhas de implantes dentários incluem qualidade e quantidade inadequadas de osso e tecido mole, doenças que afetam a cicatrização óssea e hábitos nocivos, como o exemplo o tabagismo; além de técnicas protéticas e trabalhos irregulares (Levin & Schwartz-Arad 2005).⁶²

Nos dias de hoje, o tabagismo é considerado um hábito comum. A nível da cavidade oral, o efeito do tabaco é exercido sobre a microcirculação, produzindo uma redução da irrigação e, conseqüentemente, sobre a nutrição gengival e óssea (Cunha, Jorge, Sousa, Glauce Viana & Vasconcelos)⁶³ Estes fatores elevam o risco de desenvolvimento ou agravamento da lesão periodontal, assim como podem influenciar na osseointegração de implantes dentários. (Balaji 2008; Sham, Cheung, Jin & Corbet; Caetano-Lopes, Canhao & Fonseca; Datta, WF, Walker, Tuck & Varanasi 2008).⁶⁴⁻⁶⁷

A nicotina é conhecida por interferir no comportamento normal das células ósseas, o qual é indispensável para o metabolismo ósseo. Segundo (Henemyre, Scales, Hokett, Cuenin, Peacock & Parker 2003)⁶⁸, em um estudo com células da medula óssea suína, o aumento da concentração de nicotina promove um aumento do número de células multinucleadas (osteoclastos).

Durante a queima das substâncias presentes no cigarro ocorre a liberação de produtos que afetam funções celulares, relacionadas com ribossomos mitocôndrias, gerando ERO (espécies reativas de oxigênio) e ERN (espécies reativas de nitrogênio), as quais causam déficit de enzimas antioxidantes, promovendo, estresse oxidativo e danos celulares (Balatsouka, Gotfredsen, Lindh & Berglundh. 2005).⁷¹

Pereira et al. (Pereira, Carvalho, Peres, & Fernandes 2010)³⁴ realizou um trabalho com o objetivo de analisar o efeito da nicotina na proliferação e atividade funcional das células osteoblásticas na superfície de implantes de titânio, e foi constatado que estas são afetadas pela contínua exposição à nicotina. Os resultados obtidos através deste estudo levaram os autores a concluir que existe a possibilidade de uma modulação direta da atividade osteoblástica, sendo considerada um fator que contribui para o efeito total da nicotina no microambiente de osso ao redor dos implantes dentários (Datta Ng Walker, Tuck & Varanasi 2008).⁶⁸ Foi possível observar no atual estudo menor número de células TRAP- positivas nos grupos SS-Q10 e NIC-Q10, indicando a diminuição da atividade osteoclástica e sugerindo a reversão de características comuns em pacientes tabagistas, como o aumento da reabsorção e diminuição do volume ósseo (Tanaka, Tanabe, Kawato, Nakai, Kariya, Matsumoto, Zhao, Motohashi & Maeno 2013)³⁵, reequilibrando a formação óssea com a reabsorção, característica que afeta diretamente a osseointegração dos implantes de titânio.

(Akel & Mohammad 2019)⁶⁹ demonstram que uma concentração baixa de nicotina leva a um aumento da proliferação de osteoblastos e da expressão de genes importantes para o metabolismo ósseo, enquanto concentrações elevadas originavam efeitos contrários. Verificou-se que o tabaco contribui para um aumento da mobilidade dentária e consequente perda, com uma incidência de 1,53 vezes mais frequente em pacientes fumantes, do que em não fumantes. (Pickworth, Rosenberry, Gold & Koszowski 2014)⁷⁰ demonstrou uma taxa de insucesso de 16,6% em fumantes, comparando à uma taxa de insucesso de 6,9% em não fumantes, num estudo realizado recorrendo a 56 pacientes e utilizando 187 implantes num período de tempo de 4 anos. Quando incubada a coenzima Q10, aumenta o número de fibroblastos e osteoblastos⁴⁸, o que favorece a formação e remodelação óssea. Quando observadas as características histológicas podemos analisar um padrão similar entre ambos os grupos e detecção de diferenças entre o número de células OCN e BMP2-positivas, de acordo com nossos achados sob a influência da nicotina e da influência da Coenzima Q10; o grupo SS-Q10 apresentou resultados similares de Contato Osso/Implante e de área de formação óssea quando comparado ao grupo NIC-Q10.

A partir da fundamentação de que os casos de pacientes fumantes com perdas dentárias são crescentes e corriqueiros na prática clínica odontológica, visando reduzir algumas das falhas nestes procedimentos com uma terapia coadjuvante, é de extrema importância a avaliação da osseointegração nessas condições. Modelos animais tem sido utilizados para estudos há aproximadamente três décadas e se mostram fontes confiáveis para análise das alterações ósseas, demonstrando padrão semelhante à de humanos (Fagundes & Taha 2004).⁷⁴

Apesar do contato osso/implante ser considerado pela literatura o padrão de avaliação de sucesso da instalação de implantes, outras características devem ser levadas em consideração. Condições sistêmicas que afetam o metabolismo ósseo nem sempre se refletem na diminuição do BIC, mas podem afetar a área de tecido ósseo neoformado entre as roscas do implante, sendo esse um fator que se mostra importante quando avaliamos o implante em função. A maior quantidade de tecido ósseo está diretamente relacionada com a capacidade de dissipação de forças e, indiretamente, relacionada com a criação de pontos de estresse entre o implante e o osso. Quando comparamos os grupos, os suplementados com a CoQ10, SS-Q10 e NIC-Q10, apresentaram diferenças estatisticamente significantes de PTON em ambos os períodos.

Extrapolando esses resultados para humanos, de acordo com nosso estudo pré-clínico, podemos concluir que o tratamento com a Coenzima Q10 apresenta uma influência positiva na remodelação óssea periimplantar, revertendo total ou parcialmente os efeitos da nicotina, assim podendo apresentar melhora na taxa de sucesso e a longevidade de implantes de titânio, entretanto, outros estudos em modelos animais, e posteriormente, em humanos são necessários para confirmar esses resultados.

6 CONCLUSÃO

Diante das limitações do presente estudo, pode-se concluir que a Coenzima Q10 exerceu uma influência positiva na remodelação óssea periimplantar em implantes de titânio osseointegrados.

REFERÊNCIAS

1. . Cattoni, F., Tetè, G.,Uccioli, R., Manazza, F.,Gastaldi,G., & Perani,D. (2020). An fMRI study on self-perception of patients after aesthetic implant-prosthetic rehabilitation. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*, 588. doi: 10.3390/ijerph17020588
2. Bellia, E., Audenino, G., Ceruti, P., & Bassi, F. (2020). Clinical assessment of short implants retaining removable partial dentures: 4-year follow-up. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, *35*, 207–213. doi: 10.11607/jomi.7239
3. Hosseini, M., Worsaae, N., & Gotfredsen, K. (2019). Tissue changes at implant sites in the anterior maxilla with and without connective tissue grafting: a five-year prospective study. *Clinical Oral Implants Research*. *31*, 18–28. doi: 10.1111/clr.13540
4. Hasanoglu Erbasar, G. N., Hocoğlu, T. P., & Erbasar, R. C. (2019). Risk factors associated with short dental implant success: along-term retrospective evaluation of patients followed up for up to 9 years. *Brazilian Oral Research*, *Brazilian Oral Research*, *33*, e030. doi: 10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0030
5. Rismanchian, M., Bajoghli, F., Mostajeran, Z., Fazel, A., & Eshkevari, P. (2009). Effect of implants on maximum bite force in edentulous patients. *The Journal of Oral Implantology*, *35*, 196–200. doi: 10.1563/1548-1336-35.4.196
6. Howe, M. S., Keys, W., & Richards, D. (2019). Long-term (10-year) dental implant survival: A systematic review and sensitivity meta-analysis. *Journal of Dentistry*, *84*, 9–21. doi: 10.1016/j.jdent.2019.03.008
7. Franchi, M., Bacchelli, B., Martini, D., Pasquale, V. D., Orsini, E., Ottani, V., Fini, M., Giavaresi, G., Giardino, R., & Ruggeri, A. (2004). Early detachment of titanium particles from various different surfaces of endosseous dental implants. *Biomaterials*, *25*, 2239–2246. doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.017
8. Brink, J., Meraw, S. J., & Sarment, D. P. (2007). Influence of implant diameter on surrounding bone. *Clinical Oral Implants Research*, *18*, 563–568. doi: 10.1111/j.1600-0501.2007.01283.x

9. Siqueira, J. T., Cavalher-Machado, S. C., Arana-Chavez, V. E., & Sannomiya, P. (2003). Bone formation around titanium implants in the rat tibia: role of insulin. *Implant Dentistry*, *12*, 242–251. doi: 10.1097/01.id.00000744440.04609.4f
10. Keller, M., & Steiger, R. (2004). The pi plate: an implant for unstable extension fractures of the distal radius in patients with osteoporotic bone. *Techniques in Hand & Upper Extremity Surgery*, *8*, 212–218. doi: 10.1097/00130911-200412000-00003
11. Duarte, P. M., Nogueira Filho, G. R., Sallum, E. A., de Toledo, S., Sallum, A. W., & Nociti Júnior, F. H. (2001). The effect of an immunosuppressive therapy and its withdrawal on bone healing around titanium implants: a histometric study in rabbits. *Journal of Periodontology*, *72*, 1391–1397. doi: 10.1902/jop.2001.72.10.1391
12. Sakakura, C. E., Marcantonio, E., Jr, Wenzel, A., & Scaf, G. (2007). Influence of cyclosporin A on quality of bone around integrated dental implants: a radiographic study in rabbits. *Clinical Oral Implants Research*, *18*, 34–39. doi: 10.1111/j.1600-0501.2006.01253.x
13. Fujimoto, T., Niimi, A., Sawai, T., & Ueda, M. (1998). Effects of steroid-induced osteoporosis on osseointegration of titanium implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, *13*, 183–189.
14. 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. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02088.x
15. Nack, C., Raguse, J. D., Stricker, A., Nelson, K., & Nahles, S. (2015). Rehabilitation of irradiated patients with chemically modified and conventional SLA implants: five-year follow-up. *Journal of Oral Rehabilitation*, *42*, 57–64. doi: 10.1111/joor.12231
16. Al-Mahalawy, H., Marei, H. F., Abuohashish, H., Alhawaj, H., Alrefaee, M., & Al-Jandan, B. (2016). Effects of cisplatin chemotherapy on the osseointegration of titanium implants. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, *44*, 337–346. doi: 10.1016/j.jcms.2016.01.012
17. Tang, J., Chen, L., Yan, D., Shen, Z., Wang, B., Weng, S., Wu, Z., Xie, Z., Shao, J., Yang, L., & Shen, L. (2020). Surface functionalization with proanthocyanidins provides an anti-oxidant defense mechanism that improves the long-term stability and

- osteogenesis of titanium implants. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 1643–1659. doi: 10.2147/IJN.S231339
18. Javed, F., Rahman, I., & Romanos, G. E. (2019). Tobacco-product usage as a risk factor for dental implants. *Periodontology 2000*, 81, 48–56. doi: 10.1111/prd.12282
 19. Hameister, R., Kaur, C., Dheen, S. T., Lohmann, C. H., & Singh, G. (2020). Reactive oxygen/nitrogen species (ROS/RNS) and oxidative stress in arthroplasty. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 108, 2073–2087. doi: 10.1002/jbm.b.34546
 20. Benowitz N. L. (2008). Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 83, 531–541. doi: 10.1038/clpt.2008.3
 21. Mosely, L. H., & Finseth, F. (1977). Cigarette smoking: impairment of digital blood flow and wound healing in the hand. *The Hand*, 9, 97–101. doi: 10.1016/s0072-968x(77)80001-6.
 22. Skinovsky, J., Malafaia, O., Chibata, M., Tsumanuma, F., Panegalli, F., Filho, & Martins, M. V. (2016). The influence of nicotine in healing of small bowel anastomoses in rats: angiogenesis and miofibroblasts. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, 43, 87–92. doi: 10.1590/0100-69912016002004
 23. Yin, L., Morita, A., & Tsuji, T. (2003). Tobacco smoke extract induces age-related changes due to modulation of TGF-beta. *Experimental Dermatology*, 12, 51–56. doi: 10.1034/j.1600-0625.12.s2.8.x
 24. 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. doi: 10.1016/j.surg.2010.02.005
 25. 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. doi: 10.1097/SLA.0b013e31824f632d

26. 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. doi: 10.1902/jop.2003.74.10.1454
27. Fang, J., & Hall, B. K. (1997). Chondrogenic cell differentiation from membrane bone periosteal. *Anatomy and Embryology*, *196*, 349–362. doi: 10.1007/s004290050104
28. 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. doi: 10.1016/j.bone.2010.12.007
29. 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. doi: 10.1210/edrv.20.3.0367
30. 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. doi: 10.1073/pnas.95.7.3597
31. 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. doi: 10.1084/jem.188.5.997
32. 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. doi: 10.1097/00007632-200010150-00008
33. Walker, L. M., Preston, M. R., Magnay, J. L., Thomas, P. B., & El Haj, A. J. (2001). Nicotinic regulation of c-fos and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. *Bone*, *28*, 603–608. doi: 10.1016/s8756-3282(01)00427-6

34. 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. doi: 10.1111/j.1745-7270.2006.00240.x
35. 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.
36. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0059402
37. Moraschini, V., & Barboza, E. D. (2016). Success of dental implants in smokers and non-smokers: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 45, 205–215. doi: 10.1016/j.ijom.2015.08.996
38. 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. doi: 10.1902/jop.2007.060299
39. 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.
40. 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 and Maxillofacial Surgery*, 68, 2675-2681. doi: 10.1016/j.joms.2010.04.018
41. 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.

42. 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. doi: 10.1007/BF02390832
43. Berley, J., Yamano, S., & Sukotjo, C. (2010). The effect of systemic nicotine on osseointegration of titanium implants in the rat femur. *The Journal of Oral Implantology*, *36*, 185–193. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-09-00050
44. Yamano, S., Berley, J. A., Kuo, W. P., Gallucci, G. O., Weber, H. P., & Sukotjo, C. (2010). Effects of nicotine on gene expression and osseointegration in rats. *Clinical Oral Implants Research*, *21*, 1353–1359. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.01955.x
45. Rivera-Hidalgo F. (2003). Smoking and periodontal disease. *Periodontology 2000*, *32*, 50–58. doi: 10.1046/j.0906-6713.2003.03205.x
46. 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. doi: 10.1016/s0022-3913(96)90435-7
47. 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. doi: 10.1177/154405910208100814
48. Figuero, E., Soory, M., Cerero, R., & Bascones, A. (2006). Oxidant/antioxidant interactions of nicotine, Coenzyme Q10, Pycnogenol and phytoestrogens in oral periosteal fibroblasts and MG63 osteoblasts. *Steroids*, *71*, 1062–1072. doi: 10.1016/j.steroids.2006.09.003
49. Dommisch, H., Kuzmanova, D., Jönsson, D., Grant, M., & Chapple, I. (2018). Effect of micronutrient malnutrition on periodontal disease and periodontal therapy. *Periodontology 2000*, *78*, 129–153. doi: 10.1111/prd.12233
50. Manthena, S., Rao, M. V., Penubolu, L. P., Putcha, M., & Harsha, A. V. (2015). Effectiveness of CoQ10 oral supplements as an adjunct to scaling and root planing in improving periodontal health. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *9*, ZC26–ZC28. doi: 10.7860/JCDR/2015/13486.6291

51. Shukla, S., & Dubey, K. K. (2018). CoQ10 a super-vitamin: review on application and biosynthesis. *3 Biotech*, 8, 249. doi: 10.1007/s13205-018-1271-6
52. Varela-Lopez, A., Bullon, P., Battino, M., Ramirez-Tortosa, M. C., Ochoa, J. J., Cordero, M. D., Ramirez-Tortosa, C. L., Rubini, C., Zizzi, A., & Quiles, J. L. (2016). Coenzyme Q protects against age-related alveolar bone loss associated to n-6 polyunsaturated fatty acid rich-diets by modulating mitochondrial mechanisms. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 71, 593–600. doi: 10.1093/gerona/glv063
53. Prakash, S., Sunitha, J., & Hans, M. (2010). Role of coenzyme Q10 as an antioxidant and bioenergizer in periodontal diseases. *Indian Journal of Pharmacology*, 42, 334-337. doi: 10.4103/0253-7613.71884
54. Raut, C. P., Sethi, K. S., Kohale, B., Mamajiwala, A., & Warang, A. (2018). Subgingivally delivered coenzyme Q10 in the treatment of chronic periodontitis among smokers: a randomized, controlled clinical study. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 9, 204-208. doi: 10.1016/j.jobcr.2018.05.005
55. Naseri, R., Yaghini, J., & Feizi, A. (2020). Levels of smoking and dental implants failure: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 47, 518–528. doi: 10.1111/jcpe.13257
56. Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, 8, e1000412. doi: 10.1371/journal.pbio.1000412
57. Gusman, D., Mello-Neto, J. M., Alves, B., Matheus, H. R., Ervolino, E., Theodoro, L. H., & de Almeida, J. M. (2018). Periodontal disease severity in subjects with dementia: a systematic review and meta-analysis. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 76, 147–159. doi: 10.1016/j.archger.2018.02.016
58. 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. doi: 10.1111/j.1600-0773.1994.tb00316.x
59. Caton JG., Armitage G., Berglundh T., Chapple ILC., Jepsen S., Kornman KS., Mealey BL., Papapanou PN., Sanz M., & Tonetti MS. (2018) A new classification scheme for

- periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol*.1, 1-8. doi:10.1002/JPER.18-0157.
60. Ye, L., Mishina, Y., Chen, D., Huang, H., Dallas, S. L., Dallas, M. R., Sivakumar, P., Kunieda, T., Tsutsui, T. W., Boskey, A., Bonewald, L. F., & Feng, J. Q. (2005). Dmp1-deficient mice display severe defects in cartilage formation responsible for a chondrodysplasia-like phenotype. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 6197–6203. doi: 10.1074/jbc.M412911200
61. Cury, Patricia Ramos; Sendyk, Wilson Roberto; Sallum, Antonio Wilson. *Rev. bras. odontol* ; 60(3): 192-195, maio-jun. 2003. [The etiology of osseointegrated implant failure](#)
62. Papaspyridakos P, Chen CJ, Singh M, Weber HP, Gallucci GO. Success criteria in implant dentistry: a systematic review. *J Dent Res*. 2012 Mar;91(3):242-8. doi: 10.1177/0022034511431252. Epub 2011 Dec 8. PMID: 22157097.
63. Levin L, Schwartz-Arad D. The effect of cigarette smoking on dental implants and related surgery. *Implant Dent*. 2005 Dec;14(4):357-6.
64. Gilmara Holanda da Cunha, Antonio Rafael Coelho Jorge, Marta Maria F. Fonteles, Francisca Cléa F. Sousa, Glauce Socorro B. Viana, Vasconcelos SMM. Nicotina e tabagismo. *Revista Eletrônica Pesquisa Médica*. 2007 Outubro - Dezembro:1-10.
65. Balaji SM. Tobacco smoking and surgical healing of oral tissues: a review. *Indian J Dent Res*. [Review]. 2008 Oct-Dec;19(4):344-8.
66. Sham AS, Cheung LK, Jin LJ, Corbet EF. The effects of tobacco use on oral health. *Hong Kong Med J*. [Review]. 2003 Aug;9(4):271-7
67. Caetano-Lopes J, Canhao H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port*. [Review]. 2007 Apr-Jun;32(2):103-10.

68. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*. [Review]. 2008 May;61(5):577-87
69. Henemyre CL, Scales DK, Hokett SD, Cuenin MF, Peacock ME, Parker MH, et al. Nicotine stimulates osteoclast resorption in a porcine marrow cell model. *J Periodontol*. 2003 Oct;74(10):1440-6
70. Akel, Mohammad S., "Dental Implant Failure Rate and Marginal Bone Loss in Smokers Compared to Non-Smokers: A Systematic Review and Meta-Analysis" (2019).
71. Pickworth WB, Rosenberry ZR, Gold W, Koszowski B (2014) Nicotine Absorption from Smokeless Tobacco Modified to Adjust pH. *J Addict Res Ther* 5:184. doi:10.4172/2155-6105.1000184
72. Balatsouka D, Gotfredsen K, Lindh CH, Berglundh T. The impact of nicotine on osseointegration. An experimental study in the femur and tibia of rabbits. *Clin Oral Implants Res*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Aug;16(4):389-95
73. Robert Alan Bonakdar, M.D., And Erminia Guarneri, M.D. Coenzyme Q10. September 15, 2005; Volume 72, Number
74. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente *Acta Cirúrgica Brasileira* - Vol 19 (1) 2004.

ANEXOS

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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

Araçatuba, 12 de maio de 2020.

Prezada Professora,

CÓPIA

Vimos, pelo presente, encaminhar a Vossa Senhoria o Projeto de Pesquisa intitulado "Avaliação da influência da Coenzima Q10 sobre o processo de reparo peri-implantar de implantes instalados em tíbias de ratos expostos ou não à nicotina", para avaliação dessa Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.

Sem mais para o momento, despedimo-nos cordialmente.

Atenciosamente,


Pesquisador(a) Responsável
Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida
Departamento de Diagnóstico e cirurgia
Disciplina de Periodontia

UNESP ARAÇATUBA - 2.020.05005 FOR
13 Mai 2020 11:54 02:00 2/2

Ilma. Sra.
Profa. Titular Maria Cristina Rosfini Alves Rezende,
MD Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Nesta

